مطالعه فیتوشیمیایی و گرده‌شناسی تعدادی از گونه‌های جنس *Mentha* L. در شمال ایران

یاسمن یحیی‌آبادی، آرمان محمودی اطاقوری و احسان نظیفی*

ایران، مازندران، دانشگاه مازندران، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۸/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۱۵

چکیده

جنس نعنا (*Mentha* L.) از مهمترین و پرمصرف‌ترین گیاهان خانواده Lamiaceae در صنایع غذایی و دارویی می‌باشد. طبقه‌بندی تاکسونومیکی این جنس به دلیل تنوع زیاد در خصوصیات ریخت‌شناسی و هیبریداسیون مکرر، پیچیده می‌باشد. مطالعات فیتوشیمیایی و گرده‌شناسی به همراه ویژگی‌های ریخت‌شناسی می‌تواند کمک شایانی به سیستماتیک گیاهی و طبقه‌بندی آنها کند. در این پژوهش، متابولیت‌های گیاهی جمعیت‌های گونه‌های *M. aquatica*، *M. pulegium* و *M. longifolia* در استان‌های گیلان، مازندران و گلستان، با روش‌های کروماتوگرافی گازی-طیف سنجی جرمی و اسپکتروفوتومتری، و ریخت‌شناسی دانه گرده آنها با میکروسکوپ الکترونی نگاره بررسی شد. نتایج نشان داد که در گونه *M. aquatica*، بتا-کاریوفیلن و ژرماکرن-دی، در گونه *M. pulegium*، پولگون و منتون، در گونه *M. longifolia*، دی-کارون و پیپریتنون اکساید، عمده‌ترین ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس بودند. همچنین، میزان فنل، فلاونوئید، فلاونول، ساپونین، کاروتنوئید کل و میزان کلروفیل a و b دارای تفاوت معنی‌داری در بین گونه‌ها بوده و گونه *M. aquatica* بیشترین میزان از این متابولیت‌های ثانویه را نشان داد. دانه‌های گرده در جمعیت‌های مختلف این گونه‌ها به‌صورت منفرد، اغلب کروی کشیده، ۶ شیاری، با تزئینات سطح اگزین شبکه‌ای بودند. طول قطبی (P)، عرض استوایی (E)، نسبت P به E، عرض شیار و فاصله دو شیار دانه‌های گرده در این گونه‌ها تفاوت معنی‌داری داشته و گونه‌های *M. aquatica* و *M. pulegium* به ترتیب بیشترین و کمترین مقادیر را نشان دادند. نتایج اشاره دارد به این‌که متابولیت‌های ثانویه و ریخت‌شناسی دانه گرده می‌تواند در شناسایی و تاکسونومی این گونه‌ها مؤثر بوده و به رده‌بندی آنها کمک نماید.

واژه‌های کلیدی: گرده‌شناسی، تاکسونومی، فیتوشیمی، *Mentha*

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۱۱۳۵۳۰۲۴۵۰ و ۰۹۱۱۲۲۸۹۴۵۹، پست الکترونیکی: e.nazifi@umz.ac.ir

مقدمه

جنس نعنا بانام علمی *Mentha* L. یکی از مهمترین و پرمصرف‌ترین گیاهان خانواده نعنائیان (Lamiaceae) است. از این جنس ۶ گونه در فلور گیاهی ایران ذکر شده که اغلب از گیاهان دارویی حائز اهمیت در متون طب سنتی می‌باشند. از برگ‌ها، پیکر رویشی و اسانس حاصل از گونه‌های این جنس به‌عنوان ماده دارویی استفاده می‌شود. این جنس دارای گیاهان علفی چندساله معطر، با ریزوم‌های خزنده و با ساقه‌های راست یا خیزان، ساده یا منشعب می‌باشد. برگ‌ها دمبرگ‌دار یا بدون دمبرگ بوده و در حاشیه کم‌وبیش صاف یا دندانه‌دار می‌باشند. برگه‌ها اغلب نامشخص و گل‌ها به تعداد زیاد در چرخه‌های دور از هم و یا نزدیک به هم و گل‌آذین سنبله مانند می‌باشد (۱، ۳، ۶و ۴۶).

پونه آبی یا نعنای جویباری بانام علمی *Mentha aquatica* L. یکی از گونه‌های این جنس است که در دنیا در اروپا، ترکیه و منطقه قفقاز پراکنده می‌باشد و در ایران نیز در منطقه آذربایجان رویش داشته و در مناطق جلگه‌ای یا جنگلی شمال ایران شامل استان‌های گیلان، مازندران و

گلستان گسترش فراوانی دارد و اغلب در کنار جویبارها و مناطق مرطوب و سایه‌دار مشاهده می‌شود. پونه آبی گیاهی علفی چندساله با ساقه‌های ایستاده به ارتفاع ۲۰ تا ۹۰ سانتی‌متر، پوشیده از کرک‌های ساده، برگ‌ها دمبرگدار، با حاشیه دندانه اره‌ای تا دندانه‌ای نامشخص، پوشیده از کرک‌های ساده در محل رگبرگ‌ها و در سایر قسمت‌ها تقریباً بدون کرک می‌باشد. دارای گل‌آذین کپه‌ای بوده و زمان گلدهی از تابستان تا پاییز می‌باشد (۳و ۵۸).

پونه معطر یا خالواش بانام علمی *Mentha pulegium* L. از گونه‌های دیگر جنس نعنا با پراکنش وسیعی در اروپا، منطقه قفقاز، آسیای میانه، مناطقی از جنوب غربی آسیا و شمال افریقا می‌باشد. در ایران نیز در دامنه‌های شمالی البرز و در شمال شرق و برخی نقاط دیگر انتشار دارد و از گیاهان بومی استان‌های شمالی گیلان، مازندران و گلستان می‌باشد. پونه معطر گیاهی است علفی که به شکل بوته‌های کوتاهی روی زمین اطراف جریان آب می‌روید و ساقه مستقیم آن تا ۳۰ سانتیمتر نیز رشد می‌کند. برگ‌های آن بیضی‌شکل و نوک‌تیز بوده و بیشتر آنها دارای دندانه‌های کوچک و منظم می‌باشند. ساقه‌ی شاخه‌دار و چهاربر آن دارای برگ‌های تخم‌مرغی شکل بوده که با کرک‌های کم‌پشتی پوشیده شده‌اند و به رنگ سبز مایل به خاکستری می‌باشند. در اواخر تابستان، گل‌های دو لبه‌ای آبی‌رنگ مایل به بنفش در محور برگ‌ها شکوفه می‌شوند (۳، ۶ و ۵۸).

پونه وحشی یا نعنای اسبی بانام علمی *Mentha longifolia* L. از دیگر گونه‌های جنس نعنا با پراکنش وسیع در اروپا، آسیا و افریقا می‌باشد و در اکثر نقاط ایران نیز گزارش شده است. پونه وحشی گیاهی علفی پایا و دارای ساقه‌ای با ظاهری تقریباً استوانه‌ای به ارتفاع ۴۰-۱۲۰ سانتیمتر است و به حالت خودرو در دشت‌های مرطوب و حاشیه آب‌ها حتی داخل آب می‌روید. برگ‌های این‌گونه ازنظر اندازه، شکل و پوشش کرکی بسیار متنوع بوده و تماماً بدون دمبرگ و یا برگ‌های پایینی ساقه دارای دمبرگ‌های کوتاه می‌باشد (۳و ۵۸).

هدف اولیه از ایجاد یک سیستم طبقه‌بندی، جمع‌آوری اطلاعاتی دقیق درباره گیاهان می‌باشد. این پیشرفت در قرن هجدهم با فعالیت‌های لینه بر پایه خصوصیات ریخت‌شناسی آغاز گردید و بعدها با عنوان سیستم طبقه‌بندی کلاسیک نامگذاری شد. امروزه رویکردهای تجربی جدید، جنبه‌های بیشتری از زیست‌شناسی را جهت مطالعات سیستماتیکی و طبقه‌بندی با عنوان علم بیوسیستماتیک شامل علومی چون آناتومی، گرده‌شناسی، مورفومتری، سیتولوژی، فیتوشیمی و ... را فراهم آورده است، که برای مطالعات مقایسه‌ای گونه‌های متفاوت یک جنس و یا خانواده در تعیین روابط تکاملی مورد استفاده قرار می‌گیرند. همچنین، داده‌های به دست آمده از این مطالعات می‌تواند در تفکیک و شناسایی گونه‌ها بسیار مؤثر باشد (۱۳، ۱۴، ۵۵، ۵۹ و ۶۱).

ویژگی‌های شیمیایی گیاهان می‌تواند همانند خصوصیات ریخت‌شناسی، به‌طور گسترده در طبقه‌بندی قابل‌استفاده باشد. همچنین اطلاعات مفیدی را برای درک روابط تکاملی تاکسون‌های گوناگون فراهم نموده و در حل بسیاری از مسائل تاکسونومی کمک کرده است. معروف‌ترین گروه‌های متابولیت‌های گیاهی که می‌توان در تاکسونومی استفاده نمود شامل آلکالوئیدها، فنولیک‌ها، گلوکزینولات‌ها، آمینواسیدها، ترپنوئیدها، روغن‌ها و واکس‌ها و کربوهیدرات‌ها می‌باشند (۵۹). اولین طبقه‌بندی شیمیایی توسط مک نیر در سال ۱۹۳۵ صورت گرفت که توزیع روغن‌های فرار، روغن‌های پایدار و آلکالوئیدها را در نهاندانگان بررسی نمود. در همان زمان اولین تجزیه‌وتحلیل تطبیقی گزارش شد که شامل بررسی روغن‌های فرار در تیره Myrtaceae بویژه اکالیپتوس بود (۵۶). مطالعات فیتوشیمیایی نه‌تنها تمایز مواد شیمیایی مختلف را در جنس‌های مختلف تأیید می‌کند، بلکه به

وجود تنوع مواد شیمیایی در گونه‌های مختلف نیز اشاره دارد (۶۶).

ازآنجایی‌که تشخیص نمونه گیاهی صرفاً از طریق ریخت‌شناسی بسیار مشکل است، مطالعه دانه گرده در گونه‌های گیاهی مختلف می‌تواند کمک شایانی به سیستماتیک گیاهی کند. دانه‌های گرده به دلیل ساختار شیمیایی خاص (حضور اسپوروپولنین) تحت تأثیر شرایط محیطی قرار نمی‌گیرند و بنابراین یکی از پارامترهای بسیار مؤثر در شناسایی و تشخیص گونه‌ها بوده و می‌تواند برای حل مشکلات تاکسونومیکی و تفکیک گونه‌ها، بسیار مؤثر واقع شود. ساختمان و تزئینات سطح دیواره دانه گرده دارای ارزش تشخیصی غالباً در حد جنس و گونه بوده و امکان بررسی ارتباط تکاملی موجود در بین جمعیت‌های گیاهی را فراهم می‌سازد (۱۴).

تحقیقات زیادی در رابطه با تنوع فیتوشیمیایی اجزای اسانس گونه‌های مختلف جنس نعنا در ایران و جهان صورت گرفته است (۵، ۱۱، ۱۲، ۱۶، ۲۷، ۴۸، ۶۰و ۶۲). اما نتایج به‌دست آمده کمتر در مطالعات تاکسونومی گونه‌های مختلف این جنس در ایران استفاده شده است، در حالیکه می‌تواند منبع اطلاعاتی مناسبی برای طبقه‌بندی آن باشد. از این‌رو در این پژوهش، جمعیت‌های مختلف گونه‌های *M. aquatica*، *M. pulegium* و *M. longifolia* در شمال ایران، ازنظر میزان و محتوای متابولیت‌های گیاهی موجود در اسانس و عصاره مورد بررسی قرارگرفته و مقایسه شدند. همچنین، از آنجایی که تابه‌حال گزارشی از مطالعه گرده‌شناسی در جنس *Mentha* در ایران ذکر نشده است، دانه‌های گرده جمعیت‌های مختلف گونه‌های ذکر شده ازلحاظ پارامترهای کمّی و کیفی مقایسه شدند.

مواد و روشها

جمع‌آوری نمونه‌های گیاهی: جمعیت‌هایی از جنس *Mentha* از استان‌های گیلان، مازندران و گلستان در تابستان ۱۳۹۶ و در زمان گلدهی جمع‌آوری شدند. با استفاده از کلیدهای رایج گیاه‌شناسی شامل فلور ایرانیکا و فلور ایران (۳و ۵۸)، ۲۹ جمعیت از گونه‌های *M. aquatica* ، *M. pulegium* و *M. longifolia* subsp. *longifolia* شناسایی شد و در مراحل آزمایشگاهی مورد استفاده قرارگرفت. مشخصات جغرافیایی جمعیت‌های جمع‌آوری شده به تفکیک گونه‌ها در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱- مختصات جغرافیایی جمعیت‌های جمع‌آوری شده گونه های جنس *Mentha*

نام گونه	کد جمعیت	طول جغرافیایی (E)	عرض جغرافیایی (N)	شهر	ارتفاع (متر)	استان
Mentha aquatica	A_1	۵۳° ۱۳′ ۲۳″	۳۶° ۱۰′ ۵۱″	دودانگه	۱۱۰۰	مازندران
	A_2	۵۱° ۵۹′ ۵۹″	۳۶° ۳۳′ ۲۷″	نور	-۱۲	
	A_3	۵۲° ۳۵′ ۲۰″	۳۶° ۳۹′ ۲۰″	بابلسر	-۱۱	
	A_4	۵۲° ۴۶′ ۰۸″	۳۶° ۳۹′ ۵۶″	بهنمیر	-۹	
	A_5	۵۲° ۴۸′ ۱۱″	۳۶° ۳۵′ ۳۵″	کیاکلا	-۷	
	A_6	۵۲° ۳۸′ ۲۶″	۳۶° ۱۰′ ۳۰″	بندپی	۹۶۰	
	A_7	۵۴° ۰۶′ ۴۲″	۳۶° ۴۵′ ۴۰″	کردکوی	۷۵	گلستان
	A_8	۵۴° ۴۳′ ۱۰″	۳۶° ۵۴′ ۰۵″	گرگان	۱۴۹	
	A_9	۴۸° ۴۰′ ۵۲″	۳۷° ۳۹′ ۲۴″	ناو	۱۶۴۰	گیلان
	A_{10}	۴۸° ۵۴′ ۵۱″	۳۷° ۴۷′ ۴۵″	هشتپر	۴۵	
	A_{11}	۴۹° ۰۲′ ۱۳″	۳۷° ۳۷′ ۴۲″	پره سر	۷	

	A_{12}	۴۸° ۵۴′ ۱۷″	۳۷° ۴۶′ ۴۲″	طولارود	۵۴	
Mentha pulegium	P_1	۵۰° ۳۸′ ۳۹″	۳۶° ۵۵′ ۴۲″	رامسر	۳	مازندران
	P_2	۵۱° ۵۹′ ۵۰″	۳۶° ۳۳′ ۵۰″	نور	-۱۲	
	P_3	۵۲° ۳۸′ ۱۰″	۳۶° ۱۰′ ۴۸″	بندپی	۹۸۰	
	P_4	۵۴° ۲۸′ ۲۷″	۳۶° ۴۵′ ۴۷″	نهارخوران	۶۲۳	گلستان
	P_5	۵۴° ۵۲′ ۴۴″	۳۶° ۵۵′ ۳۰″	علی آبادکتول	۱۳۳	
	P_6	۵۴° ۰۶′ ۴۲″	۳۶° ۴۵′ ۵۹″	کردکوی	۵۰	
	P_7	۴۹° ۰۲′ ۴۳″	۳۷° ۳۷′ ۲۶″	پره سر	۶	گیلان
	P_8	۴۸° ۵۴′ ۲۱″	۳۷° ۴۶′ ۴۰″	طولارود	۶۰	
	P_9	۴۹° ۰۶′ ۵۹″	۳۷° ۳۰′ ۱۵″	بندر انزلی	۸۷	
Mentha longifolia	L_1	۵۲° ۴۶′ ۳۶″	۳۶° ۳۹′ ۰۲″	بهنمیر	-۹	مازندران
	L_2	۵۲° ۴۹′ ۳۳″	۳۶° ۳۴′ ۵۴″	کیاکلا	-۷	
	L_3	۵۱° ۲۲′ ۵۴″	۳۶° ۳۹′ ۵۶″	چالوس	۰	
	L_4	۵۴° ۲۸′ ۱۷″	۳۶° ۴۶′ ۰۲″	نهارخوران	۵۴۷	گلستان
	L_5	۵۴° ۵۲′ ۵۶″	۳۶° ۵۴′ ۱۶″	علی آبادکتول	۱۵۵	
	L_6	۴۸° ۴۱′ ۱۲″	۳۷° ۳۸′ ۵۹″	ناو	۱۰۰۰	گیلان
	L_7	۴۸° ۵۶′ ۴۲″	۳۷° ۴۳′ ۲۶″	اسالم	۴۷	
	L_8	۴۹° ۰۷′ ۴۳″	۳۷° ۲۱′ ۱۸″	ماسال	۶۵	

مطالعات فیتوشیمیایی: در این بخش از روش کروماتوگرافی گازی – طیف‌سنجی جرمی (GC-MS) برای شناسایی ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس حاصل از اندام هوایی و از روش اسپکتروفتومتری برای بررسی میزان متابولیت‌های گیاهی موجود در برگ‌ها استفاده شد. جهت حفظ ساختار شیمیایی متابولیت‌های موجود، همه نمونه‌های جمع‌آوری شده به‌صورت یکسان، در شرایط تاریکی و در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد خشک و تا زمان استفاده در پاکت‌های مخصوص و در یخچال نگهداری شدند.

کروماتوگرافی گازی- طیف‌سنجی جرمی (GC-MS): یک جمعیت از هرگونه جهت تهیه اسانس انتخاب شد. در انتخاب نمونه‌ها دقت شد تا از جمعیت‌های دارای شرایط اکولوژیکی تقریباً یکسان استفاده شود. گونه‌های انتخاب شده شامل جمعیت A_{12} از گونه *M. aquatica* و جمعیت P_8 از گونه *M. pulegium* و جمعیت L_7 از گونه *M. longifolia* بود (جدول۱). اندام هوایی نمونه‌های خشک‌شده، توسط آسیاب برقی پودر شده و اسانس‌گیری با استفاده از دستگاه کلونجر و به روش تقطیر با آب انجام شد. به این منظور از ۱۰ گرم نمونه پودر شده به همراه ۳۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر استفاده شد. بعد از حدود ۳ ساعت عمل تقطیر با آب، اسانس حاصله جمع‌آوری و تا زمان آنالیز در یخچال نگهداری شد. شناسایی و آنالیز اسانس به‌وسیله دستگاه GC (Agilent 7890 A) –MS (Agilent 5975 C) انجام گرفت. نوع ستون DB5 و به طول ۶۰ متر و قطر داخلی ۰٫۲۵ میلی‌متر بود. برنامه‌ریزی حرارتی ستون از ۵۰ تا ۲۶۵ درجه سانتی‌گراد بود. ابتدا دمای ستون ۴ دقیقه در ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرارگرفت، سپس تا دمای ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۶ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه و در ادامه تا دمای ۲۶۵ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۴ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه افزایش یافت و درنهایت ۲۰ دقیقه در این دما باقی ماند. گاز حامل، هلیوم و سرعت

جریان آنیک میلی‌لیتر بر دقیقه و نوع تزریق Split بود. پتانسیل یونیزاسیون دستگاه Mass برابر با ۷۰ الکترون‌ولت و دمای اتاقک تزریق، منبع یونی و Quadrupole به ترتیب۲۷۰، ۲۳۰ و ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد بود. شناسایی ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس با بررسی طیف‌های جرمی و مسیر فراگمانتاسیون آنها و مقایسه با طیف‌های جرمی استاندارد در بانک اطلاعاتی موجود در دستگاه (Nist08 & Wiley7n) انجام گرفت (۱۵، ۱۸و ۲۹).

اسپکتروفتومتری: دراین روش برگ‌های خشک‌شده جمعیت‌های جمع‌آوری شده توسط آسیاب برقی پودر شدند. تعدادی از متابولیت‌های گیاهی شامل فنل، فلاونوئید، فلاونول، آنتوسیانین، ترپنوئید، رنگیزه‌های فتوسنتزی و برخی از کربوهیدرات‌های محلول با عصاره-گیری‌های ویژه هر دسته از متابولیت‌ها، استخراج و پس از آماده‌سازی با استفاده از دستگاه UV-VIS Spectrophotometer (SU 6100) سنجش شدند. تمام سنجش‌ها با ۳ تکرار انجام شد.

سنجش فنل، فلاونوئید و فلاونول کل: ابتدا ۰/۱ گرم از پودر برگ خشک در ۵ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد سائیده و سپس به مدت یک ساعت در دمای اتاق روی شیکر با سرعت ۱۰۰ دور بر دقیقه قرار داده شد. بعد از ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ با سرعت ۹۰۰۰ دور بر دقیقه، عصاره متانولی از رسوب جداسازی شد و برای سنجش فنل، فلاونوئید و فلاونول کل مورد استفاده قرار گرفت.

میزان فنل کل براساس روش رنگ‌سنجی Folin-ciocalteu اندازه‌گیری شد. در این روش به ۰/۲۵ میلی‌لیتر از عصاره متانولی ۸۰ درصد، ۱/۲۵ میلی‌لیتر معرف فولین ۱۰ درصد و ۱ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۷/۵ درصد اضافه شد. بعد از ۳۰ دقیقه توقف در تاریکی، جذب هر نمونه در طول‌موج ۷۶۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. از غلظت‌های مختلف گالیک اسید جهت رسم نمودار استاندارد استفاده شد و درنهایت میزان فنل کل براساس میلی‌گرم بر گرم وزن خشک (mg g^{-1} DW) بیان گردید (۱۹و ۵۰).

محتوای فلاونوئید کل به روش رنگ‌سنجی آلومینیوم کلراید اندازه‌گیری شد. در این روش، به ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره متانولی ۸۰ درصد، ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر و ۱/۵ میلی‌لیتر متانل ۸۰ درصد اضافه شد. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر آلومینیوم کلراید ۱۰درصد و ۰/۱ میلی‌لیتر پتاسیم استات ۱ مولار اضافه گردید. بعد از ۳۰ دقیقه توقف در تاریکی، جذب هر نمونه در طول‌موج ۴۱۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. در این سنجش با استفاده از غلظت‌های مختلف روتین نمودار استاندارد تهیه گردید و در آخر میزان فلاونوئید کل براساس میلی‌گرم بر گرم وزن خشک (mg g^{-1} DW) بیان گردید (۲۶).

جهت سنجش فلاونول کل، به ۱ میلی‌لیتر از عصاره ، ۱ میلی‌لیتر آلومینیوم کلراید ۲ درصد و ۳ میلی‌لیتر سدیم استات ۵ درصد اضافه گردید. بعد از ۲/۵ ساعت توقف در تاریکی، جذب نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول‌موج ۴۴۰ نانومتر خوانده شد. همچنین در این سنجش با استفاده از غلظت‌های مختلف روتین نمودار استاندارد تهیه گردید و در آخر میزان فلاونول کل بر اساس میلی‌گرم بر گرم وزن خشک (mg g^{-1} DW) بیان شد (۵۲).

سنجش آنتوسیانین کل: ابتدا عصاره‌گیری با متانول اسیدی (متانول و کلریدریک اسید ۱:۹۹) به مدت ۲۴ ساعت در یخچال انجام شد. بعد از ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد و با سرعت (rpm) ۵۰۰۰، جذب محلول رویی در طول‌موج ۵۵۰ نانومتر خوانده شد و برای محاسبه غلظت آنتوسیانین از ضریب خاموشی (ε) mol^{-1} cm^{-1} ۳۳۰۰۰ استفاده شد (A = جذب، b = عرض کووت، c= غلظت محلول موردنظر) و درنهایت میزان آنتوسیانین کل براساس میلی مول بر گرم وزن خشک (mmol g^{-1} DW) بیان گردید (۵۱ و ۶۵).

$$A = \varepsilon b c$$

سنجش ساپونین کل: از روش وانیلین-اسید سولفوریک جهت سنجش ساپونین کل استفاده شد. در این روش ابتدا عصاره‌ی اتانولی ۲۰ درصد تهیه شد. ۵ میلی‌لیتر از عصاره تهیه شده با ۷ میلی‌لیتر دی اتیل اتر مخلوط و فاز پایینی حاوی آب جداسازی شد و در ادامه با ۵ میلی‌لیتر n- بوتانل مخلوط گردید. سپس فاز بالایی حاوی n- بوتانل جداسازی شد و با ۵ میلی‌لیتر کلرید سدیم ۵ درصد مخلوط گردید. در ادامه فاز بالایی حاوی n- بوتانل جمع‌آوری و خشک شد. عصاره حاصل در یک میلی‌لیتر متانول حل و سپس به ۲۰۰ میکرولیتر از آن، ۲۰۰ میکرولیتر وانیلین ۸ درصد و ۱ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک ۷۲ درصد اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و در پایان به مدت ۳ دقیقه در حمام یخ قرار داده شد. درنهایت جذب نمونه‌ها در طول‌موج ۵۴۴ نانومتر خوانده شد. دراین سنجش برای رسم نمودار استاندارد از غلظت‌های مختلف دیوسژنین استفاده شد و میزان ساپونین براساس میلی‌گرم بر گرم وزن خشک (mg g^{-1} DW) بیان گردید (۳۹و ۴۹).

سنجش رنگیزه‌های فتوسنتزی: ابتدا عصاره‌گیری با استن ۸۰ درصد انجام شد و سپس جذب هر نمونه در طول‌موج‌های ۶۶۳ نانومتر، ۶۴۵ نانومتر و ۴۷۰ نانومتر خوانده شد. درنهایت با استفاده از فرمول‌های زیر میزان کلروفیل a، کلروفیل b و کارتنوئید کل برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن خشک (mg g^{-1} DW) محاسبه گردید. (A = جذب، V = حجم عصاره، W = وزن نمونه) (۲۰و ۴۷).

$$\text{Chlorophyll } a = (12.7 * A_{663} - 2.69 * A_{645})\ V/1000W$$

$$\text{Chlorophyll } b = (22.9 * A_{645} - 4.68 * A_{663})\ V/1000W$$

$$\text{Carotenoids} = [((1000 * A_{470}) - (1.82 * chl.\ a) - (85.02 * chl.\ b))/198]\ V/1000W$$

سنجش کربوهیدرات‌های محلول: ابتدا ۰/۰۵ گرم از پودر برگ خشک با ۱/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی مولار (pH=۶/۸) به مدت یک دقیقه ورتکس و بعد به مدت ۱۰ دقیقه روی شیکر با سرعت ۱۰۰ دور بر دقیقه قرار داده شد. بعد از ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ با سرعت ۹۰۰۰ دور بر دقیقه، محلول رویی از رسوب جداسازی و برای سنجش قند استفاده شد. جهت سنجش فروکتوز از روش رنگ‌سنجی آنترون و جهت سنجش مانوز، گلوکز و زایلوز از روش رنگ سنجی فنل- اسیدسولفوریک استفاده شد. جهت سنجش فروکتوز به ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره، ۲/۵ میلی‌لیتر آنترون ۰/۰۲ درصد اضافه شد و نمونه‌ها به مدت ۸ دقیقه درون حمام آب گرم ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرارگرفت. پس از خنک شدن، جذب هر نمونه در طول‌موج ۶۲۵ نانومتر خوانده شد (۲۴). نمودار استاندارد برای قند فروکتوز با استفاده از غلظت‌های مختلف قند خالص فروکتوز تهیه گردید. جهت سنجش مانوز، گلوکز و زایلوز به ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره، ۰/۵ میلی‌لیتر فنل ۵ درصد و ۲/۵ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک غلیظ اضافه شد. بلافاصله بعد از افزودن اسیدسولفوریک، رنگ نارنجی ایجاد می‌شود. بعد از سرد شدن مخلوط واکنش، جذب در طول‌موج‌های ۴۸۰ نانومتر برای قند زایلوز، ۴۸۵ نانومتر برای قند گلوکز و ۴۹۰ نانومتر برای قند مانوز خوانده شد (۳۱). نمودارهای استاندارد با استفاده از غلظت‌های مختلف قندهای خالص زایلوز، گلوکز و مانوز تهیه گردیدند. درنهایت میزان قندها براساس میلی‌گرم بر گرم وزن خشک (mg g^{-1} DW) بیان گردید.

مطالعات گرده‌شناسی: جهت بررسی دانه گرده، سه جمعیت از هرگونه (از هر استان یک جمعیت) و درمجموع ۹ جمعیت انتخاب شد. به‌منظور مطالعه دانه گرده، گل‌های سالم و مناسب انتخاب و بساک‌ها از پرچم جدا و توسط سوزن شکافته شده و دانه‌های گرده از آن خارج شدند. این دانه‌های گرده توسط لایه‌نازکی از طلا پوشیده شده و روی پایک مخصوصی قرارگرفته و درنهایت جهت تصویربرداری درون محفظه میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) (مدل VEGA3 TESCAN) قرارگرفتند. با استفاده از تصاویر به‌دست آمده ۴ صفت کیفی شامل شکل و نوع دانه گرده، نوع شیار و تزئینات سطح اگزین و ۶ صفت

کمّی شامل طول قطبی (P)، عرض استوایی (E)، نسبت P به E، بیشترین فاصله دو شیار، بیشترین عرض شیار و تعداد شیار با استفاده از نرم‌افزار Digimizer مورد ارزیابی قرار گرفت (۲۱، ۲۵، ۳۰، ۵۴و ۵۷). اصطلاحات گرده‌شناسی و شکل دانه گرده باتوجه به منابع موجود تعیین شد (۴، ۲۵و ۳۵). دانه‌های گرده دارای نسبت P/E برابر با یک، به شکل کروی (Spheroidal)، نسبت P/E بزرگتر از یک (تا ۱/۱)، به شکل کروی نسبتاً کشیده (Prolate-spheroidal) و نسبت P/E کمتر از یک (تا ۰/۹)، به شکل کروی نسبتاً پهن شده (Oblate-spheroidal) تعریف شدند.

آنالیزهای آماری: داده‌های حاصل از سنجش‌های اسپکتروفتومتری و مطالعات گرده‌شناسی در نرم‌افزار SPSS 18 با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه (one-way ANOVA) مورد تجزیه‌وتحلیل قرارگرفت. برای انجام مقایسه میانگین بین جمعیت‌ها و همچنین گونه‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن (Duncan) در سطح معنی‌داری ۵ درصد استفاده شد.

نتایج

کروماتوگرافی گازی - طیف‌سنجی جرمی (GC-MS):

نتایج حاصل از بررسی اسانس گونه‌های *M. aquatica*، *M. pulegium* و *M. longifolia* با دستگاه GC-MS ترکیبات شیمیایی زیاد و متنوعی را نشان داد (جدول ۲). ترکیبات شیمیایی بتا-کاریوفیلن با ۴۲/۷۷ درصد، ژرماکرن-دی با ۱۵/۸۸ درصد، ویریدیفلورال با ۵/۹۶ درصد، اسید پالمیتیک با ۵/۸۰ درصد و بتا-فارنسن با ۳/۷۳ درصد به ترتیب عمده‌ترین ترکیبات موجود در اسانس گونه *M. aquatica* جمعیت A_{12} بودند. ترکیبات شیمیایی پولگون و منتون به ترتیب با ۸۴/۵۸ درصد و ۲/۴۵ درصد ترکیبات شاخص موجود در گونه *M. pulegium* جمعیت P_8 بودند. همچنین ترکیبات شیمیایی مانند دی-کارون با ۶۱/۷۰ درصد، پیپریتنون اکساید با ۲۰/۰۰ درصد، دی هیدروکارون با ۶/۲۳ درصد عمده‌ترین ترکیبات موجود در گونه *M. longifolia* جمعیت L_7 بودند (جدول ۲).

جدول ۲- ترکیبات شیمیایی شناسایی‌شده در اسانس گونه‌های جنس *Mentha* توسط دستگاه GC-MS

M. longifolia (L_7)		*M. pulegium* (P_8)		*M. aquatica* (A_{12})		زمان بازداری (دقیقه)
ترکیب شیمیایی	درصد	ترکیب شیمیایی	درصد	ترکیب شیمیایی	درصد	
Sabinene	۰/۱۱					۱۳/۹۶
β-Pinene	۰/۱۱					۱۴/۱۱
				Eucalyptol	۱/۸۸	۱۵/۵۳
Limonene	۰/۲۱					۱۵/۶۱
β-Ocimene	۰/۰۴					۱۵/۶۶
Alloocimene	۰/۰۲					۱۸/۱۸
		Menthone	۲/۵۴			۱۸/۶۳
				Menthofuran	۵/۲۵	۱۹/۰۲
		Isopulegone	۰/۱۸			۱۹/۰۷
				Borneol	۱/۴۳	۱۹/۱۰
Trichlorobenzene	۰/۱۳			Trichlorbenzene	۰/۳۲	۱۹/۲۷
Dihydrocarvone	۶/۲۳					۱۹/۸۴
		Pulegone	۸۴/۵۸			۲۰/۸۱
D-Carvone	۶۱/۷۰					۲۱/۴۴

۲۱٫۶۳				Piperitone oxide	۳٫۶۵
۲۱٫۶۷				Piperitone	۲٫۱۵
۲۱٫۸۵				Carvone oxide	۰٫۲۷
۲۱٫۹۰	Myrcene	۰٫۲۶			
۲۱٫۹۸	Bornyl Acetate	۰٫۳۶			
۲۲٫۹۶				Carhydrine	۰٫۰۶
۲۳٫۰۳			Piperitenone	۰٫۳۶	
۲۳٫۱۵				Eucarvone	۰٫۲۴
۲۳٫۹۹				Piperitenone oxide	۲۰٫۰۰
۲۴٫۶۳	β-Elemene	۱٫۲۶			
۲۴٫۷۱				β-Bourbonene	۰٫۱۰
۲۵٫۴۱	β-Caryophyllene	۴۲٫۷۷		β-Caryophyllene	۱٫۷۳
۲۵٫۷۸	β-Farnesene	۳٫۷۳		β-Farnesene	۰٫۰۵
۲۶٫۰۵	α-Caryophyllene	۲٫۸۵		α-Caryophyllene	۰٫۰۷
۲۶٫۶۱	Germacrene-D	۱۵٫۸۸		Germacrene D	۰٫۳۰
۲۶٫۷۷				3,5-Di-t-butylphenol	۰٫۰۲
۲۶٫۹۰	Germacrene-B	۰٫۲۹		Germacrene-B	۰٫۰۱
۲۷٫۳۲	D-Cadinene	۰٫۴۵		D-Cadinene	۰٫۰۱
۲۸٫۴۷	Spathulenol	۰٫۶۵		Spathulenol	۰٫۰۱
۲۸٫۸۶	Viridifloral	۵٫۹۶			
۳۰٫۲۱			Tetradecanol	۰٫۵۴	
۳۳٫۷۶				Phytone	۰٫۰۵
۳۴٫۴۵	Hexadecanol	۰٫۹۱			
۳۶٫۳۴	Palmitic acid	۵٫۸۰		Palmitic acid	۰٫۰۶
۳۹٫۴۶	Phytol	۲٫۷۵			
۳۹٫۸۷	Linolenic acid	۰٫۳۶			
۴۱٫۸۹			Tributyacetylcitrate	۱٫۶۳	

اسپکتروفتومتری: بررسی میزان فنل، فلاونوئید و فلاونول کل در بین جمعیت‌های جمع‌آوری شده نشان داد که گونه‌های *M. aquatica* شماره A_{12} و *M. longifolia* شماره L_7 از استان گیلان، و گونه *M. aquatica* شماره A_8 از استان گلستان به ترتیب بیشترین میزان فنل، فلاونوئید و فلاونول کل را نشان دادند. همچنین نتایج نشان داده که گونه *M. longifolia* شماره L_5 از استان گلستان دارای کمترین میزان فنل، فلاونوئید و فلاونول کل می‌باشد (جدول ۳). میانگین به‌دست آمده از جمعیت‌های هرگونه نشان می‌دهد که تفاوت معنی‌داری بین گونه‌های مورد مطالعه از لحاظ میزان فنل، فلاونوئید و فلاونول کل وجود داشته و بیشترین میزان، به‌طور میانگین در گونه *M. aquatica* می‌باشد (جدول ۵). بررسی میزان آنتوسیانین، کلروفیل a و b و کاروتنوئید کل در بین جمعیت‌های مختلف نشان داده که گونه *M. aquatica* شماره A_4 از استان مازندران دارای بیشترین میزان از این رنگیزه‌ها می‌باشد. همچنین گونه *M. longifolia* شماره L_8 از استان گیلان و شماره L_5 از استان گلستان به ترتیب دارای کمترین میزان آنتوسیانین و کاروتنوئید کل بوده و گونه *M. pulegium* شماره P_6 از استان گلستان دارای

کمترین میزان کلروفیل a و b می‌باشد (جدول ۳). میانگین به‌دست آمده از جمعیت‌های متعلق به هرگونه نشان می‌دهد که گونه *M. aquatica* به‌طور میانگین دارای بیشترین میزان از این رنگیزه‌ها می‌باشد، اگرچه این تفاوت در مورد آنتوسیانین کل معنی‌دار نمی‌باشد (جدول ۵).

بررسی میزان ساپونین کل نیز نشان داده که گونه *M. aquatica* شماره A_{10} از استان گیلان و گونه *M. longifolia* شماره L_4 از استان گلستان به ترتیب دارای بیشترین و کمترین میزان ساپونین کل می‌باشند (جدول ۳). مقایسه میانگین به دست آمده از جمعیت‌های هرگونه نشان می‌دهد که به‌طور معنی‌داری، میزان ساپونین کل در گونه *M. aquatica* بیشتر می‌باشد (جدول ۵).

بررسی میزان کربوهیدرات‌های محلول در بین جمعیت‌های مختلف نشان داده که گونه *M. aquatica* شماره A_{10} از استان گیلان دارای بیشترین مقدار از قندهای مانوز، گلوکز و زایلوز بوده و گونه *M. aquatica* شماره A_{12} از استان گیلان دارای بیشترین مقدار از قند فروکتوز می‌باشد. کمترین میزان از قندهای مانوز، گلوکز و زایلوز در گونه *M. pulegium* شماره P_5 از استان گلستان، و کمترین میزان قند فروکتوز در گونه *M. longifolia* شماره L_5 از استان گلستان مشاهده شد (جدول ۴). مقایسه میانگین به‌دست آمده از جمعیت‌های هرگونه نشان می‌دهد که اگرچه تفاوت معنی‌داری بین گونه‌ها وجود ندارد اما گونه *M. pulegium* دارای بیشترین میزان از این چهار قند می‌باشد (جدول ۵).

جدول ۳- مقایسه میزان متابولیت‌های گیاهی در جمعیت‌های جمع‌آوری شده جنس ***Mentha*** در شمال ایران

کد جمعیت	فنل	فلاونوئید	فلاونول	آنتوسیانین	ساپونین	a کلروفیل	b کلروفیل	کاروتنوئید
A_1	۱۲٫۵۴ m	۸٫۱۲ n	۳٫۶۵ o	۰٫۵۶ hi	۳٫۵۲ kl	۱٫۶۴ hi	۰٫۸۶ ghi	۰٫۶۳ i
A_2	۱۵٫۰۹ l	۵٫۹۶ o	۲٫۵۱ q	۰٫۵۰ jklm	۴٫۹۰ ghi	۱٫۰۹ kl	۰٫۶۵ jk	۰٫۴۷ j
A_3	۳۰٫۵۹ fg	۱۸٫۷۲ hi	۷٫۴۱ g	۰٫۷۴ bc	۵٫۹۴ ef	۲٫۲۱ d	۱٫۰۹ de	۰٫۷۶ gh
A_4	۳۶٫۴۵ e	۲۹٫۸۷ d	۱۲٫۱۱ c	۰٫۹۵ a	۵٫۱۵ gh	۳٫۱۷ a	۱٫۵۳ a	۱٫۲۳ a
A_5	۳۵٫۹۲ e	۱۸٫۰۷ i	۶٫۱۶ ij	۰٫۶۸ de	۶٫۴۳ e	۱٫۹۴ f	۱٫۵۱ a	۰٫۸۴ ef
A_6	۱۵٫۷۴ l	۷٫۴۹ n	۳٫۳۱ p	۰٫۶۱ fg	۲٫۴۴ n	۱٫۴۹ j	۰٫۷۸ ij	۰٫۶۱ i
A_7	۴۷٫۲۶ c	۲۳٫۹۵ f	۱۰٫۳۹ d	۰٫۵۸ gh	۳٫۲۷ lm	۲٫۱۷ d	۱٫۱۳ de	۱٫۰۵ c
A_8	۴۴٫۱۸ d	۳۰٫۰۴ d	۱۳٫۱۴ a	۰٫۵۰ jkl	۵٫۰۲ ghi	۲٫۱۸ d	۱٫۰۳ ef	۰٫۷۹ fg
A_9	۲۷٫۸۷ hi	۱۳٫۵۶ l	۵٫۹۵ j	۰٫۷۴ bc	۲٫۷۷ mn	۲٫۷۰ b	۱٫۳۰ bc	۱٫۱۹ ab
A_{10}	۵۰٫۸۳ b	۳۲٫۱۵ b	۱۰٫۴۴ d	۰٫۴۴ no	۱۰٫۷۲ a	۱٫۷۹ gh	۰٫۸۹ fghi	۰٫۸۷ e
A_{11}	۲۰٫۷۴ k	۱۶٫۵۰ j	۶٫۸۷ h	۰٫۴۴ no	۷٫۲۸ d	۱٫۶۹ hi	۰٫۸۷ ghi	۰٫۸۱ fg
A_{12}	۵۴٫۷۴ a	۲۶٫۶۲ e	۱۱٫۹۰ c	۰٫۴۶ mn	۸٫۵۲ bc	۲٫۵۲ c	۱٫۲۳ cd	۱٫۱۶ b
P_1	۳۳٫۲۱ f	۱۸٫۲۴ i	۶٫۲۸ i	۰٫۶۴ ef	۳٫۵۲ kl	۱٫۷۶ hi	۰٫۸۵ hi	۰٫۸۰ fg
P_2	۲۷٫۸۴ hi	۱۵٫۱۸ k	۵٫۰۴ l	۰٫۷۱ cd	۴٫۱۰ jk	۲٫۵۰ c	۱٫۳۸ ab	۱٫۱۳ b
P_3	۳۲٫۶۳ f	۱۶٫۴۲ j	۴٫۵۱ m	۰٫۵۳ ij	۴٫۳۷ ij	۱٫۶۱ ij	۰٫۸۵ hi	۰٫۷۸ gh
P_4	۸٫۹۳ n	۵٫۳۳ o	۲٫۲۱ r	۰٫۴۱ op	۴٫۸۲ ghi	۰٫۷۷ m	۰٫۵۳ klm	۰٫۳۸ k
P_5	۴٫۳۳ op	۴٫۴۸ p	۱٫۷۰ s	۰٫۵۱ jk	۲٫۴۲ n	۰٫۹۷ l	۰٫۶۰ kl	۰٫۴۲ jk
P_6	۵٫۴۳ o	۳٫۸۰ p	۱٫۳۸ t	۰٫۴۶ lmn	۲٫۴۱ n	۰٫۶۰ n	۰٫۴۱ m	۰٫۲۸ l
P_7	۲۵٫۴۵ ij	۱۳٫۳۹ l	۴٫۶۴ m	۰٫۵۳ ij	۸٫۹۸ b	۲٫۰۱ de	۱٫۱۱ de	۰٫۹۹ cd
P_8	۴۵٫۰۰ cd	۱۹٫۴۶ h	۶٫۹۲ h	۰٫۵۱ jk	۴٫۵۵ hij	۱٫۱۰ kl	۰٫۵۳ klm	۰٫۴۶ j
P_9	۳۱٫۲۵ fg	۱۳٫۲۶ l	۵٫۳۶ k	۰٫۵۶ hi	۳٫۵۰ kl	۱٫۹۰ fg	۱٫۰۴ ef	۰٫۹۴ d
L_1	۱۹٫۶۸ k	۱۱٫۰۶ m	۴٫۰۳ n	۰٫۵۸ gh	۶٫۲۲ e	۱٫۶۴ i	۰٫۴۷ lm	۰٫۴۸ j
L_2	۱۹٫۸۵ k	۱۰٫۷۵ m	۳٫۱۵ p	۰٫۳۹ p	۲٫۸۰ mn	۱٫۲۳ k	۰٫۶۱ kl	۰٫۴۴ j
L_3	۲۹٫۷۶ gh	۳۱٫۰۶ c	۱۲٫۵۹ b	۰٫۷۶ b	۳٫۵۷ kl	۲٫۰۱ ef	۰٫۹۷ efgh	۰٫۹۵ d

L_4	۵٫۰۷ op	۵٫۲۹ o	۱٫۶۳ s	۰٫۴۸ klmn	۱٫۶۸ o	۰٫۸۱ m	۰٫۴۹ klm	۰٫۳۷ k
L_5	۲٫۶۶ p	۲٫۸۸ q	۰٫۹۸ w	۰٫۴۷ lmn	۸٫۰۲ c	۰٫۶۸ mn	۰٫۴۲ m	۰٫۲۷ l
L_6	۲۱٫۳۶ k	۲۰٫۸۹ g	۷٫۸۹ f	۰٫۷۸ b	۵٫۴۹ fg	۲٫۵۷ c	۱٫۲۱ cd	۱٫۱۴ b
L_7	۲۵٫۱۸ j	۳۳٫۱۴ a	۱۲٫۹۹ a	۰٫۴۶ lmn	۲٫۹۱ lmn	۱٫۱۸ k	۰٫۵۴ klm	۰٫۶۳ i
L_8	۳۸٫۲۰ e	۲۰٫۴۱ g	۸٫۴۰ e	۰٫۳۷ p	۲٫۲۳ no	۱٫۴۸ j	۰٫۹۱ fghi	۰٫۷۱ h

اعداد در یک ستون با حروف متفاوت، ازنظر آماری با آزمون دانکن (در نرم‌افزار SPSS) در سطح معنی‌داری ۵ درصد دارای اختلاف معنی‌داری می‌باشند. میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشابه باهم اختلاف ندارند. مقادیر فنل، فلاونوئید، فلاونول، ساپونین، کلروفیل a و b و کاروتنوئید با واحد میلی‌گرم بر گرم وزن خشک ($mg\ g^{-1}\ DW$) و آنتوسیانین با واحد میلی مول بر گرم وزن خشک ($mmol\ g^{-1}\ DW$) اندازه‌گیری شدند.

جدول ۴- مقایسه میزان کربوهیدرات‌های محلول در جمعیت‌های جمع‌آوری شده جنس ***Mentha*** در شمال ایران

کد جمعیت	مانوز	گلوکز	زایلوز	فروکتوز
A_1	۱۵٫۱۶ kl	۵۱٫۵۴ mn	۰٫۹۳ n	۴٫۳۲ mn
A_2	۱۶٫۴۱ k	۵۷٫۰۰ m	۱٫۰۵ m	۴٫۲۴ mn
A_3	۲۷٫۲۸ ij	۹۵٫۵۷ k	۱٫۷۸ jk	۹٫۲۷ j
A_4	۲۵٫۷۵ j	۹۰٫۴۳ kl	۱٫۶۹ k	۹٫۲۵ j
A_5	۲۹٫۶۶ i	۱۰۲٫۲۱ j	۱٫۸۷ j	۸٫۸۴ j
A_6	۱۴٫۱۹ kl	۴۸٫۸۶ n	۰٫۹۰ n	۴٫۹۴ l
A_7	۴۶٫۵۰ ef	۱۶۱٫۰۴ f	۲٫۹۶ f	۱۳٫۷۸ f
A_8	۴۶٫۱۶ ef	۱۵۴٫۸۲ fg	۲٫۷۳ g	۱۵٫۴۳ d
A_9	۲۶٫۰۹ j	۸۶٫۸۹ l	۱٫۵۲ l	۹٫۳۸ j
A_{10}	۶۴٫۲۲ a	۲۲۵٫۲۱ a	۴٫۱۹ a	۱۶٫۲۸ c
A_{11}	۳۸٫۵۶ g	۱۳۵٫۱۱ h	۲٫۵۲ h	۱۱٫۹۲ g
A_{12}	۵۳٫۴۷ c	۱۸۸٫۰۴ c	۳٫۵۱ d	۱۹٫۰۶ a
P_1	۶۳٫۱۶ a	۲۱۹٫۸۶ a	۴٫۰۶ b	۱۶٫۰۴ c
P_2	۳۳٫۵۹ h	۱۱۷٫۵۴ i	۲٫۱۹ i	۱۰٫۰۶ i
P_3	۵۸٫۴۷ b	۲۰۵٫۵۰ b	۳٫۸۳ c	۱۸٫۲۱ b
P_4	۱۰٫۷۸ m	۳۸٫۳۶ o	۰٫۷۳ o	۴٫۵۹ lm
P_5	۵٫۳۱ n	۱۸٫۰۰ p	۰٫۳۳ q	۲٫۶۶ o
P_6	۵٫۹۱ n	۱۹٫۳۹ p	۰٫۳۵ pq	۳٫۸۴ n
P_7	۵۰٫۳۴ d	۱۷۴٫۷۵ d	۳٫۲۲ e	۱۶٫۱۷ c
P_8	۴۶٫۴۴ ef	۱۳۱٫۷۹ h	۲٫۴۴ h	۱۰٫۴۵ hi
P_9	۴۹٫۱۹ de	۱۷۱٫۶۴ de	۳٫۱۳ e	۱۴٫۸۸ e
L_1	۱۲٫۷۵ lm	۴۴٫۷۹ n	۰٫۸۴ no	۵٫۰۶ l
L_2	۴۴٫۳۴ f	۱۵۳٫۹۶ g	۲٫۸۳ g	۱۴٫۱۰ f
L_3	۳۸٫۵۰ g	۱۳۴٫۳۶ h	۲٫۴۹ h	۸٫۱۸ k
L_4	۱۲٫۹۱ lm	۴۵٫۰۰ n	۰٫۸۴ no	۳٫۹۴ n
L_5	۷٫۰۹ n	۲۴٫۴۳ p	۰٫۴۵ p	۲٫۱۸ o
L_6	۲۵٫۵۹ j	۹۰٫۰۰ kl	۱٫۶۸ k	۹٫۰۷ j
L_7	۳۸٫۱۶ g	۱۳۴٫۶۸ h	۲٫۵۳ h	۱۰٫۷۳ h
L_8	۴۸٫۳۱ de	۱۶۸٫۱۱ e	۳٫۱۱ e	۱۳٫۶۱ f

اعداد در یک ستون با حروف متفاوت، ازنظر آماری با آزمون دانکن (در نرم‌افزار SPSS) در سطح معنی‌داری ۵ درصد دارای اختلاف معنی‌داری می‌باشند. میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشابه باهم اختلاف ندارند. همه مقادیر با واحد میلی‌گرم بر گرم وزن خشک (mg g^{-1} DW) اندازه‌گیری شدند.

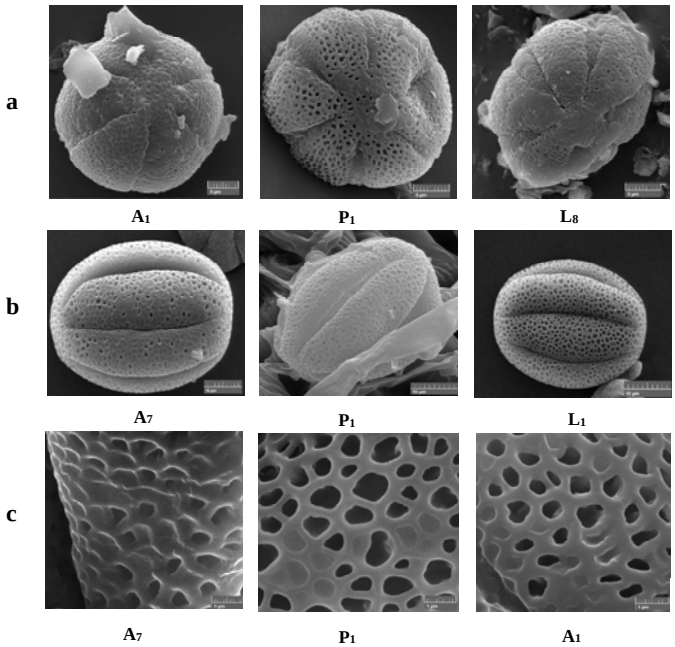
جدول ۵- مقایسه میانگین متابولیت‌های گیاهی در گونه‌های جنس *Mentha* در شمال ایران

متابولیت‌های گیاهی	گونه گیاهی		
	M. aquatica	*M. pulegium*	*M. longifolia*
فنل	۳۲٫۶۷±۱۴٫۲۸ a	۲۳٫۷۹±۱۳٫۷۲ b	۲۰٫۲۲±۱۱٫۴۱ b
فلاونوئید	۱۹٫۲۵±۹٫۰۵ a	۱۲٫۱۷±۵٫۸۵ b	۱۶٫۹۴±۱۰٫۸۱ ab
فلاونول	۷٫۸۲±۳٫۵۹ a	۴٫۲۳±۱٫۹۳ b	۶٫۴۶±۴٫۵۱ a
آنتوسیانین	۰٫۶۰±۰٫۱۵ a	۰٫۵۴±۰٫۰۹ a	۰٫۵۴±۰٫۱۵ a
ساپونین	۵٫۵۰±۲٫۴۳ a	۴٫۳۰±۱٫۸۹ ab	۴٫۱۱±۲٫۱۴ b
کلروفیل a	۲٫۰۵±۰٫۵۶ a	۱٫۴۸±۰٫۶۳ b	۱٫۴۵±۰٫۶۰ b
کلروفیل b	۱٫۰۷±۰٫۲۹ a	۰٫۸۱±۰٫۳۱ b	۰٫۷۰±۰٫۲۹ b
کاروتنوئید	۰٫۸۷±۰٫۲۴ a	۰٫۶۹±۰٫۳۰ b	۰٫۶۲±۰٫۲۹ b
مانوز	۳۳٫۶۲±۱۵٫۷۱ a	۳۵٫۹۱±۲۲٫۱۷ a	۲۸٫۴۶±۱۵٫۳۲ a
گلوکز	۱۱۶٫۳۹±۵۵٫۱۰ a	۱۲۱٫۸۷±۷۶٫۲۱ a	۹۹٫۴۲±۵۳٫۴۱ a
زایلوز	۲٫۱۴±۱٫۰۳ a	۲٫۲۵±۱٫۴۱ a	۱٫۸۵±۰٫۹۹ a
فروکتوز	۱۰٫۵۶±۴٫۷۲ a	۱۰٫۷۶±۵٫۷۱ a	۸٫۳۶±۴٫۲۱ a

اعداد در یک سطر با حروف متفاوت، ازنظر آماری با آزمون دانکن (در نرم‌افزار SPSS) در سطح معنی‌داری ۵ درصد دارای اختلاف معنی‌داری می‌باشند. میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشابه باهم اختلاف ندارند. مقادیر آنتوسیانین با واحد میلی مول بر گرم وزن خشک (mmol g^{-1} DW) و سایر متابولیت‌ها با واحد میلی‌گرم بر گرم وزن خشک (mg g^{-1} DW) اندازه‌گیری شدند.

گرده‌شناسی: مطالعه دانه گرده جمعیت‌های مختلف گونه‌های *M. aquatica*، *M. pulegium* و *M. longifolia* جمع‌آوری شده از استان‌های گیلان، مازندران و گلستان نشان داد که تمام جمعیت‌های مربوط به این سه گونه ازلحاظ پارامترهای کیفی بررسی شده تقریباً یکسان ولی ازلحاظ پارامترهای کمّی اندازه‌گیری شده متغیر هستند (جدول ۶). در جمعیت‌های مطالعه شده A_1، A_7 و A_{12} از گونه *M. aquatica*، دانه‌های گرده از نوع منفرد (Monad) بودند. طول قطبی از ۳۷٫۴۷ تا ۴۰٫۷۰ میکرومتر و عرض استوایی از ۳۶٫۱۰ تا ۳۹٫۵۶ میکرومتر متغیر بودند. شکل دانه گرده در آنها باتوجه به نسبت طول قطبی به عرض استوایی (P/E) که به ترتیب برابر با ۱٫۰۴، ۱٫۰۳ و ۱٫۰۳ بودند به‌صورت کروی نسبتاً کشیده (Prolate-spheroidal) است. گرده‌های آنها شش شیاری (Hexacolpate) بودند. عرض شیار از ۱٫۷۸ تا ۱٫۹۰ میکرومتر و فاصله دو شیار از ۵٫۲۵ تا ۵٫۸۵ میکرومتر متغیر بودند. تزئینات سطح اگزین آنها به‌صورت شبکه‌ای (Reticulum) بود. دانه‌های گرده جمعیت‌های P_1، P_4 و P_8 از گونه *M. pulegium* نیز از نوع منفرد بودند. طول قطبی از ۲۰٫۱۸ تا ۲۵٫۱۷ میکرومتر و عرض استوایی از ۱۹٫۹۸ تا ۲۴٫۸۶ میکرومتر متغیر بودند. شکل دانه گرده در جمعیت‌های P_1 و P_8 به‌صورت کروی نسبتاً کشیده (P/E=۱٫۰۱) و در جمعیت P_4 به‌صورت کروی نسبتاً پهن (P/E=۰٫۹۸) است. گرده‌های هر سه جمعیت شش شیاری بودند. عرض شیار از ۱٫۱۳ تا ۱٫۱۸ میکرومتر و فاصله دو شیار از ۴٫۰۵ تا ۴٫۷۲ میکرومتر متغیر بودند. تزئینات سطح اگزین آنها نیز به‌صورت شبکه‌ای بود. دانه‌های گرده جمعیت‌های L_1، L_5 و L_8 از گونه *M. longifolia* نیز از نوع منفرد بودند. طول قطبی از ۲۵٫۱۶ تا ۳۱٫۲۲ میکرومتر و عرض استوایی از ۲۴٫۶۷ تا ۳۰٫۸۷ میکرومتر متغیر بودند. شکل دانه گرده در جمعیت‌های L_5

و L_8 (به ترتیب با P/E برابر با ۱٫۰۲ و ۱٫۰۱) به‌صورت کروی نسبتاً کشیده و در جمعیت L_1 به‌صورت کروی (P/E=۱٫۰۰) است. گرده‌های هر سه جمعیت شش شیاری بودند. عرض شیار از ۱٫۶۸ تا ۱٫۷۲ میکرومتر و فاصله دو شیار از ۵٫۰۹ تا ۵٫۶۱ میکرومتر متغیر بودند. تزئینات سطح اگزین آنها نیز به‌صورت شبکه‌ای بود. (شکل ۱ و جدول ۶). مقایسه داده‌های به‌دست آمده از جمعیت‌های مربوط به هرگونه با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه (one-way ANOVA) و آزمون چند دامنه‌ای دانکن (Duncan) در سطح معنی‌داری ۵ درصد نشان می‌دهد که تفاوت معنی‌داری بین گونه‌های مورد مطالعه در مورد پارامترهای طول قطبی (P)، عرض استوایی (E)، نسبت P به E، فاصله دو شیار و عرض شیار وجود دارد؛ بیشترین مقادیر پارامترهای اندازه‌گیری شده مربوط به گونه *M. aquatica* و کمترین مقادیر مربوط به گونه *M. pulegium* بوده است (جدول ۷).



شکل ۱- تصاویر تهیه شده از میکروسکوپ الکترونی نگاره از دانه گرده جمعیت‌های جنس *Mentha*. نمای قطبی با خط نشانه=۵µm (a)، نمای استوایی با خط نشانه=۱۰µm (b)، تزئینات سطح اگزین با خط نشانه=۱µm (c). *Mentha aquatica* از دودانگه مازندران (A_1)، *Mentha aquatica* از کردکوی گلستان (A_7)، *Mentha pulegium* از رامسر مازندران (A_1)، *Mentha longifolia* از ماسال گیلان (A_1).

جدول ۶- بررسی پارامترهای کمّی دانه‌های گرده تعدادی از جمعیت‌های جنس *Mentha* در شمال ایران

کد جمعیت	پارامترهای کمّی و کیفی								
	P	E	P/E	شکل دانه گرده	عرض شیار	فاصله دو شیار	نوع شیار	واحد دانه گرده	تزئینات سطح اگزین
A_1	۳۷٫۴۷±۰٫۲۹	۳۶٫۱۰±۰٫۳۵	۱٫۰۴±۰٫۰۱	کروی نسبتاً کشیده	۱٫۸۱±۰٫۰۹	۵٫۷۰±۰٫۱۱	۶ شیاری	منفرد	شبکه‌ای
A_7	۳۹٫۹۱±۰٫۲	۳۸٫۷۸±۰٫۱۵	۱٫۰۳±۰٫۰۱	کروی نسبتاً کشیده	۱٫۹۰±۰٫۰۴	۵٫۲۵±۰٫۰۹	۶ شیاری	منفرد	شبکه‌ای
A_{12}	۴۰٫۷۰±۰٫۱۳	۳۹٫۵۶±۰٫۴۳	۱٫۰۳±۰٫۰۱	کروی نسبتاً کشیده	۱٫۷۸±۰٫۱۰	۵٫۸۵±۰٫۱۶	۶ شیاری	منفرد	شبکه‌ای
P_1	۲۰٫۱۸±۰٫۱۱	۱۹٫۹۸±۰٫۷۷	۱٫۰۱±۰٫۰۵	کروی نسبتاً کشیده	۱٫۱۸±۰٫۰۳	۴٫۷۲±۰٫۱۸	۶ شیاری	منفرد	شبکه‌ای
P_4	۲۰٫۵۸±۰٫۱۸	۲۰٫۹۵±۰٫۳۸	۰٫۹۸±۰٫۰۲	کروی نسبتاً پهن	۱٫۲۲±۰٫۰۹	۴٫۰۵±۰٫۲۰	۶ شیاری	منفرد	شبکه‌ای
P_8	۲۵٫۱۷±۰٫۰۶	۲۴٫۸۶±۰٫۱۵	۱٫۰۱±۰٫۰۱	کروی نسبتاً کشیده	۱٫۱۳±۰٫۰۸	۴٫۵۰±۰٫۱۶	۶ شیاری	منفرد	شبکه‌ای
L_1	۲۷٫۹۰±۰٫۲۷	۲۷٫۸۰±۰٫۱۸	۱٫۰۰±۰٫۰۱	کروی	۱٫۶۸±۰٫۱۲	۵٫۱۴±۰٫۱۹	۶ شیاری	منفرد	شبکه‌ای
L_5	۲۵٫۱۶±۰٫۶۱	۲۴٫۶۷±۰٫۴۴	۱٫۰۲±۰٫۰۴	کروی نسبتاً کشیده	۱٫۷۲±۰٫۱۹	۵٫۶۱±۰٫۱۶	۶ شیاری	منفرد	شبکه‌ای

L_8	۳۱٫۲۲±۰٫۴۵	۳۰٫۸۷±۰٫۴۷	۱٫۰۱±۰٫۰۲	کروی نسبتاً کشیده	۱٫۷۰±۰٫۱۱	۵٫۰۹±۰٫۵۰	۶ شیاری	منفرد	شبکه‌ای

جمعیت‌های A_1، A_7 و A_{12} از گونه *M. aquatica*، جمعیت‌های P_1، P_4 و P_8 از گونه *M. pulegium* و جمعیت‌های L_1، L_5 و L_8 از گونه *M. longifolia* هستند. طول قطبی (P)، عرض استوایی (E) و نسبت طول قطبی به عرض استوایی (P/E). مقادیر کمّی اندازه‌گیری شده برحسب µm هستند.

جدول ۷- مقایسه دانه‌های گرده در بین گونه‌های جمع‌آوری شده جنس *Mentha* در شمال ایران

پارامترهای کمّی	گونه گیاهی		
	M. longifolia	*M. pulegium*	*M. aquatica*
طول قطبی (P)	۲۵/۰۹±۳/۰۳ ^{b}	۲۱/۹۸±۲/۷۷ ^{c}	۳۹/۳۶±۱/۶۸ ^{a}
عرض استوایی (E)	۲۷/۷۸±۳/۱۰ ^{b}	۲۱/۹۳±۲/۵۹ ^{c}	۳۸/۱۵±۱/۸۱ ^{a}
نسبتP به E	۱/۰۱±۰/۰۱ ^{ab}	۱/۰۰±۰/۰۲ ^{b}	۱/۰۳±۰/۰۱ ^{a}
عرض شیار	۱/۷۰±۰/۰۲ ^{b}	۱/۲۳±۰/۰۵ ^{c}	۱/۸۳±۰/۰۶ ^{a}
فاصله دو شیار	۵/۲۸±۰/۲۹ ^{a}	۴/۴۳±۰/۳۴ ^{b}	۵/۶۰±۰/۳۱ ^{a}

اعداد در یک سطر با حروف متفاوت، ازنظر آماری با آزمون دانکن (در نرم‌افزار SPSS) در سطح معنی‌داری ۵ درصد دارای اختلاف معنی‌داری می‌باشند. میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشابه باهم اختلاف ندارند. مقادیر اندازه‌گیری شده برحسب µm می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

دراین پژوهش، تعدادی از متابولیت‌های موجود در اسانس و عصاره‌های مختلف گیاهی به‌عنوان صفات بیوشیمیایی و تعدادی از پارامترهای کیفی و کمّی دانه گرده به‌عنوان صفات گرده‌شناسی در ۳ گونه از جنس *Mentha* شامل *M. aquatica*، *M. pulegium* و *M. longifolia* در شمال ایران شامل استان‌های گیلان، مازندران و گلستان، مورد مطالعه قرار گرفت. بررسی اسانس گونه *M. aquatica* نشان داد که بتا-کاریوفیلن و جرماکرن-دی به ترتیب با ۴۲٫۷۷ و ۱۵٫۸۸ درصد ترکیبات اصلی این‌گونه بوده و ترکیباتی نظیر اوکالیپتول، منتوفوران، بورنئول، بتا-المن، بتا-فارنسن، آلفا-کاریوفیلن، ویریدی فلورال، اسید پالمیتیک و فیتول نیز میزان قابل‌توجهی از اجزای اسانس را تشکیل دادند (جدول ۲). مطالعات زیادی روی اسانس گونه *M. aquatica* انجام شده است که باتوجه به محل و زمان جمع‌آوری، ترکیبات متنوعی و درنتیجه شیمیوتایپ‌های متعددی گزارش شده است که می‌توان آنها را در سه گروه کلی دسته‌بندی نمود. گروه اول شامل گیاهانی می‌شود که اسانس آنها حاوی مقدار خیلی زیادی از منتوفوران می‌باشد، گروه دوم گیاهانی که منتوفوران و اکالیپتول فراوانی تولید می‌کنند و گروه سوم شامل گیاهانی است که ترکیبات متنوع دیگری را تولید می‌کنند (۲۷و ۶۲). نگاهی کلی به این گزارش‌ها نشان می‌دهد که اگرچه ترکیبات متنوعی در مطالعات مختلف گزارش شده است اما تعدادی از ترکیبات در اغلب موارد حضور داشته و تنها از لحاظ کمّی متفاوت می باشند بررسی ترکیبات موجود در اسانس گونه‌های خودرو و آزمایشگاهی *M. aquatica* جمع‌آوری شده از منطقه Corsica نشان داده که منتوفوران ترکیب عمده این نمونه‌ها بوده و همانند مطالعه حاضر، ترکیباتی نظیر اوکالیپتول، منتوفوران، بورنئول، بتا-کاریوفیلن، جرماکرن-دی و ویریدی فلورال با درصد قابل‌توجهی در این نمونه‌ها نیز گزارش‌شده‌اند (۶۲). مطالعه اسانس حاصل از جمعیت‌های مختلف گونه *M. aquatica* در استان مازندران نشان داد که شاخص‌ترین ترکیبات اسانس شامل منتوفوران، ترانس-کاریوفیلن، اوکالیپتول، جرماکرن-دی و ویریدی فلورال بوده که مشابه با مطالعه حاضر می‌باشد (۱۲). سایر تحقیقات نیز حاکی از آن است که مهم‌ترین ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس این گیاه شامل ترکیباتی نظیر بتا-کاریوفیلن، ویریدی فلورال، سینئول (۳۲) و منتوفوران، سینئول و بتا-کاریوفیلن (۴۱)

می‌باشد. اگرچه در گونه *M. aquatica* مورد مطالعه ترکیباتی نظیر بتا-کاریوفیلن و جرماکرن-دی بخش عمده‌ای از اسانس گیاه را تشکیل می‌دهند و می‌توانند به‌عنوان یک شیمیوتایپ جدید در نظر گرفته شوند، به نظر می‌رسد که احتمالاً سنتز ترکیبات شاخصی نظیر منتوفوران و ویریدی فلورال، به ترتیب اهمیت، از ویژگی‌های این‌گونه باشد. بررسی اسانس گونه *M. pulegium* نشان داد که پولگون و منتون به ترتیب با ۸۴٫۵۸ و ۲٫۵۴ درصد عمده‌ترین ترکیبات موجود در اسانس این‌گونه بوده و ترکیباتی نظیر پیپریتنون و ایزوپولگون نیز با مقادیر کمتری وجود داشته‌اند (جدول ۲). گزارش‌های زیادی از شناسایی اجزای اسانس این‌گونه ارائه شده که نتایج متنوعی را نشان داده و براساس آن شیمیوتایپ‌های مختلفی ازاین‌گونه نظیر نوع پولگون، نوع پیپریتنون/پیپریتون و نوع ایزومنتون/ نئوایزومنتون گزارش شده است (۴۴). درواقع این تفاوت‌ها نشان دهنده تأثیر مناطق جغرافیایی مختلف با شرایط اکولوژیک متفاوت و مراحل فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه بر بیوسنتز این ترکیبات می‌باشد (۳۶، ۴۲و ۴۴). بررسی اسانس گونه *M. pulegium* جمع‌آوری شده از جنوب ایران نشان داد که پولگون، پیپریتنون، اوکالیپتول و پیپریتنون اکساید از عمده‌ترین ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس بودند (۴۲). همچنین پولگون و ایزومنتون به‌عنوان عمده‌ترین ترکیبات موجود در اسانس حاصل از نمونه‌های گیاهی جمع‌آوری شده از ماکو در شمال غربی ایران گزارش شده‌اند (۱۰). آنالیز اسانس در دو مرحله تکوینی رویشی و زایشی این‌گونه ترکیبات متنوعی را نشان داد که از میان این ترکیبات بیش از ۹۰ درصد اسانس از دو ترکیب پولگون و منتون تشکیل شده بود (۷). اسانس نمونه‌های جمع‌آوری شده از اروگوئه نشان داد که پولگون، ایزومنتون و منتون از ترکیبات عمده این گیاه می‌باشند (۴۸). اسانس حاصل از نمونه‌های جمع‌آوری شده از شمال مراکش نیز نشان داد که قبل و بعد از مرحله گلدهی، پولگون عمده‌ترین ترکیب موجود در اسانس می‌باشد (۶۷). همچنین منتون، پولگون و نئومنتول بیشترین درصد از اسانس نمونه‌های جمع‌آوری شده از پرتغال را نشان دادند (۶۳). نگاهی جامع به این نتایج نشان می‌دهد که باوجود تنوع زیاد، ترکیباتی نظیر پولگون و منتون به‌طور مشترک ولی با درصدهای متفاوت در تمامی این تحقیقات گزارش شده‌اند که می‌توانند از شاخصه‌های این‌گونه به شمار آیند.

بررسی ترکیبات موجود در اسانس گونه *M. longifolia* در مطالعه حاضر نشان داد که دی-کارون و پیپریتنون اکساید به ترتیب با ۶۱٫۷۰ و ۲۰٫۰۰ درصد عمده‌ترین و دی هیدرو کارون، پیپریتون اکساید، پیپریتون و بتا-کاریوفیلن این‌گونه بودند (جدول ۲).

مطالعات گیاه‌شناسی روی گونه *M. longifolia* نشان داده که باتوجه به پراکنش وسیع آن، این‌گونه دارای تنوع ریخت‌شناسی فراوانی می‌باشد که درنتیجه آن ۲۷۶ زیرگونه ، واریته و فرم ازاین‌گونه گزارش شده است (۳۳، ۵۳ و ۶۰). این تنوع بالای ریخت‌شناسی احتمالاً موجب تنوع شیمیایی بالا و درنتیجه شیمیوتایپ‌های فراوان در این‌گونه شده است. تنوع فصلی، موقعیت جغرافیایی و فاکتورهای محیطی مطمئناً نقش مهمی در تغییرات ریخت‌شناسی و شیمیایی این‌گونه دارند (۶۰). بررسی اسانس گونه *M. longifolia* جمع‌آوری شده از مناطق جنوبی هیمالیا نشان داد که ترکیباتی نظیر ترانس-پیپریتون اپوکساید، پیپریتنون اکساید، جرماکرن-دی و بتا-کاریوفیلن بترتیب عمده‌ترین ترکیبات موجود در این‌گونه بودند (۶۴). مطالعه ۵ جمعیت ازاین‌گونه در مناطق جنوبی-مرکزی تاجیکستان نشان داد که به‌طور متوسط در تمام جمعیت‌ها ترکیباتی نظیر سیس-پیپریتون اپوکساید، پیپریتنون اکساید، کارون، پولگون و منتون بیشترین حضور را داشتند (۶۰). اسانس حاصل از جمعیت جمع‌آوری شده از شهرکرد نشان داد که عمده‌ترین ترکیبات حاضر در این‌گونه عبارتند از پیپریتنون اکساید، اکالیپتول و پولگون (۸). اسانس به‌دست آمده از جمعیت‌های مختلف جمع‌آوری شده از استان‌های فارس،

نتایج متفاوتی را نشان دادند. پیپریتنون اکساید عمده‌ترین ترکیب موجود در جمعیت‌های سپیدان، چناران و تربت‌حیدریه، اکالیپتول عمده‌ترین ترکیب موجود در جمعیت‌های فسا و نیشابور، پولگون عمده‌ترین ترکیب موجود در جمعیت‌های بوانات، کوار، کاشمر و مشهد و پیپریتنون عمده‌ترین ترکیب موجود در جمعیت سپیدان گزارش شد (۵). اسانس حاصل از نمونه‌های جمع‌آوری شده از جنوب لهستان نیز مقادیر خیلی زیادی از پیپریتون اکساید را نشان دادند (۳۷). نگاهی بر گزارش‌های پیشین تنوع زیادی از متابولیت‌های گیاهی را در جمعیت‌های مختلف این‌گونه نشان می‌دهد.

باتوجه به گزارش‌های قبلی و مقایسه آن با گزارش حاضر، حضور قابل‌توجه ترکیباتی نظیر پولگون و پیپریتنون و مشتقاتشان در ترکیب اسانس این‌گونه، به نظر می‌رسد که ازلحاظ ترکیبات موجود در اسانس، این‌گونه به گونه *M. pulegium* شباهت بیشتری داشته و به آن نزدیکتر باشد. سنتز مقادیر زیادی از دی-کارون در گونه مورد مطالعه و مقایسه آن با دیگر جمعیت‌های این‌گونه اشاره دارد به این که احتمالاً تولید این ترکیب از مشخصه‌های این جمعیت بوده و می‌تواند به‌عنوان یک شیمیوتایپ معرفی شود.

جنس *Mentha* شامل گیاهان معطری می‌باشد که به دلیل تنوع زیاد در خصوصیات ریخت‌شناسی و هیبریداسیون مکرر، طبقه‌بندی تاکسونومیکی آنها پیچیده می‌باشد. مطالعه اسانس حاصل از گونه‌های این جنس یک پلی مورفیسم شیمیایی مهم را نشان داده و شیمیوتایپ‌های مختلفی را برای اغلب گونه‌های این جنس گزارش کرده است (۴۵و ۴۸). مطالعات انجام شده روی اسانس گونه‌های مختلف این جنس نشان می‌دهد که GC-MS می‌تواند اطلاعاتی کامل از ترکیبات موجود در اسانس این گیاهان خصوصاً ترکیبات ترپنوئیدی فراهم سازد، مقایسه و آنالیز این داده‌ها، تفاوت‌ها و شباهت‌هایی را بین گونه‌های این جنس نشان می‌دهد که می‌تواند همانند اثرانگشت برای آنها بوده و در تاکسونومی آنها مفید باشد (۳۷). نتایج حاصل از بررسی اسانس گونه‌های *M. aquatica*، *M. pulegium* و *M. longifolia* در این مطالعه و گزارش‌های دیگر نشان داد که ترکیبات شیمیایی زیادی توسط گونه‌های جنس *Mentha* تولید می‌شود که تعدادی از این ترکیبات در برخی گونه‌های این جنس مشترک بوده و ترکیباتی نیز به‌طور اختصاصی توسط گونه‌ای خاص و یا با مقدار بسیار زیادی توسط آن‌گونه تولید می‌شوند. اگرچه ممکن است تعدادی از متابولیت‌ها در گونه‌های مختلف مشترک باشند، اما به نظر می‌رسد که سنتز مقادیر زیادی از متابولیت‌هایی نظیر بتا-کاریوفیلن، جرماکرن-دی، منتوفوران و ویریدی فلورال در گونه *M. aquatica*، پولگون و منتون در گونه *M. pulegium* و دی-کارون و پیپریتنون اکساید در گونه *M. longifolia* از اختصاصات این گونه‌ها باشند.

در این پژوهش متابولیتهای دیگری نظیر فنل، فلاونوئید، فلاونول، آنتوسیانین، ساپونین و کاروتنوئید کل، کلروفیل a و b و تعدادی از کربوهیدارت‌های محلول در برگ نیز بررسی شدند. نتایج نشان داد که میزان این متابولیت‌های گیاهی دارای تفاوت معنی‌داری در بین جمعیت‌های این جنس و جمعیت‌های هرگونه می‌باشد (جداول ۳ و ۴). سایر مطالعات انجام شده روی گونه‌های این جنس نیز نشان دهنده میزان متفاوت متابولیت‌های گیاهی موجود در جمعیت‌های مختلف هرگونه می‌باشد. در مطالعه‌ای میزان اسانس، محتوای کلروفیل، کاروتنوئید، آنتوسیانین و فلاونوئید کل در ۵ جمعیت از گونه *M. longifolia*، جمع‌آوری شده از مناطق مختلف مرند، مورد ارزیابی قرار گرفت که تفاوت معنی‌داری را در متابولیت‌های گیاهی اندازه‌گیری شده نشان دادند که پیشنهاد شد احتمالاً این تفاوت ناشی از شرایط محیطی متفاوت باشد (۱۶). نقش رویشگاه به‌عنوان عامل تأثیرگذار در تجمع متابولیت‌های ثانویه بسیار بااهمیت می‌باشد. عوامل محیطی نظیر خاک، دما، رطوبت، نور و ارتفاع از سطح دریا از مهم‌ترین عوامل

تأثیرگذار در تجمع متابولیت‌های ثانویه می‌باشند (۲، ۹، ۲۸و ۳۸). در مطالعه‌ای دیگر ۲۵ جمعیت از گیاه نعنای خوراکی *M. spicata* از مناطق مختلف ایران جمع‌آوری و در شرایط یکسان گلخانه‌ای کشت داده شدند و تنوع بیوشیمیایی عصاره حاصل از این جمعیت‌ها بررسی شد. علی‌رغم شرایط محیطی یکسان برای همه جمعیت‌ها، تفاوت معنی‌داری در میزان ترکیبات فنلی، فلاون، فلاونول، فلاونوئید، کلروفیل a و b، کاروتنوئید، کربوهیدرات کل و میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی مشاهده شد که پیشنهاد شد باتوجه به ایجاد شرایط محیطی یکسان، احتمالاً تنوع موجود اساس ژنتیکی داشته باشد (۱۱). بنابراین، در کنار عوامل محیطی، عوامل ژنتیکی نیز در تولید و تجمع متابولیت‌های ثانویه گیاهان دارویی نقش مهمی دارند. شناسایی شرایط مناسب جهت تولید متابولیت‌های خاص گیاه می‌تواند در افزایش تولید این متابولیت‌ها در محیط‌های کشت مؤثر باشد و همچنین از این نتایج می‌توان جهت معرفی جمعیت‌ها و گونه‌های شاخص و تولید ارقامی با خصوصیات زراعی مطلوب استفاده نمود (۱، ۲۲، ۱۷و ۴۳). در مطالعه حاضر، در بین جمعیت‌های گونه *M. aquatica*، جمعیت A_{12} (طولارود) از استان گیلان دارای بیشترین میزان فنل کل و جمعیت A_{10} (هشتپر) از استان گیلان دارای بیشترین میزان از فلاونوئید و ساپونین کل بودند. جمعیت A_4 (بهنمیر) از استان مازندران نیز دارای بیشترین مقدار از آنتوسیانین و رنگیزه‌های فتوسنتزی شامل کلروفیل a و b و کاروتنوئید بود (جدول ۳). در بین جمعیت‌های گونه *M. pulegium*، جمعیت P_8 (طولارود) از استان گیلان دارای بیشترین میزان فنل، فلاونوئید و فلاونول کل، و جمعیت P_7 (پره سر) از استان گیلان دارای بیشترین میزان از ساپونین کل بود. همچنین جمعیت P_2 (نور) از استان مازندران دارای بیشترین مقدار از آنتوسیانین و رنگیزه‌های فتوسنتزی بود (جدول ۳). در بین جمعیت‌های گونه *M. longifolia*، جمعیت L_8 (ماسال) از استان گیلان دارای بیشترین میزان فنل کل و جمعیت L_7 (اسالم) از استان گیلان بیشترین میزان از فلاونوئید و فلاونول کل، و جمعیت L_6 (ناو) از استان گیلان دارای بیشترین میزان از آنتوسیانین و رنگیزه های فتوسنتزی بود (جدول ۳). در مورد سنجش کربوهیدرات‌ها و به‌طور خاص در مورد قند گلوکز، که بیشترین مقدار را در مقایسه با قندهای دیگر دارد (جدول ۴)، در بین جمعیت‌های گونه *M. aquatica*، جمعیت A_{10} (هشتپر) و در بین جمعیت‌های گونه *M. longifolia*، جمعیت L_8 (ماسال) هر دو از استان گیلان بیشترین مقدار را نشان دادند. در بین جمعیت‌های گونه *M. pulegium*، جمعیت L_8 (رامسر) از استان مازندران، که از لحاظ موقعیت جغرافیایی به استان گیلان نزدیک‌تر می‌باشد، دارای بیشترین مقدار از قند گلوکز بود (جدول ۴). نتایج اشاره دارد به این که احتمالاً جمعیت‌های موجود در استان گیلان دارای غنای بیشتری از متابولیت‌های گیاهی خصوصاً ترکیبات فنولیک و کربوهیدرات‌ها هستند، اگرچه برای یک نتیجه‌گیری کلی، نیاز به مطالعات بیشتر با نمونه‌برداری‌های بیشتر و گسترده‌تری همراه با اندازه‌گیری پارامترهای اکولوژیک می‌باشد. نتایج نشان می‌دهد که در این مطالعه به‌طور مشترک در هر سه گونه، جمعیت دارای بیشترین میزان ترکیبات فنولیک از استان گیلان بوده است. همچنین در گونه‌های *M. aquatica* و *M. pulegium*، جمعیت دارای بیشترین میزان آنتوسیانین و رنگیزه‌های فتوسنتزی از استان مازندران و در مورد گونه *M. longifolia* بازهم از استان گیلان بوده است. در گونه‌های *M. aquatica* و *M. longifolia*، جمعیت دارای بیشترین میزان گلوکز از استان گیلان و در مورد گونه *M. pulegium* از استان مازندران بوده است. باتوجه به خواص بیوشیمیایی و تغذیه‌ای این متابولیت‌ها، به‌طور مثال خاصیت آنتی‌اکسیدانی اغلب ترکیبات فنولیک و کاروتنوئیدها (۲۳)، می‌توان جمعیت‌های ذکر شده را جهت استفاده در صنایع دارویی و غذایی مورد توجه بیشتری قرارداد.

دراین پژوهش، علاوه بر مقایسه بین جمعیت‌های جنس *Mentha* که در بالا ذکر شد، گونه‌های مورد مطالعه نیز ازلحاظ این متابولیت‌های گیاهی مقایسه شدند. ارزیابی میانگین به‌دست آمده از جمعیت‌های هرگونه نشان می‌دهد که تفاوت معنی‌داری بین میزان فنل، فلاونوئید، فلاونول، ساپونین و کاروتنوئید کل و کلروفیل a و b در بین گونه‌ها وجود داشته (جدول ۵) و در همه صفات ذکر شده، گونه *M. aquatica* بیشترین میزان را نشان می‌دهد. مقایسه این گونه‌ها نشان می‌دهد که اغلب گونه *M. aquatica* تفاوت معنی‌داری با دو گونه دیگر داشته و به نظر می‌رسد گونه‌های *M. pulegium* و *M. longifolia* ازلحاظ این متابولیت‌های گیاهی، همانند متابولیت‌های موجود در اسانس، به هم نزدیک‌تر می‌باشند. علی‌رغم میزان بیشتر آنتوسیانین در گونه *M. aquatica* نسبت به دو گونه دیگر، تفاوت معنی‌داری در میزان آنتوسیانین در بین این گونه‌ها مشاهده نشد. بررسی میزان قندهای مانوز، گلوکز، زایلوز و فروکتوز نشان می‌دهد که اگرچه تفاوت معنی‌داری در بین این گونه‌ها مشاهده نشده است، اما گونه *M. pulegium* در مورد همه قندهای سنجش شده، بیشترین مقدار را نشان می‌دهد. مقایسه ترکیبات فنولی، فلاونوئید و تانن کل در ۶ گونه از جنس *Mentha* ی جمع‌آوری شده از الجزایر شامل *M. aquatica*، *M. arvensis*، *M. piperita*، *M. pulegium*، *M. rotundifolia* و *M. villosa* نیز تفاوت معنی‌داری را در بین گونه‌ها نشان داد به‌طوری که گونه *M. aquatica* دارای بیشترین میزان از این ترکیبات و دارای بالاترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد (۲۳). همچنین، بررسی تعدادی از متابولیت‌های گیاهی استخراج‌شده از ۵ گونه از جنس *Mentha* ی کشت شده در شرایط گلخانه‌ای در لهستان، نشان داد که گونه *M. aquatica* دارای بیشترین میزان از ترکیبات پلی فنولیک و کلروفیل کل می‌باشد (۳۴). نتایج به‌دست آمده در این پژوهش و سایر مطالعات به این نکته اشاره داد که گونه *M. aquatica* در مقایسه با دو گونه دیگر متابولیت‌هایی نظیر ترکیبات فنولیک و رنگیزه‌های فتوسنتزی را به میزان بیشتری تولید می‌کند، بنابراین می‌توان خواص آنتی‌اکسیدانی بالاتری را در این‌گونه گیاهی انتظار داشت. همچنین باتوجه به تولید میزان بیشتری از متابولیت‌های اولیه‌ای نظیر قندها در گونه *M. pulegium*، می‌توان این‌گونه را جهت استفاده‌های خاص در صنایع غذایی و دارویی معرفی نمود.

مطالعات ریخت‌شناسی دانه گرده در تیره نعنائیان جهت رده‌بندی این تیره نقش بسیار مهمی داشته‌اند که در این راستا، چندین گزارش نیز ارائه شده است؛ اما مطالعات کمی روی جنس *Mentha* انجام شده (۲۵، ۴۰و ۵۷) و تا به حال گزارشی از این جنس در ایران ارائه نشده است. دراین پژوهش، برای اولین بار مطالعه گرده‌شناسی این جنس در شمال ایران انجام شد. مقایسه دانه‌های گرده گونه‌های *M. aquatica*، *M. pulegium* و *M. longifolia* در این مطالعه نشان داد که این گونه‌ها در خصوصیات کیفی دانه گرده، شامل شکل و نوع دانه گرده، نوع شیار و تزئینات سطح اگزین تقریباً یکسان بوده و تفاوت زیادی مشاهده نشد (جدول ۶). در جمعیت‌های بررسی شده، شکل دانه گرده به‌صورت تقریباً کروی (P/E=۰٫۹۸–۱٫۰۴) (جدول ۶)، نوع دانه گرده به‌صورت منفرد، نوع شیار به‌صورت ۶ شیاری و تزئینات سطح اگزین به‌صورت شبکه‌ای بوده است. مقایسه پارامترهای کمّی شامل طول قطبی، عرض استوایی و نسبت آنها، عرض شیار و فاصله دو شیار نشان داد که تفاوت معنی‌داری در بین گونه‌های مورد مطالعه وجود دارد (جدول ۷). میانگین به‌دست آمده از جمعیت‌های هرگونه نشان می‌دهد که در همه پارامترهای اندازه‌گیری شده، گونه *M. aquatica* و گونه *M. pulegium* بترتیب دارای بیشترین و کمترین مقادیر می‌باشند. نتایج به‌دست آمده، اغلب تأیید کننده گزارش‌های پیشین می‌باشند. مطالعه انجام شده روی ۵ گونه از جنس *Mentha* شامل *M. arvensis*، *M. aquatica*، *M. pulegium*، *M. longifolia* و *M. spicata* در صربستان نشان داد که همه گونه‌ها دارای ۶

شیار بوده و شکل کروی کشیده داشتند. همچنین، سایز دانه گرده گونه *M. aquatica* بزرگتر از گونه‌های *M. pulegium* و *M. longifolia* بود؛ در حالیکه، برخلاف مطالعه حاضر، سایز دانه گرده در گونه *M. longifolia* و نسبت طول قطبی به عرض استوایی در گونه *M. pulegium* بطور قابل‌ملاحظه‌ای، بترتیب، کوچکتر و بزرگتر از سایر گونه‌های مورد مطالعه بوده است (۴۰). طول قطبی، عرض استوایی و نسبت به‌دست آمده از آنها در گونه *M. longifolia* مورد مطالعه در پاکستان نتایج مشابهی را بامطالعه حاضر نشان می‌دهد (۵۷). مطالعه ۲۰ گونه متعلق به ۱۶ جنس از تیره نعنائیان در عربستان صعودی، آنها را به دو گروه ۳ و ۶ شیاری تقسیم‌بندی نمود. سایز دانه گرده در بین جنس‌ها متغیر ولی در بین گونه‌های یک جنس تقریباً یکسان بود. با توجه به تزئینات سطحی اگزین، گونه‌های مورد مطالعه به ۶ گروه با تزئینات خاص خود تقسیم‌بندی شدند. این تنوع تزئینات سطحی اگزین اشاره دارد به این که ریخت‌شناسی دانه گرده می‌تواند صفت ارزشمندی در رده‌بندی گیاهان این تیره باشد. ضمناً بررسی دانه گرده گونه *M. longifolia* در این مطالعه نتایج مشابهی را برای پارامترهای طول قطبی، عرض استوایی و نسبت بین آنها بامطالعه حاضر نشان داد (۳۰). مطالعه گونه *M. pulegium* در بین گونه‌های موجود در طایفه Mentheae و بویژه زیر طایفه Menthinae نشان داد که دانه‌های گرده همه گونه‌ها دارای ۶ شیار بوده و دانه گرده گونه *M. pulegium* دارای کوچکترین سایز در بین گونه‌های مورد مطالعه می‌باشد. جمعیت‌های مختلف مورد مطالعه نیز اشکال مختلفی از دانه گرده مانند کروی، کروی پهن شده و کروی کشیده داشتند (۵۴). مطالعه ۱۰ گونه از جنس *Mentha* در ترکیه نشان داد که، مطابق با نتایج مطالعه حاضر، در همه آنها دانه گرده به‌صورت منفرد و دارای ۶ شیار بوده و تزئینات روی سطح اگزین به‌صورت شبکه‌ای بوده است. شکل دانه‌های گرده همانند مطالعه حاضر در حالت کلی به‌صورت کروی بوده است، اما تفاوت اندکی وجود داشته است که در گونه *M. aquatica* به کاملاً کروی، در گونه *M. longifolia* و *M. pulegium* به‌صورت کروی پهن شده گزارش شده است. سایز دانه گرده با توجه به طول قطبی و عرض استوایی همانند مطالعه حاضر دارای بیشترین مقدار در گونه *M. aquatica* و دارای کمترین مقدار در گونه *M. pulegium* بوده است (۲۵). مقایسه نتایج مطالعه حاضر و گزارشات پیشین نشان می‌دهد که دانه‌های گرده گونه‌های مختلف، ویژگی‌های ریخت‌شناسی خاص خود را داشته و این ویژگی‌ها را در مطالعات مختلف تقریباً مشابه نشان داده‌اند. بنابراین، خصوصیات دانه گرده جنس *Mentha* می‌تواند جهت کاربردهای تاکسونومیکی ارزشمند باشد و احتمالاً برای رده‌بندی آنها مورد استفاده قرار گیرد.

مقایسه خصوصیات بیوشیمیایی و گرده‌شناسی گونه‌های *M. aquatica*، *M. pulegium* و *M. longifolia* در شمال ایران نشان داد که تفاوت معنی‌داری ازلحاظ خصوصیات ارزیابی شده در بین این گونه‌ها وجود دارد. این گونه‌ها بترتیب ترکیباتی نظیر بتاکاریوفیلن، پولگون و دی-کارون را به مقدار بسیار زیاد تولید می‌کنند. وجود مقادیر بسیار زیادی از بتاکاریوفیلن و جرماکرن-دی در گونه *M. aquatica* و دی-کارون در گونه *M. longifolia* مورد مطالعه، احتمالاً به شیمیوتایپ‌های جدیدی اشاره دارد. با توجه به ترکیبات گزارش شده در اسانس این گونه‌ها به نظر می‌رسد که به علت حضور ترکیباتی نظیر پولگون و پیپریتنون و مشتقاتشان در گونه‌های *M. pulegium* و *M. longifolia*، این دو گونه شباهت بیشتری به هم داشته و متفاوت‌تر از گونه *M. aquatica* می‌باشند. بررسی میزان تعدادی از متابولیت‌های گیاهی کل در این گونه‌ها تفاوت معنی‌داری را نشان داده و گونه *M. aquatica* میزان بیشتری از این متابولیت‌ها را تولید نموده است، که با توجه به خصوصیات آنتی‌اکسیدانی این متابولیت‌ها، این‌گونه گیاهی جهت استفاده بیشتر در صنایع دارویی و غذایی پیشنهاد می‌گردد. به نظر می‌رسد در مورد میزان

متابولیت‌های گیاهی کل نیز دو گونه *M. pulegium* و *M. longifolia* به هم نزدیک‌تر باشند. بررسی میزان متابولیت‌های اولیه‌ای مانند کربوهیدرات‌های محلول نشان می‌دهد که اگرچه تفاوت معنی‌داری در بین گونه‌ها وجود ندارد اما گونه *M. pulegium* مقادیر بیشتری از این کربوهیدرات‌ها را نشان داده است. مطالعه گرده‌شناسی این گونه‌ها نشان داده است که دانه‌های گرده آنها تقریباً پارامترهای کیفی یکسانی داشته در حالیکه در مورد پارامترهای کمّی، خصوصاً پارامترهای طول قطبی و عرض استوایی، تفاوت معنی‌داری وجود داشته است و گونه‌های *M. aquatica* و *M. pulegium* بترتیب بیشترین و کمترین مقادیر را نشان دادند. به نظر می‌رسد مطالعه ریخت‌شناسی دانه گرده و متابولیت‌های ثانویه موجود در اسانس و عصاره‌های این گونه‌ها می‌تواند در شناسایی و تاکسونومی این گونه‌ها مؤثر بوده و در رده‌بندی آنها کمک نماید.

منابع

۱- امید بیگی، ر.، ۱۳۸۴. تولید و فرآوری گیاهان دارویی، جلد دوم، انتشارات آستان قدس رضوی به نشر، ۴۳۸ صفحه.

۲- آذرکیش، پ.، مقدم، م.، خاکدان، ف.، و قاسمی پیربلوطی، ع.، ۱۳۹۷. بررسی و مقایسه خصوصیات ریختی، محتوای فنل کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی جمعیت‌های مختلف سه گونه از گیاه دارویی *Prangos spp.* در رویشگاه‌های مختلف استان‌های فارس، کهگیلویه و بویراحمد. اکوفیتوشیمی گیاهان دارویی، ۶(۳)، صفحات ۱-۲۰.

۳- جمزاد، ز.، ۱۳۹۱. فلور ایران (خانواده نعنائیان)، انتشارات موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، ۱۷۰۲ صفحه.

۴- حسنی‌نژاد، م.، جمزاد، ز.، و یوسفی، م.، ۱۳۹۰. مطالعه دانه گرده در جنس *Scutellaria* L. از خانواده Lamiaceae در ایران، تاکسونومی و بیوسیستماتیک، ۳(۷)، صفحات ۳۳-۴۴.

۵- حسینی، س. ز.، فیضی، ح.، وطن‌دوست جرتوده، ص.، و علی‌پناه، م.، ۱۳۹۶. بررسی و مقایسه ترکیب‌های شیمیایی اسانس سرشاخه‌های گلدار گیاه دارویی *Mentha longifolia* L. Hudson. در رویشگاه‌های مختلف استان‌های فارس و خراسان رضوی، فصلنامه اکوفیتوشیمی گیاهان دارویی، ۱۷(۱)، صفحات ۳۰-۳۹.

۶- زرگری، ع.، ۱۳۷۶. گیاهان دارویی، جلد چهارم، انتشارات دانشگاه تهران، ۹۶۹ صفحه.

۷- زرین‌کمر، ف.، و عرب‌زاده قهیازی، ن.، ۱۳۹۸. مورفولوژی کرک‌ها و بررسی ترکیبات اسانس در مراحل مختلف تکوین پونه معطر (*Mentha pulegium* L.)، مجله پژوهشهای گیاهی، ۳۲(۴)، ۷۹۲-۸۰۵.

۸- سعیدی، ک.، بابا احمدی، ه.، و صالح جونقانی، ر.، ۱۳۸۹. شناسایی ترکیبات اسانس گیاه دارویی پونه *Mentha longifolia* (L.) Hudason. در شهرکرد، همایش ملی گیاهان دارویی، ساری، جهاد دانشگاهی واحد مازندران، https://www.civilica.com/Paper-HERBAL01-HERBAL01_875.html

۹- سعیدی، ک.، لری گوئینی، ز.، کریمی، م.، مختاریان، ف.، و آزاده، ز.، ۱۳۹۷. مطالعه کمیت و کیفیت اسانس گیاهان دارویی *Thymus vulgaris* L.، *Melissa officinalis* L. و *Achilleamill efoilum* L. کشت شده در شرایط اقلیمی شهرکرد، اکوفیتوشیمی گیاهان دارویی، ۶(۳)، صفحات ۲۱-۳۱.

۱۰- غلامی پورناکی، پ.، آقازاده، م.، و صادقی، م. ر.، ۱۳۹۶. بررسی ترکیب شیمیایی و فعالیت ضد میکروبی اسانس پونه کوهی (*Mentha pulegium*) منطقه ماکو و اثر مهاری آن بر روی استافیلوکوکوس اورئوس در سوسیس، تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک، ۱۱۷، صفحات ۶۹-۷۷.

۱۱- غنی، ع.، نعمتی، س. ح.، عزیزی، م.، سحرخیز، م. ج.، و فارسی، م.، ۱۳۹۲. بررسی تنوع بیوشیمیایی عصاره تعدادی از جمعیت‌های نعنای خوراکی (*Mentha spicata* L.)، نشریه علوم باغبانی، ۲۷(۴)، صفحات ۴۳۳-۴۴۳.

۱۲- محسن پور، م.، وفادار، م.، میقانی، ح.، و وطن‌خواه، ا.، ۱۳۹۶. بررسی تأثیر شرایط محیطی بر میزان و ترکیبات شیمیایی روغن اسانسی گیاه پونه آبی (*Mentha aquatica* L.) از رویشگاه‌های مختلف استان مازندران، مجله پژوهش‌های گیاهی، ۳۰(۲)، صفحات ۴۳۲-۴۴۳.

۱۳- محمودی اطاقوری، آ.، براری، س.، و سلیم بهرامی، م.، ۱۳۹۳. بیوسیستماتیک گیاهی، انتشارات یزدا، ۲۴۰ صفحه.

۱۴- محمودی اطاقوری، آ.، و حسن‌نژاد دیوکلایی، ح.، ۱۳۹۳. گرده‌شناسی. انتشارات یزدا، ۱۵۲ صفحه.

۱۵- نظیفی، ا.، موافقی، ع.، ناظمیه، ح.، اثنی‌عشری، س.، بامداد مقدم، ص.، و دل‌آذر، ع.، ۱۳۸۹. بررسی فیتوشیمیایی اسانس حاصل از بخش‌های مختلف گیاه *Ornithogalum cuspidatum* Bertol، علوم دارویی، ۱۶(۱)، صفحات ۳۷-۴۶.

۱۶- نوروزی، و.، یوسف‌زاده، س.، اسیلان، ک.، و منصوری فر، س.، ۱۳۹۶. بررسی میزان تغییرات اسانس، کلروفیل، کاروتنوئید، آنتوسیانین و فلاونوئید گیاه دارویی *Mentha longifolia* (L.) Hods. subsp. *longifolia* در رویشگاه‌های مختلف مرند، فصلنامه اکوفیتوشیمی گیاهان دارویی، ۱۷(۱۹)، صفحات ۵۲-۶۴.

17- Abd El-Zaher, M. A. M., Badr, A., El-Galaly, M. A., Mobarak, A. A., and Hassan, M. G., 2005. Genetic diversity among *Mentha* populations in Egypt as reflected by isozyme polymorphism. International Journal of Botany, 1(2), PP: 188-195.

18- Adams, R. P., 2007. Identification of essential oil component by gas chromatography. Quadropole Mass Spectroscopy, Allured Publishing Corporation, Illinois, U.S.A, 804 p.

19- Ainsworth, E. A., and Gillespie, K. M., 2007. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent, Nature Protocols. 2(4), PP: 875-877.

20- Arnon, D. I., 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts, Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiology, 24(1), PP: 1-15.

21- Atalay, Z., Celep, F., Bilgili, B., and Dogan, M., 2016. Pollen morphology of the genus *Lamium* L., (Lamiaceae) and its systematic implications. Flora, 219, PP: 68-64.

22- Becerro, M. A., and Paul, V. J., 2004. Effects of depth and light on secondary metabolites production and *Cyanobacterial symbionts* of the sponge Dysidea granulose, .Marine Ecology Progress Series, 280, PP: 115-128.

23- Benabdallah, A., Rahmoune, C., Boumendje, M., Aissi, O., and Messaoud, C., 2016. Total phenolic content and antioxidant activity of six wild *Mentha* species (Lamiaceae) from northeast of Algeria. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 6(9), PP: 760-766.

24- Buckee, G. K., and Haroitt, R., 1978. Measurement of carbohydrates in wort and beer-a review. J. Inst. Brew, 84(1), PP: 13-21.

25- Celenk, S., Tarimcilar, G., Bicakci, A., Kaynak, G., and Malyer, H., 2008. A palynological study of the genus *Mentha* L. (Lamiaceae), Journal of the Institute of Brewing, 157(1), PP: 141-154.

26- Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., and Chern, J. C., 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. Journal of Food and Drug Analysis, 10(3), PP: 178-182.

27- Dai, D. N., Thang, T. D., Emmanuel, E. E., Abdulkabir, O. O., and Ogunwande, I. A., 2015. Study on essential oil of *Mentha aquatica* L. from Vietnam. American Journal of Essential Oils and Natural Products, 2(4), PP: 12-16.

28- Davise, F. S., and Albrigo, L. G., 1994. Citrus. CAB, International Press, Wallingford, UK. 254 p.

29- Delazar, A., Nazifi, E., Movafeghi, A., Nahar, L., Nazemieh, H., Moghadam, S. B., and Sarker, S. D., 2009. GC-MS analysis of *Ornithogalum procerum*. DARU, 17(1), PP: 33-36.

30- Doaigey, A. R., El-Zaidy, M., Alfarhan, A., Milagy, A. E., and Jacob, T., 2018. Pollen morphology of certain species of the family Lamiaceae in Saudi Arabia, Saudi Journal of Biological Sciences. 25(2), PP: 354-360.

31- Dubois, M., Gilles, k. A., Hamilton, j. K., Rebers, P. A., and Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances, Analytical Chemistry, 28(3), PP: 350-356.

32- Esmaeili, A., Rustaiyan, A., Masoudi, S. H., and Nadji, K., 2006. Composition of the essential oils of *Mentha aquatica* L., and *Nepeta meyeri* Benth, from Iran, Journal of Essential Oil Research, 18(3), PP: 263-265.

33- Gobert, V., Moja, S., Colson, M., and Taberlet, P., 2002. Hybridization in the section Mentha (Lamiaceae) inferred from AFLP markers, American Journal of Botany, 89(12), PP: 2017-2023.

34- Grzeszczuk, M., and Jadczak, D., 2009. Estimation of biological value of some species of mint (*Mentha* L.). Herba Polonica, 55(3), PP: 193-199.

35- Halbritter, H., Weber, M., Zetter, R., Frosch-Radivo, A., Buchner, R., and Hesse, M., 2006. PalDat-Illustrated handbook on pollen terminology, University of Vienna, Vienna:

Society of the Promotion of Palynological Research in Austria. 61 p.

36- Hassanpouraghdam, M. B., Akhgari, A. B., Aazami, M. A., and Emarat-Pardaz, J., 2011. New menthone type of *Mentha pulegium* L. volatile oil from Northwest Iran. Czech Journal of Food Sciences, 29(3), PP: 285-290.

37- Hawrył, M. A., Skalicka-Woźniak, K., Świeboda, R., Niemiec, M., Stępak, K., Waksmundzka-Hajnos, M., Hawrył, A., and Szymczak, G., 2015. GC-MS fingerprints of mint essential oils, Open Chemistry, 13(1), PP: 1326-1332.

38- Hemmati, K. H., Ghasemnejad, A., Mashayekhi, K., and Bashiri-Sadr, Z., 2012. Site effect on some important flavonoid compounds of Linden tree (*Tilia platifolia* L.). International Journal of Plant Production, 19(2), PP: 141-148.

39- Hiai, S., Oura, H., and Nakajima, T., 1976. Color reaction of some sapogenins with vanillin and sulfuric acid. Planta Medica, 29(2), PP: 116-22.

40- Jancic, R., and Polic, D., 1989. Morphology of pollen grains of the genus *Mentha* L., (Lamiaceae), Acta Botanica Croatica, 48(1), PP: 161-164.

41- Jerkovic, I., and Mastelic, J., 2001. Composition of Free and Glycosidically Bound Volatiles of *Mentha aquatica* L., Croatica Chemica Acta, 74(2), PP: 431-439.

42- Khalilipour, A., and Dejam, M., 2014. Essential oil composition of Pennyroyal (*Mentha pulegium* L.) from Southern Iran. Journal of Herbal Drugs, 5(1), PP: 33-38.

43- Khanuja, S. P. S., Shasany, A. K., Srivastava, A., and Kumar, S., 2000. Assessment of genetic relationships in *Mentha* species. Euphytica, 111(2), PP: 121-125.

44- Kokkini, S., Hanlidou, E., Karousou, R., and Lanaras, T., 2004. Clinal variation of *Mentha pulegium* essential oils along the climatic gradient of Greece, Journal of Essential Oil Research, 16(6), PP: 588-593.

45- Lawrence, B. M., 1978. A study of monoterpene interrelations in the genus *Mentha* with special reference to the origin of pulegone and menthofuran, PhD dissertation. Groningen University, Groningen, The Netherlands.

46- Lawrence, B. M., 2006. Mint: the genus *Mentha*, CRC Press: Boca Raton, FL, USA. 598 p.

47- Lichtenthaler, H. K., 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. Methods in Enzymology, 148, PP: 350-382.

48- Lorenzo, D., Paz, D., Dellacassa, E., Davies, P., Vila, R., and Cañigueral, S., 2002. Essential oils of *Mentha pulegium* and *Mentha rotundifolia* from Uruguay, Brazilian Archives of Biology and Technology, 45(4), PP: 519-524.

49- Madland, E., 2013. Extraction, isolation and structure elucidation of saponins from *Herniaria incana*. Master's thesis, Norwegian University of Science and Technology, Norway.

50- Marinova, D., Ribarova, F., and Atanassaova M., 2005. Total phenolics and total flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables, Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy, 40(3), PP: 255-260.

51- Masukasu, H., Karin, O., and Kyoto, H., 2003. Enhancement of anthocyanin biosynthesis by sugar in radish (*Raphanus sativus*) hypocotyls. Plant Science, 164(2), PP: 259-265.

52- Miliauskas, G., Venskutonis, P. R., and Van Beek, T. A., 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. Food Chemistry, 85(2), PP: 231-237.

53- Missouri Botanical Garden. 2011. Accessed on the web at http://www.tropicos.org/

54- Moon, H. K., Vinckier, S., Smets, E., and Huysmans, S., 2008. Palynological evolutionary trends within the tribe Mentheae with special emphasis on subtribe Menthinae (Nepetoideae: Lamiaceae). Plant Systematics and Evolution, 275(1-2), PP: 93-108.

55- Pakravan, M., Dastpak, A., Sonboli, A., and Khalaj, Z., 2018. A taxonomic reassessment of *Consolida* (Ranunculaceae) species: insight from morphological and molecular data, Journal of Genetic Resources, 4(1), PP: 14-25.

56- Penfold, A. R., and Morrison, F. R., 1927. The occurrence of a number of varieties of Eucalyptus dives as determined by chemical analyses of the essential oils, Journal and Proceedings of the Royal Society of New South Wales, 61, PP: 54-67.

57- Perveen, A., and Qaiser, M., 2003. Pollen morphology of the family Labiatae from Pakistan, Pak, Journal Bot., 35(5), PP: 671-693.

58- Rechinger, K. H., 1982. Flora Iranica, Labiatae, No., 150. Akademische Druck-u Verlagsanstalt, Graz (Austria), Austria. 479 p.

59- Reynolds, T., 2007. The evolution of chemosystematics. Phytochemistry, 68, PP: 887-2895.

60- Sharopov, F. S., Sulaimonova, V. A., and Setzer, W. N., 2012. Essential oil composition of *Mentha longifolia* from wild populations growing in Tajikistan, Journal of Medicinally Active Plants, 1(2), PP: 76-84.

61- Stace, C. A., 1991. Plant taxonomy and biosystematics. Cambridge University Press., 272 p.

62- Sutour, S., Tomi, F., and Bradesi, P., 2011.Casanova, JournalChemical composition of the essential oil from corsican *Mentha aquatica* - combined analysis by GC (RI), GC-MS and ^{13}C NMR spectroscopy. Natural Product Communications, 6(10), PP: 1479-1482.

63- Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Batista, I., Serrano, C., Matos, O., Neng, N. R., Jorge, J. M. F., Saraiva, J. A., and Nunes, M. L., 2012. European pennyroyal (*Mentha pulegium*) from Portugal: Chemical composition of essential oil and antioxidant and antimicrobial properties of extracts and essential oil. Industrial Crops and Products, 36(1), PP: 86-87.

64- Verma, R. S., Pandey, V., Chauhan, A., and Tiwari, R., 2015. Essential oil composition of *Mentha longifolia* (L.) L., collected from Garhwal region of western-Himalaya., Journal of Essential Oil Bearing Plants, 18(4), PP: 957-966.

65- Wagner, G. J., 1979. Content and vacuole/extra vacuole distribution of neutral sugars free amino acids, and anthocyanins in protoplast. Plant Physiology, 64(1), PP: 88-93.

66- Wink, M., and Waterman, P. G., 1999. Chemotaxonomy in relation to molecular phylogeny of plants. Biochemistry of plant secondary metabolism. Sheffield Academic Press and CRC Press, Sheffield, PP: 300-341.

67- Zantar, S., Garrouj, D. E., Pagán, R., Chabi, M., Laglaoui, A., Bakkali, M., and Zerrouk, M. H., 2015. Effect of harvest time on yield, chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Thymus vulgaris* and *Mentha pulegium* essential oils. European Journal of Medicinal Plants, 8(2), PP: 69-77.

Phytochemical and palynological study of several species of *Mentha* L. in north of Iran

Yahyaabadi Y., Mahmoudi Otaghvari A. and Nazifi E.

Dept. of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Mazandaran, I.R. of Iran.

Abstract

The genus *Mentha* L. is one of the most important taxa of the Lamiaceae family which is widely used in the food and pharmaceutical industries. Because of wide variety in morphological characteristics and frequent hybridization, the taxonomic classification of this genus is complex. Phytochemical and palynological studies, along with morphological characteristics, can be helpful in plant systematic and taxonomy. In this study, plant metabolites of various populations of *M. aquatica*, *M. pulegium* and *M. longifolia* species in Gilan, Mazandaran and Golestan provinces, by gas chromatography-mass spectrometry and spectrophotometeric methods, as well as their pollen morphology with scanning electron microscope were studied. The results showed that β-caryophylline and germacrene-D in *M. aquatica*, pulegone and menthone in *M. pulegium* and D-carvon and piperitenone oxide in *M. Longifolia* were the major chemical compounds in the essential oil. Moreover, the total amount of phenols, flavonoids, flavonols, saponins, carotenoids and chlorophyll a and b were significantly different among species and *M. aquatica* showed the highest amount of these secondary metabolites. The pollen grains in different populations of these species were monad, hexacolpate and often prolate-spheroidal with reticulate tectum surface. The polar length (P), equatorial width (E), P to E ratio, colpus width and the distance between two colpi in the pollen grains of these species showed significant differences; *M. aquatica* and *M. pulegium* species had the highest and lowest values. The results suggest that the secondary metabolites and the morphology of pollen grains can be effective in identification and taxonomic classification of these species.

Key words: Palynology, Taxonomy, Phytochemistry, *Mentha*