Journal of
Plant Environmental Physiology
Print ISSN: 2423-7671
Online ISSN: 2783-4689
Phycological Society of Iran

Changes in the phytochemical content and antioxidant activity of the medicinal plant *Clematis ispahanica* Boiss. in three natural habitats of Semnan province

Mohammad Mehdi Zolfaghari[1], Reza Naderi[2], Atefe Amirahmadi[3]*

[1] Department of Plant Sciences, Faculty of Biology, Damghan University, Damghan, Iran,
Email: mm.zolfaghari@std.du.ac.ir
[2] Department of Plant Sciences, Faculty of Biology, Damghan University, Damghan, Iran,
Email: rezanaderia@du.ac.ir
[3]Department of Plant Sciences, Faculty of Biology, Damghan University, Damghan, Iran,
Email: a.amirahmadi@du.ac.ir

Article type:
Research article

Article history
Received: 09.06.2023
Revised: 09.09.2023
Accepted: 14.09.2023
Published:22.12.2023

Keywords
Biochemical tests
Ecophysiology
Habitat
Medicinal plant
Salinity stress

Abstract

In this study the antioxidant activity and physiological properties of *Clematis ispahanica* from different habitats of Semnan province were investigated. Three natural habitats of this plant were identified in Semnan province (Cheshmeh Ali, Dibaj and Mojen) and leaf were sampled from plants. Chlorophyll, carotenoid, anthocyanin, proline, protein, phenol, flavonoid, reducing sugars, hydrogen peroxide, malondialdehyde, catalase and guaiacol peroxidase activities were measured. Also, the antioxidant properties of plants were investigated using DPPH radical scavenging capacity. Soil analysis of all three habitats was also done. The experiment was carried out as a completely random design with 3 repetitions and comparison of the average data using Duncan's test at a probability level of 5%. The results showed that the amount of plant metabolites, including soluble sugars, phenolic compounds and flavonoids, catalase enzyme activity and antioxidant properties was the highest in Cheshmeh Ali habitat and the lowest in Mojen habitat. On the other hand, the amount of plant defense compounds including proline, hydrogen peroxide, malondialdehyde and guaiacol peroxidase enzyme activity was the lowest in Cheshmeh Ali habitat and the highest in Mojen habitat. The amount of chlorophyll, carotenoids, anthocyanin and protein was also the lowest in the Dibaj habitat with the highest altitude above sea level. The results of this research showed that the Cheshmeh Ali habitat with the highest amount of metabolites and the lowest amount of defense compounds is the least stressful habitat, and conversely, the Mojen habitat is the most stressful habitat for *C. ispahanica*.

Cite this article as: Zolfaghari, M.M., Naderi, R., Amirahmadi, A. (2023). The Changes in the phytochemical content and antioxidant activity of the medicinal plant *Clematis ispahanica* Boiss. in three natural habitats of Semnan province. *Journal of Plant Environmental Physiology*, 18(4): 49-64.

©The author(s)
Publisher: Islamic Azad University, Gorgan branch

فیزیولوژی محیطی گیاهی
شاپا چاپی: ۲۴۲۳-۷۶۷۱
شاپا الکترونیکی: ۲۷۸۳-۴۶۸۹
PSI
انجمن جلبک شناسی ایران
Phycological Society of Iran
دانشگاه آزاد اسلامی
واحد گرگان

تغییر محتوای فیتوشیمیایی و فعالیت آنتی اکسیدانتی گیاه دارویی کلماتیس اصفهانی (*Clematis ispahanica* Boiss.) در سه رویشگاه طبیعی استان سمنان

محمدمهدی ذوالفقاری[۱]، رضا نادری[۲]، عاطفه امیراحمدی[۳]*

[۱] گروه علوم گیاهی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه دامغان، دامغان، ایران، رایانامه: mm.zolfaghari@std.du.ac.ir
[۲] گروه علوم گیاهی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه دامغان، دامغان، ایران، رایانامه: rezanaderia@du.ac.ir
[۳] گروه علوم گیاهی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه دامغان، دامغان، ایران، رایانامه: a.amirahmadi@du.ac.ir

نوع مقاله:
مقاله پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۳/۱۹
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۶/۱۸
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۲۳
تاریخ چاپ: ۱۴۰۲/۱۰/۰۱

واژه‌های کلیدی:
اکوفیزیولوژی
تنش شوری
سنجش‌های بیوشیمیایی
زیستگاه
گیاهان دارویی

چکیده

در این مطالعه پتانسیل آنتی‌اکسیدانتی و خواص فیزیولوژیکی گیاه کلماتیس اصفهانی از رویشگاه‌های مختلف استان سمنان بررسی شد. سه رویشگاه طبیعی این گیاه در استان سمنان (چشمه علی، دیباج و مجن) شناسایی و نمونه برداری از برگ گیاهان صورت گرفت. میزان کلروفیل، کاروتنوئید، آنتوسیانین، پرولین، پروتئین، فنول، فلاونوئید، قندهای احیاکننده، پراکسیدهیدروژن، مالون دی آلدهید و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و گایاکول پراکسیداز اندازه گیری شد. همچنین خواص آنتی اکسیدانتی گیاهان با استفاده از ظرفیت مهار رادیکال‌های DPPH مورد بررسی قرار گرفت. آنالیز خاک هر سه رویشگاه نیز انجام شد. آزمایش به‌صورت طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد. نتایج نشان داد که مقدار متابولیت‌های گیاه شامل قندهای محلول، ترکیبات فنولی و فلاونوئیدها، فعالیت آنزیم کاتالاز و خواص آنتی اکسیدانتی در رویشگاه چشمه علی در بالاترین و در رویشگاه مجن در کمترین میزان قرار دارد. در مقابل مقدار ترکیبات دفاعی گیاه شامل پرولین، پراکسیدهیدروژن، مالون دی آلدهید و فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در رویشگاه چشمه علی در کمترین و در رویشگاه مجن در بالاترین میزان قرار دارد. مقدار کلروفیل، کارتنوئیدها، آنتوسیانین و پروتئین نیز در رویشگاه دیباج با بالاترین ارتفاع از سطح دریا در کمترین میزان قرار دارد. نتایج این تحقیق نشان داد که رویشگاه چشمه علی با داشتن بیشترین میزان متابولیت‌ها و کمترین میزان ترکیبات دفاعی کم تنش‌ترین رویشگاه و بالعکس رویشگاه مجن پرتنش‌ترین رویشگاه برای گیاه کلماتیس اصفهانی می‌باشد.

استناد: ذوالفقاری، محمدمهدی؛ نادری، رضا؛ امیراحمدی، عاطفه. (۱۴۰۲). تغییر محتوای فیتوشیمیایی و فعالیت آنتی‌اکسیدانتی گیاه دارویی کلماتیس اصفهانی (*Clematis ispahanica* Boiss) در سه رویشگاه طبیعی استان سمنان. *فیزیولوژی محیطی گیاهی*، ۱۸ (۴)، ۶۴-۴۹.

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان
© نویسندگان.

مقدمه

گیاهان دارویی، گیاهانی هستند که دارای مواد مؤثره بوده و کاربردهای پزشکی برای انسان و دام دارند. این گیاهان در صنایع مختلف از قبیل تولید داروهای گیاهی، طعم دهنده، معطر کننده، سموم، علفکش طبیعی و نگهدارنده‌ی مواد غذایی استفاده می‌شوند (Ghasemi Pirbalouti, 2010). گیاهان دارویی به دلیل منشأ طبیعی خود، دارای عوارض جانبی کمتری نسبت به مواد شیمیایی هستند و همچنین هزینه کمتری در تولید دارو دارند (Asadi et al., 2013; Asadi-Semnani et al., 2013). امروزه گیاهان دارویی به عنوان منبع ارزشمندی از ترکیبات طبیعی برای استفاده در تولید داروهای ضد میکروبی، ضد ویروسی، ضد قارچی، ضد سرطانی و آنتی‌اکسیدانتی در نظر گرفته می‌شوند (Papari Moghadam Fard et al., 2020). مصرف گیاهان دارویی و فرآورده‌های آن‌ها نقش مهمی در اقتصاد جهانی دارد به طوری که طبق گزارشات سازمان جهانی بهداشت، گردش مالی و تجارت جهانی داروهای گیاهی تا سال ۲۰۵۰ به ۵ تریلیون دلار خواهد رسید (Handa et al., 2006). از مجموع ۸ هزار گونه گیاهی در ایران، ۲۶۰۰ گونه بومی ایران هستند و حدود ۱۵۰۰ گونه اثرات دارویی ثابت شده‌ای دارند که از این تعداد ۲۴۴ گونه دارویی در استان سمنان می‌روید (Naderi et al., 2021; Amirahmadi et al., 2022). اگرچه نوع و میزان ترکیبات شیمیایی در گیاهان به عوامل ژنتیکی بستگی دارد اما عوامل محیطی مانند ارتفاع، میزان و جهت شیب، دما، رطوبت، اسیدیته، جنس و بافت خاک و غیره اثرات قابل توجهی بر کمیت و کیفیت ترکیبات شیمیایی گیاهان دارند (Nabavi et al., 2018). بنابراین شناسایی رویشگاه‌های مناسب برای کشت گیاهان دارویی نقش بسزایی در استخراج مواد موثره ثانویه با بالاترین عملکرد در طب سنتی خواهد داشت (Kaghazloo et al., 2017). در این رابطه پژوهش‌های مختلفی با هدف بررسی تاثیر رویشگاه بر روی متابولیت‌های ثانویه گیاهان صورت گرفته است (Saberi et al., 2018; Ashrafzadeh et al. 2019a; Eisapoor et al., 2020; Fathi et al., 2020; Farzaneh et al., 2021; Parvizi et al., 2021).

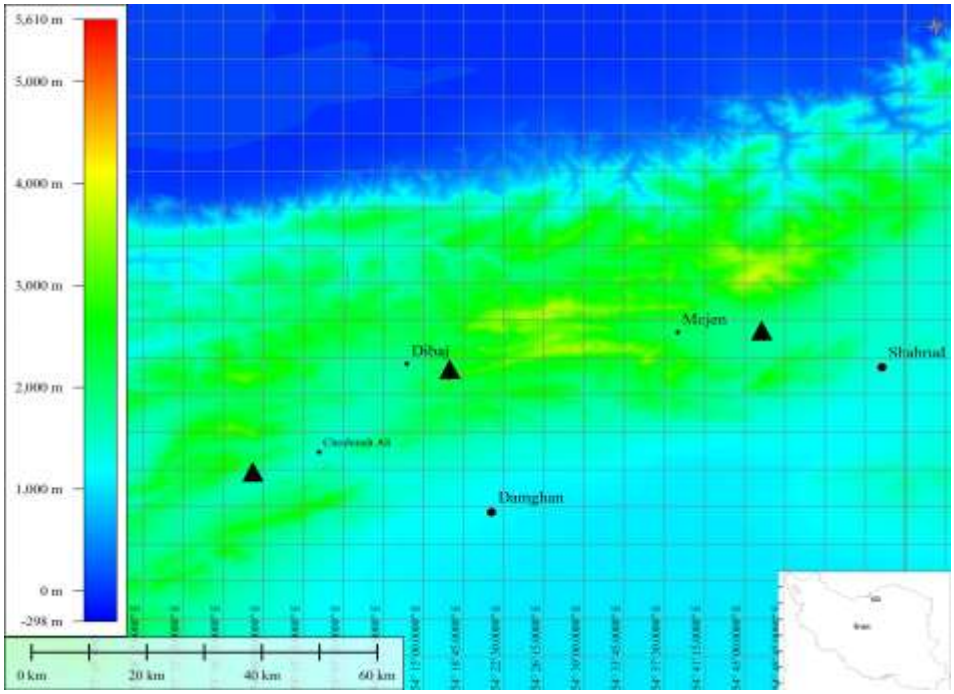
کلماتیس یک جنس بزرگ از خانواده آلاله (Ranunculaceae) است که با حدود ۳۰۰ گونه در سراسر جهان و بویژه در مناطق معتدل نیمکره شمالی پراکنده است. گیاه کلماتیس دارای متابولیت‌های ثانویه مانند کومارین‌ها، استروئیدها، لیگنین‌ها، آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، ساپونین‌های تری ترپنی، گلیکوزیدها و روغن‌های فرار است و از گونه‌های آن برای درمان نارسایی‌های عصبی، نقرس، مالاریا، اسهال خونی، دردهای روماتیسمی و غیره استفاده می‌کنند (Chawla et al., 2012; Chohra et al., 2020). جنس *Clematis* در ایران دارای ۸ گونه درختچه‌ای و درختی بالارونده است که در نواحی ایران و تورانی و اغلب استان‌های فلات مرکزی ایران پراکنش دارند (Ashrafzadeh et al., 2019; Dinarvand, 2020). دو گونه *Clematis ispahanica* Boiss. و *C. orientalis* L. از پراکنش وسیع تری در ایران برخوردار بوده و بر اساس فرم رویشی گیاه (درختچه‌ای یا بالارونده) از یکدیگر قابل تفکیک هستند (Iranshahr et al., 1992). گونه *C. ispahanica* (کلماتیس اصفهانی) به صورت درختچه‌ای چند ساله و گاهی چوبی می‌باشد. این گونه در خاک‌های غیرشور با بافت شنی و شنی-لومی رویش دارد. به شرایط آب و هوایی سخت بسیار مقاوم است و سازگاری زیادی به تنش‌های محیطی دارد (Ashrafzadeh et al., 2019a). زیستگاه این گونه به دلیل خوشخوراک بودن توسط چرای مفرط دام تهدید می‌شود و به همین دلیل مطالعاتی در

رابطه با چگونگی شکست خواب بذر و تکثیر گونه‌ی کلماتیس اصفهانی صورت گرفته است (Razmjoo et al., 2009; Ashrafzadeh et al., 2019b). قسمت‌های هوایی این گیاه در طب سنتی برای شستشو و درمان زخم‌های عفونی دام استفاده می‌شود (Koohpayeh et al., 2011). مطالعات انجام شده روی گونه‌های مختلف کلماتیس نشان داد که عصاره کلروفرمی *C. ispahanica* و عصاره اتیل استاتی گونه *C. orientalis* بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانتی را دارند (Karimi et al., 2018). بررسی خواص ضدباکتری عصاره متانولی و اتانولی این دو گونه نشان داد که عصاره متانولی فعالیت ضد باکتری قوی‌تری نسبت به عصاره متانولی دارد. همچنین فعالیت ضد باکتری گونه‌ی *C. ispahanica* بیشتر از گونه *C. orientalis* است. باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی حساسیت بیشتری در مقابل هر دو گونه دارند (Raei et al., 2014). تاکنون در مورد تأثیر عوامل توپوگرافی و تغییرات اقلیمی بر ترکیبات و متابولیت‌های گونه کلماتیس اصفهانی مطالعه‌ای انجام نشده است، لذا این تحقیق با هدف بررسی پتانسیل آنتی‌اکسیدانتی و همچنین اندازه گیری خواص فیزیولوژیکی گیاه کلماتیس اصفهانی از رویشگاه‌های مختلف در استان سمنان انجام شد.

مواد و روش‌ها

منطقه مورد مطالعه: شمال استان سمنان در ناحیه بینابینی اروپا-سیبری (حوزه هیرکانی) و ایران و تورانی (فلات مرکزی ایران) قرار دارد و از تنوع بالای گونه‌های گیاهی برخوردار است (Zakeri et al., 2020). بررسی گیاهان این منطقه، باعث شناخت و آشنایی با گیاهان دارویی، گیاهان در حال انقراض و گیاهان ناخواسته (هرز) و گونه‌های مقاوم شده و تعیین‌کننده پتانسیل‌های اکولوژیکی و رویشی منطقه است. بنابراین از بین مناطقی که برای یافتن کلماتیس اصفهانی پیمایش شد، از سه منطقه چشمه علی (ارتفاع ۱۵٤٤ متر)، دیباج (۲۰۸۵ متر) و مجن (۱۷۹۳ متر) جمع آوری صورت گرفت (شکل ۱). ابتدا گیاهان جمع آوری شده با روش‌های رایج در تاکسونومی شناسایی شدند و یک نمونه هرباریومی از گونه‌ی *C. ispahanica* با شماره هرباریومی نادری ۲۰۵۱ (DU000794) مستند شد که هم اکنون در هرباریوم دانشگاه دامغان نگهداری می‌شود. پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه ابتدا سرشاخه‌های سالم جدا و با آب مقطر شسته شدند و سپس در فریزر منفی بیست درجه جهت انجام مطالعات بعدی نگهداری شدند. همچنین برای بررسی و مطالعات خاکشناسی از خاک هر رویشگاه نمونه برداری انجام شد.

اندازه‌گیری میزان فنول: برای محاسبه‌ی میزان فنول یک دهم گرم از بافت‌های هوایی با سه میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد سابیده و پس از تیمار ۲٤ ساعته در تاریکی به مدت ۵ دقیقه با سرعت ٤۰۰۰ دور در دقیقه سانتریوفوژ شدند. ۰/۵ میلی‌لیتر محلول رویی به ۱/۵ میلی‌لیتر آب مقطر، ۰/۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد، ۰/۵ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۵ درصد و ۰/۲۵ میلی‌لیتر معرف فولین ۵۰ درصد اضافه شد و مجدداً محلول حاصل یک ساعت دیگر در تاریکی قرار داده شد. جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۲۵ نانومترخوانده شد (Lee, 2000).



شکل ۱: موقعیت سه رویشگاه جمع آوری شده (مثلث سیاه) از گونه *Clematis ispahanica* (کلماتیس اصفهانی) در استان سمنان.

اندازه‌گیری میزان فلاوونوئید: میزان فلاوونوئید هر عصاره با استفاده از روش‌های رنگ سنجی مورد سنجش قرار گرفت (Chang et al., 2002). ۰/۱ گرم بافت هوایی با ۵ میلی‌لیتر اتانول اسیدی سابیده شد. محلول حاصل به مدت ۵ دقیقه با سرعت ٤۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس محلول رویی به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری در دمای ۸۰ درجه قرار داده شد. جذب محلول در طول موج‌های ۲۷۰، ۳۰۰، ۳۳۰ نانومتر با اسپکتوفتومتر خوانش شد.

اندازه‌گیری میزان قندهای احیاکننده: جهت سنجش میزان قندهای احیاکننده ۰/۵ درصد از سرشاخه‌های گیاه با ۵ میلی‌لیتر آب مقطر سابیده شد سپس محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ با ۰/۵ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک ۹۸ درصد و ۰/۵ میلی‌لیتر فنول ۵ درصد حل شده و جذب آن در طول موج ٤۸۵ نانومتر خوانده شد (Somogy, 1952).

اندازه‌گیری میزان پرولین و پروتئین: برای سنجش پرولین ۰/۰۲ گرم از سرشاخه‌های گیاه کلماتیس با ۳ سی سی اسید سولفوسالیسیلیک دی هیدرات ۳ درصد، در هاون سابیده شد و پس از سانتریفیوژ با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه محلول رویی با یک میلی‌لیتر اسید استیک و یک میلی‌لیتر معرف نین هیدرین، مخلوط شده و به مدت یک ساعت تیمار گرمایی در دمای صد درجه و تیمار سرمایی (یخ)، جذب هر نمونه در طول موج ۵۲۰ نانومتر خوانش شد (Bates et al., 1973). برای محاسبه میزان پروتئین ۰/۵ گرم بافت‌های هوایی و برگ کلماتیس با ۳ میلی‌لیتر بافر پتاسیم فسفات با pH برابر ۷/۵ در هاون سرد سابیده شد و پس از ۱۰ دقیقه سکون محلول رویی به مدت ۲۵ دقیقه با سرعت ۱۰ هزار دور در دقیقه در درمای ٤ درجه سانتریفیوژ شد. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رویی با ۳ میلی‌لیتر معرف برادفورد ورتکس شده و جذب آن در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانش شد (Bradford, 1976).

اندازه‌گیری میزان پراکسید هیدروژن: برای سنجش میزان پراکسید هیدروژن ۰/۲ گرم از بافت‌های هوایی و برگ گیاه توسط ۳ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید ۰/۱ درصد در هاون سرد سابیده شد و محلول به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ٤ درجه با سرعت ۱۰ هزار دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول رویی با ۱ میلی‌لیتر یدید پتاسیم ۱ مولار و ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی‌مولار با pH برابر ۷ اضافه شد. جذب محلول در طول موج ۳۹۰ نانومتر با اسپکتوفتومتر خوانش شد (Alexieva et al., 2001).

اندازه‌گیری میزان مالون دآلدهید: جهت سنجش میزان مالون دآلدهید ۰/۲ گرم بافت‌های هوایی و برگ گیاه کلماتیس اصفهانی با ۳ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید ۵ درصد و ۳ میلی‌لیتر تری کلرواستیک ۲۰ درصد حاوی تیوباربیوتیک اسید ۰/۵ درصد در هاون سابیده و پس از یک ساعت تیمار گرمایی (۹۵ درجه سانتی گراد) و سرمایی، به مدت ۵ دقیقه در ٤۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. جذب محلول رویی در طول موج‌های ٤۵۵ و ٦۰۰ نانومتر خوانش شد (Heath and Packer, 1965).

اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم گایاکل پراکسیداز و کاتالاز: جهت سنجش میزان فعالیت آنزیم گایاکل پراکسیداز ۱۰۰ میکرولیتر عصاره گیاهی با ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار با pH برابر ٦/۱ و ۰/۵ میلی‌لیتر و گایاکل یک درصد و ۰/۵ میلی‌لیتر H_2O_2 مخلوط شده و در زمان‌های صفر، ۳۰، ٦۰ و ۱۲۰ ثانیه جذب محلول توسط اسپکتوفتومتر خوانش شد. در پایان تغییرات جذب در دقیقه بر حسب میلی گرم پروتئین ارائه گردید (Upadhyaya, 1985). برای تعیین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز ابتدا ۲/۵ میکرولیتر عصاره گیاهی با ۲/۵ میلی‌لیتر بافر پتاسیم فسفات با pH برابر ۷/٤ مخلوط شد. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر H_2O_2 یک درصد به آن اضافه شده و جذب محلول در طول موج ۲٤۰ نانومتر در زمان‌های صفر، ۳۰، ٦۰ و ۱۲۰ ثانیه خوانش شد (Maehly and Chance, 1959). در پایان تغییرات جذب در دقیقه بر میلی گرم پروتئین ارائه گردید.

اندازه‌گیری رنگیزه‌های فتوسنتزی: جهت سنجش رنگیزه‌های فتوسنتزی (شامل کلرفیل a، کلرفیل b، کلرفیل کل و کارتنوئید) ۰/۱ گرم از بافت‌های هوایی و برگ کلماتیس با ۵ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد در هاون سابیده و محلول حاصل در سرعت ٤۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوز شد. سپس جذب محلول رویی با اسپکتوفتومتر در طول موج‌های ٤۷۰، ٦٤۷ و ٦٦۳ نانومتر خوانش شد (Lichtenthaler, 1987).

اندازه‌گیری میزان آنتوسیانین: برای سنجش آنتوسیانین یک دهم گرم از بافت هوایی با ۵ میلی‌لیتر متانول اسیدی سابیده شد و پس از تیمار ۲٤ ساعته در تاریکی نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ٤۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. جذب محلول رویی در دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج ۵۵۰ نانومتر خوانش شد (Wagner, 1979).

تعیین فعالیت آنتی اکسیدانتی: فعالیت آنتی اکسیدانتی با مهار رادیکال آزاد (DPPH) انجام شد. توانایی دادن اتم H یا الکترون توسط ترکیبات با میزان بی رنگ کردن محلول بنفش ۲ و۲ دی فنیل ۱پیکریل هیدرازیل در متانول مورد ارزیابی قرار گرفت. یک میلی گرم از پودر DPPH در ۲۵ میلی لیتر حلال متانول حل شد. ۲۰۰ میکرولیتر از محلول رادیکال آزاد به هر یک از خانه‌های پلیت ۹٦ خانه اضافه شد و در هر خانه مقدار ۱۰ میکرولیتر از عصاره‌های مختلف با غلظت ٤۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر (با سه تکرار) و برای نمونه شاهد نیز ۱۰ میکرولیتر متانول اضافه شد. سپس پلیت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه

در تاریکی قرار داده شد و جذب در ۵۱۷ نانومتر خوانش شد (Koleva et al., 2002).

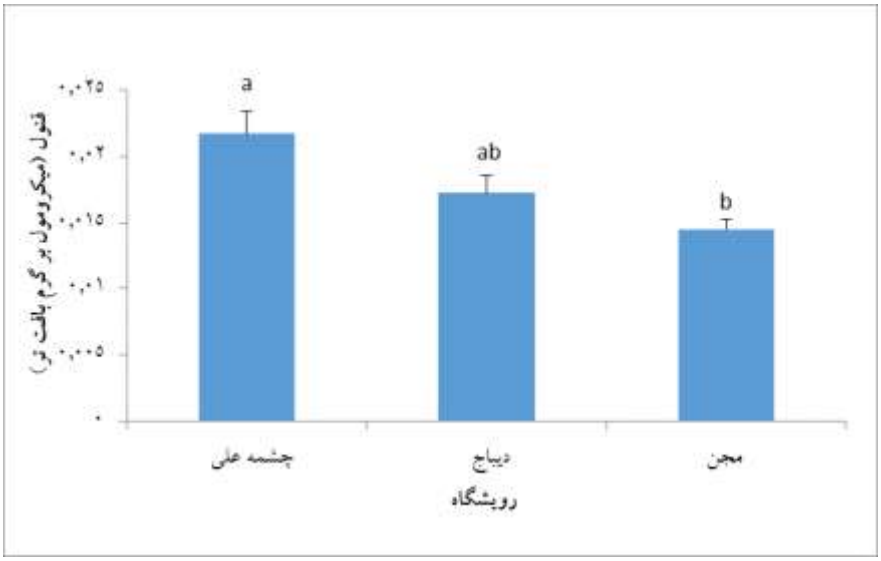
تجزیه و تحلیل آماری

آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد. داده‌های بدست آمده از آزمایش‌های بیوشیمیایی با نرم افزار آماری SPSS تجزیه و تحلیل شد و سپس به کمک نرم افزار Excel نمودارها ترسیم شد.

نتایج

میزان کلروفیل a، b، کلروفیل کل، کاروتنوئید، آنتوسیانین و پروتئین در سه رویشگاه مورد مطالعه گیاه کلماتیس اصفهانی تفاوت معنی داری از لحاظ آماری نشان دادند. بیشترین میزان این ترکیبات مربوط به رویشگاه مجن و کمترین آن مربوط به رویشگاه چشمه علی می‌باشد. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که میزان قندهای محلول، فلاونوئیدها، ترکیبات فنولی، فعالیت آنزیم کاتالاز و آنتی اکسیدانتی در سه رویشگاه گیاه کلماتیس اصفهانی متفاوت می‌باشد. بیشترین میزان این ترکیبات از رویشگاه چشمه علی و کمترین آن‌ها از رویشگاه مجن اندازه گیری شد. میزان پرولین، پراکسید هیدروژن، مالون دآلدهید و سایر آلدهیدها و فعالیت آنزیم گایاکل پراکسیداز در سه رویشگاه مورد بررسی اختلاف معنی داری نشان دادند. بیشترین میزان این ترکیبات در رویشگاه مجن و کمترین آن‌ها در رویشگاه چشمه علی محاسبه شد (جدول ۱ و شکل‌های ۲ تا ۵). همچنین نتایج آنالیز خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک در سه رویشگاه مورد مطالعه در جدول ۲ نشان داده شده است.

نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که میزان فنول کلماتیس اصفهانی در سه رویشگاه مورد مطالعه تفاوت معنی داری از لحاظ آماری دارند. در ادامه تست تکمیلی دانکن نشان داد که میزان فنول در منطقه چشمه علی با منطقه مجن تفاوت معنا داری دارد. همانطور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود بیشترین میزان فنول مربوط به رویشگاه چشمه علی و کمترین میزان آن مربوط به رویشگاه مجن است.



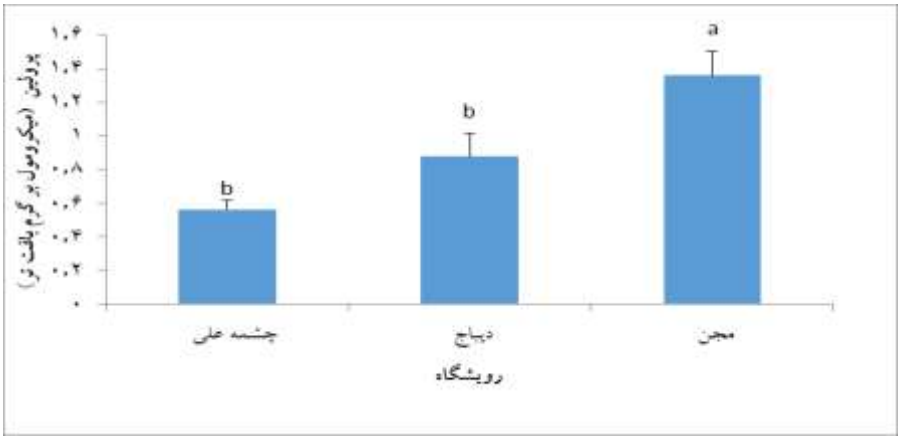
شکل۲: مقایسه میزان فنول گیاه کلماتیس اصفهانی در سه رویشگاه طبیعی استان سمنان. حروف مشترک در هر نمودار نشانگر غیرمعنی دار بودن و حروف غیر مشترک نشانگر معنی دار بودن اختلافات است (مقادیر، میانگین سه تکرار SE ±، P ≤0/05).

جدول ۱: میانگین صفات مورد بررسی کلمانیس اصفهانی در رویشگاه‌های مختلف استان سمنان

کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	کارتنوئید	فلاونوئید (۳۳۰ نانومتر)	فلاونوئید (۳۰۰ نانومتر)	فلاونوئید (۲۷۰ نانومتر)	آنتوسیانین	قندهای احیا کننده	مالون دآلدهید	گایاکل پراکسیداز	پروتئین	کاتالاز	ایستگاه
۱/۴۳^{b}	۰/۹^{a}	۲/۰۶^{b}	۰/۴۶^{b}	۹۲/۷۲^{a}	۸۴/۹۰^{a}	۸۹/۲۷^{a}	۸۹/۲۷^{a}	۱۶/۷۷^{a}	۱۴/۹۵^{c}	۰/۹^{b}	۰/۰۸^{a}	۶۴/۶۴^{a}	چشمه علی
۱/۲۲^{c}	۰/۵۴^{b}	۱/۷۹^{c}	۰/۲۵^{c}	۵۷/۱۲^{b}	۴۶/۶۸^{b}	۵۶/۶۸^{b}	۵۶/۶۸^{b}	۸/۷^{b}	۲۴/۴۸^{b}	۰/۵^{b}	۰/۰۵^{b}	۳۶/۹۴^{b}	دیباج
۱/۶۹^{a}	۰/۶۴^{a}	۲/۳۶^{a}	۰/۵۶^{a}	۴۳/۰۳^{c}	۳۶/۷۵^{b}	۲۹/۶۰^{c}	۲۹/۶۰^{c}	۵/۹^{b}	۲۸/۷۱^{a}	۲/۹۲^{a}	۰/۰۸۴^{a}	۱۸/۰۵^{c}	مجن

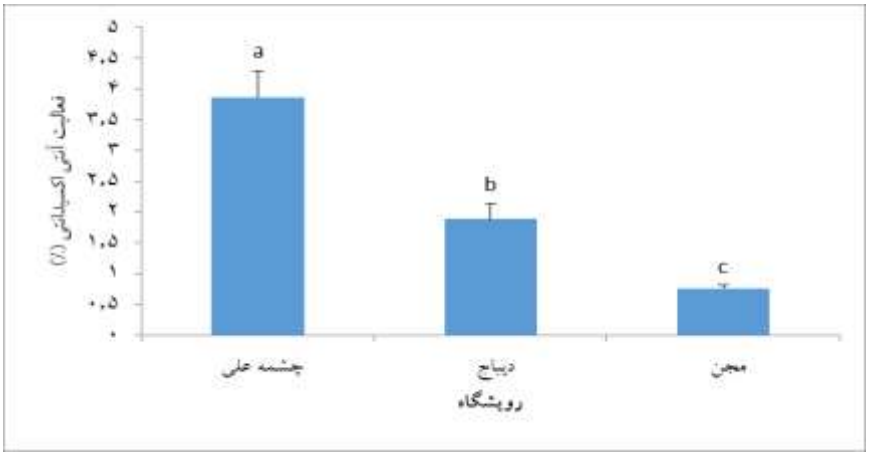
جدول ۲: خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک رویشگاه‌های کلمانیس اصفهانی

بافت خاک	رس (درصد)	سیلت (درصد)	ماسه (درصد)	آهک (درصد)	ماده آلی (درصد)	پتاس (ppm)	فسفر (ppm)	شوری (dS/m)	اسیدیته	ایستگاه
لوم شنی	۱۶	۲۰	۶۴	۲۳/۵	۰/۸۷	۲۳۰	۱۰/۰	۱/۸۴	۷/۷۶	چشمه علی
لوم شنی	۶	۲۲	۷۲	۴۸/۲	۱/۱۴	۲۷۰	۹/۱۰	۱/۱۳	۷/۸۵	دیباج
لوم شنی	۱۴	۴۰	۴۶	۳۷/۱۹	۰/۶۱	۲۵۰	۳/۸۸	۱/۱۶	۷/۵۲	مجن



شکل ۳: مقایسه میزان پرولین گیاه کلماتیس اصفهانی در سه رویشگاه طبیعی استان سمنان. حروف مشترک در هر نمودار نشانگر غیر معنی دار بودن و حروف غیر مشترک نشانگر معنی دار بودن اختلافات است (مقادیر، میانگین سه تکرار SE ±، P ≤0/05).

شکل ٤: مقایسه میزان پراکسید هیدروژن گیاه کلماتیس اصفهانی در سه رویشگاه طبیعی استان سمنان. حروف مشترک در هر نمودار نشانگر غیر معنی دار بودن و حروف غیر مشترک نشانگر معنی دار بودن اختلافات است (مقادیر، میانگین سه تکرار SE ±، P ≤0/05).



شکل ۵: مقایسه میزان فعالیت آنتی اکسیدانتی گیاه کلماتیس اصفهانی در سه رویشگاه طبیعی استان سمنان. حروف مشترک در هر نمودار نشانگر غیر معنی دار بودن و حروف غیر مشترک نشانگر معنی دار بودن اختلافات است است (مقادیر، میانگین سه تکرار SE ± ، P ≤0/05).

بحث

شرایط رویشگاه شامل ارتفاع از سطح دریا، میزان رطوبت نسبی، نور، درجه حرارت، ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک و غیره از مهم ترین عوامل تأثیرگذار بر میزان ترکیبات گیاهان دارویی هستند (Gairola et al., 2010). اطلاعات به دست آمده در این مطالعه به وضوح نشان می‌دهد که میزان کلروفیل a، b، کلروفیل کل و کاروتنوئید تحت تاثیر رویشگاه و ارتفاع معنی دار شدند. بطوریکه بالاترین میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی از رویشگاه مجن به دست آمده و کمترین میزان مربوط به رویشگاه دیباج است. عوامل متفاوتی بر میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی در گیاهان تاثیر می‌گذارند. به عنوان مثال در گیاه کلماتیس اصفهانی با افزایش میزان خشکی میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی افزایش یافت. اما در تنش‌های شدیدتر میزان رنگیزه‌های فتوسنتری (بجز کارتنوئید) کاهش یافت (Amiri, 2013). همچنین میزان کلروفیل در گیاه بلوط ایرانی (*Quercus brantii* Lindl.) در فصل بهار با افزایش ارتفاع افزایش یافت ولی در فصل پاییز روند عکس مشاهده شد (Azizi et al., 2020). از آنجا که در رویشگاه‌های مختلف مجموعه‌ای از عوامل مختلف بر گیاه تاثیرگذار هستند، لذا نمی‌توان کاهش یا افزایش ترکیبات مختلف را ناشی از اثر یک عامل دانست. بنابراین نتایج مطالعه حاضر نشان داد که رویشگاه دیباج با بالاترین ارتفاع از سطح دریا دارای پایین‌ترین میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی می‌باشد. نتایج این مطالعه سازگار با مطالعه انجام شده روی بلوط، بنه و زالزاک می‌باشد که در این گیاهان نیز با افزایش ارتفاع از سطح دریا میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی کاهش یافته است (Parvizi et al., 2021).

آنتوسیانین‌ها از دسته مولکول‌های فلاونوئید هستند و از مسیر فنیل پروپانوئید سنتز می‌شوند (Pezhmanmehr et al., 2015). این ترکیبات در برابر گونه‌های فعال اکسیژن نقش آنتی اکسیدانتی دارند. نتایج مطالعات انجام شده نشان داد که در تنش‌هایی مثل افزایش شوری میزان آنتوسیانین در گیاه کاهش می‌یابد و در مقابل عواملی مانند افزایش ارتفاع، دمای پایین، اشعه ماورابنفش و عوامل بیماری‌زا می‌توانند موجب افزایش آنتوسیانین در گیاهان شوند (Hipskind et al., 1996). در تضاد با نتایج یاد شده محققان نشان دادند که در گیاه پنیرک (*Malva sylvestris* L.) با افزایش ارتفاع در رویشگاه‌های مختلف میزان آنتوسیانین کاهش می‌یابد (Fathi et al., 2020) و علاوه بر میزان ارتفاع و اشعه ماورا بنفش عوامل دیگری نیز مانند شرایط اقلیمی و خاکی بر میزان آنتوسیانین در گیاه موثر هستند. نتایج مطالعه حاضر نیز نشان داد که کمترین میزان آنتوسیانین در رویشگاه دیباج با بالاترین ارتفاع وجود دارد.

افزایش میزان پروتئین می‌تواند به دلیل افزایش سنتز پروتئین، کاهش فعالیت متابولیکی گیاه و یا افزایش ساخت پروتئین‌هایی مانند متالوتیونین‌ها، فیتوکلاتین‌ها و یا چاپرون‌ها باشد که نقش دفاعی یا حفاظتی دارند (Foy et al., 1978; Feder and Hofmann, 1999). کاهش در میزان پروتئین می‌تواند به دلیل تجزیه آن از طریق افزایش پروتئولیز، کاهش سنتز پروتئین بوسیله جلوگیری از تبدیل اسیدآمینه به پروتئین و کاهش میزان پلی ریبوزوم‌ها باشد (Hare and Cress, 1997). یکی از اثرات شوری کاهش سنتز پروتئین است (Fedina et al., 2002). در شرایط شوری رادیکال‌های آزاد اکسیژن تولید شده و موجب اکسیداسیون زنجیره‌های آمینواسید و تشکیل اتصالات پروتئین-پروتئین شده و در نهایت باعث تجزیه پروتئین می‌شود. همچنین در شوری آنزیم پروتئاز فعال می‌شود (Hameed et al., 2008; Chittoor et al., 2016). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که کمترین

میزان پروتئین در رویشگاه دیباج (با بالاترین ارتفاع از سطح دریا) وجود دارد.

در دهه‌های اخیر به عصاره و اسانس استخراجی از گیاهان مختلف به دلیل کاربرد آن‌ها در درمان بسیاری از بیماری‌های عفونی و حفاظت از مواد غذایی در برابر اثرات اکسیدانتی، توجه زیادی شده است و گیاهان غنی از ترکیبات آنتی اکسیدانتی می‌توانند باعث حفاظت سلول‌ها در برابر آسیب‌های اکسیداتیو شوند (Kumaran and Karunakaran, 2007). آنتی اکسیدانت‌های طبیعی ابتلا به بیماری‌هایی از قبیل سرطان، بیماری‌های قلبی و سکته‌های مغزی را کاهش می‌دهند (Prior and Cao, 2000). کاتالاز نیز به عنوان یک آنزیم آنتی اکسیدانتی عمل کرده و در حذف و جاروب کردن پراکسید هیدروژن تولید شده در پراکسی زوم‌ها و کاهش اثرات تخریبی گونه‌های اکسیژن فعال نقش مهمی بر عهده دارد (Simova-Stoilova et al., 2008). فنل‌ها و فلاونوئیدها معمولاً به عنوان آنتی اکسیدانت‌های ثانویه و جاروب کننده رادیکال‌های آزاد عمل می‌کنند (Schwambach et al., 2008; Firoozeh et al., 2019). نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد بیشترین میزان ترکیبات فنولی، فلاونوئید، کاتالاز و خواص آنتی اکسیدانتی مربوط به رویشگاه چشمه علی و کمترین آن مربوط به رویشگاه مجن می‌باشد. دلیل تغییرات میزان فنول، فلاونوئید و کاتالاز هر رویشگاه احتمالاً مربوط به میزان تنش‌های موجود می‌باشد. بطوریکه در رویشگاه چشمه علی (ارتفاع ۱۵٤٤ متر) به دلیل وجود تنش خشکی و شوری میزان فنول، فلاونوئید، کاتالاز و خواص آنتی اکسیدانتی افزایش یافته است. این نتایج همچنین با نتایج مطالعات پیشین به عنوان مثال روی گیاه کوشیا (*Kochia scoparia* (L.) Schrad.) و پونه سای بی کرک (*Nepeta nuda* L.) مطابقت دارد که در آنها با افزایش شوری خاک میزان ترکیبات فنولی نیز افزایش یافته است (Nabati et al., 2014; Mojarab et al., 2018).

قندهای احیاکننده در برگ‌های گیاهان در معرض تنش خشکی در نتیجه برهمکنش‌های متابولیسمی افزایش می‌یابد (Campos et al., 1999). افزایش قندهای محلول باعث کاهش سرعت فتوسنتز شده و از این طریق فشار تورژسانس را حفظ می‌کند (Turner, 1997). نتایج مطالعه حاضر نیز نشان داد که بیشترین میزان قندهای احیاکننده در رویشگاه چشمه علی مشاهده شد که خشک‌ترین و شورترین رویشگاه است. نقش پرولین در امر سازگاری گیاهان به تنش‌ها ضروری است و دارای آثار بیولوژیک زیادی مثل تنظیم اسمزی، آثار حمایتی سلول، عمل آنتی اکسیدانتی، انتقال انرژی، ذخیره کربن و نیتروژن بوده که برای پایداری سلول و سازگاری با شرایط جدید لازم است (Kuznetsov and Shevyakova, 1999).

تنش‌های محیطی موجب افزایش ذخیره پرولین در برگ گیاهان می‌شود و افزایش سطح این ترکیبات در گیاهان از نظر سازگاری گیاه اهمیت دارد و گیاهان را قادر می‌سازد تا در شرایط تنش زا زنده بمانند. انباشته شدن پرولین آزاد، نتیجه سنتز آن از اسید گلوتامیک است و در شرایط مستقل از تنش ممکن است توسط اسید آبسیزیک القا شود به طوریکه افزایش میزان پرولین آزاد در برگ گیاهان تیمار شده با این هورمون مشاهده شده است (Stewart and Voetberg, 1985). تجمع پرولین به گیاه کمک می‌کند که در دوره کوتاهی بعد از اعمال تنش شوری زنده بماند و گیاه بتواند بعد از رفع تنش رشد خود را بازیابی کند، از طرفی پرولین ممکن است با پروتئین‌های غشا پیوند تشکیل داده و ساختار آن ها را طی تنش پایدار سازد (Shariat and Asareh, 2008).

تنش‌هایی مانند خشکی و شوری باعث شکسته شدن زنجیره انتقال الکترون و تولید گونه‌های اکسیژن

فعال می‌شوند. مکانیسم‌های دفع گونه‌های اکسیژن فعال در گیاهان توسط آنزیم‌هایی مانند گایاکول پراکسیداز انجام می‌شود. بنابراین در هنگام مواجهه با تنش بسته به میزان و شدت تنش، مقدار این آنزیم در برگ گیاه می‌تواند افزایش یابد. آنزیم گایاکول پراکسیداز در سیتوزول وجود دارد و با کمک گلوتاتیون، پراکسید هیدروژن را به آب تبدیل می‌کند و از این طریق به پایداری این بخش کمک می‌کند (Mohseni et al., 2020). در مطالعه انجام شده بر روی ۵ رقم کلزا با افزایش میزان تنش شوری تا ۳۰۰ میلی مولار، میزان گایاکول پراکسیداز کاهش یافت (Heydari et al., 2010). همچنین در مطالعه‌ای که روی گیاه زعفران انجام شد، تنش شوری به میزان کمتر از ۳۰۰ میلی مولار باعث افزایش فعالیت و مقادیر بالاتر از ۳۰۰ میلی مولار باعث کاهش فعالیت این آنزیم شد که نشان دهنده حساسیت گیاه زعفران نسبت به غلظت‌های بالای شوری است (Torabi Pashai et al., 2017). در مطالعه حاضر نیز کمترین میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در رویشگاه چشمه علی (دارای بالاترین میزان شوری و کمترین میزان ارتفاع) مشاهده شده که با نتایج مطالعات فوق الذکر سازگار است. آنزیم‌های پراکسیداز در تنش‌ها افزایش می‌یابند. در مقادیر کمتر، تنش شوری میزان فعالیت این آنزیم‌ها را افزایش می‌دهد ولی اگر غلظت نمک بیشتر شود، با بر هم خوردن تعادل یونی فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز کاهش می‌یابد (Mohseni et al., 2020).

همانطور که بیان شد تنش‌ها موجب تولید گونه‌های فعال اکسیژن می‌شوند. گونه‌های فعال اکسیژن به دو گروه مولکول‌های رادیکال آزاد و بدون رادیکال تقسیم می‌شوند. پراکسید هیدروژن جز گروه مولکول‌های بدون رادیکال و نسبتاً پایدار است و مقدار آن در گیاه می‌تواند نشان دهنده میزان گسترش تنش اکسیداتیو باشد. به همین دلیل سریعاً باید به آب و اکسیژن تبدیل شود در غیر اینصورت به گیاه آسیب وارد می‌کند (Guo et al., 2006). معمولاً در بیشتر گیاهانی که در معرض تنش قرار می‌گیرند میزان پراکسید هیدروژن افزایش می‌یابد (Sofo et al., 2015). در برخی گیاهان هالوفیت چند روز پس از اعمال تنش میزان پراکسید هیدروژن کاهش می‌یابد که نشان دهنده وجود سیستم سم زدایی قوی در این گیاهان است (Sofo et al., 2015). با مطالعه بر روی گیاه آلوروس لیتورالیس مشخص شد که با افزایش غلظت نمک میزان پراکسید هیدروژن در اندام هوایی گیاه کاهش می‌یابد (Younesi-Melerdi et al., 2019). نتایج مطالعه حاضر نیز نشان داد که کمترین میزان پراکسید هیدروژن مربوط به رویشگاه چشمه علی با بیشترین میزان شوری است. یکی از عوارض تنش که گیاه با آن مواجه می‌شود، تولید انواع رادیکال‌های آزاد اکسیژن است. وجود رادیکال‌های آزاد آسیب‌های زیادی می تواند به گیاه وارد کند که یکی از آن‌ها آسیب و تخریب غشای سلولی است (Farhoudi, 2011) و در صورت آسیب غشای سلولی میزان مالون دی آلدهید در گیاه افزایش می‌یابد (Bhattacharjee and Mukherjee, 2002). بنابراین اندازه گیری میزان این ترکیب در رویشگاه‌های مختلف می‌تواند نشان دهنده میزان تنش‌های رویشگاه باشد. پژوهشگران در مطالعه‌ای که روی ارقام مختلف کلزا انجام دادند متوجه ارتباط مثبت معنی‌دار بین فعالیت آنزیم کاتالاز و مقاومت به شوری شدند (Ghorbanli et al., 2003). نتایج مطالعه حاضر نیز در تایید این مطالعه نشان داد که بیشترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز و کمترین میزان مالون دی آلدهید و پراکسیدهیدروژن در رویشگاه چشمه علی مشاهده شد.

نتیجه‌گیری کلی

مقدار متابولیت‌های گونه *C. ispahanica* شامل قندهای محلول، ترکیبات فنولی و فلاونوئیدها، فعالیت

آنزیم کاتالاز و خواص آنتی اکسیدانتی در رویشگاه چشمه علی در بالاترین و در رویشگاه مجن در کمترین میزان قرار داشته است. در مقابل مقدار ترکیبات دفاعی گیاه شامل پرولین، پراکسیدهیدروژن، مالون دی آلدهید و فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در رویشگاه چشمه علی در کمترین و در رویشگاه مجن در بالاترین میزان قرار داشته است. مقدار کلروفیل، آنتوسیانین و پروتئین نیز در رویشگاه دیباج با بالاترین ارتفاع از سطح دریا در کمترین میزان قرار داشته است. نتایج این تحقیق نشان داد که رویشگاه چشمه علی با داشتن بیشترین میزان متابولیت‌ها و کمترین میزان ترکیبات دفاعی کم تنش ترین رویشگاه و بالعکس رویشگاه مجن پرتنش ترین رویشگاه برای گیاه کلماتیس اصفهانی می‌باشد.

References

Amirahmadi, A., Naderi, R. and Afsharian, M.H. (2022). An investigation into the medicinal plants of Semnan province with taxonomic and therapeutic aspects. Trends in Phytochemical Research. 6(4), 312-338.

Amiri, S. (2013). Investigating the morphophenological traits, pollination method and the amount of essential oil of *Clematis ispahanica* under conditions of drought stress and lack of drought stress. Msc thesis, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology.

Asadi, S.Y., Parsaei, P., Karimi, M., Ezzati, S., Zamiri, A. and Mohammadizadeh, F. (2013). Effect of green tea (*Camellia sinensis*) extract on healing process of surgical wounds in rat. International Journal of Surgery. 11(4): 332-337.

Asadi-Samani, M., Rafieian-Kopaei, M. and Azimi, N. (2013). *Gundelia*. A systematic review of medicinal and molecular perspective. Pakistan Journal of Biological Science. 16(21): 1238-1247.

Ashrafzadeh, M., Gharemakher, H.N., Heshmati, G., Saharkhiz, M. and Nohooji, M.G. (2019a). Ecological characteristics and forage quality of *Clematis ispahanica* in Fars and Yazd Provinces. Iranian Journal of Range and Desert Research. 26(2): 432-446.

Ashrafzadeh, M., Niknahad, H., Saharkhiz, M., ghorbani Nohouji, M. and Heshmati, G. (2019b). Breaking seed dormancy of *Clematis ispahanica* and its optimum planting depth and density (Case study: Bavanat, Fars Province). Iranian Journal of Range and Desert Research. 26(3), 629-639.

Azizi, K., Naji, H.R., Hassaneian Khoshroo, H. and Mehdi, H.M. (2020). Effect of altitude and growing season on some physiological properties of leaf from Persian oak (*Quercus brantii*) in Zagros forest (case study: Ilam). Plant Process and Function. 9 (35):101-114.

Bates, L., Waldren, R.P. and Teare, I.D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant and Soil. 39: 205-207.

Bhattacharjee, S. and Mukherjee, A.K. (2002). Salt stress induced cytosolute accumulation, antioxidant response and membrane deterioration in three rice cultivars during early germination. Seed Science and Technology. 30: 279-287.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry. 72(1-2): 248-254.

Campos, P.S., Ramalho, J.C., Lauriano, J.A., Silva, M.J. and do Ceu Matos, M. (1999). Effects of drought on photosynthetic performance and water relations of four Vigna genotypes. Photosynthetica 36: 79-87.

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

Chawla, R., Kumar, S. and Sharma, A. (2012). The genus *Clematis* (Ranunculaceae): Chemical and pharmacological perspectives. Journal of Ethnopharmacology. 143(1): 116-150.

Chittoor, J. T., Balaji, L. and Jayaraman, G. (2016). Optimization of parameters that affect the activity of the alkaline protease from halotolerant bacterium, *Bacillus acquimaris* VITP4, by the application of response surface methodology and evaluation of the storage stability of the enzyme. Iranian Journal of Biotechnology. 14(1): 23-32.

Chohra, D., Ferchichi, L., Cakmak, Y.S., Zengin, G. and Alsheikh, S.M. (2020). Phenolic profiles, antioxidant activities and enzyme inhibitory effects of an Algerian medicinal plant (*Clematis cirrhosa* L.). South African Journal of Botany. 132: 164-170.

Dinarvan, M. (2020). *Clematis khuzestanica* (Ranunculaceae) a new species from southwest of Iran. Iranian Journal of Botany. 26(1): 16-18.

Eisapoor, M., Hemmati, K. and Hemmati, N. (2020). Study of the effect of habitat on morphological and phytochemical traits of horsemint (*Mentha longifolia* L.). Journal of Horticultural Science. 33(4): 698-710.

Farhoudi, R. (2011). Evolution effect of salt stress on growth, antioxidant enzymes activity and malondealdehaid concentration of Canola verities. Iranian Journal of Field Crops Research. 9(1): 123-130.

Farzaneh, M., Amirahmadi, A., Poozesh, V. and Salimi, F. (2021). Study on Phytochemical diversity and antioxidant properties of extracts from different populations of *Perovskia abrotanoides* Kar. in Eastern Alborz. Eco-phytochemical Journal of Medicinal Plants. 9(3): 16-28.

Fathi, T., Seghatoleslami, M., Yari, R. and Nakhaei, F. (2020). Study on some ecomorphological, phenological, and phytochemical characteristics of common mallow (*Malva sylvestris* L.) in two native habitats of Ferdows and Tabas regions. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research. 36(4): 590-608.

Fathi, T., Seghatoleslami, M.J., Yari, R. and Nakhaei, F. (2020). Study on some ecomorphological, phenological, and phytochemical characteristics of common mallow (*Malva sylvestris* L.) in two native habitats of Ferdows and Tabas regions. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants. 36(4): 590-608.

Feder, M.E. and Hofmann, G.E. (1999). Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. Annual review of physiology. 61(1): 243-282.

Fedina, I.S., Georgieva, K. and Grigorova, I. (2002). Light-dark changes in proline content of barley leaves under salt stress. Plant Biology. 45: 59-63.

Firoozeh, R., Khavarinejad, R., Najafi, F. and Saadatmand, S. (2019). Effects of gibberellin on contents of photosynthetic pigments, proline, phenol and flavonoid in savory plants (*Satureja hortensis* L.) under salt stress. Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology). 31(4): 894-908.

Foy, C.D., Chaney, R.L. and White, M.C. (1978). The physiology of metal toxicity in plants. Annual Review of Plant Physiology. 29: 511-566.

Gairola, S., Shariff, N.M., Bhatt, A. and Kala, C.P. (2010). Influence of climate change on production of secondary chemicals in high altitude medicinal plants: Issues needs immediate attention. Journal of Medicinal Plants Research. 4(18): 1825-1829.

Ghasemi Pirbalouti, A. (2010). Medicinal and Aromatic Plants (Identifying and examining their effects). Shahrekord, Iran: Publisher of I.A.U. Shahrekord Branch.

Ghorbanli, M. Satei, A. and Maghise, A. (2003). The effect of different amounts of salinity on the activities of catalase, peroxidase and nitrate reductase enzymes in the roots and leaves of Canola cultivars. Pajouhesh-va-Sazandegi. 58: 39-43.

Guo, Z., Ou, W., Lu, S. and Zhong, Q. (2006). Differential responses of antioxidative system to chilling and drought in four rice cultivars differing in sensitivity. Plant Physiology and Biochemistry. 44: 828-836.

Hameed, A., Naseer, S., Iqbal, T., Syed, H. and Haq, M.A. (2008). Effects of NaCl salinity on seedling growth, senescence, catalase and protease activities in two wheat genotypes differing in salt tolerance. Pakistan Journal of Botany. 40(3): 1043-1051.

Handa, S.S., Rakesh, D.D. and Vasisht, K. (2006). Compendium of Medicinal and Aromatic Plants Asia. Italy: ICS UNIDO.

Hare, P.D. and Cress, W. A. (1997). Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. Plant Growth Regulation. 21: 79-102.

Heath, R.L. and Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives of Biochemistry and Biophysics. 125(1): 189-198.

Heydari, M., Mesri, F. and Keykha, Z. (2010). Effects of salinity stress on nucleic acid metabolism, antioxidants enzyme activity, chlorophyll fluorescence and osmotic adjustment in five Canola genotypes. Iranian Journal of Field Crop Science. 41(3): 491-502.

Hipskind, J., Wood, K. and Nicholson, R.L. (1996). Localized stimulation of anthocyanin accumulation and delineation of pathogen ingress in maize genetically resistant to *Bipolaris maydis* race O. Physiological and Molecular Plant Pathology. 49(4): 247-256.

Iranshahr, M., Rechinger, K.H. and Riedl, H. (1992). Ranunculaceae. In: Flora Iranica, vol. 171. ed. K.H. Rechinger. Graz: Akademische Druck- und Verlagsanstalt.

Kaghazloo, Z., Hemati, K. and Khorasaninejad, S. (2017). The effect of height on some secondary metabolites of different organs of *Sambucus* (*Sambucus ebulus* L.) in three cities of Golestan province. Journal of Iranian Plant Ecophysiological Research. 12(47): 31-43.

Karimi, E., Ghorbani Nohooji, M., Habibi, M., Ebrahimi, M., Mehrafarin, A. and Khalighi-Sigaroodi, F. (2018). Antioxidant potential assessment of phenolic and flavonoid rich fractions of *Clematis orientalis* and *Clematis ispahanica* (Ranunculaceae). Natural Product Research. 32(16): 1991-1995.

Koleva, I.I., van Beek, T.A., Linssen, J.P.H., de Groot, A. and Evstatieva, L.N. (2002). Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. Phytochemical Analysis. 13: 8-17.

Koohpayeh, A., Ghasemi Pirbalouti, A., Yazdanpanah Ravari, M.M., Pourmohseni Nasab, E. and Arjomand, D. (2011). Study the ethno-veterinary of medicinal plants in Kerman province, Iran. Journal of Medicinal Herbs. 2(3): 211-216. (in Persian).

Kumaran, A. and Karunakaran, R.J. (2007). In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five Phyllanthus species from India. LWT-Food Science and Technology. 40(2): 344-352.

Kuznetsov, V. and Shevyakova, N.I. (1999). Proline under stress, biological role, metabolism and regulation. Russian Journal of Plant Physiology. 46: 274-287.

Lee, H.S. (2000). The experimental principle and technology of plant physiology and biochemistry. Beijing: Higher Education Press.

Lichtenthaler, H.K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. Methods in enzymology. 148: 350-382.

Maehly, A.C. and Chance, B. (1954). The assay of catalase and peroxidase. In: Methods in biochemistry analysis, vol 1., pp. 357-425. ed. D. Glick. New York: Interscience Publishers.

Mohseni, Z., Moradian, F. and Rahdari, P. (2020). The study of activity of antioxidant enzymes, guaiacol peroxidase and ascorbate peroxidase and the amount of Na, K and pigment content in *Spinach oleracea* L. under NaCl salinity stress. Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology). 32(4): 915-924.

Mojarab, S., Moghaddam, M. and Narimani, R. (2018). The effect of pretreatment of salicylic acid on seed germination, total phenol and antioxidant activity of *Nepeta nuda* L. seedling under salt stress. Eco-phytochemical Journal of Medicinal Plants. 6(1): 21-31.

Nabati, J., Kafi, M., Nezami, A., Rezvani Moghaddam, P., Masoumi, A. and Zare Mehrjerdi, M. (2014). Evaluation of quantitative and qualitative characteristic of forage kochia (*Kochia scoparia*) in different salinity levels and time. Iranian Journal of Field Crops Research. 12(4): 613-620.

Nabavi, S.J., Zali, S.H., Ghorbani, J. and Kazemi, S.Y. (2018). Effects of some ecological factors on extract of *Juniperus communis* L. in Mountainous Rangelands of Hezarjarib - Behshahr. Plant Process and Function. 6(19): 367-374.

Naderi, R., Zakeri, A. and Afsharian, M.H. (2021). Identification of medicinal plants of Semnan province: description, distribution and therapeutic properties. Damghan: Damghan University Publisher.

Papari Moghadam Fard, M., Ketabchi S. and Farjam, M.H. (2020). Chemical composition, antimicrobial and antioxidant potential of essential oil of *Ziziphus spina-christ* var *aucheri* grown wild in Iran. Journal of Medicinal Plants and By-product. 9(Special): 69-73.

Parvizi, A., Hatamnia, A.A., Mohammadkhani, N. and Naji, H.R. (2021). Effect of altitude on photosynthesis rate and some physiological indices from three species of *Quercuis brantii*,

Pistacia atlantica, *Crataegus pontica* in Ilam province forests. Plant Process and Function. 10(45): 57-70.

Parvizi, A., Hatamnia, A.A., Mohammadkhani, N. and Naji, H.R. (2021). Effect of altitude on photosynthesis rate and some physiological indices from three species of *Quercus brantii*, *Pistacia atlantica*, *Crataegus pontica* in Ilam province forests. Plant Process and Function. 10 (45): 57-70.

Pezhmanmehr, M., Ebadi, A., Moosavi, A. R., Walker, A. and Rahimi, A. (2015). Quantitative and qualitative analysis of anthocyanins and flavonols in berry skin of some grape cultivars using High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Journal of Medicinal Plants. 14 (56): 123-138.

Prior, R.L. and Cao, G. (2000). Analysis of botanicals and dietary supplements for antioxidant capacity: a review. Journal of AOAC International. *83*(4): 950-956.

Raei, F., Ghorbani Nohooji, M., Habibi, M. and Ashoori, N. (2014). Antibacterial activity of alcoholic extracts of two *Clematis* L. (Ranunculaceae) Species from Iran. Journal of Medicinal Plants, 13(49): 39-45.

Razmjoo, K., Khodaeian, N., Razzazi, A. and Askari, E. (2009). Breaking seed dormancy of *Clematis ispahanica* Bioss. a medicinal plant of Iran. Seed Technology. 31(1): 101-107.

Saberi, M., Niknahad, H., Heshmati, G.A., Barani, H. and Shahriari, A.R. (2018). Evaluation of the content and performance of some active ingredients extracts of *Citrullus colocynthis* organs from two habitats of Sistan and Balochestan province in different growth stages. Journal of Plant Ecosystem Conservation. 5 (11): 49-63.

Schwambach, J., Ruedell, C.M., de Almeida, M.R., Penchel, R.M., de Araújo, E.F. and Fett-Neto, A.G. (2008). Adventitious rooting of *Eucalyptus globulus* × *maidennii* minicuttings derived from mini-stumps grown in sand bed and intermittent flooding trays: a comparative study. New Forests. 36(3): 261-271.

Shariat, A. and Asareh, M.H. (2008). Effects of drought stress on pigments, prolin, soluble sugar and growth parameters on four *Eucalyptus* species. Pajouhesh-va-Sazandegi. 87: 139-148.

Simova-Stoilova, L., Demirevska, K., Petrova, T., Tsenov, N. and Feller, U. (2008). Antioxidative protection in wheat varieties under severe recoverable drought at seedling stag. CAAS Agricultural Journals. 54(12): 529-536.

Sofo, A., Scopa, A., Nuzzaci, M. and Vitti, A. (2015). Ascorbate peroxidase and catalase activities and their genetic regulation in plants subjected to drought and salinity stresses. International Journal of Molecular Sciences. 16: 13561-13578.

Somogy, M. (1952). Note on sugar determination. Journal of Biological Chemistry. 195: 19-29.

Stewart, C.R. and Voetberg, G. (1985). Relationship between stress-induced ABA and proline accumulations in excised barley leaves. Plant Physiology. 79: 24-27.

Torabi Pashai, S., Niknam, V., Ebrahimzadeh, H. and Sharifi, G.A. (2017). Comparative study of biochemical responses of different saffron (*Crocus sativus*) accessions to salt stress and alleviative effects of salicylic acid. Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology). 29(4): 728-740.

Turner, N.C. (1997). Further progress in crop water relations. Advances in Agronomy. 58: 293-338.

Upadhyaya, A., Sankhla, D., Davis, T.D., Sankhla, N. and Smith, B. (1985). Effect of paclobutrazol on the activities of some enzymes of activated oxygen metabolism and lipid peroxidation in senescing soybean leaves. Journal of Plant Physiology. 121(5): 453-61.

Wagner, G.J. (1979). Content and vacuole/extravacuole distribution of neutral sugars, free amino acids, and anthocyanin in protoplasts. Plant physiology. 64(1): 88-93.

Younesi-Melerdi, E., Nematzadeh, G.A. and Pakdin Parizi, A. (2019). Antioxidant responses of different tissues of *Aeluropus littoralis* to salinity stress. Journal of Plant Process and Function. 8(32): 433-446.

Zakeri, A., Naderi, R. and Poozesh, V. (2020). An investigation of plant species distribution in Semnan province (Case study: Herbarium of Damghan University). Journal of Plant Researches. 33(4):817-827.