



Antimicrobial Effects and Nutraceutical Composition of Asafoetida (*Ferula assa foetida* L.) Slurry: Impact of Harvest Methods (Case Study: Tangsorkh Rangeland, Boyerahmad County)

Sajad Ghaderi¹, Vahid Karimian^{*2}, Fariba Ghaderi³, Sepehr Haghdoost⁴

¹. Assistant Prof., Department of Nutrition and Food Sciences, School of Health and Nutrition Sciences, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran.

². Corresponding author; Assistant Prof., Department of Forest, Range and Watershed Management, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Yasouj University, Yasouj, Iran. E-mail: v.karimian@yu.ac.ir

³. Assistant Prof., Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Yasouj University, Yasouj, Iran.

⁴. PhD. student . Research expert, Administration Standard of Kohgiluyeh and Boyerahmad Province, Yasouj, Iran.

Article Info

Article type:
Research Full Paper

2023; Vol 17, Issue 3

Article history:
Received: 26.02.2023
Revised: 14.08.2023
Accepted: 16.08.2023

Keywords:
Medicinal plants,
Asafetida,
Harvest age;
Harvest stage,
Essential oil.

Abstract

Background and objectives: Asafoetida (*Ferula assa foetida* L.) is a crucial pharmaceutical-industrial species native to Iranian rangelands and is harvested by local communities. The resulting slurry is a significant export in the medicinal plants sector. However, the quality of the product declines as local beneficiaries collect slurries from different age bases, mix them, and supply them to the market. This study aims to investigate the antimicrobial properties, total phenolic content (TPC), and total flavonoid content (TFC) of asafoetida slurry obtained from different harvest methods to optimize product quality.

Methodology: A factorial completely randomized design was employed in the rangeland of Tangsorkh, Boyerahmad County. Asafoetida slurry was harvested from three age groups (5-6 years old, 7-8 years old, and 9-10 years old) in June, July, August, and September. Essential oil extraction, TPC, and TFC measurements were conducted, and the antimicrobial effects (MIC and MBC) were tested against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus flavus*, and *Aspergillus parasiticus*.

Results: The results showed that the TPC and TFC of asafetida slurry essential oil obtained from different ages and harvest times did not significantly differ. In terms of age, the highest (92 mg GA/g) and lowest (74 mg GA/g) TPC values belonged to the groups of 1 and 3, respectively. Similarly, the highest (37 mg quercetin/g) and lowest (20 mg quercetin/g) TFC values were respectively associated with the groups of 1 and 3. In terms of the harvest time, the highest TPC (93 mg GA/g) was found in the essential oil obtained in June, while the lowest TPC (56 mg GA/g) was related to the essential oil extracted in September. Similarly, the highest (37 mg quercetin/g) and lowest (19.3 mg quercetin/g) TFC values were respectively associated with the essential oils obtained from the products harvested in June and September. The results also demonstrated that the MICs of the essential oil were equal to 1250, 312.5, 625, and 625 ppm for *E. coli*, *S. aureus*, *A. flavus*, and *A.*

parasiticus, respectively. Furthermore, the MBCs of the essential oil were respectively equal to 2500, 650, 1250, and 1250 for the four microorganisms.

Conclusion: The study highlights the influence of plant age and harvest time on the nutraceutical composition of asafoetida slurry. Younger plants harvested earlier exhibited higher TPC and TFC, accompanied by more pronounced antimicrobial effects. These findings underscore the importance of optimizing harvest methods to enhance the quality of asafoetida slurry.

Cite this article: Ghaderi, S., V. Karimian, F. Ghaderi, S. Haghdoost, 2023. Antimicrobial Effects and Nutraceutical Composition of Asafoetida (*Ferula assa foetida* L.) Slurry: Impact of Harvest Methods (Case Study: Tangsorkh Rangeland, Boyerahmad County). *Journal of Rangeland*, 17(3): 411-425.



© The Author(s).
Publisher: Iranian Society for Range Management

DOR: 20.1001.1.20080891.1402.17.3.6.9

بررسی اثرات ضد میکروبی و میزان کل فنل و فلاونوئید شیرابه آنغوزه (*Ferula assa-foetida* L.) در روش‌های مختلف برداشت (مطالعه موردی: مراتع تنگ سرخ، شهرستان بویراحمد)

سجاد قادری^۱، وحید کریمیان^{۲*}، فریبا قادری^۳، سپهر حقدوست^۴

^۱ استادیار گروه علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشکده بهداشت و علوم تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران.
^۲ نویسنده مسئول، استادیار گروه جنگل، مرتع و آبخیزداری، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران. رایان‌نامه: v.karimian@yu.ac.ir
^۳ استادیار گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران.
^۴ دانشجوی دکتری، کارشناس پژوهش، اداره استاندارد استان کهگیلویه و بویراحمد، یاسوج، ایران.

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله کامل - پژوهشی	سابقه و هدف: آنغوزه <i>Ferula assa-foetida</i> L. از گونه‌های دارویی-صنعتی بسیار مهم مراتع ایران بوده که توسط بهره‌برداران محلی برداشت می‌شود. شیرابه تولیدی این گیاه از جمله محصولات صادراتی در حوزه گیاهان دارویی کشور محسوب می‌شود. بهره‌برداران شیرابه استحصالی از پایه‌های سنی مختلف در طول دوره بهره‌برداری را برداشت، باهم مخلوط و روانه بازار می‌کنند که منجر به پایین آمدن کیفیت محصول می‌شود. نظر به اینکه عوامل مختلف محیطی و غیر محیطی از جمله سن و زمان برداشت سبب تغییرات در کمیت و کیفیت مواد مؤثره گیاهان دارویی می‌شود، هدف این پژوهش تعیین ویژگی‌های ضد میکروبی و تغییرات فنل و فلاونوئید کل شیرابه آنغوزه در شیوه‌های مختلف برداشت جهت رسیدن به محصول با کیفیت است.
۱۴۰۲؛ جلد ۱۷، شماره ۳	مواد و روش‌ها: تحقیق در قالب فاکتوریل با طرح کاملاً تصادفی در مراتع تنگ سرخ شهرستان بویراحمد انجام شد. پس از شناسایی منطقه، قسمت‌هایی که به لحاظ درصد شیب، پوشش و خصوصیات ظاهری خاک وضعیت مشابهی داشتند و به تعداد کافی پایه گیاه آنغوزه در سنین مختلف در آن‌ها وجود داشت، بعنوان محدوده انجام تحقیق انتخاب شدند. شیرابه گیاه آنغوزه از سه گروه سنی مختلف (سن ۱ (پایه‌های ۵-۶ ساله)، سن ۲ (پایه‌های ۷-۸ ساله) و سن ۳ (پایه‌های ۹-۱۰ ساله)) در ماه‌های تیر، مرداد، شهریور و مهر برداشت شد. اسانس‌گیری از شیرابه گیاه به روش تقطیر با بخار آب به وسیله کلونجر انجام گرفت. اندازه‌گیری فنل کل با استفاده از معرف فولین سیوکالتیو با اسید گالیک به عنوان استاندارد و مقدار کل فلاونوئید موجود در اسانس‌ها با استفاده از روش رنگ سنجی کلرید آلومینیوم با کوئرستین به عنوان استاندارد تعیین شد. خصوصیات ضد میکروبی (MIC و MBC) اسانس گیاه آنغوزه بر چهار میکروارگانیسم اشیرشیا کلی، استافیلوکوکس اورئوس، آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس مورد بررسی قرار گرفت. مقایسه میانگین‌ها با آزمون چنددامنه‌ای دانکن در محیط SPSS Ver.21 انجام شد.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۰۷ تاریخ ویرایش: ۱۴۰۲/۰۵/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۵/۲۵	
واژه‌های کلیدی: گیاهان دارویی، آنغوزه، سن برداشت، مرحله برداشت، اسانس.	

نتایج: بر اساس نتایج به دست آمده فنل و فلاونوئید کل اسانس شیرابه آنگوزه در سنین و مراحل مختلف برداشت اختلاف معنی داری باهم دارند. از نظر سن گیاه، بیشترین میزان فنل در اسانس گیاهان سن ۱ (۹۲ میلی گرم گالیک اسید در گرم) و کمترین در اسانس سن ۳ (با ۷۴ میلی گرم گالیک اسید در گرم) به دست آمد. بیشترین میزان فلاونوئید در اسانس سن ۱ (۳۷ میلی گرم کوئرستین در گرم) و کمترین اسانس سن ۳ (۲۰ میلی گرم کوئرستین در گرم) وجود داشت. از نظر زمان برداشت، بیشترین میزان فنل در اسانس شیرابه تیرماه (۹۳ میلی گرم گالیک اسید در گرم) و کمترین در اسانس شیرابه مهرماه (۵۶ میلی گرم گالیک اسید در گرم) وجود دارد. بیشترین میزان فلاونوئید در اسانس اسانس شیرابه تیرماه (۳۷ میلی گرم کوئرستین در گرم) و کمترین در اسانس شیرابه مهرماه (۱۹/۳ میلی گرم کوئرستین در گرم) وجود داشت. نتایج مربوط به حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت بازدارندگی (MIC و MBC) اسانس شیرابه آنگوزه در سنین مختلف نشان داد که MIC برای باکتری‌های اشیرشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس، اسپرژیلوس فلاوس و اسپرژیلوس پارازیتیکوس به ترتیب ۱۲۵۰، ۳۱۲/۵، ۶۲۵ و ۶۲۵ و همچنین MBC برای این میکروارگانیسم‌ها به ترتیب ۲۵۰۰، ۶۵۰، ۱۲۵۰ و ۱۲۵۰ پی‌پی‌ام است.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه مشخص شد که میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی کل گیاه آنگوزه تحت تاثیر زمان و سنین مختلف برداشت شیرابه این گیاه است. میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی در اسانس برداشت شده از پایه‌های گیاهی جوان‌تر و در مراحل اول برداشت از بیشترین میزان برخوردار است و همچنین اثرات ضد میکروبی این اسانس نسبت به نمونه برداشت شده در سن‌های بالاتر بیشتر است.

استناد: س. قادری، و. کریمیان، ف. قادری، س. حقدوست، ۱۴۰۲. بررسی اثرات ضد میکروبی و میزان کل فنل و فلاونوئید شیرابه آنگوزه (*Ferula assa-foetida*) (L.) در روش‌های مختلف برداشت (مطالعه موردی: مراتع تنگ سرخ، شهرستان بویراحمد). مرتع، ۱۷(۳): ۴۱۱-۴۲۵.



DOR: 20.1001.1.20080891.1402.17.3.6.9

© نویسندگان

ناشر: انجمن علمی مرتعداری ایران

مقدمه

ایران خاستگاه نزدیک به ۸۰۰۰ گونه گیاهی است که بیش از ۲۳۰۰ گونه آن استفاده‌های دارویی و صنعتی دارد (۹). گیاهان متعلق به خانواده چتریان (Umbelliferae) از جمله گونه‌های گیاهی با کاربرد خوراکی، دارویی و صنعتی می‌باشند که در اکوسیستم‌های مرتعی پراکنش دارند. جنس *Ferula* متعلق به خانواده چتریان دارای ۱۴۰ گونه است که در منطقه مدیترانه و آسیای مرکزی گسترش یافته است (۱۶). از این جنس ۳۰ گونه در ایران وجود دارد که گونه‌هایی از جمله؛ *F. gabrielii* *F. pseudalli-acea* *F. microcolea* *F. stenocarpa* *F. persica kahanica* *F. F. behboudiana* *F. macrocolea* *F. tabasensis* *F. serpentinica* *F. sharifii* *F. assa-foetida* *Jutensis* *F. xylorhachis* و *F. flabelliloba* بومی ایران است (۲۸). آنغوزه با نام علمی *Ferula assa-foetida* L. از گونه‌های دارویی-صنعتی بسیار مهمی که در مراتع ایران رویش دارد و از گذشته توسط مردم محلی مورد بهره‌برداری قرار می‌گیرد. ارزش اصلی آنغوزه شیرابه‌ای است که از آن استحصال می‌شود، شیرابه تولیدی آنغوزه از جمله محصولات صادراتی کشور محسوب می‌شود (۱۷ و ۲۹). *F. assa-foetida* گیاهی علفی و کرکدار است که تجدیدحیات طبیعی آن از طریق تولید و پراکنش بذر صورت می‌گیرد (۳۲). این گیاه ارزشمند یکپایه (Monocious) و یکبار گل‌دهنده (Monocarpic) بوده و بومی ایران و قسمت‌هایی از افغانستان است (۱۴، ۳۵). گل آذین آنغوزه چتر مرکب، گلها زرد رنگ، ریشه راست، برگهای قاعده ساقه این گیاه عموماً گوشتدار، به طول متوسط ۵۰ تا ۶۰ سانتی‌متر و فاقد دم‌برگ و منقسم به قطعاتی با تقسیمات فرعی دنداندار یا لوبدار است (۴۲). فلات مرکزی و مناطق بیابانی تا سلسله جبال زاگرس در استان‌های کهگیلویه و بویراحمد، فارس، کرمان، خراسان، یزد، سمنان، هرمزگان، سیستان و بلوچستان، اصفهان، لرستان و بوشهر به عنوان رویشگاه اصلی این گیاه در ایران ذکر شده‌اند (۲۰). شیرابه آنغوزه در بعضی از کشورها بعنوان داروی گیاهی و چاشنی مصرف می‌شود (۱۸). شیرابه آنغوزه

شامل ترکیبات گوگردی، آلفا پینن، بتا پینن، مشتقات کومارینی فئوتیدن، کامولونفرول، آمبلی پرنین، کانفرول بسیاری ترکیبات دیگر است (۴۱). از صمغ گیاه آنغوزه علاوه بر مصارف دارویی در صنایع عطرسازی نیز استفاده می‌شود. در طب سنتی تاثیر ضد تشنج، ضد کرم، رفع بیماری‌های عصبی، اشتهاآور، رفع تنبلی روده، رفع درد کلیه، تقویت حافظه، ضد روماتیسم، رفع ضرر اغذیه چرب، ضد گرفتگی عضلات و تاثیر بر فشار خون برای آنغوزه ذکر شده است. ویژگی‌های ضد ویروسی (۲۱)، ضد قارچ (۳)، آنتی‌اکسیدان (۸)، ضد دیابتی (۱) و ضد اسپاسم (۱۰) برای شیرابه آنغوزه در مطالعات قبلی گزارش شده است. عوامل مختلف سبب تغییراتی در رشد گیاهان دارویی و کیفیت مواد مؤثره آن‌ها می‌گردند، لذا برداشت یک گیاه دارویی زمانی مقرون به صرفه است که مواد مؤثره آن به حد مطلوب رسیده باشد. برداشت گیاهان دارویی در زمان نامناسب نه تنها میزان محصول به دست آمده را کاهش می‌دهد بلکه محصول برداشت شده نیز از کیفیت خوبی برخوردار نخواهد بود زیرا عملکرد اندام مورد نظر و میزان متابولیت‌های ثانویه یک گیاه دارویی در مراحل مختلف رشد و نمو گیاه متفاوت است. به طور کلی متغیرهای ژنتیکی و غیر ژنتیکی مانند شرایط محیطی (۲، ۱۲ و ۳۴) و همچنین فاکتورهای دیگری چون؛ گونه گیاهی، اندم گیاهی (برگ‌ها، گل‌ها، ساقه و ریشه‌ها)، سن گیاه، زمان برداشت، مرحله رشد، شرایط نگهداری و خشک کردن و روش استخراج از جمله عوامل مهم و تاثیر گذار بر کمیت و کیفیت گیاهان دارویی و صنعتی می‌باشند (۱۳، ۳۹).

مطالعات نشان داده اند که ترکیب شیمیایی و عملکرد گیاهان دارویی به لحاظ زمان، دوره و محل جمع آوری تفاوت‌های قابل توجهی را نشان می‌دهد (۲۲ و ۳۱).

مطالعات مختلفی تاثیر زمان‌های مختلف برداشت بر کمیت و کیفیت ترکیبات شیمیایی و عملکرد گیاهان مختلف را مورد بررسی قرار داده است؛ کزیرسکی و همکاران (۲۰۱۶) گیاه *Aesculus hippocastanum*، بیتو و همکاران (۲۰۱۵) گیاه *Lippia gracilis* Schauer، سینتیم و همکاران (۲۰۱۵) گیاه *Anethum graveolens* L.



شکل ۲: تصویر محدوده مورد مطالعه و گیاه آنگوزه

روش کار عملیات میدانی

تحقیق در قالب فاکتوریل با طرح کاملاً تصادفی انجام شد. پس از انتخاب پایه‌های گیاهی آنگوزه در محدوده مورد نظر، بعد از اینکه برگ گیاهان از رنگ سبز به زرد متمایل شدند، طبق شیوه رایج منطقه بهره‌برداری از شیرابه آنگوزه انجام شد. باتوجه به اینکه پایه‌های آنگوزه مورد بهره‌برداری در محدوده سنی حداقل ۵ و حداکثر ۱۰ می‌باشد سه دسته سنی شامل؛ سن ۱ (پایه‌های ۶-۵ ساله)، سن ۲ (پایه‌های ۸-۷ ساله) و سن ۳ (پایه‌های ۱۰-۹ ساله) انتخاب شد که جهت تعیین سن گیاه از نظرات بهره‌برداران محلی و دوایر بجای مانده از برگ‌های اطراف قاعده استفاده شد. همچنین باتوجه به اینکه دوره برداشت شیرابه آنگوزه از تیرماه تا مهرماه به طول می‌انجامد در ماه‌های تیر، مرداد، شهریور و مهر با مراجعه به مراتع تنگ‌سرخ نمونه‌برداری شیرابه انجام گرفت. شیرابه‌های جمع‌آوری شده در ظروف ویژه درب‌دار ذخیره و به محیط آزمایشگاهی جهت انجام آزمایشات باکتری، قارچ، تست‌های فنل و فلاونوئید کل منتقل شد.

عملیات آزمایشگاهی

اسانس‌گیری

از نمونه شیرابه‌های آنگوزه جمع‌آوری شده در طول دوره بهره‌برداری در منطقه تنگ‌سرخ، از هر کدام از ماه‌های مختلف برداشت (چهار ماه) و سنین متفاوت (سه طبقه

سن)، نمونه‌های ۵۰ گرمی با سه تکرار برداشت شد. اسانس‌گیری از گیاه به روش تقطیر با بخار آب (Water distillation) به وسیله دستگاه کلونجر (Clevenger) انجام گرفت (۲۶). ۵۰ گرم از شیرابه را درون بالن دستگاه کلونجر ریخته شد و به آن یک لیتر آب اضافه گردید. پس از گذشت مدت زمان ۳ ساعت، به کمک سرمای حاصل از مبرد، قطرات حاوی اسانس، به رنگ زرد روشن به‌دست آمد که بعلت سبکتر بودن وزن حجمی آن درون لوله مدرج دستگاه بر روی آب قرار گرفته بودند استخراج گردیدند. اسانس به‌دست آمده توسط سولفات سدیم رطوبت‌زدایی و خشک شد سپس درون ظروف مخصوص شیشه‌ای جهت آنالیز در محیط خنک و تاریک یخچال نگهداری گردید.

سنجش میزان فنل کل

اندازه‌گیری فنل کل به با استفاده از معرف فولین سیوکالتیو با اسید گالیک به عنوان استاندارد تعیین شد (۲۳). ۰/۱ میلی‌لیتر اسانس استخراج شده (۰/۱ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر) یا محلول استاندارد اسید گالیک (۰/۵-۰ میلی‌گرم) به ۱ میلی‌لیتر معرف فولین سیوکالتیو اضافه شد (۰/۱۰). پس از ۵ دقیقه ۰/۳ میلی‌لیتر Na_2CO_3 (۰/۱۰) اضافه شد و مخلوط به مدت ۱ ساعت بر روی شیکر قرار داده شد. جذب در طول موج ۷۶۵ نانومتر با استفاده از

اسپکتروفتومتر خوانده شد. فنل کل به صورت میلی گرم اسید گالیک در هر گرم اسانس بیان شد.

سنجش میزان فلاونوئید کل

مقدار کل فلاونوئید موجود در اسانس ها با استفاده از روش رنگ سنجی کلرید آلومینیوم با کوئرستین به عنوان استاندارد تعیین شد (۲۳). به طور خلاصه، ۰/۱ میلی لیتر از اسانس استخراج شده (۰/۱ میلی گرم/ میلی لیتر) یا محلول استاندارد کوئرستین (۰/۵-۰ میلی گرم) به ۰/۳ میلی لیتر NaNO_2 (۵٪) اضافه شد. پس از ۵ دقیقه ۰/۳ میلی لیتر از AlCl_3 (۱۰٪) اضافه شد. پس از ۶ دقیقه، ۲ میلی لیتر NaOH ۱ مولار اضافه شد و سپس حجم کل با آب مقطر به ۱۰ میلی لیتر رسید و به دقت مخلوط شد. جذب در طول موج ۵۱۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر خوانده شد. فلاونوئید کل به صورت میلی گرم کوئرستین در هر گرم اسانس بیان شد.

بررسی خصوصیات آنتی میکروبیال اسانس های گیاه

الف) سوش های میکروبی مورد بررسی

برای بررسی خصوصیات ضد میکروبی اسانس گیاه آنغوزه، اثرات آن بر چهار پاتوژن حائز اهمیت در ایجاد مسمومیت های غذایی شامل دو باکتری اشیرشیا کلی و استافیلوکوکس اورئوس و همچنین دو قارچ آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس مورد بررسی قرار گرفت. سویه های باکتری یک شب قبل از انجام آزمایش روی محیط نوترینت آگار و سویه های قارچی یک هفته قبل روی محیط سابور و دکستروز آگار در دمای ۳۷ و ۲۲ درجه سانتیگراد و در شرایط هوازی گرمخانه گذاری شدند.

ب) تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC)

برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) اسانس بر روی باکتریهای مورد بررسی از روش ریز رقت (Micro Dilution) با استفاده از میکروپلت های ۹۶ خانه ای الیزا (ELISA) به صورت رقیق سازی دو برابر متوالی از غلظت های ۱۲۵/۷۸ ppm تا ۴۰۰۰۰ ppm در سه تکرار بهره گرفته شد. در این روش ابتدا سوش های میکروبی خالص بر روی محیط مولر هینتون آگار (Mueller-Hinton Agar) بصورت خطی کشت داده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷

درجه سانتیگراد گرم خانه گذاری شدند. سپس به کمک محلول ۰/۵ مک فارلند، سوسپانسیون میکروبی معادل ۱۰۸ CFU/ml از هر باکتری تهیه شد. برای هر اسانس توسط دی متیل سولفوکساید (DMSO)، به صورت دو برابر متوالی غلظت های ۱۲۵/۷۸ ppm تا ۴۰۰۰۰ ppm تهیه و به چاهک های سه ردیف (سه تکرار) از میکروپلیت ۹۶ خانه ای الیزا انتقال داده شد. برای این منظور در هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت مولر هینتون برات (Mueller-Hinton Broth) ریخته شده و سپس ۳۰ میکرولیتر از هر یک از غلظت های اسانس تهیه شده به چاهک ها افزوده گردید. از یک ردیف اسانس با غلظت های ذکر شده به تنهایی، یک ردیف محیط کشت بدون باکتری و یک ردیف محیط کشت به علاوه باکتری به ترتیب به عنوان شاهد غلظت اسانس، محیط کشت و مقدار رشد باکتری استفاده شد. سپس گرمخانه گذاری میکروپلیت ها در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت انجام گردید و بعد از آن کدورت چاهک ها توسط دستگاه خواننده الیزا (ELISA READER) مدل Bio-Tek Instruments. U.S قرائت شد در نهایت حداقل غلظت مهارکنندگی از رشد برای اسانس های مورد مطالعه اندازه گیری شد.

تجزیه و تحلیل داده ها

تجزیه واریانس داده های به دست آمده با نرم افزار SPSS انجام شد. میانگین ها با آزمون چنددامنه ای دانکن با ضریب اطمینان ۹۵ درصد مقایسه شدند. رسم نمودارها نیز با استفاده از نرم افزار اکسل انجام شد.

نتایج

فنل و فلاونوئید کل اسانس شیرابه آنغوزه در سنین مختلف برداشت

بر اساس نتایج به دست آمده فنل و فلاونوئید کل اسانس شیرابه در سنین مختلف برداشت در سطح یک درصد معنی دار است (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین نشان می دهد که بین سن های مختلف از نظر فنل و فلاونوئید کل اختلاف معنی داری وجود دارد. بترتیب بیشترین میزان فنل در اسانس سن ۱ (پایه های گیاهی ۶-۵ ساله) با ۹۲ میلی گرم گالیک اسید در گرم، سن ۲

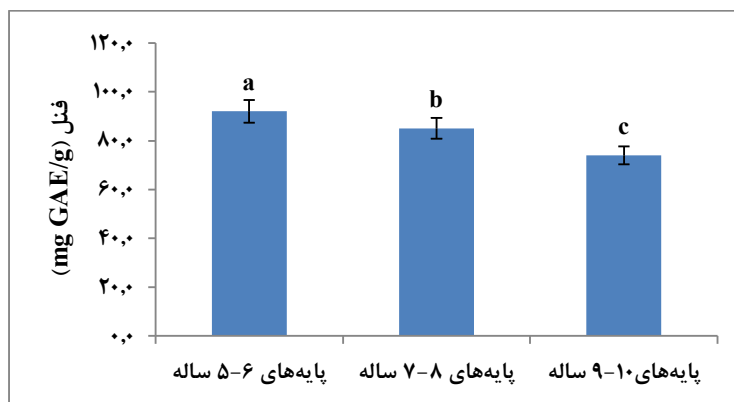
بررسی اثرات ضد میکروبی و میزان کل فنل و فلاونوئید شیرابه آنگوزه ... / قادری و همکاران

ساله) با ۳۷ میلی گرم کوئرستین در گرم، سن ۲ (پایه‌های گیاهی ۷-۸ ساله) با ۲۷ میلی گرم گالیک اسید گرم و کمترین میزان فلاونوئید در اسانس سن ۳ (پایه‌های گیاهی ۹-۱۰ ساله) با ۲۰ میلی گرم کوئرستین در گرم وجود دارد (شکل ۴).

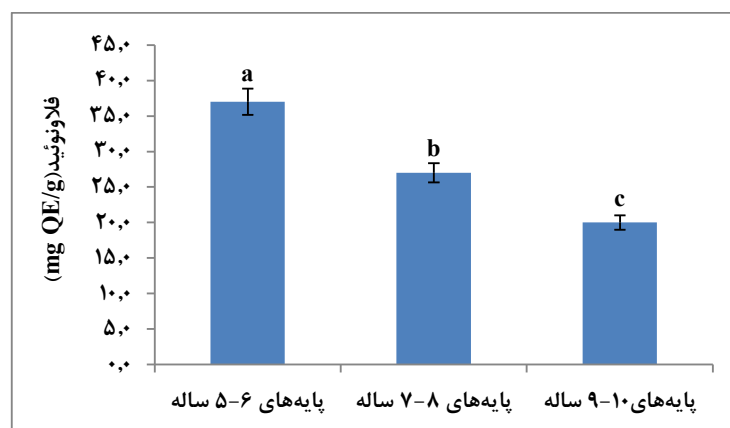
(پایه‌های گیاهی ۷-۸ ساله) با ۸۵ میلی گرم گالیک اسید گرم و کمترین میزان فنل در اسانس سن ۳ (پایه‌های گیاهی ۹-۱۰ ساله) با ۷۴ میلی گرم گالیک اسید در گرم وجود دارد (شکل، ۳). از نظر فلاونوئید کل به ترتیب بیشترین میزان در اسانس سن ۱ (پایه‌های گیاهی ۵-۶

جدول ۱: تجزیه واریانس فنل و فلاونوئید اسانس شیرابه آنگوزه در سن‌های مختلف برداشت

شاخص (سن)	منابع تغییرات	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	معنی‌داری
فنل کل	بین گروه	۴۹۴/۰۰۰	۲	۲۴۷/۰۰۰	۲۴۷/۰۰۰**
	درون گروه	۶/۰۰۰	۶	۱/۰۰۰	
	مجموع	۵۰۰/۰۰۰	۸		
فلاونوئید کل	بین گروه	۴۳۸/۰۰۰	۲	۲۱۹/۰۰۰	۲۱۹/۰۰۰**
	درون گروه	۵/۰۰۰	۶	۱/۰۰۰	
	مجموع	۴۴۴/۰۰۰	۸		



شکل ۳: مقایسه میانگین فنل کل اسانس شیرابه آنگوزه در سن‌های مختلف برداشت



شکل ۴: مقایسه میانگین فلاونوئید کل اسانس شیرابه آنگوزه در سن‌های مختلف برداشت

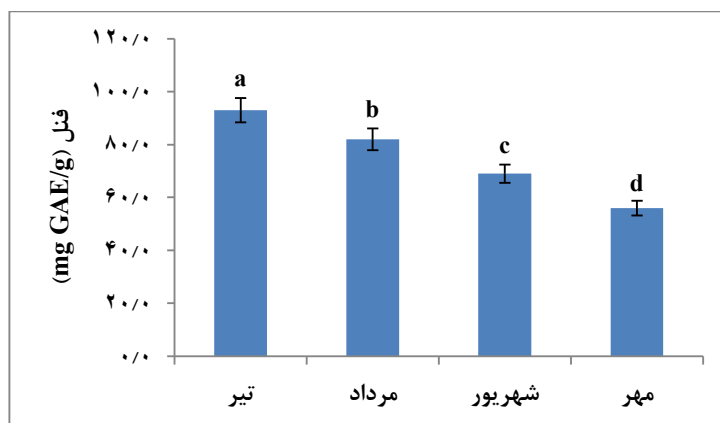
فنل و فلاونوئید کل اسانس شیرابه آنغوزه در ماه‌های مختلف برداشت

بر اساس نتایج به دست آمده فنل و فلاونوئید کل اسانس شیرابه در ماه‌های مختلف برداشت در سطح یک درصد معنی دار است (جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین فنل و فلاونوئید کل اسانس شیرابه آنغوزه نشان می‌دهد که بین ماه‌های مختلف برداشت اختلاف معنی داری وجود دارد. بتریب بیشترین میزان فنل در اسانس شیرابه تیرماه (۹۳ میلی گرم گالیک اسید در گرم)، اسانس شیرابه مردادماه (۸۲ میلی گرم گالیک اسید در گرم)، اسانس شیرابه شهریورماه

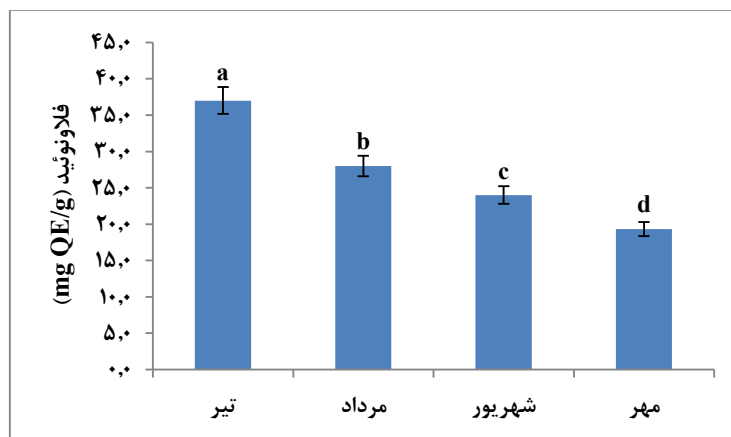
(۶۹ میلی گرم گالیک اسید در گرم) و کمترین میزان فنل در اسانس شیرابه مهرماه (۵۶ میلی گرم گالیک اسید در گرم) وجود دارد (شکل ۵). از نظر فلاونوئید کل بتریب بیشترین میزان در اسانس اسانس شیرابه تیرماه (۳۷ میلی گرم کوئرستین در گرم)، اسانس شیرابه مردادماه (۲۸ میلی گرم کوئرستین در گرم)، اسانس شیرابه شهریورماه (۲۴ میلی گرم کوئرستین در گرم) و کمترین میزان فلاونوئید در اسانس شیرابه مهرماه (۱۹/۳ میلی گرم کوئرستین در گرم) وجود دارد (شکل ۶).

جدول ۲: تجزیه واریانس فنل و فلاونوئید اسانس شیرابه آنغوزه در ماه‌های مختلف برداشت

شاخص (مرحله)	منابع تغییرات	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	معنی داری
فنل کل	بین گروه	۲۳۱۰/۰۰۰	۳	۷۷۰/۰۰۰	۷۷۰/۰۰۰**
	درون گروه	۸/۰۰۰	۸	۱/۰۰۰	
	مجموع	۲۳۱۸/۰۰۰	۱۱		
فلاونوئید کل	بین گروه	۵۰۶/۲۵۰	۳	۱۶۸/۷۵۰	۲۰۲/۵۰۰**
	درون گروه	۶/۶۶۷	۸	۰/۸۸۳	
	مجموع	۵۱۲/۹۱۷	۱۱		



شکل ۵: مقایسه میانگین فنل کل اسانس شیرابه آنغوزه در ماه‌های مختلف برداشت



شکل ۶: مقایسه میانگین فلاونوئید کل اسانس شیرابه آنگوزه در ماه‌های مختلف برداشت.

نشان داد که MIC برای باکتری‌های اشیرشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس، اسپرژیلوس فلاووس و اسپرژیلوس پارازیتیکوس به ترتیب ۱۲۵۰، ۳۱۲/۵، ۶۲۵ و ۶۲۵ و همچنین MBC برای این میکروارگانیسم‌ها به ترتیب ۲۵۰۰، ۶۵۰، ۱۲۵۰ و ۱۲۵۰ پی‌پی‌ام بود. با توجه به نتایج حاصل از ارزیابی اثر ضد میکروبی اسانس شیرابه آنگوزه بر میکروارگانیسم‌های مورد بررسی می‌توان آنها را از مقاومترین به ترتیب باکتری گرم منفی اشیرشیا کلی، کپک‌های اسپرژیلوس پارازیتیکوس و اسپرژیلوس فلاووس و در نهایت باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس نام برد.

بررسی خصوصیات ضد میکروبی اسانس شیرابه آنگوزه در سنین مختلف برداشت

نتایج حاصل از بررسی میکروبی اسانس شیرابه آنگوزه بر میکروارگانیسم‌ها نشان داد که این اسانس بر همه میکروارگانیسم‌های مورد بررسی موثر بوده و میزان این تاثیرگذاری عکس‌العملی از غلظت ماده موثره موجود در اسانس و همچنین میزان این اسانس بر اساس سن گیاه بوده است.

نتایج مربوط به حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت بازدارندگی (MIC و MBC) اسانس شیرابه آنگوزه در سنین مختلف رشد در جدول (۳) آورده شده است. نتایج

جدول ۳: حداقل و حداکثر غلظت مهارکنندگی اسانس گیاه آنگوزه بر روی میکروارگانیسم‌های مورد بررسی

MIC و MBC (برحسب ppm)				باکتری
سن ۱ (MIC)	سن ۱ (MBC)	سن ۳ (MIC)	سن ۳ (MBC)	
۱۲۵۰	۲۵۰۰	۲۵۰۰	۵۰۰۰	اشیرشیا کلی
۳۱۲/۵	۶۵۰	۶۲۵	۱۲۵۰	استافیلوکوکوس اورئوس
۶۲۵	۱۲۵۰	۶۲۵	۲۵۰۰	اسپرژیلوس فلاووس
۶۲۵	۱۲۵۰	۱۲۵۰	۲۵۰۰	اسپرژیلوس پارازیتیکوس

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داد که اسانس شیرابه آنگوزه تحت تاثیر سن و زمان برداشت گیاه است. نتایج مطالعات محققین نشان می‌دهد که بافت گیاه جوانتر

به دلیل افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه، می‌تواند فعالیت‌های بیوسنتز را افزایش دهند (۲۷). در مطالعه حاضر مشخص شد که با افزایش سن میزان فنل و فلاونوئید کل کاهش می‌یابد. مطالعات نشان داده است که فرایند پیری

گیاهان می‌تواند سبب کاهش محتوای اسانس‌ها و ترکیبات اصلی شود (۱۱، ۲۴ و ۳۳). نتایج کاووسی و روشن (۲۰۱۳) در زمینه تاثیر مراحل مختلف برداشت بر روی میزان فنل و فلاونوئید کل آنگوزه نشان داد که با افزایش مراحل مختلف برداشت از ۱۵ ژوئن تا ۳۰ ژوئن و رسیدن به ۱۵ جولای از میزان فنل و فلاونوئید اسانس گیاه کاسته می‌شود که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد. براساس نتایج ژرکوویچ و همکاران (۲۰۰۱)، کاهش محتوای روغن گیاه *Origanum vulgare* L. در طی ماه آگوست می‌تواند باعث پیری بافت گیاهی باشد که منجر به تجزیه فنل‌ها می‌شود و از این طریق سبب جلوگیری از آسیب‌های استرس بوسپله آنتی‌اکسیدان‌های غیرطبیعی می‌شود.

نتایج نشان داد که با توجه به میزان بیشتر ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی در اسانس برداشت شده از سنین اول گیاه، خصوصیات ضد میکروبی این اسانس نسبت به نمونه برداشت شده در سن‌های بالاتر بیشتر می‌باشد. نتایج این پژوهش با تحقیقات مشابه همخوانی قابل توجهی دارد. سرانو و همکاران (۲۰۱۱) اثر ضدباکتریایی اسانس مرزه را بر باکتری‌های بروکوترکس ترموسفاکتا، لیستریا مونوسیتوژنز، لیستریا اینوکووا، سودوموناس پوتیدا، سالمونلا تیفی موریوم، شوانلا پوتریفشینس مورد بررسی قرار دادند. نتایج به وضوح نشان داد که باکتری گرم مثبت بروکوتریکس ترموسفاکتا حساسترین و باکتری گرم منفی اشیرشیا کلی مقاومترین میکروارگانیسم مورد بررسی بودند. همچنین این نتایج با نتایج پژوهش میهاجیلو و همکاران (۲۰۰۹) مطابقت دارد. نتایج نشان داد، اثر ضد میکروبی اسانس بسته به نوع میکروارگانیسم متفاوت می‌باشد. به طور کلی باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی حساسیت بیشتری نسبت به اسانس شیرابه آنگوزه از خود نشان دادند و رشد باکتری‌های گرم مثبت نسبت به گرم منفی در غلظت کمتری از اسانس متوقف شد، علت آن اختلاف ساختمان دیواره باکتری گرم مثبت به گرم منفی می‌باشد. به طوری که باکتری‌های گرم مثبت در دیواره ی سلولی خود دارای ترکیب موکوپپتید بوده، در حالی که باکتری‌های گرم منفی فقط لایه نازکی از موکوپپتید دارند و قسمت اعظم ساختمان دیواره در آنها لیپوپروتئین و لیپوپلی

ساکارید است. به همین دلیل باکتری‌های گرم منفی مقاوم‌ترند. در نتیجه مقاومت بالاتر باکتری‌های گرم منفی را می‌توان به حضور غشای فسفولیپیدی خارجی تقریباً غیرقابل نفوذ به ترکیبات چربی دوست نسبت داد. با توجه به تعداد ترکیبات شیمیایی در اسانس گیاهان، نمی‌توان مکانیسم واحدی برای اثرات ضد میکروبی آنها در نظر گرفت، بلکه آنها هدف‌های متعددی در سلول خواهند داشت. این مکانیسم‌ها جداگانه عمل نمی‌کنند و بعضی از آنها توسط سایرین تحت تاثیر قرار می‌گیرد. به نظر می‌رسد ترکیبات فنلی موجود در اسانس از طریق تغییر ساختار و عمل غشاء سلولی اثرات ضد میکروبی خود را اعمال می‌کنند. این ترکیبات با افزایش نفوذپذیری غشاء منجر به افزایش حجم و متورم شدن سلول می‌شوند (۷).

باکتری‌های گرم منفی غشاء دولایه دارند که لایه پپتیدوگلیکان در فضایی بین غشای داخلی و خارجی به نام فضای پری پلاسمی قرار دارد. پری پلاسم بسیار فعال بوده و دارای آنزیم‌های مختلف تجزیه کننده و سم زدا است. آنزیم‌های موجود در فضای پری پلاسمی (فسفاتاز و پروتئازها از گروه آنزیم‌های تجزیه‌ای و بتالاکتامازها) پنی‌سلیناز و آنزیم‌های فسفوریله کننده آمینوگلیکوزید از گروه آنزیم‌های سم‌زدا قادرند مولکول‌های وارد شده را تجزیه کنند. در مورد باکتری‌های گرم مثبت مواد ضد میکروبی به راحتی دیواره سلولی و غشاء سیتوپلاسمی را تخریب نموده که منجر به نشت سیتوپلاسم و انعقاد آن می‌شود. مکانیسم دیگر توانایی ترکیبات فنلی در اتصال با پروتئین‌ها است. این ترکیبات با تخریب گیرنده‌های سطحی دیواره باکتری‌ها، در سنتز پروتئین‌ها اختلال ایجاد می‌کنند؛ لذا دلیل بالاتر بودن حداقل غلظت کشندگی میکروارگانیسم‌های گرم منفی با توجه به توضیحات گفته شده به خوبی توجیه می‌شود (۳۰). در مطالعه‌ای که توسط آرورا و کوآر انجام گردید فعالیت ضد باکتریایی عصاره آبی آنگوزه بر علیه سوش‌های خالص استافیلوکوکوس اورئوس، اشیرشیا کلی، سودوموناس آئروجینوزا، سالمونلا تیفی موریوم، شیگلا فلکسینری و سالمونلا تیفی بررسی شد. نتایج نشان داد عصاره این گیاه دارای فعالیت ضد میکروبی معنی‌داری بر روی تمام سوش‌های باکتریایی مورد بررسی

آنگوزه نشان داد که مقاومترین میکروارگانیسم‌های مورد بررسی به ترتیب باکتری گرم منفی اشیرشیا کلی، کپک‌های آسپرژیلوس پارازیتیکوس و آسپرژیلوس فلاوس و در نهایت باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس بودند. بطور کلی با در نظر گرفتن این مهم که گیاهان دارویی-صنعتی از جمله محصولات حائز اهمیت اکوسیستم‌های مرتعی است که در راستای بهره‌برداری چندمنظوره از مراتع جهت مدیریت پایدار این اکوسیستم باارزش و همچنین کمک به بهبود معیشت بهره‌برداران بومی می‌بایست بصورت علمی و اصولی بررسی شود. با توجه به این که عوامل مختلف (زمان برداشت، سن برداشت و غیره)، کیفیت مواد مؤثره گیاهان دارویی را دستخوش تغییرات می‌کند لذا برداشت یک گیاه دارویی زمانی مفید است که مواد مؤثره آن به حد مطلوب رسیده باشد. با توجه به نتایج این پژوهش جهت رسیدن به میزان بالای ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی و همچنین تاثیرگذاری موثر گیاه دارویی آنگوزه بر میکروارگانیسم‌ها و همچنین رسیدن به شرابه با کیفیت بهتر و به طبع آن بالا رفتن درآمد بهره‌برداران محلی استفاده از نتایج تحقیق حاضر در زمینه بهره‌برداری مناسب آنگوزه پیشنهاد می‌شود. سپاسگزاری: این تحقیق توسط معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی یاسوج حمایت شده است، از حمایت این معاونت کمال تشکر و قدردانی را داریم.

می‌باشد (۴). که طبق نتایج به دست آمده از تحقیق ما ارزش بالقوه بالای این گیاه را در ممانعت از رشد طیف وسیعی از باکتری‌های پاتوژن و مولد فساد مواد غذایی نشان می‌دهد. به طور کلی در مطالعه حاضر مشخص شد که میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی کل گیاه آنگوزه تحت تاثیر زمان و سنین مختلف برداشت شیرابه این گیاه است. بیشترین میزان فنل و فلاونوئید کل شیرابه در ماه اول برداشت (تیرماه) و کمترین میزان در ماه آخر برداشت (مهرماه) می‌باشد که هر چه به مراحل پایانی دوره برداشت شیرابه نزدیک شود از میزان فنل و فلاونوئید کل کاسته می‌شود. همچنین بیشترین میزان فنل و فلاونوئید کل شیرابه در سن ۱۰ (پایه‌های گیاهی ۶-۵ ساله) و کمترین در سن ۳ (پایه‌های گیاهی ۱۰-۹ ساله) وجود داشت که با افزایش سن گیاه میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی کاهش می‌یابد. همچنین مشخص شد که با توجه به میزان بیشتر ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی در اسانس برداشت شده از پایه‌های گیاهی جوان‌تر (سنین اول)، خصوصیات ضد میکروبی این اسانس نسبت به نمونه برداشت شده در سن‌های بالاتر بیشتر می‌باشد. نتایج بررسی میکروبی اسانس شیرابه آنگوزه بر میکروارگانیسم‌ها نشان داد که این اسانس بر همه میکروارگانیسم‌های مورد بررسی موثر بوده و میزان این تاثیرگذاری عکس‌العملی از غلظت ماده مؤثره موجود در اسانس و همچنین میزان این اسانس بر اساس سن گیاه است. نتایج بررسی نهایی اثر ضد میکروبی اسانس شیرابه

References

1. Abu-Zaiton, A.S., 2010. Anti-diabetic activity of *Ferula assafoetida* extract in normal and alloxan-induced diabetic rats. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 13: 97-100.
2. Adams, R.P., R.K. Thappa, S.G. Agarwal, B.K. Kapahi & Y.K. Sarin, 1992. The volatile leaf oils of *Juniperus semiglobosa* Regel from India compared with *J. excelsa* M.- Bieb. From Greece. *Journal of Essential Oil Research*, 4: 143-149.
3. Angelini, P., R. Pagiotti, R. Venanzoni & B. Granetti, 2009. Antifungal and allelopathic effects of asafetida against *Trichoderma harzianum* and *Pleurotus* spp. *Allelopathy Journal*, 23: 357-368.
4. Arora, D.S. & J.G. Kuar., 2007. Antibacterial activity of some Indian medical plants. *J. National Library of Medicine*, 61: 313- 317.
5. Baranauskienė, R., P. Venskutonis, E. Dambrauskienė & P. Viskelis. 2013. Harvesting time influences the yield and oil composition of *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare* and ssp. *Hirtum*. *Journal of Industrial Crops and Products*, 49: 43-51
6. Bitu, V., J. Costa, F. Rogrigues, A. Colares, H. Coutinho, M. Botelho, A. Portela, N. Santana & I. Menezes, 2015. Effect of Collection Time on Composition of Essential Oil of *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae) Growing in Northeast Brazil. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 18(3): 647-653.

7. Celiktas, O. Y., E. H. Kocabas, E. Bedir, F. V. Sukan, T. Ozek & K. Baser, 2007. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry*, 100(2): 553-559.
8. Dehpour, A.A., M.A. Ebrahimzadeh, N.S. Fazel & N.S. Mohammad, 2009. Antioxidant activity of the methanol extract of *Ferula assafoetida* and its essential oil composition. *Grasasy Aceites*, 60: 405-412.
9. Eskandari Damaneh, N. & M. Sharafatmandrad, 2017. Assessing the Effects of Different Incision Techniques on *Ferula assafoetida* Properties. *Journal of Rangeland Science*, 7:1. 45-54.
10. Fatehi, M., F. Farifteh & Z. Fatehi-Hassanabad, 2004. Antispasmodic and hypotensive effects of *Ferula asafoetida* gum extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 91: 321-324.
11. Figueiredo, L.S., F.P.G. Bonfim, C.S. Siqueira, M.M. Fonseca, A.H. Silva & E.R. Effect of harvest time on phytomass production and essential oil yield of pepper-rosemary (*Lippia sidoides* Cham.). *Brazilian Journal of Medicinal Plants*, 11: 154-158.
12. Fluck, H., 1963. *Chemical Plant Taxonomy*. Academic Press, London.
13. Hajimehdipoor, H., M. Khanavi, M. Shekarchi, Z. Abedi & M. Pirali Hamedani, 2010. Investigation of the best method for extraction of phenolic compounds from *Echinaceae purpurea* L. (Moench). *Journal of Medicinal Plants*, 8: 145-52. (In Persian)
14. Hosseinjafari, S., A. Sepehri, H. Soltanloo & A. Karimiyan, 2019. Investigation and Comparison of Resin Yield Operation of Sweet Asafetida Medicinal Plant in Taft Rangelands of Yazd Province. *Journal of Rangeland*, 13(3): 387-397. (In Persian)
15. Jerkovic, I., J. Mastelic & M. Milos, 2001. The impact of both the season of collection and drying on the volatile constituents of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* grown wild in Croatia. *Journal of Food Science Technology*, 36: 649-654.
16. Karimian, V., P. Ramak & J. Teymuri Majnabadi, 2021. Chemical composition and biological effects of three different types (tear, paste, and mass) of bitter *Ferula assa-foetida* Linn. Gum. *Natural Product Research*, 35(15): 3136-3134.
17. Karimian, V., A. Sepehri & H. Barani, 2018. Effects of different utilization methods of *Ferula assa foetida* L. on oleo-gum-resin production (Case Study: Tangsorkh rangeland, Kohgiluyeh and Boyerahmad province). *Journal of Rangeland*, 12(3): 295-304. (In Persian)
18. Kavooosi, Gh. & V. Rowshan., 2013. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil obtained from *Ferula assa-foetida* oleo-gum-resin: Effect of collection time. *Journal of Food Chemistry*, 138: 2180-2187.
19. Kedzierski, B., W. Kukula-Koch, J. Widelski & K. Głowniak, 2016. Impact of harvest time of *Aesculus hippocastanum* seeds on the composition, antioxidant capacity and total phenolic content. *Industrial Crops and Products*, 86: 68-72.
20. Khosravi, H. & A. Mehrabi., 2006. Economic study of *Ferula* harvesting in Tabass region. *Journal of Natural Research*, 58(4): 933-944. (In Persian)
21. Lee, C.L., L.C. Chiang, L.H. Cheng, C.C. Liaw, M.H. Abd El-Razek, F.R. Chang & Y.C. Wu, 2009. Influenza A (H1N1) antiviral and cytotoxic agents from *Ferula assa-foetida*. *Journal of Natural Products*, 72: 1568-1572.
22. Manganotti, S.A., M.F. Souza, P.N. Silva Souza, M.R. Meira, C.C. de Matos & E.R. Martins, 2011. Influence of time of collection, geographic orientation and canopy in the production of essential oil of *Cordia verbenacea* DC. *Biotemas*, 24: 9-14.
23. Marinova, D., F. Ribarova & M. Atanasova, 2005. Total phenolics and flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*, 40: 255-260.
24. Matos, S.H. & R. Innecco., 2002. Ideal cutting age of *Mentha arvensis* L. as an essential oil and menthol producer in the State of Ceará, Brazil. *Brazilian Journal of Medicinal Plants*, 5: 15-18.
25. Mihajilov-Krstev, T., D. Radnović, D. Kitić, Z. Stojanović-Radić & B. Zlatković, 2010. Antimicrobial activity of *Satureja hortensis* L. essential oil against pathogenic microbial strains. *Archives of Biological Sciences*, 62(1): 159-166.
26. Moghaddam, M. & N. Farhadi, 2015. Influence of environmental and genetic factors on resin yield, essential oil content and chemical composition of *Ferula assa-foetida* L. populations. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 2: 69-76.
27. Moraes, L.A.S., 2009. Influence of abiotic factors on the chemical composition of essential oils. *Horticultura Brasileira*, 27: 4050-4063.
28. Mozaffarian, V., 1996. *A Dictionary of Iranian Plant Names*, Farhang Moaser Press, Iran. (In Persian)

29. Nabian, S., A. Saadatfar & M. Barjoefar, 2021. Production and Marketing Strategies of *Ferula assa-foetida* L. in Kerman Province. *Journal of Rangeland*, 15(1): 59-71. (In Persian)
30. Negi, P., G. Jayaprakasha & B. Jena, 2003. Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts. *Food Chemistry*, 80(3): 393-397.
31. Neves, I.A., J.C.S. de Oliveira, C.A.G. da Camara & M.O.E. Schwartz, 2008. Chemical composition of the leaf oils of *Lippia gracilis* Schauer from two localities of Pernambuco. *Journal of Essential Oil Research*, 20:157-160.
32. Nowruzian, A., M. Masoumian & M.A. Ebrahimi, 2016. Micropropagation of *Ferula assa-foetida* L. Iranian *Journal of Rangeland and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 24: 123-133. (In Persian)
33. Oliveira, A.R.M.F., C.N. Jezler, R.A. Oliveira & L.C.B. Costa, 2012. Influence of plant age on the production of elevated essential oil. *Revista Ceres*, 59: 241-245.
34. Powell, R.A., & R.P. Adams., 1973. Seasonal variation in the volatile terpenoids of *Juniperus scopulorum* (Cupressaceae). *American Journal of Botany*, 60: 1041-1050.
35. Raeisi, S., A. Khavanizadeh, M. Shirmardi & M. Vhidi, 2021. Effective factors on density condition of *Ferula* spp. in two habitats of Zarand, Kerman (Syriz and Reyhanshahr). *Journal of Rangeland*, 15(2): 309-320. (In Persian)
36. Rafieiolhossaini, M., H. Sodaiezadeh, An. Adams, D. Norbert & P. Van Damme, 2010. Effects of planting date and seedling age on agro-morphological characteristics, essential oil content and composition of German chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) grown in Belgium. *Industrial Crops and Products*, 31: 145-152.
37. Sefidkon, F., A. Bahmanzadegan & MH. Assareh, 2008. The Effect of Distillation Methods and Harvesting Times on the Volatile Oil and Cineole Content of *Eucalyptus dealbata*. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 11(3): 242 - 251.
38. Serrano, C., O. Matos, B. Teixeira, C. Ramos, N. Neng, J. Nogueira & A. Marques, 2011. Antioxidant and antimicrobial activity of *Satureja montana* L. extracts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(9): 1554-1560.
39. Shekarchia, M., H. Hajimehdipoor., M. Khanavid & A. Roostaied, 2012. The Effects of Plant Age and Harvesting Time on Chicoric and Caftaric Acids Content of *E. purpurea* (L.) Moench. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 8(3): 203-208.
40. Sintim, Y., H. Burkhardt, A. Gawde, A. Cantrell, Ch. Astatkie, T. Obour, A. Zheljzkov & V. Schlegel, 2015. Hydrodistillation time affects dill seed essential oil yield, composition, and bioactivity. *Industrial Crops and Products*, 63: 190-196.
41. Zare, AR., A. Omidi, M. Fallah Hoseini, H. Yazdani, D. Rezazadeh & S. Irvani, 2011. A Review on Pharmacological Effects of *Ferula assa - foetida* L.: a Systematic Review. *Journal of Medicinal Plants*, 10(40): 17-25. (In Persian)
42. Zargari, A., 1990. Medicinal plants, Tehran University Publication, 923p. (In Persian)