



"Research Paper"

Quantitative and Qualitative Evaluation of some Biochemical Traits of *Sambucus ebulus* L. Medicinal Plant in Different Habitats of Mazandaran Province.

Roghayeh Polaki Khokhroudi¹, Nad ali Bagheri² and Nadali Babaeian Jolodar³

1- Master's student in Agricultural Biotechnology, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University

2- Associate Professor, Department of Biotechnology, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (Corresponding author: n.bagheri@sanru.ac.ir)

3- Professor of Biotechnology Department of Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University

Received: 7 November, 2022

Accepted: 24 January, 2023

Extended Abstract

Introduction and Objective: Medicinal plants are a source of many organic substances, including secondary metabolites, which are used as raw materials for pharmaceutical and industrial compounds. Knowing medicinal plants and using their compounds instead of making chemical compounds has always been of interest to researchers. Elderberry (*Sambucus ebulus* L.) is a valuable native medicinal plant that grows in the north of Iran.

Material and methods: In this research, in order to quantitatively and qualitatively evaluate some of the biochemical traits of *Sambucus ebulus* plant, the three organs of the leaf, stem and fruit of this plant from the three regions of Sari, Babol and Amol at three altitudes of 0-100, 500-600 and 900-1000 meters from the sea level were collected and extracted with three replications in a completely random design, and traits such as chlorophyll, carotenoid, anthocyanin and proline were analyzed quantitatively. Also, anthocyanin and proline traits were also qualitatively investigated.

Results: The qualitative test results showed the presence of anthocyanin and proline in all three organs. The results of analysis of variance showed that the height above sea level and the body had a significant effect on chlorophyll a, chlorophyll b, total chlorophyll, carotenoid, anthocyanin and proline. The effect of region was also significant on all investigated traits except chlorophyll b and total chlorophyll. The comparison of the averages showed that carotenoid and anthocyanin increased in all three organs of the leaf, stem and fruit of the mackerel plant with increasing altitude. Also, the amounts of chlorophyll and proline decreased with increasing height in leaf organs, but these compounds increased in stem and fruit organs. The amount of anthocyanin and proline in the fruit of *Sambucus ebulus* plant was the highest, but the number of photosynthetic pigments was higher in the leaf organ than in the fruit and then in the stem. The highest amount of chlorophyll a and b (21.45 and 11.55 mg/g fresh weight) related to leaf organ was observed in Sari region at an altitude of 0-100 meters above sea level. The results of correlation coefficients showed that there was a positive and significant correlation between photosynthetic pigments and the highest correlation coefficient was observed between chlorophyll b and total chlorophyll ($r = 0.962$).

Conclusion: The results of the present experiment show that environmental factors such as altitude and geographic characteristics have a significant effect on the number of metabolites. In general, according to the results obtained from this research, the best habitat in terms of the highest number of photosynthetic pigments was Sari region among the studied regions.

Keywords: anthocyanin, chlorophyll, height, proline, *Sambucus ebulus* L.

**"مقاله پژوهشی"****ارزیابی کمی و کیفی برخی از صفات بیوشیمیایی گیاه داروئی آقطی (*Sambucus ebulus* L.) در رویشگاه‌های مختلف استان مازندران**رقیه پولکی خشک‌رودی^۱، نادعلی باقری^۲ و نادعلی بابائیان جلودار^۳

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
 ۲- دانشیار گروه اصلاح نباتات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری (نویسنده مسول: n.bagheri@sanru.ac.ir)
 ۳- استاد گروه اصلاح نباتات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
 تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۸/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۴
 صفحه: ۱۷۸ تا ۱۸۸

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: گیاهان دارویی منبع بسیاری از مواد آلی از جمله متابولیت‌های ثانویه هستند که به عنوان مواد اولیه ترکیبات دارویی و صنعتی استفاده می‌شوند. شناخت گیاهان دارویی و استفاده از ترکیبات آنها به جای ساخت ترکیبات شیمیایی، همواره مورد توجه محققین بوده است. آقطی (*Sambucus ebulus* L.) گیاه دارویی و بومی ارزشمندی است که در شمال ایران می‌روید.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق به منظور ارزیابی برخی از صفات بیوشیمیایی گیاه آقطی از نظر کمی و کیفی، سه اندام برگ، ساقه و میوه این گیاه از سه منطقه ساری، بابل و آمل در سه ارتفاع ۱۰۰-، ۶۰۰-۵۰۰ و ۱۰۰۰-۹۰۰ متر از سطح دریا، با سه تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی جمع‌آوری و عصاره‌گیری شد و صفاتی مانند کلروفیل، کارتنوئید، آنتوسیانین و پرولین مورد بررسی از نظر کمی قرار گرفت. همچنین صفات آنتوسیانین و پرولین نیز از نظر کیفی بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج آزمون کیفی، حضور آنتوسیانین و پرولین را در هر سه اندام نشان داد. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که ارتفاع از سطح دریا و اندام اثر معنی‌داری بر کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل، کارتنوئید، آنتوسیانین و پرولین داشت. اثر منطقه نیز بر همه صفات مورد بررسی به جز کلروفیل b و کلروفیل کل معنی‌دار بود. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که کارتنوئید و آنتوسیانین در هر سه اندام برگ، ساقه و میوه گیاه آقطی، با افزایش ارتفاع از سطح دریا، افزایش داشت. همچنین مقادیر کلروفیل و پرولین با افزایش ارتفاع، در اندام برگ کاهش یافته اما در اندام ساقه و میوه، این ترکیبات افزایش نشان دادند. میزان آنتوسیانین و پرولین در میوه گیاه آقطی بیشترین مقدار را دارا بود، اما میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی در اندام برگ بیشتر از میوه و پس از آن ساقه بود. بیشترین میزان کلروفیل a و b (۲۱/۴۵ و ۱۱/۵۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) مربوط به اندام برگ، منطقه ساری در ارتفاع ۱۰۰-۰ متری از سطح دریا مشاهده شد. نتایج ضرایب همبستگی نشان داد که بین رنگیزه‌های فتوسنتزی، همبستگی مثبت و معنی‌داری وجود داشته و بیشترین میزان ضریب همبستگی بین کلروفیل b و کلروفیل کل (۰/۹۶۲ r =) مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: نتایج آزمایش حاضر، نشان می‌دهد عوامل محیطی از جمله ارتفاع از سطح دریا و مشخصات جغرافیایی تأثیر معنی‌داری در میزان متابولیت‌ها دارد. در مجموع با توجه به نتایج بدست آمده از این تحقیق، بهترین رویشگاه از نظر بیشترین مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی، از بین مناطق مورد مطالعه، منطقه ساری، بود.

واژه‌های کلیدی: آقطی (*Sambucus ebulus* L.)، آنتوسیانین، ارتفاع، پرولین، کلروفیل**مقدمه**

گیاهان دارویی یک منبع طبیعی از مواد با ارزش و ضروری هستند که دارای پتانسیل بالایی جهت تولید محصولات جدید و ترکیبات زیست‌فعال در توسعه دارو می‌باشند. تخمین زده می‌شود که ۸۰ درصد مردم کشورهای در حال توسعه و ۶۰ درصد مردم دنیا، برای مراقبت‌های اولیه از سلامت خود، از طب سنتی و گیاهان داروئی استفاده می‌کنند. با توجه به افزایش جمعیت و به دنبال آن بالا رفتن نیازهای غذایی، داروئی و بهداشتی، نقش گیاهان داروئی و خودرو در برآورده کردن این نیازها حائز اهمیت می‌باشد (۲۲). گیاهان علاوه بر متابولیت‌های اولیه ضروری، مقادیر وسیعی از ترکیبات با جرم مولکولی پایین تولید می‌کنند که ترکیبات فیتوشیمیایی یا متابولیت‌های ثانویه نامیده می‌شوند (۱۲). تغییرات آب و هوا علاوه بر تغییر فنولوژی گیاه، سبب تغییراتی در توزیع گونه‌ها نیز می‌شود، همچنین تغییر زیستگاه و تنش دمایی می‌تواند سبب تغییر میزان کمی و کیفی متابولیت‌های ثانویه (یا مواد دیگری که برای سنتز این مواد ضروری هستند) شود به همین دلیل، تحقیق و مطالعه در این زمینه حائز اهمیت می‌باشد (۱۳). آقطی (*Sambucus ebulus* L.) از تیره (Caprifoliaceae) که با نام‌های dwarf elder یا

elder berry شناخته می‌شود، گیاه داروئی دو ساله و علفی بوده و در صنایع دارویی کاربرد دارد. معمولاً ارتفاع آن بین ۲۰۰-۶۰ سانتی‌متر است و به شکل کلونی از ریزوم گسترده رشد می‌کند (۲۴). این گیاه در خاک‌هایی با pH مختلف (اسیدی، قلیایی و خنثی) رشد نموده و به دلیل مقاومت خوبی که در برابر آلودگی هوا و بادهای شدید دارد، بسیار مشهور است. همچنین، گیاه آقطی دارای پراکنش گسترده‌ای در امتداد لبه جنگل‌ها، کنار جاده‌ها و چمنزارها بوده و در کنار دریاها رشد نمی‌کند (۸). تحقیقات زیادی در مورد کاربردهای دارویی و بالینی این گیاه انجام شده است، اما جنبه‌های بیوتکنولوژی این گیاه به‌طور کامل بررسی نشده است (۱۷).

آنتوسیانین‌ها یکی از شش گروه گسترده فنل‌های گیاهی، به عنوان فلاونوئیدها شناخته شده و مسئول رنگ‌های قرمز، نارنجی، بنفش و آبی در بسیاری از میوه‌ها و سبزیجات هستند. آنتوسیانین، آنتی‌اکسیدان بالقوه در محیط درون آزمایشگاهی است. مطالعات نشان داده است که آنتوسیانین‌های طبیعی در ممانعت از بیماری‌های عروقی، کاهش سطح تری‌گلیسرید و اسیدهای چرب آزاد مؤثر هستند. آنتوسیانین‌ها بیشتر از فلاونوئیدها، در مهار رشد سلول‌های توموری مؤثرند (۱۸).

هستند. در واقع با افزایش ارتفاع از سطح دریا، از محتوی فنل کل و فلاونوئید کل کاسته شده و بهترین کیفیت و کمیت این متابولیت‌های ثانویه در گیاهان آقطی روئیده در ارتفاعات پایین، دانستند. محل رویش گیاه، به عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل مؤثر بر میزان بیان ژن‌های بیوسنتزکننده ترکیبات ثانویه در گیاهان دارویی مطرح می‌باشد (۳۴). بنابراین شناخت عوامل تأثیرگذار بر کیفیت و کمیت مواد مؤثره گیاهان دارویی حائز اهمیت می‌باشد. با توجه به مطالب فوق، در این تحقیق به شناسایی بهترین رویشگاه، از بین سه منطقه با ارتفاعات مختلف، برای بدست آوردن بهترین و بیشترین مقدار برخی مواد مؤثره دارویی گیاه آقطی، پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

برای انجام این پژوهش، نمونه‌های برگ، ساقه و میوه آقطی در سه ارتفاع ۱۰۰-، ۶۰۰-۵۰۰، ۹۰۰-۱۰۰۰ متری از سطح دریا و از شهرستان آمل، بابل و ساری واقع در استان مازندران، جمع‌آوری و به آزمایشگاه بیوتکنولوژی گیاهی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری انتقال داده شد. اندام برگ و ساقه با استفاده از ازت مایع و هاون چینی، پودر و به فریزر منتقل شده و میوه این گیاه نیز در آن در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد خشک و با استفاده از هاون چینی پودر گردید و تا زمان اندازه‌گیری آزمایشات، در یخچال نگهداری شد. هنگام جمع‌آوری گیاه در هر منطقه، با استفاده از دستگاه موقعیت‌سنج (GPS) اقدام به تعیین موقعیت جغرافیایی منطقه از نظر ارتفاع از سطح دریا، طول و عرض جغرافیایی گردید. جهت بررسی خصوصیات اقلیمی رویشگاه‌ها، بر اساس نزدیک‌ترین ایستگاه هواشناسی به رویشگاه، پارامترهای هواشناسی از قبیل میانگین رطوبت، میانگین درجه حرارت و میانگین بارندگی سالانه تهیه شد.

همچنین به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالا (در حدود ۸۵٪ آنتی‌اکسیدان‌های معروف مثل توکوفرول) می‌توانند جایگزین مناسبی برای آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی در صنایع غذایی باشند. آنتوسیانین موجود در آقطی اثر ضدالتهابی دارند. این موضوع می‌تواند اثر ضد التهابی و ضد درد این گیاه را توجیه کند (۳۱).

فتوسنتز شامل بسیاری از فرایندهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی مانند جذب نور و کربن، انتقال الکترون و فتوفسفوریلاسیون است. کلروفیل، اولین گام فتوسنتز را انجام می‌دهد که شامل جذب انرژی نوری و انتقال آن می‌باشد (۳۸). مولکول‌های کلروفیل مانند سایر رنگدانه‌ها از جمله کاروتنوئیدها به پروتئین‌ها متصل هستند (۴۱). مجموعه‌های جمع‌کننده نور دارای کلروفیل و کاروتنوئید هستند و مرکز واکنش را که حاوی ترکیبات انتقال الکترون است احاطه می‌کند (۷). بسیاری از میوه‌ها، گل‌ها و ریشه‌ها رنگ‌های نارنجی، زرد و قرمز روشن خود را مدیون کاروتنوئیدها هستند و نقش اساسی در فتوسنتز و محافظت از نور دارند (۱۰).

پروکلین از دو مسیر اورنیتین و گلوتامات سنتز می‌شود که تحت استرس سرما تا حد زیادی سنتز آن افزایش می‌یابد (۱). افزایش تولید پروکلین، نوعی راهبرد تنظیم اسمزی است که می‌تواند منجر به کاهش رشد گیاه شود (۳۷). پروکلین در محافظت از غشاهای تیلوکوئیدی کلروپلاست در برابر رادیکال‌های آزاد ناشی از آسیب‌های نوری نیز نقش دارد (۲). کاتابولیسیم سریع پروکلین بلافاصله پس از رفع عامل تنش‌زا، باعث تأمین احیاکننده‌ها می‌گردد که فسفریلاسیون اکسیداتیو میتوکندریایی را حمایت و باعث تولید ATP^۲ به منظور بهبودی از استرس شده و آسیب‌های ناشی از تنش را جبران می‌کند (۹).

مازندرانی و همکاران (۲۳) دریافتند که با افزایش ارتفاع، میزان آنتوسیانین گیاه آقطی افزایش قابل توجهی داشته است. کاغذلو و همکاران (۱۶) دریافتند که سه عامل منطقه، ارتفاع و اندام، دارای اثرات معنی‌داری بر خصوصیات بیوشیمیایی گیاه آقطی

جدول ۱- مشخصات جغرافیایی رویشگاه‌های مورد مطالعه گیاه آقطی

Table 1. Geographical characteristics of studied habitats of *Sambucus ebulus* plant

کاربری زمین Land use	میانگین بارندگی سالانه Average annual rainfall (mm)	میانگین رطوبت سالانه Average annual humidity (%)	میانگین دمای سالانه Average annual temperature (°C)	عرض جغرافیایی Latitude	طول جغرافیایی Longitude	ارتفاع از سطح دریا Height above sea level (m)	منطقه climate
زراعی agricultural	1.672	78	17.4	52°2424E	36°2814N	0-100	آمل (رشکلا) Amol (Rashkola)
مرتعی pasture	-	-	-	52°2336E	36°1330N	500-600	آمل (پاریمه) Amol (Parymeh)
مرتعی pasture	-	-	-	52°2455E	36°1237N	900-1000	آمل (پاشاکلا) Amol (Pashakola)
زراعی agricultural	1.684	78	17.3	52°3910E	36°2530N	0-100	بابل (گتاب) Babol (Gatab)
مرتعی pasture	-	-	-	52°3805E	36°1315N	500-600	بابل (لمسوکلا) Babol (Lamsokola)
مرتعی pasture	-	-	-	52°3557E	36°0944N	900-1000	بابل (شورکش) Babol (Shorkesh)
زراعی agricultural	1.628	75	18.4	53°0113E	36°3244N	0-100	ساری (گرگی کلا) Sari (Gorgikola)
مرتعی pasture	-	-	-	53°2305E	36°1911N	500-600	ساری (قادیکلا) Sari (Gadikola)
مرتعی pasture	-	-	-	53°2540E	36°1603N	900-1000	ساری (اسکارد) Sari (Eskard)

عصاره‌گیری

برای عصاره‌گیری به ازای هر ۰/۱ گرم نمونه، ۵ میلی‌لیتر متانول ۹۸ درصد اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی و در دمای اتاق قرار گرفت و پس از آن، به مدت ۲۰ دقیقه در دستگاه حمام التراسونیک قرار داده شد تا محلول همگن شود. سپس از عصاره روئی برای اندازه‌گیری کلروفیل a، b، کل، کاروتنوئید و آنتوسیانین اندام برگ، ساقه و میوه استفاده شد. برای اندازه‌گیری محتوای کلروفیل a، b و کل از روش پورا (۲۹)، برای کاروتنوئید از روش لیختن تالر و ولبورن (۲۰) و برای آنتوسیانین از روش سیمز و گامون (۳۹) استفاده شد و به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر میزان جذب نور در طول موج‌های ۶۴۷، ۶۶۳/۶، ۶۴۳/۶، ۴۷۰، ۶۶۳ و ۵۳۷ مشخص و با استفاده از روابط زیر رنگدانه‌های فتوسنتزی محاسبه شدند (۲۱).

$$a \text{ کلروفیل} = 12/25 (A663.6) - 2/55 (A646.6)$$

$$b \text{ کلروفیل} = 20/31 (A646.6) - 4/91 (A663.6)$$

$$\text{کلروفیل کل} = 17/76(A646.6) + 7/34 (A663.6)$$

$$\text{آنتوسیانین} = 0.08173(A537) - 0/00697(A647) - 0/002228 (A663)$$

$$104 (b \text{ کلروفیل} - a) = [(1000(A470) - 3/27(a \text{ کلروفیل}))]/227$$

در روابط فوق A طول موج جذب اسپکتروفتومتر است.

پرولین

به منظور اندازه‌گیری محتوای پرولین، از روش بیتس استفاده شد. ابتدا ۰/۱ گرم نمونه را درون لوله آزمایش ریخته و به آن ۱۰ میلی‌لیتر محلول ۳٪ اسید سولفوسالسیلیک اضافه کرده و روی شیکر به مدت ۲ ساعت قرار داده شد تا به خوبی مخلوط گردد. سپس مخلوط حاصل را به کمک کاغذ صافی، تصفیه کرده و پس از آن، ۲ میلی‌لیتر از عصاره حاصل را در لوله آزمایش دیگری ریخته و به آن ۲ میلی‌لیتر معرف نین‌هیدرین (۱/۲۵ گرم نین‌هیدرین + ۳۰ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال) و ۲ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال اضافه شد. سپس لوله‌ها به

جدول ۲- نتایج کیفی آنتوسیانین و پرولین در گیاه آقطی

Table 2. Qualitative results of anthocyanin and proline in *ambucus ebulus* plant

میوه fruit	ساقه stem	برگ leaf	
++*	+	+	Anthocyanin
+	+	+	Proline

++ نشان‌دهنده وجود متابولیت مورد نظر است.

*؛ نشان‌دهنده وجود تقریباً دو برابری آنتوسیانین موجود در میوه است.

+؛ It indicates the presence of the desired metabolite.

*؛ It indicates the presence of almost twice the amount of anthocyanin in the fruit.

کلروفیل

نتایج تجزیه واریانس، اختلاف معنی‌داری اثر ارتفاع، اندام و اثرات دوگانه منطقه × اندام و اندام × ارتفاع بر کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل را در سطح احتمال یک درصد نشان داد. اثر سه‌گانه منطقه × اندام × ارتفاع بر کلروفیل b و کلروفیل کل معنی‌دار بود اما بر کلروفیل a اختلاف معنی‌دار نشان نداد.

تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۳) نشان داد، اثر منطقه بر رنگیزه‌های فتوسنتزی به غیر از کلروفیل b و کلروفیل کل و همچنین بر پرولین، در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود و همچنین اثر اندام، ارتفاع و اثرات متقابل منطقه × اندام و اندام × ارتفاع روی همه صفات اندازه‌گیری شده، اختلاف معنی‌داری نشان داد. اثر دوگانه منطقه × ارتفاع نیز بر صفات کلروفیل a، آنتوسیانین و پرولین اختلاف معنی‌داری نشان داد.

مدت یک ساعت در بن‌ماری (حمام آب گرم) با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و پس از خروج لوله‌ها از بن‌ماری، آنها را به مدت نیم‌ساعت در حمام آب یخ قرار داده تا سرد شوند. سپس به هر یک از نمونه‌ها، ۴ میلی‌لیتر تولوئن اضافه کرده و به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس انجام شد تا دو تا فاز جدا شدند. در نهایت از فاز روئی (صورتی‌رنگ) جهت رنگ‌سنجی به وسیله اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۲۰ نانومتر استفاده شد. سپس داده‌های حاصل را در فرمول زیر قرار داده و مقدار پرولین بدست آمد (۴).

$$y = 0.0459x + 0.028$$

تشخیص کیفی پرولین

به ۲ میلی‌لیتر از فاز روئی محلول مورد نظر (محلول آماده شده برای اندازه‌گیری میزان پرولین)، ۱ میلی‌لیتر معرف نین‌هیدرین اضافه نموده و ۵ دقیقه در بن‌ماری در حال جوش گذاشته شد. رنگ زرد نشانه‌ی وجود پرولین است.

تشخیص کیفی آنتوسیانین: ۰/۲۵ گرم عصاره را در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر، حل و محلول حاصل را به وسیله‌ی اسیدکلریدریک یک درصد اسیدی شد. تغییر رنگ (رنگ قرمز)، با تغییرات PH نشان‌دهنده حضور آنتوسیانین می‌باشد (۶).

تجزیه و تحلیل آماری

در این مطالعه از آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی استفاده شد که فاکتورهای آزمایش شامل منطقه، ارتفاع از سطح دریا و اندام گیاهی می‌باشند. تجزیه واریانس با نرم افزار SPSS و رسم نمودارها با نرم افزار Excel انجام شد. برای مقایسه میانگین تیمارها از روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک و پنج درصد، استفاده شد.

نتایج و بحث**آنتوسیانین و پرولین**

با انجام آزمون‌های کیفی، حضور آنتوسیانین و پرولین در همه‌ی اندام‌ها به اثبات رسید (البته به میزان کم) و میزان آنتوسیانین در اندام میوه بیشتر بود (جدول ۲).

جدول ۳- تجزیه واریانس صفات بیوشیمیایی مورد بررسی در آقطی

Table 3. Variance analysis of investigated biochemical traits in *ambucus ebulus*

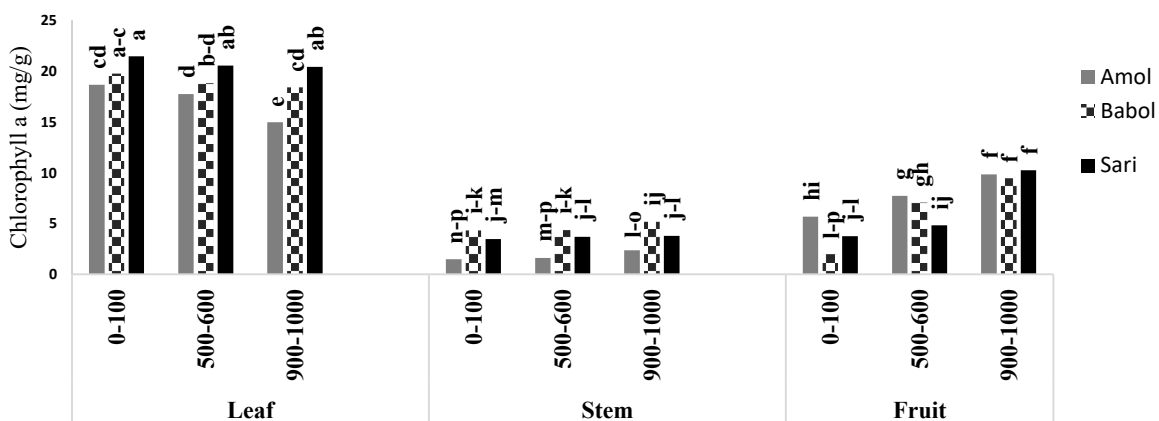
واریانس							S.C
Proline	Anthocyanin	Carotenoid	Total chlorophyll	Chlorophyll b	Chlorophyll a	df	
0.001**	0.001**	3.990**	0.765 ^{ns}	1.500 ^{ns}	13.460**	2	منطقه Climate
0.001**	0.008**	259.955**	132.343**	246.922**	1824.937**	2	اندام Organ
0.0001**	0.002**	18.439**	7.259*	24.715**	16.684**	2	ارتفاع Height
0.001**	0.001**	10.544**	20.428**	29.595**	21.086**	4	منطقه×اندام Area×Organ
0.0002**	0.002**	7.605**	41.129**	50.932**	38.056**	4	اندام×ارتفاع Organ×Height
0.0001**	0.0005**	0.500 ^{ns}	1.458 ^{ns}	^{ns} 3.534	3.263*	4	منطقه×ارتفاع Area×Height
0.00007**	0.0003**	0.681*	3.449*	5.455*	2.169 ^{ns}	8	منطقه×اندام×ارتفاع Area×Organ×Height
0.000004	0.00008	0.268	1.604	2.253	1.246	54	خطا Error
3.72	10.46	12.06	29.12	26.79	11.53		ضریب تغییرات (%) CV

ns, * و **: به ترتیب نشان دهنده غیر معنی دار، معنی دار بودن در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد می باشد.

ns, * and **: indicate non-significance, significance at 5% and 1% probability levels, respectively

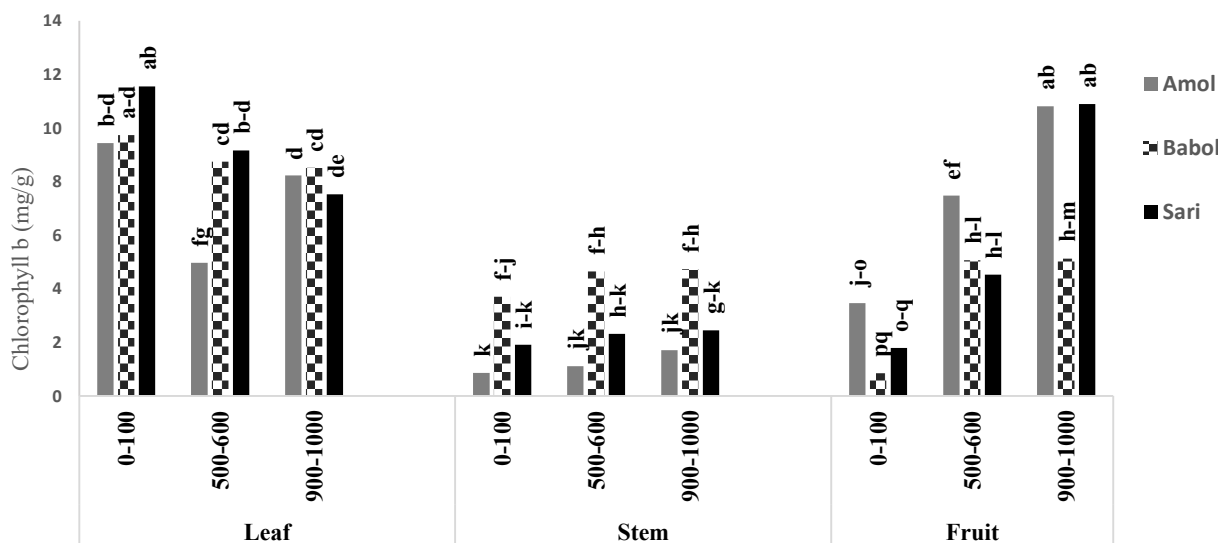
از سطح دریا، تغییرات میزان کلروفیل، افزایشی بود که با نتایج تحقیقات قنبری و همکاران (۱۲) و نجار فیروزجایی و همکاران (۲۵) مطابق بود. ایشان با بررسی میزان کلروفیل در گیاه علف مار (در استان مازندران) و گزنه (مازندران و گلستان) در ارتفاعات مختلف گزارش نمودند که بیشترین میزان این متابولیت، در ارتفاعات بالاتر از ۱۰۰۰ متر بدست آمد. بیشترین میزان کلروفیل a، b و کل، در اندام برگ، مربوط به منطقه ساری (۲۰/۴۴، ۷/۴۰ و ۶/۰۶ میلی گرم بر گرم وزن تر) بوده و پس از آن در منطقه بابل (۱۸/۹۸، ۸/۹۹ و ۶/۴۶ میلی گرم بر گرم وزن تر) و کمترین میانگین، در منطقه امل (۱۷/۱۱، ۷/۵۳ و ۵/۹۶ میلی گرم بر گرم وزن تر) مشاهده شد که این نتیجه، ممکن است به دلیل میانگین دمایی کمتر حاکم بر منطقه امل نسبت به منطقه بابل و ساری و نیز به علت تفاوت شدت نور خورشید در طول و عرض‌های جغرافیایی مختلف و میانگین بارندگی بین مناطق مورد بررسی باشد (جدول ۱).

مقایسه میانگین کلروفیل a، b و کل در هر سه منطقه (شکل‌های ۱، ۲ و ۳) نشان داد که بیشترین میزان این رنگیزه‌های فتوسنتزی در اندام برگ و در ارتفاع ۱۰۰-۰ متری (رویشگاه گرجی کالا) مربوط به منطقه ساری (به ترتیب ۲۱/۴۵، ۱۱/۵۵ و ۸/۸۹ میلی گرم بر گرم وزن تر) بود و کمترین میزان کلروفیل a و b را اندام ساقه، در ارتفاع ۱۰۰-۰ متری (رویشگاه رشکلا) منطقه امل (به ترتیب ۱/۴۶ و ۰/۸۶ میلی گرم بر گرم وزن تر) داشت و همچنین کمترین میزان کلروفیل کل نیز، مربوط به اندام ساقه و ارتفاع ۱۰۰-۰ متری (رویشگاه کتاب) منطقه بابل (۰/۶۳ میلی گرم بر گرم وزن تر) مشاهده شد. اندام برگ، با افزایش ارتفاع از سطح دریا روند کاهشی نشان داد. این نتیجه با نتایج تحقیقات کاغذلو و همکاران (۱۶) و صائب و همکاران (۳۳) مطابقت دارد. آنها مطالعه‌ای در مورد اثر ارتفاع از سطح دریا بر میزان کلروفیل گیاهان آقطی و گزنه انجام دادند و نتیجه گرفتند که با افزایش ارتفاع، میزان کلروفیل کاهش داشته است. همچنین در تحقیق حاضر، اندام ساقه و میوه با افزایش ارتفاع

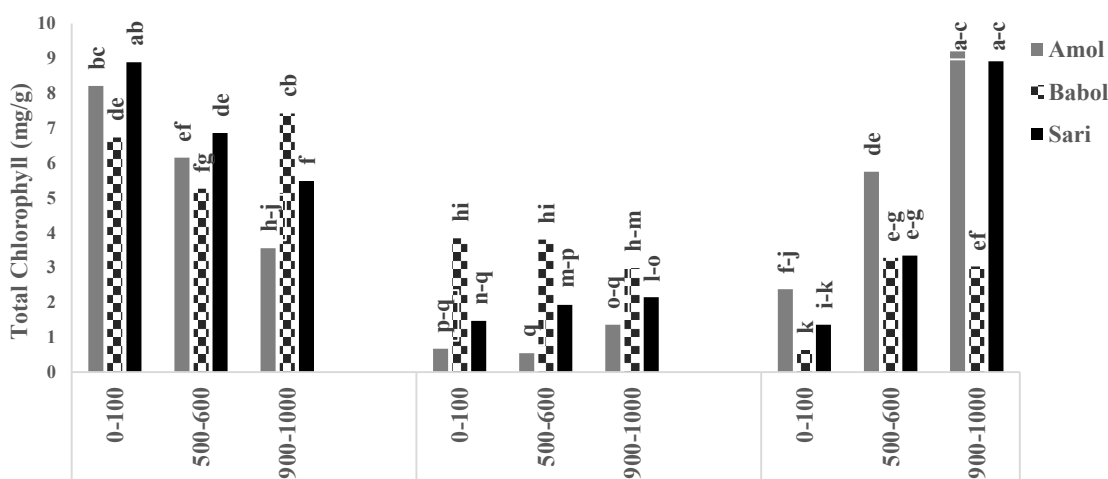


شکل ۱- میزان کلروفیل a در سه منطقه، سه ارتفاع و سه اندام مختلف گیاه داروئی آقطی

Figure 1. The amount of chlorophyll a in three regions, three heights and three different organs of the medicinal plant *Sambucus ebulus*



شکل ۲- میزان کلروفیل b در سه منطقه، سه ارتفاع و سه اندام مختلف گیاه دارویی آقطی

Figure 2. The amount of chlorophyll b in three regions, three heights and three different parts of the medicinal plant of *Sambucus ebulus*

شکل ۳- میزان کلروفیل کل در سه منطقه، سه ارتفاع و سه اندام مختلف گیاه دارویی آقطی

Figure 3. The amount of total chlorophyll in three regions, three heights and three different organs of the medicinal plant of *Sambucus ebulus*

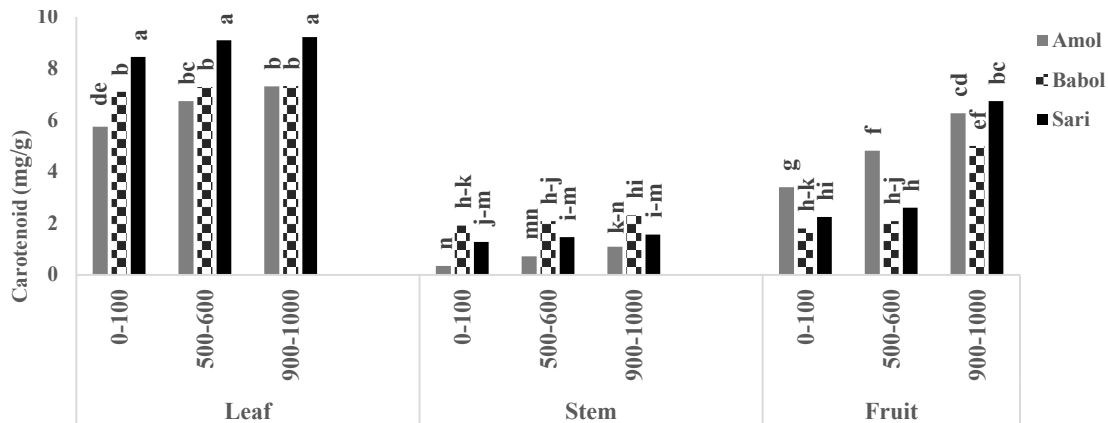
که بیشترین میزان کارتنوئید مربوط به منطقه کردستان (۱/۰۹۷ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) و کمترین میزان مربوط به منطقه کهگیلویه بویراحمد (۰/۱۹۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) بود. عبداللهی نطنزی و عرب (۱۱) در بررسی‌ای که به تأثیر آب و هوا روی گیاه هویج انجام دادند، نتیجه گرفتند که بیشترین میزان کارتنوئید تام در منطقه خوزستان و کمترین میزان در منطقه اصفهان مشاهده شد. طبق این تحقیقات، تفاوت در میزان کارتنوئید در مناطق مختلف، می‌تواند ناشی از عوامل آب و هوایی (نور، درجه حرارت، بارندگی، رطوبت نسبی و ...)، عوامل جغرافیایی (ارتفاع از سطح دریا، طول و عرض

کارتنوئید

همه تیمارها بصورت جداگانه و همچنین اثرات دوگانه و سه‌گانه آنها به‌جز اثر منطقه، ارتفاع اختلاف معنی‌داری بر میزان کارتنوئید نشان داد (جدول ۳). بررسی این رنگیزه در ارتفاعات مختلف (شکل ۴) نشان داد که با افزایش ارتفاع، میزان کارتنوئید گیاه دارویی آقطی افزایش داشت و بر خلاف کلروفیل‌ها، روند تغییر میانگین کارتنوئید در همه‌ی اندام‌ها یکی بود. بیشترین میانگین‌ها از نظر منطقه، مربوط به منطقه ساری و کمترین میانگین را منطقه آمل داشت. سعیدی و همکاران (۳۵) در تحقیقی بر نسترن کوهی تحت تأثیر مناطق مختلف دریافتند

به ارتفاع ۸۵۰ متر بوده و با افزایش ارتفاع از سطح دریا میزان کارتنوئید نیز افزایش یافت. که مطابق با نتایج آزمایش حاضر بود. اما برخلاف تحقیق حاضر، ذکریانژاد و همکاران (۴۳) دریافتند با افزایش ارتفاع میزان کارتنوئید گیاه بنفشه معطر کاهش داشته است.

جغرافیایی)، شرایط خاک (بافت خاک و عناصر خاک و...) و عوامل ژنتیکی باشد. قنبری و همکاران (۱۲) در مورد میزان کارتنوئید در گیاه علف مار تحت تأثیر ارتفاعات مختلف بیان کردند که بیشترین مقدار کارتنوئید (۳/۵۹ میلی گرم بر گرم وزن تر) مربوط به ارتفاع ۱۶۵۰ و کمترین مقدار (۲/۲۲ میلی گرم بر گرم وزن تر) مربوط



شکل ۴- میزان کارتنوئید در سه منطقه، سه ارتفاع و سه اندام مختلف گیاه داروئی آقطی
Figure 4. Carotenoid level in three regions, three heights and three different organs of the medicinal plant of *Sambucus ebulus*

کردند که میزان آنتوسیانین در میوه، بسیار بیشتر از اندام برگ این گیاه می باشد. آنتوسیانین موجود در گیاهان تحت تأثیر عوامل محیطی از جمله شدت نور، دما، تنش ها و حملات پاتوژن ها قرار می گیرند (۵). اختلاف ارتفاع در القای کیفیت نور و میزان درجه حرارت مؤثر بوده و سبب تراکم آنتوسیانین در اندام های گیاه می شود که نوعی مقاومت در مقابل تنش های سرمای است (۱۲).

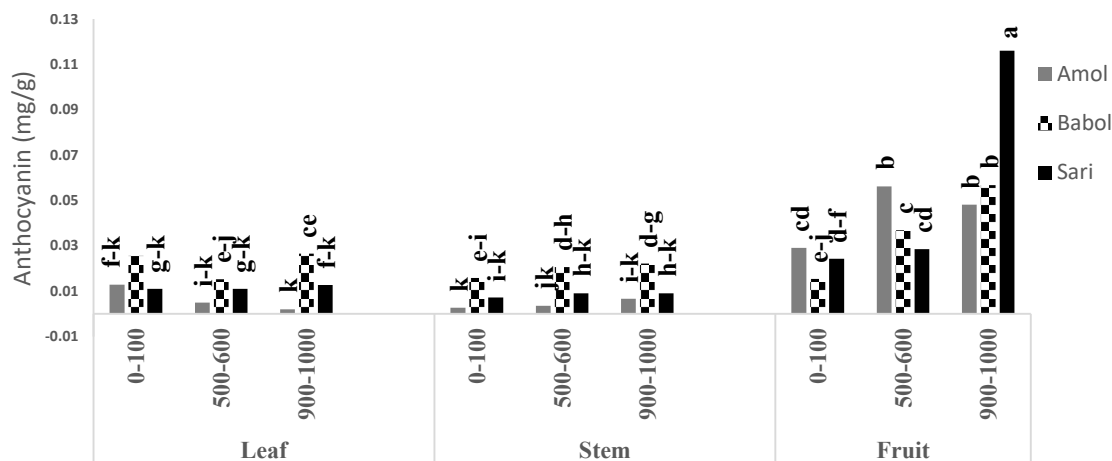
همانند تحقیق حاضر، مازندرانی و همکاران (۲۳) در تحقیقی روی گیاه آقطی و بررسی اثر دو رویشگاه بر این گیاه به این نتیجه رسیدند که با افزایش ارتفاع، میزان آنتوسیانین افزایش معنی داری داشته است. محققان در تحقیقی که بر تأثیر رویشگاه روی گیاه داروئی گل گاوزبان انجام دادند به این نتیجه رسیدند که میزان آنتوسیانین در ارتفاعات مختلف متفاوت است و با افزایش ارتفاع، میزان این متابولیت افزایش یافته است (۳) و همچنین قنبری و همکاران (۱۲) نیز در بررسی خود، روی گیاه علف مار، نتایج مشابه گزارش نمودند.

بر خلاف تحقیق حاضر، کاغذلو و همکاران (۱۶) در بررسی اثرات سه جانبه منطقه، ارتفاع و اندام بر گیاه آقطی بیان داشتند که بیشترین میزان آنتوسیانین، مربوط به اندام میوه (۲/۴۷۶ میکروگرم بر گرم وزن تر) بود که در ارتفاعات پست رشد کرده بودند.

آنتوسیانین

اثر منطقه، ارتفاع، اندام و اثرات متقابل آنها روی میزان آنتوسیانین در سطح احتمال ۱ درصد معنی دار بود (جدول ۳). مقایسات میانگین اثرات تیمارها بر آنتوسیانین (شکل ۵) نشان داد که بیشترین میزان آنتوسیانین در اندام میوه، ارتفاع ۹۰۰-۱۰۰۰ متری (رویشگاه اسکارد) منطقه ساری (۱۱۶/۱ میلی گرم بر گرم وزن تر) و کمترین میانگین مربوط به اندام برگ، ارتفاع ۹۰۰-۱۰۰۰ متری (رویشگاه پاشاکلا) منطقه آمل (۰/۰۰۲ میلی گرم بر گرم وزن تر) بود. در این تحقیق، با افزایش ارتفاع از سطح دریا، میزان آنتوسیانین نیز افزایش داشت. بیشترین میزان آنتوسیانین در اندام میوه آقطی وجود داشت و پس از آن در اندام های برگ و ساقه مشاهده شد. آنتوسیانین در همه ی بافت های گیاهی شامل میوه، برگ، ساقه، ریشه و گل یافت می شوند. پایداری این رنگدانه ها تحت تأثیر نور، pH، دما و عوامل دیگر است. با افزایش ارتفاع، میزان اشعه UV-B افزایش می یابد که سبب بیان بیش از حد ژن های اکسیداز و سوپراکسیددیسموتاز در گیاه می شوند تا محتویات آنتوسیانین برای جبران اثرات زیان بار اشعه ماوراء بنفش تجمع بیشتری داشته باشد (۱۹).

سپهری فر و حسنیو (۳۶) در تحقیقی که بر گیاه داروئی قره قاط جمع آوری شده از مناطق مختلف انجام دادند، بیان



شکل ۵- میزان آنتوسیانین در سه منطقه، سه ارتفاع و سه اندام مختلف گیاه داروئی آقطی

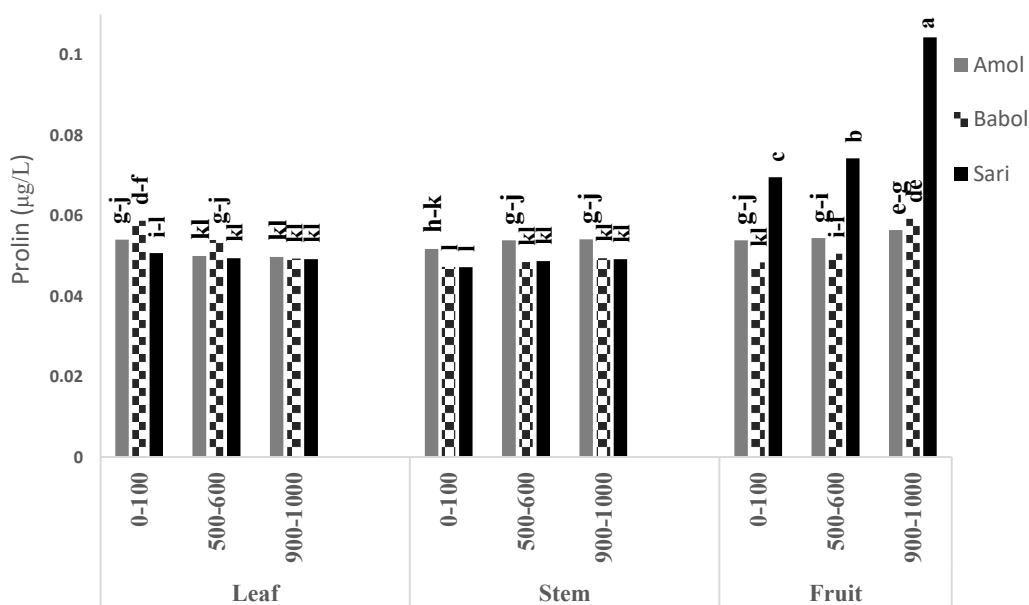
Figure 5. The amount of anthocyanin in three regions, three heights and three different organs of the medicinal plant of *Sambucus ebulus*

کلروفیل هستند (۳۰). تحت شرایط تنش، پرولین اثرات بیولوژیکی متعددی را نشان می‌دهد که در اعمال حفاظتی و تعدیل اسمزی تظاهر می‌یابد. علاوه بر نقش تنظیم اسمزی، پرولین به عنوان یک محافظ در برابر تنش‌ها عمل می‌کند. بدین گونه که به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم با ماکرومولکول‌ها اثر متقابل داشته و از این طریق به حفظ شکل و ساختار طبیعی آن‌ها تحت شرایط تنش کمک می‌کند (۳۰).

زاهد چکووری و قاسم‌اف (۴۲) در بررسی تغییرات برخی از عناصر مثل پرولین در برگ و ریشه گیاه گاوزبان اروپایی تحت تنش خشکی بیان کردند که بیوستز پرولین با اعمال تنش خشکی نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری داشته است.

پرولین

اثر اندام، منطقه، ارتفاع و همچنین اثر متقابل آنها بر پرولین بسیار معنی‌دار بود (جدول ۳). مقایسه میانگین پرولین (شکل ۶) نشان داد که با افزایش ارتفاع، در اندام‌های ساقه و میوه، میزان این صفت افزایش داشته اما در اندام برگ با افزایش ارتفاع، میزان این صفت کاهش داشت. بیشترین مقدار پرولین مربوط به اندام میوه، در ارتفاع ۹۰۰-۱۰۰۰ متری (رویشگاه اسکارد) در منطقه ساری (۰/۱۰۴ میکروگرم بر لیتر عصاره) بود و کمترین میزان را اندام ساقه، در ارتفاع ۱۰۰-۰ متری (رویشگاه گرجی کلا) مربوط به منطقه ساری (۰/۰۴۷ میکروگرم بر لیتر عصاره) بود. مطالعات نشان می‌دهد که بیشترین تجمع در بافت‌هایی دیده می‌شوند که یا از گیاه جدا شده‌اند یا فاقد



شکل ۶- میزان پرولین در سه منطقه، سه ارتفاع و سه اندام مختلف گیاه داروئی آقطی

Figure 6. The amount of proline in three regions, three heights and three different organs of the medicinal plant of *Sambucus ebulus*

گردد. کلروفیل کل و کاروتنوئید نیز که هر دو جزء رنگیزه‌های فتوسنتزی هستند، همبستگی مثبت و معنی‌داری ($r=0/775$) بین این دو صفات، وجود دارد. همچنین همبستگی مثبت و معنی‌داری بین صفات پرولین و آنتوسیانین نیز مشاهده شد ($r=0/783$) بدین معنا که با افزایش پرولین، میزان آنتوسیانین نیز افزایشی است. بیشترین میزان همبستگی بین صفات مورد بررسی، بین کلروفیل b و کلروفیل کل ($r=0/796$) برقرار بود.

نتایج ضرایب همبستگی بین متابولیت‌های مورد بررسی گیاه آفتی (جدول ۴) نشان داد که بین کلروفیل a و کلروفیل b ($r=0/783$)، کلروفیل a و کلروفیل کل ($r=0/744$) و همچنین بین کلروفیل b و کلروفیل کل ($r=0/962$) همبستگی مثبت و معنی‌داری برقرار است. با توجه به اینکه مجموع کلروفیل a و b، میزان کلروفیل کل را تعیین می‌نمایند (۱۲) بدیهی است که افزایش هر یک از این ترکیبات، موجب افزایش کلروفیل کل

جدول ۴- ضرایب همبستگی بین صفات بیوشیمیایی مورد بررسی در آفتی

Proline	Anthocyanin	Total chlorophyll	Carotenoid	Chlorophyll b	Chlorophyll a
					1
				0.824 **	0.783 **
			1	0.962 **	0.956 **
		1	0.775 **	0.962 **	0.744 **
	1	0.483 **	0.22 ns	0.474 **	0.39 **
1	0.796 **	0.337 *	0.207 ns	0.326 *	0.006 ns

ns, * و **: به ترتیب نشان دهنده غیر معنی دار و معنی دار بودن در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد.

ns, * and **: indicate non-significance, significance at 5% and 1% probability levels, respectively.

وجود تفاوت‌ها در تحقیقات می‌تواند به عوامل ژنتیکی و نوع گونه و همچنین عوامل محیطی از جمله شرایط اقلیمی، زمان برداشت گیاه، تفاوت ارتفاعات از سطح دریا و عوامل دیگر ارتباط داشته باشد.

نتیجه‌گیری کلی

طبق نتایج بدست آمده در این تحقیق، همه‌ی صفات مورد بررسی، تحت تأثیر عوامل محیطی مختلف ناشی از تفاوت ارتفاع و منطقه قرار گرفتند و همچنین همه‌ی صفات در اندام‌های مختلف نیز تفاوت معنی‌داری داشتند. میزان کلروفیل در برگ با افزایش ارتفاع، کاهش پیدا کرده است و با توجه به این که رنگیزه‌های فتوسنتزی بیشترین فعالیت خود را در اندام برگ دارند می‌توان نتیجه گرفت بهترین رویشگاه از بین سه ارتفاع مورد بررسی، مربوط به مناطق پست یعنی ارتفاع ۰-۱۰۰ متری بوده و همچنین از نظر منطقه نیز، رویشگاه ساری بیشترین مقدار رنگیزه را نشان داده است. بنابراین با شناسایی رویشگاه‌های مختلف و بررسی تأثیر عوامل محیطی از جمله ارتفاع از سطح دریا بر عملکرد کمی و کیفی ترکیبات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاهان دارویی، می‌توان برای حفظ تنوع ژنتیکی این گیاهان تلاش نمود و پس از شناسایی رویشگاه مناسب جهت استخراج متابولیت‌های خاص گیاه برای استفاده در صنایع مختلف می‌توان برنامه‌ریزی کرد.

شناخت عوامل تأثیرگذار بر کمیت و کیفیت گیاهان دارویی و مواد مؤثره‌ی آنها از اهمیت بالایی برخوردار است. از مهم‌ترین عوامل محیطی که تأثیر زیادی بر کمیت و کیفیت مواد مؤثره گیاهان می‌گذارد، نور، آبیاری، درجه حرارت و ارتفاع محل رویش می‌باشد (۲۸). جمشیدی و همکاران (۱۵) نتیجه گرفتند که بهترین محل رویش گیاه آویشن کوهی برای حصول بهترین عملکرد کیفیت و کمیت اسانس، ارتفاع ۲۴۰۰ متر می‌باشد. با افزایش ارتفاع، دما به‌طور محسوس کاهش می‌یابد و درجه حرارت از جمله عوامل محیطی تأثیرگذار در تشکیل و تجمع متابولیت‌های ثانویه است. با توجه به نتایج به دست آمده از تحقیق نجار فیروزجایی و همکاران (۲۵)، ارتفاعات بالا از نظر کمیت و کیفیت مواد مؤثره برای کشت و توسعه گیاه گزنه قابلیت بالایی دارد. نیکخواه امیرآباد و همکاران (۲۶) بیان داشتند که ارتفاع منطقه بر ماده مؤثره گیاه چویل اثر داشته است. در مشاهدات قنبری و همکاران (۱۲)، نوروزی و همکاران (۲۷) و نجار فیروزجایی و همکاران (۲۵) با بررسی اثر ارتفاع بر رنگیزه‌های فتوسنتزی گیاهان دارویی علف مار، پونه و گزنه گزارش نمودند که با افزایش ارتفاع از سطح دریا میزان رنگیزه‌ها افزایش داشته و ارتفاع روی این صفات اثر مثبت و معنی‌داری داشته است. برخلاف این نتایج، محققان دیگری در مورد گیاهان مهر سلیمان (۴۰)، پیرو (۱۴)، هندوانه ابوجهل (۳۱) و آفتی (۱۶) همبستگی ارتفاع از سطح دریا با متابولیت‌های ثانویه از جمله ترکیبات فنلی را منفی گزارش کردند.

منابع

- Alia, P. and P. Saradhi. 1991. Proline accumulation under heavy metal stress. Journal of Plant Physiology. 138: 554-558.
- Ashraf, M. and M.R. Foolad. 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. Environmental and Experimental Botany. 59: 206-216.
- Babakhanzadeh Sejrani, A., J. Hadian, V. Abdoussi and K. Larijani. 2013. Investigating some effects of different habitats on the amount of flavonoid and anthocyanin compounds of Iranian Borage flower in Ashkorat area of Gilan province. National Conference of Medicinal Plants. Islamic Azad University, Ayatollah Amoli branch. 177-172. (In Persian)
- Bates, L. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant Soil. 39: 205-207.
- Bourgaud, A., S. Milesi and E. Gontier. 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. Plant Sci. 161: 839-851.

6. Brain K.R. and T.D. Turner. 1975. The practical evaluation of phytopharmaceuticals. Bristol: Wright-Scientifica 10-30.
7. Britt R.D. 1996. The Light Reactions. In Oxygenic Photosynthesis (ed). DR Ort and CF Yocum; Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
8. Cvetanovic, A. 2020. *Sambucus ebulus* L. antioxidants and potential in disease. Journal of Elsevier, 31: pp. 321-333.
9. Davoudi, A., H. Zainelzadeh Tabrizi and A. Shirani Rad. 2018. The effect of selenium foliar plication on some quantitative and qualitative characteristics of rapeseed cultivars under temperature stress conditions at the end of the season. Agricultural Plant Breeding Journal, 11(33): 74-78. (In Persian)
10. Domonkos, I., M. Kis, Z. Gombos and B. Ughy. 2013. Carotenoids, versatile components of oxygenic photosynthesis. Prog. Lipid Res. 52:539-561.
11. Ebadoallahi, A. and Q. Arab. 2019. Investigating the amount of chlorophyll, total carotenoid and beta-carotene in carrots and the effect of weather on them. Quarterly Journal of Medicinal Plants, 19 (75), 265-254. (In Persian)
12. Ghanbari, A., M. Azimi, A. Rafiei, P. Biparva and M. Ebrahimzadeh. 2019. Phytochemical content change of medicinal plant snake grass (*Capparis spinosa* collected from cuttings Different climates. Plant process and function, volume 9, number 39. pp. 178-165. (In Persian)
13. Gairola, S., N.M. Shariff, A. Bhatt and C. Prakash Kala. 2010. Influence of climate change on production of secondary chemicals in high altitude medicinal plants: Issues needs immediate attention. Journal of Medicinal Plants Research Vol. 4(18), pp. 1825-1829.
14. Ghorbanzadeh, A., A. Ghasmenjad, M. Khushal Sarmast and P. Nejad Ebrahimi. 2018. Phytochemical investigation and comparison of essential oil and antioxidant activity of medicinal plant branches. *Juniperus communis* L. in different habitats of Mazandaran and Golestan. Eco phytochemistry of medicinal plants. 7: 15-32. (In Persian)
15. Jamshidi, M., M. Mazandarani and F. Fathi Azad. 2018. Investigating the effect of altitude on the number of secondary metabolites of *Sambucus ebulus* L. fruit. National Conference of Medicinal Plants. (In Persian)
16. Kagazelo, Z., Kh. Hemti and S. Khorasani Nejad. 2016. The effect of altitude on some secondary metabolites of different organs of *Sambucus ebulus* L. in three cities in Golestan province. Physiology of plant environment, plant ecophysiology researches of Iran. Volume 12, number 3, serial 47. Page 1-13. (In Persian)
17. Kaya, Y., E. Kelil Haji, Y.E. Arvas and H. Murat. 2019. *Sambucus ebulus* L.: Past, Present and Future. Journal of AIP Publishing, pp. 1-7.
18. Khanafari, A., M. Attadi and S. Arbabian. 2018. Investigating the ability of anthocyanin production in rhizobium in symbiotic and free life mode. Quarterly Journal of Microbiology. Volume 1, Number 2, pp. 1-12. (In Persian)
19. Khoo, H.E., A. Azlan, S.T. Tang and S.M. Lim. 2017. Anthocyanidins and anthocyanins: Colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. Food and Nutrition Research 61: 1-21.
20. Lichtenthaler, H.K. and A.R. Wellburn. 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. Biochemical Society Transactions, 11: 591-592
21. Lotf allahi, L., H. Torabi Gol Sefidi and H. Omid. 2013. Investigating the effect of different salinity levels on proline, photosynthetic pigments and relative humidity of the leaves of German chamomile medicinal plant (*Matricaria chamomilla* L.) in water culture environment. Journal of Plant Production Research, Volume 22, Number 1, pp. 89-104. (In Persian)
22. Lotfi, K., M. Orai, S. Hazrati, A. Faramarzi and J. Ajali. 2021. Investigating the morphological diversity of different populations of mountain tea medicinal plant based on multivariate statistical methods. Agricultural Plant Breeding Journal, 13(39):195-207. (In Persian)
23. Mazandarani, M., M. Jamshidi and F. Fathi Azad. 2018. Investigation of the most important secondary active substances of the medicinal plant *Sambucus ebulus* L. in two different habitats of Mazandaran province. Quarterly Journal of Plant Science Research. Volume 6, Number 1 (series 47), pp. 5-67. (In Persian)
24. Mohammadipour, S., Kh. Hemati, A. Ghasemnejad and P. Ebrahimi. 2013. The effect of altitude and ecotype on some secondary metabolites of the medicinal plant Aqti. Master's degree, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran, pp. 1-7. (In Persian)
25. Najjar Firouzjaei, M., Kh. Hemati, S. Khorasaninejad, A. Garne Khani Property and A. Bagheri Fard. 2013. The effect of altitude on the morphological characteristics of nettle leaves (*Urtica dioica* L.) in Mazandaran and Golestan provinces. Iranian Journal of Plant Ecophysiology, 35(9): 5, pp. 1-11. (In Persian)
26. Nikkhah Amirabad, H., B. Hosseini, Y. Kosta and M. Fatahi. 2016. The effect of altitude and different phenological stages on photochemical properties and antioxidant activity of medicinal plant *Ferulago angulate* (schlecht.) Boiss from Dana highlands. Eco phytochemistry Quarterly of Medicinal Plants, 17(5): 1, pp. 16-29. (In Persian)
27. Nowrozi, V., S. Yusef Zadeh, K. Asilan and S. Mansouri Far. 2016. Evaluation of changes in essential oil, chlorophyll, carotenoid, anthocyanin and flavonoids of *Mentha Longifolia* L. in different habitats of Marand. Eco photochemistry Quarterly Journal of Medicinal Plants. 5: pp. 52-64. (In Persian)
28. Omidbeigi, R. 2022. Production and processing of medicinal plants. Astan Quds Razavi Publications. Mashhad. Volume 1. Page 347. (In Persian)
29. Porra, R.J. 2002. The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. Photosynthesis Res. 73:149-156.

30. Pourmohammad Taghi, Y., M. Nejatian, J. Mohammadzadeh Agrigashi and J. Khan Hekmati. 2013. Investigating the effect of sodium chloride salinity on the amount of proline and malonaldehyde in 10 grape varieties. National Grape Festival of Qazvin Province - Vineyard. pp. 221-226. (In Persian)
31. Rouhani, R., S. Ain Afshar and R. Ahmadzadeh. 2013. Extraction of anthocyanin and antioxidant compounds of saffron flower flag using ultrasound technology. Journal of Iranian Food Science and Industry Research. 11: 2, pp. 161-170. (In Persian)
32. Saberi, M., H. Niknehad, G. Heshmati, H. Barani and A. Shahriari. 2016. Investigating the number of changes in some active substances in the extracts of Abu Jahl watermelon (*Citrullus colocynthis* L.) Schrab plant in two habitats of Sistan and Baluchistan province. Journal of biological protection, the universe of plants. 5:63-49. (In Persian)
33. Saeb, K., A. Kakui, B. Babakhani, S.A. Hosseini Beldaji, P. Rahdari, K. Pourshamsian and R. Jaafari Hajti. 2013. Investigating the effect of altitude on the number of medicinal compounds of the nettle plant *Urtica dioica* L. in Ramsar region. Journal of Plant and Ecology, 33, 31-40. (In Persian)
34. Saharkhiz, M. 2011. *The effect of anise medicinal plant fruit harvesting time on essential oil and its components. Horticulture master's thesis, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University. P. 77. (In Persian)*
35. Saidi, K., F. Sefidkan and A. Babaei. 2013. Determining the number of carotenoids and lycopene in the fruit of the medicinal plant of mountain nasturtium (*Rosa canina* L.) in different habitats of Iran. Researches on medicinal and aromatic plants of Iran. 30: 5, pp. 833-842. (In Persian)
36. Sepehrifar, R. and T. Hasanlou. 2010. Investigation of polyphenolic compounds, anthocyanins and total flavonoids and antioxidant properties of the medicinal plant Qaraqat (*Vaccinium artostaphylos* L.) collected from four different regions of Iran, Quarterly of Medicinal Plants, 1(33), pp. 66-74. (In Persian)
37. Shimono, H., T. Hasegawa, S. Fujimura and K. Iwama. 2004. Responses of leaf photosynthesis and plant water status in rice to low water temperature at different growth stage. Field Crop Research. 89: 71-83.
38. Shokrzadeh, M and S.S. Saeedi Saravi .2010. The chemistry, pharmacology and clinical properties of *Sambucus ebulus* L. Journal of Medicinal Plants Research. 4(2), pp. 095-103. (In Persian)
39. Sims, D.A. and J.A. Gamon. 2002. Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. Remote Sens. Environ. 81: 337-354.
40. Suyal, R., S. Rawat, R.S. Rawal and I.D. Bhatt. 2019. Variability in morphology, phytochemicals, and antioxidants in (*Polygonatum verticillatum* L.) all populations under different altitudes and habitat conditions in West Himalaya, India. Environmental Monitoring and Assessment 191: 783-801.
41. Van Amerongen, H.R., V. Grondelle and L. Valkunas. 2000. Photosynthetic Excitons. 2000; Singapore: World Scientific Publishers
42. Zahed Chakouri, S. and F. Qasim. 2014. Investigating the changes of some commonly used nutritional elements, proline and protein in plants European cow tongue (*Borago officinalis* L.) under drought stress. Biotechnology of agricultural plants. 4: 11, pp. 65-75. (In Persian)
43. Zakarijanjad, N., H. Moradi, P. Biparva and Z. Memariani. 2018. The effect of altitude on some morphological characteristics and photosynthetic pigments of *Viola odorata* L. in three regions of Mazandaran province. The second international conference and the sixth national conference on organic and conventional agriculture. P. 9-1. (In Persian)