نشریه پژوهش‌های اکوفیزیولوژی گیاهی ایران، شماره پیاپی ۳۵، سال نهم، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۳ / صفحات: ۱۱-۱

اثر ارتفاع بر خصوصیات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی برگ گیاه گزنه (*Urtica dioica* L.) در استان‌های مازندران و گلستان

مصطفی نجار فیروزجایی*[1]، خدایار همتی[2]، سارا خراسانی‌نژاد[3]، امیر دارائی گرمه‌خانی[4] و امین‌اله باقری‌فرد[5]

[1] کارشناس‌ارشد، گروه تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع‌طبیعی گرگان، گرگان

[2] دانشیار، گروه تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع‌طبیعی گرگان، گرگان

[3] استادیار، گروه تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع‌طبیعی گرگان، گرگان

[4] استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه بوعلی سینا همدان، همدان

[5] دانشجوی دکتری، گیاهان دارویی، پردیس دانشگاهی، دانشگاه گیلان، گیلان

تاریخ دریافت: ۹۳/۱/۱۸ تاریخ پذیرش:۹۳/۶/۲۱

چکیده

عوامل محیطی به‌عنوان مهم‌ترین عامل مؤثر بر صفات مورفولوژیکی و نیز بیان ژن‌های بیوسنتزکننده ترکیبات ثانویه در گیاهان دارویی مطرح می‌باشد. در این تحقیق اثر ارتفاع در دو استان مازندران و گلستان روی برخی خصوصیات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه گزنه مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌برداری از مناطق مختلف در زمان گلدهی گیاه صورت پذیرفت. داده‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی، بصورت آشیانه‌ای با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS تجزیه و تحلیل شدند. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر ارتفاع و اکوتیپ به‌صورت معنی‌داری خصوصیات مورفولوژیک و بیوشیمیایی گزنه را تحت تاثیر قرار داد. نتایج نشان داد که مقدار هر سه صفت طول و عرض برگ و نیز طول اندام هوایی گیاه با افزایش ارتفاع از سطح دریا کاهش یافت به‌طوری که کمترین میزان طول و عرض برگ و کمترین ارتفاع گیاه و نیز بیشترین میزان کلروفیل در منطقه له کوه مازندران با ارتفاع ۲۲۵۰ متر بدست آمد.همچنین نتایج تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها، اسید کلروژنیک، اسید کافئیک و روتین در برگ گیاه گزنه با افزایش ارتفاع بیشتر شد به نحوی که بیشترین میزان ترکیبات فوق در در ارتفاع ۲۲۵۰ متری منطقه له کوه مازندران مشاهده گشت.

واژگان کلیدی: ارتفاع، فلاونوئید، فنل، گزنه، HPLC.

مقدمه

گزنه با نام علمی *Urtica dioica* از خانواده Urticaceae گیاهی علفی، چندساله، پایا، دوپایه و بندرت تک‌پایه و دارای کرک‌های گزنده است (فارماکوپه گیاهی ایران، ۱۳۸۱؛ قهرمان، ۱۳۷۲). برگ‌ها، ریشه، دانه و شیرابهٔ بخش دارویی این گیاه را تشکیل می‌دهند (زرگری، ۱۳۷٦). بهترین زمان برداشت و جمع‌آوری برگ‌های این گیاه از اردیبهشت تا شهریورماه می‌باشد (فارماکوپه گیاهی ایران، ۱۳۸۱) ترکیبات فنلی موجود در گزنه شامل کافئیک اسید، فرولیک اسید، سیناپیک اسید، فیستین[2] و میریستین می‌باشند (Mahmoudi et al., 2007). از کاربردهای دارویی گزنه می‌توان به درمان آرتریت روماتید، درمان عفونت مثانه و مجاری ادراری، بزرگ شدگی

*نویسنده مسئول: m_najar342@yahoo.com

1- Fisettin

پروستات، پایین آورنده قند خون و اسید اوریک، حساسیت فصلی و درمان اکنه اشاره کرد (Julia et al., 2007).

تحقیقات نشان داده است مهم‌ترین عوامل موثر بر ترکیبات شیمیایی ثانویه گیاهان عوامل ژنتیکی، محیطی و اثرات متقابل آن‌ها ست. از مهمترین عوامل محیطی که تاثیر عمده‌ای بر کمیت و کیفیت مواد موثره گیاهان می‌گذارند، نور، درجه حرارت، آبیاری و ارتفاع محل می‌باشد (امیدبیگی، ۱۳۸٤). همتی و همکاران (۱۳۸٦) با بررسی تاثیر اقلیم و اندام‌های مختلف روی برخی فلاونوئیدهای درختچه سرخ ولیک نشان دادند که اثرات متقابلی بین مکان و صفات وجود دارد. آن‌ها به این نتیجه رسیدند که میزان کوئرستین در اندام کل گیاه سرخ ولیک در کلاردشت مازندران بیشتر از گرگان بود. در بررسی دیگری که جایمند و همکاران (۱۳۸۸) با استفاده از استخراج و اندازه‌گیری ترکیبات فلاونوئیدی کامفرول و کوئرستین در گلبرگ ده ژنوتیپ از گل محمدی در مناطق غربی ایران انجام دادند دریافتند که بهترین مناطق از نظر میزان ترکیبات کامفرول و کوئرستین به‌ترتیب آذربایجان غربی، ایلام و اردبیل بودند. Tajali و Khazaeipoor (۲۰۰۲) با بررسی تأثیر ارتفاع بر روی فنل کل و فلاونوئیدهای گیاه *Cerateagus microphylla* بیان داشتند که این گیاه در ارتفاع ۱۰۰۰ متری، دارای بیشترین میزان ترکیبات نامبرده نسبت به گیاهان رشد یافته در ارتفاعات پست بود. کریمی و همکاران (۱۳۸۹) با بررسی تنوع اکوتیپی آویشن دنایی در استان‌های اصفهان و چهارمحال بختیاری دریافتند که افزایش ارتفاع بر میزان تیمول اثر مثبت و بر کارواکرول اثر معنی‌داری نداشت. آنها بیشترین میزان تیمول را در نمونه شیخ شبان با ارتفاع ۲۷٤۷ متر از سطح دریا و بیشترین میزان کارواکرول مربوط به نمونه لارک در ارتفاع ۲۳۷۰ متر از سطح دریا را گزارش دادند. Ghasemi و همکاران (۲۰۱۱) با بررسی تأثیر فاکتورهای محیطی بر میزان آنتی‌اکسیدان‌ها، ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی در گیاه گردو (*Juglans regia*) به این نتیجه رسیدند که بیشترین میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی در منطقه آبعلی با بیشترین ارتفاع و کمترین میانگین دمای روزانه بدست آمد.

محیط به‌عنوان مهم ترین عامل مؤثر بر میزان بیان ژن‌های بیوسنتزکننده ترکیبات ثانویه در گیاهان دارویی مطرح می‌باشد (سحرخیز، ۱۳۸۱). 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 ارتفاع از سطح دریا بر مقدار ماده موثره دارویی گونه وحشی گیاه گزنه در رویشگاه‌های طبیعی دو استان مازندران و گلستان پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از گزنه‌های خودرو در ارتفاعات مختلف استان‌های مازندران و گلستان استفاده گردید. در زمستان مناطق نمونه‌گیری مشخص گردید و در فصل بهار (زمان گلدهی گیاه گزنه) از هر منطقه سه جمعیت گیاهی به‌طور تصادفی در استان‌های مازندران و گلستان انتخاب و نمونه‌گیری شد. پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه و با استناد به کلیدهای گیاهشناسی و فلور ایران و منابع موجود (قهرمان، ۱۳۷۲) و تأیید متخصصین گیاهشناسی نمونه های گیاهی تایید شدند. پس از بررسی برخی صفات مورفولوژیکی، اقدام به خشکاندن برگ‌های گیاه در شرایط سایه و تهویه مناسب شد. پس از خشک کردن، نمونه‌ها ریز شده و برای یکسان سازی با الک مش ۱۸ همسان گردید. نمونه‌های خشک شده تا زمان آزمایش در فریزر در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد

نگهداری شدند. هنگام جمع‌آوری گیاه در محل، از هر منطقه که گیاه مورد نظر جمع‌آوری شد 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 زیستگاه‌ها بر اساس نزدیکترین ایستگاه هواشناسی به زیستگاه، اطلاعات یکساله از پارامترهای هواشناسی مانند متوسط درجه‌حرارت و متوسط بارندگی تهیه شد (جدول ۱). جهت تعیین مهمترین خصوصیات خاکشناسی از هر زیستگاه نمونه خاک از عمق صفر تا ۳۰ سانتی‌متر برداشت و به آزمایشگاه خاکشناسی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع‌طبیعی گرگان انتقال داده شد (جدول ۱). میزان کلروفیل نیز با دستگاه کلروفیل سنج دستی اندازه‌گیری شد.

جدول ۱: مشخصات اقلیمی رویشگاه‌های مورد مطالعه گیاه گزنه

استان	منطقه	ارتفاع از سطح دریا (متر)	میانگین دمای سالیانه (درجه سانتی گراد)	میانگین بارش سالیانه (میلی متر)	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی	خصوصیات فیزیکی – شیمیایی خاک				
							EC (ds/m)	pH	بافت خاک	میزان ماده آلی (درصد)	کاربری زمین
مازندران	بابل- حیدرکلا	۱۰	۱۷/۱۲	٦١٦/٥	N۳٦°۳۳‘	E٥۲°٤۲‘	۱/٤۸	۷/۹۱	رسی	۳/۲۲	زراعی
مازندران	بابل- فیروزجاه	۷۵۰	۱۵/۱	٥٤٧/٥	N۳٦°۱۱‘	E٥۲°۳۹‘	۱/۲٦	۷/۷۳	لومی	۳/۹٦	باغی
مازندران	بابل- شیخ‌موسی	۱٤٥۰	۹/۵	۳٥٦/٤	N۳٦°۸‘	E٥۲°۳٦‘	۱/۸۷	۷/۱٤	سیلتی لومی	۳/۳۷	مرتعی
مازندران	بابل- له‌کوه	۲۲٥۰	۸/۹	۲۸٦	N۳٦°٦‘	E٥۲°۳٤‘	۱/٤۲	۷/٦۸	لومی	٤/۰٤	مرتعی
گلستان	گرگان- افسران	۵۰	۱۷/۷	۵۰۱	N۳٦°٥۰‘	E٥٤°۲۳‘	۱/۳٦	۷/٤۸	لومی رسی	۲/۲۵	زراعی
گلستان	گرگان-ناهارخوران	۷۵۰	۱٦/۸	٤۸۲	N۳٦°٤۳‘	E٥٤°۲۹‘	۱/۰۷	۷/۳٤	شنی لومی	۲/۲۱	جنگلی
گلستان	گرگان- زیارت	۱٤٥۰	۱۳/۳	۳۹٦	N۳٦°٤۱‘	E٥٤°۲۷‘	۱/٤۷	۷/٥۸	سیلتی لومی رسی	۳/۸۳	مرتعی
گلستان	گرگان- چهارباغ	۲۲٥۰	۱۰/۱۷	۲٥۲	N۳٦°۳۸‘	E٥٤°۳۱‘	۲/۳۲	۷/۹٥	شنی لومی	۰/۸۷٤	مرتعی

عصاره گیری: نمونه‌های الک شده توزین و مقدار یک گرم از هر نمونه به ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری انتقال و با ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد (نسبت ۱ به ۱۰) مخلوط شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۲٤ ساعت روی همزن و به‌مدت ۵ دقیقه در ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس عصاره خالص رویی برای اندازه‌گیری میزان فنل کل و فلاونوئیدها مورد استفاده قرار گرفت.

سنجش ترکیبات فنلی و فلاونوئید کل: مقدار کل ترکیبات فنلی موجود در عصاره گیاه گزنه توسط رنگ سنجی به روش فولین سیو کالتو انجام گرفت (McDonalad et al., 2001) و بر حسب میلی‌گرم گالیک اسید در یک گرم نمونه خشک بیان گردید.

برای محاسبه محتوای فلاونوئیدها نیز از روش آلومینیوم کلراید استفاده گردید (Chang et al., 2002) و بر حسب میلی‌گرم کوئرستین در یک گرم نمونه خشک بیان گردید.

اندازه‌گیری اسید کلروژنیک و اسید کافئیک و روتین با استفاده از دستگاه HPLC

آماده‌سازی نمونه: یک گرم نمونه برگ پودر شده در ۱۰ میلی‌لیتر متانول خالص (۱: ۱۰) مخصوص HPLC همگن شد و به‌مدت ۱۰ دقیقه در اولتراسوند قرار داده شد (لوله محتوی محلول کاملاً به وسیله فویل آلومینیومی در برابر نور محافظت گردید). سپس مدت ۱۲ ساعت روی همزن قرار گرفت و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دور ۳۵۰۰ سانتریفیوژ گردید. بخش فوقانی محلول بعد از گذشتن از فیلتر سرنگی، به ظروف مخصوص HPLC منتقل گردید و آماده تزریق به دستگاه HPLC شد. مشخصات دستگاه به شرح زیر بود: مدل دستگاه: مرک- هیتاچی ال- ۷۱۰۰، دتکتور: دیود اری هیتاچی ال- ۲٤٥۰[1]، آون ستون: هیتاچی ال-۲۳۰۰[2]، نوع ستون: آر پی- ۱۸[3] با ابعاد ٤/٦ × ۲۵۰ میلی‌متر و اندازه ذرات ۵ میکرومتر. فاز متحرک مورد استفاده برای اندازه گیری کلروژنیک و کافئیک شامل ۱ میلی‌لیتر اسیداستیک، ۸۹ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه شده و ۱۰ میلی‌لیتر استونیتریل با سرعت جریان یک میلی‌لیتر در دقیقه بود. فاز متحرک مورد استفاده برای اندازه‌گیری روتین شامل ۵۰ میلی‌لیتر متانول خالص مرک، ٤۹ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه شده و ۱ میلی‌لیتر اسید استیک با سرعت جریان یک میلی‌لیتر در دقیقه بود. با مقایسه زمان تأخیر و سطح زیر منحنی نمونه با نمونه‌های استاندارد، میزان اسیدکافئیک، اسیدکلروژنیک و روتین تعیین و در نهایت بر اساس میلی‌گرم بر گرم وزن خشک برگ بیان گردید (Trajtemberg et al., 2006; Santos-games et al., 2003).

برای انجام این تحقیق از طرح کاملاً تصادفی به صورت آشیانه‌ای استفاده شد. در این طرح اثر چهار ارتفاع در هر یک از دو استان مازندران و گلستان بر خصوصیات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه گزنه مورد بررسی قرار گرفت. برای ویژگی‌های مورفولوژیکی از پنج تکرار و برای ویژگی‌های بیوشیمیایی از سه تکرار استفاده شد. تجزیه واریانس داده‌های به دست آمده با نرم‌افزار SAS انجام شد و به علت معنی‌دار شدن اثر متقابل ارتفاع در استان، مقایسه میانگین این اثر به کمک نرم‌افزار MSTAT و با روش آزمون دانکن صورت پذیرفت.

نتایج

نتایج تجزیه واریانس صفات مورفولوژیک گزنه نشان داد که بین دو استان مازندران و گلستان (نسبت به هم) در تمامی صفات اختلاف معنی‌داری وجود نداشت اما اثر متقابل ارتفاع در هر استان، در همه صفات معنی‌دار بود (جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین نشان داد که مقدار هر سه صفت طول، عرض و نسبت طول به عرض برگ با افزایش ارتفاع کاهش یافت به‌طوری‌که بیشترین مقدار طول برگ (۱٤/۳ سانتی‌متر) در ارتفاع ۵۰ متری استان گلستان، بیشترین مقدار عرض برگ (۹/۱٦ سانتی‌متر) در ارتفاع ۱۰ متری مازندران و بیشترین نسبت طول به عرض برگ (۱/۸۵ سانتی‌متر) در ارتفاع ۱٤۵۰ متری گلستان مشاهده شد.کمترین مقدار این صفات (٦/۹، ۵/۵ و ۱/۱۸ سانتی‌متر به‌ترتیب) نیز در ارتفاع ۲۲۵۰ متری استان مازندران بدست آمد.

1- Diode array detector Hitachi L-2450
2- Column oven L-2300
3- Reverse Phase-18

جدول ۲- تجزیه واریانس صفات مورفولوژیک

منابع تغییرات	درجه آزادی	طول برگ	عرض برگ	نسبت طول به عرض برگ	تعداد برگ در بوته	تعداد گره	فاصله گره‌ها	ارتفاع گیاه
استان	۱	۸/۷٤۲^{ns}	۰/۰۰۲^{ns}	۰/۲۱۳^{ns}	۳۹۸۰^{ns}	۱۵/٦۲^{ns}	۲/۳۰٤^{ns}	۸/۵۵٦^{ns}
اثر متقابل ارتفاع در استان	٦	۳۹/۲۵**	۱۰/۱۳**	۰/۳۱۲**	۲۲۵۷**	۱۵۹/۱**	۱۷/۱۷**	۱۲۲٦**
خطا	۳۲	۱/۸۹	۰/٦۲۸	۰/۰٤۲	۸۵/٦۳	۱۰/٦۱	۰/٦٤۹	۳۷۲/٦
ضریب تغییرات (درصد)		۱۱/۸٦	۱۱/۰۳	۱۲/۵۷	۱۵/۹	۱۸/۵۸	۱۲/۳۱	۱۸/۵

** و ns به‌ترتیب نشان‌دهنده معنی‌دار بودن در سطح ۱ درصد و غیر معنی‌دار می‌باشد.

با افزایش ارتفاع، تعداد برگ در بوته کاهش محسوسی نشان داد به‌طوری‌که در ارتفاعات پایین مازندران و گلستان تعداد برگ در بوته، به‌ترتیب ۸٤/۸ و ۸۰/۲ عدد بود اما در ارتفاع ۲۲۵۰ متری این تعداد به ۱۹/۲ و ۳٦/٤ عدد کاهش یافت. با افزایش ارتفاع از سطح دریا در دو استان مازندران و گلستان، تعداد گره در گزنه کاهش اما فاصله گره‌ها افزایش نشان داد. در پایین‌ترین ارتفاع مازندران و گلستان تعداد گره به ترتیب ۲۳ و ۲٦/۲ عدد بود اما در بالاترین ارتفاع دو استان این تعداد به ۹/٦ و ۱۱ عدد کاهش یافت. بیشترین فاصله گره (۸/٤۸ سانتی‌متر) مربوط به استان مازندران و ارتفاع ۱٤۵۰ متری بود که البته با مقدار آن در ارتفاع ۲۲۵۰ متری اختلاف معنی‌دار نداشت. کمترین فاصله گره (۳/٤ سانتی‌متر) در ارتفاع ۵۰ متری گلستان مشاهده شد.

نتایج نشان داد افزایش ارتفاع از سطح دریا نقش موثری در کاهش ارتفاع گیاه (طول اندام هوایی) گزنه داشت. نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد در استان مازندران ارتفاع ۷۵۰ متری از سطح دریا بیشترین و در ارتفاع ۲۲۵۰ متری کمترین ارتفاع گیاه با یک اختلاف ۳۵ درصدی را به خود اختصاص داد. لازم به ذکر است ارتفاع ۲۲۵۰ متری در هر دو استان اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند (جدول ۳).

جدول ۳: مقایسه میانگین صفات مورفولوژیکی مورد بررسی

استان × ارتفاع	طول برگ (سانتی‌متر)	عرض برگ (سانتی‌متر)	نسبت طول به عرض‌برگ	تعداد برگ در بوته	تعداد گره	فاصله گره‌ها (سانتی متر)	ارتفاع گیاه (سانتی‌متر)
مازندران-۱۰متر	۱۳/۱^{ab}	۹/۱٦^{a}	۱/٤۳^{bc}	۸٤/۸^{a}	۲۳^{a}	۵/۲۸^{c}	۱۱۸/۸^{a}
مازندران- ۷۵۰ متر	۱۲/٤^{ab}	۷/۰٦^{b}	۱/۷۵^{ab}	۵۱/۲^{b}	۱۹/٦^{ab}	۵/۳٦^{c}	۱۲۰/۳^{a}
مازندران- ۱٤۵۰ متر	۱۰/۱^{b}	۷/۲٤^{ab}	۱/۳۹^{bc}	۳۷/٦^{c}	۱۵/٤^{b}	۸/٤۸^{a}	۱۰۲/۹^{c}
مازندران- ۲۲۵۰ متر	٦/۹^{c}	۵/۸^{c}	۱/۱۸^{c}	۱۹/۲^{d}	۹/٦^{c}	۸^{a}	۷۷/۲^{d}
گلستان- ۵۰ متر	۱٤/۳^{a}	۸/٦^{ab}	۱/٦٦^{ab}	۸۰/۲^{a}	۲٦/۲^{a}	۳/٤^{d}	۱۱٦/٤^{ab}
گلستان- ۷۵۰ متر	۱۲/۵^{ab}	۷/۹^{ab}	۱/۵۸^{b}	۷٦/٦^{ab}	۱۵/٤^{b}	٦/۵٦^{b}	۱۰۳^{c}
گلستان- ۱٤۵۰ متر	۱۱/۵^{b}	٦/۲^{b}	۱/۸۵^{a}	۵۹/۵^{b}	۱٤^{b}	۷/٦٤^{ab}	۹۳/۳^{cd}
گلستان- ۲۲۵۰ متر	۸/۳^{c}	۵/۸^{c}	۱/۵۰^{bc}	۳٦/٤^{c}	۱۱^{c}	۷/٦^{ab}	۸۸/۸^{d}

در هر ستون حروف مشترک نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار است.

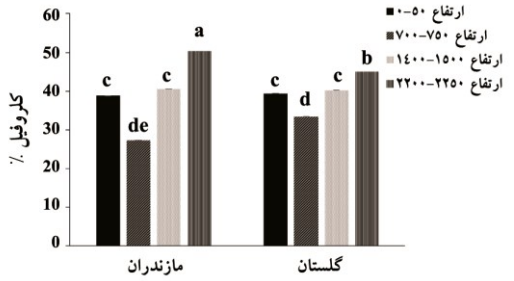
صفات بیوشیمیایی: نتایج تجزیه واریانس صفات بیوشیمیایی مورد بررسی نشان داد که اثر متقابل ارتفاع در استان برای تمامی صفات در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ٤).

جدول ٤: تجزیه واریانس صفات بیوشیمیایی مورد بررسی

منابع تغییرات	درجه آزادی	ترکیبات فنلی	فلاونوئیدها	اسیدکلروژنیک	اسیدکافئیک	روتین	کلروفیل
		(میلی‌گرم بر گرم وزن خشک)					
استان	١	٢/٢١^{ns}	٢/٨٧^{ns}	٢٤٩٩٢^{ns}	١/٧٣^{ns}	١٠٢/٦٧^{ns}	٠/٧٨٤^{ns}
اثر متقابل ارتفاع در استان	٦	١/٤١**	٢/٤١**	١٨٦١٤**	٠/٦٥**	٩٦/٧٥**	٢٧٩/٣**
خطا	١٦	٠/٠٠٨	٠/٠٠٧	٢٧٠/٧٦	٠/٠١١	١/٧٥	٣١/٧٣
ضریب تغییرات (درصد)		٤/٦٦	٢/٣١	١٨/٨٦	٢/٤٤	١٧/٨٦	١٤/٣

** و ns به‌ترتیب نشان دهنده معنی‌دار بودن در سطح ١ درصد و غیر معنی‌دار می‌باشد.

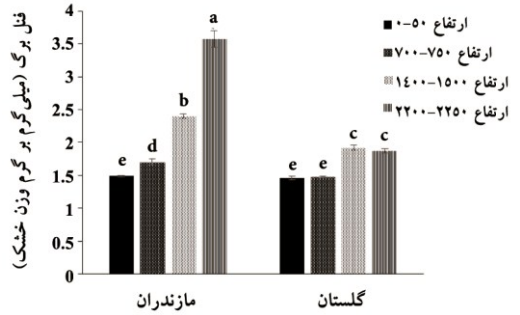
کلروفیل: با افزایش ارتفاع میزان کلروفیل روند افزایشی داشت به‌طوری‌که بیشترین میزان کلروفیل (٥٠/٣ درصد) در ارتفاع ٢٢٥٠ متری مازندران بدست آمد در حالی‌که مقدار این صفت در ارتفاع ٧٥٠ متری ٢٧/٣ درصد بود (شکل ١).



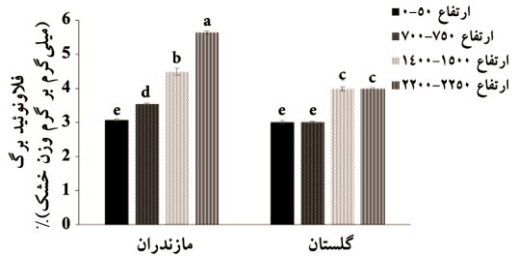
شکل ١: اثر متقابل ارتفاع در استان بر میزان کلروفیل برگ (درصد) (اعداد دارای حروف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار می‌باشند)

ترکیبات فنلی و فلاونوئید کل: نتایج نشان داد که با افزایش ارتفاع، میزان ترکیبات فنلی برگ افزایش یافت، به‌طوری که بیشترین میزان (٣/٥٧ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) در ارتفاع ٢٢٥٠ متری مازندران بدست آمد و با کاهش ارتفاع به ١٤٥٠ متر، فنل کل برگ کاهش محسوسی نشان داد، ارتفاعات بالای استان گلستان نیز از فنل بالاتری نسبت به ارتفاعات پایین برخوردار بودند (شکل ٢).

نتایج مقایسه میانگین نشان داد که با افزایش ارتفاع در دو استان مازندران و گلستان میزان فلاونوئید کل برگ افزایش یافت، به‌طوری‌که بیشترین میزان فلاونوئید کل برگ (٥/٦٤ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) در ارتفاع ٢٢٥٠ متری مازندران بدست آمد، در ارتفاع ١٤٥٠ متری مازندران مقدار آن به ٤/٩٤ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک رسید و پس از آن ارتفاعات بالای گلستان بیشترین میزان فلاونوئیدهای کل برگ را داشتند. کمترین میزان فلاونوئیدهای برگ (٣ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) مربوط به ارتفاع ٥٠ متری گلستان بود (شکل ٣).

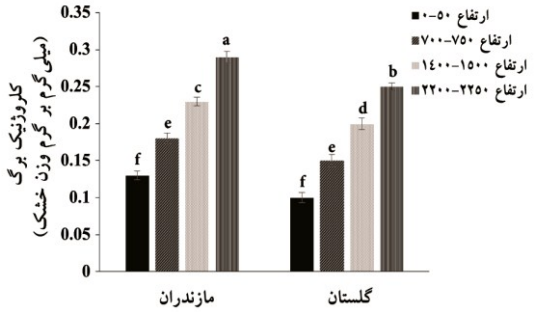


شکل ٢: اثر متقابل ارتفاع در استان بر میزان ترکیبات فنلی برگ (اعداد دارای حروف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار می‌باشند)



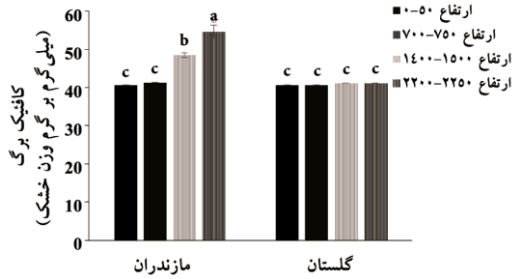
شکل ۳: اثر متقابل ارتفاع در استان بر میزان فلاونوئیدهای برگ (اعداد دارای حروف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار می‌باشند)

اسیدکلروژنیک و اسید کافئیک: مقایسه میانگین اثر متقابل ارتفاع در استان بر میزان اسید کلروژنیک برگ گیاه گزنه نشان داد که در هر دو استان مازندران و گلستان با افزایش ارتفاع میزان کلروژنیک برگ افزایش یافت، به‌طوری‌که بیشترین مقدار آن (۰/۲۹ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) در ارتفاع ۲۲۵۰ متری مازندران بدست آمد و پس از آن ارتفاع ۲۲۵۰ متری گلستان مقدار کلروژنیک بالایی داشت، کمترین مقدار این ماده (۰/۱ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) در ارتفاع ۵۰ متری گلستان مشاهده شد (شکل ٤).



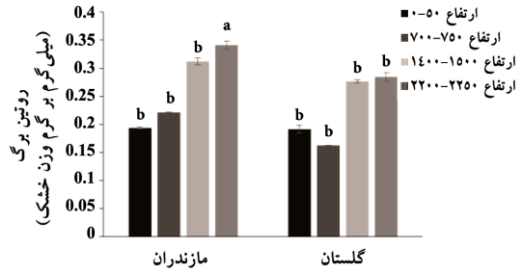
شکل ٤: اثر متقابل ارتفاع در استان بر میزان اسید کلروژنیک برگ (اعداد دارای حروف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار می‌باشند)

نتایج اثر متقابل ارتفاع در استان بر میزان اسید کافئیک برگ گیاه گزنه نشان داد که بیشترین مقدار این ماده (۰/۰٥٤ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) در ارتفاع ۲۲۵۰ متری مازندران دیده شد و پس از آن ارتفاع ۱٤٥۰ متری این استان قرار داشت، بین سایر مناطق نمونه‌برداری اختلاف معنی‌دار مشاهد نشد (شکل ۵).



شکل ۵: اثر متقابل ارتفاع در استان بر میزان اسید کافئیک برگ (اعداد دارای حروف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار می‌باشند)

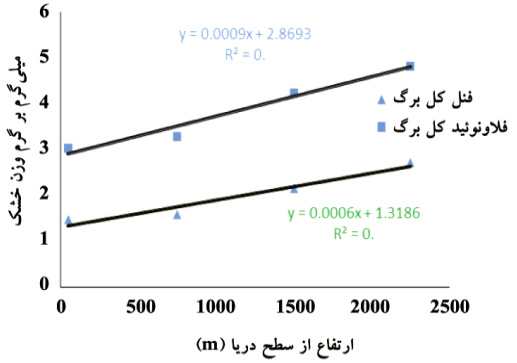
روتین برگ: در بررسی اثر متقابل ارتفاع در استان، بر میزان روتین برگ مشاهده شد که در هر دو استان مازندران و گلستان با افزایش ارتفاع مقدار روتین افزایش یافت، به‌طوری‌که بیشترین مقدار آن (۰/۳٤ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) در ارتفاع ۲۲۵۰ متری مازندران بدست آمد و پس از آن در سایر مناطق مرتفع دو استان مشاهده شد. کمترین مقدار روتین برگ (۰/۱٦ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) به ارتفاع ۷۵۰ متری گلستان تعلق داشت (شکل ٦).



شکل ٦: مقایسه میانگین اثر متقابل ارتفاع در استان بر میزان روتین برگ (اعداد دارای حروف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار می‌باشند)

رابطه رگرسیونی ارتفاع از سطح دریا با مقدار ترکیبات فنل و فلاونوئیدها : نتایج نشان داد مقدار

فلاونوئید کل برگ بیشتر از فنل کل بود. با افزایش ارتفاع از سطح دریا میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئید کل به صورت چشمگیری افزایش یافت. در ارتفاعات کمتر از ۱۰۰۰ متر مقدار شیب رگرسیون بسیار کمتر از ارتفاعات بالاتر بود. در برگ گزنه مقدار فلاونوئید کل ارتباط بیشتری با ارتفاع نسبت به فنل کل نشان داد (r^2 =۰/۹۶)، به‌طوری‌که در ارتفاعات بالا شیب خط رگرسیون افزایش بیشتری نشان داد (شکل ۷).



شکل ۷: ارتباط بین ارتفاع از سطح دریا با فنل و فلاونوئید کل در برگ گیاه گزنه

میزان اسید کلروژنیک و روتین گیاه نیز به‌طور محسوسی بیشتر از اسید کافئیک بود، همچنین بیشترین ارتباط (r^2=۰/۹۹) با ارتفاع از سطح دریا، مربوط به میزان اسید کلروژنیک کل گیاه بود که به شدت تحت تاثیر ارتفاع از سطح دریا قرار گرفت.

بحث

طبق نتایج بدست آمده صفات مورفولوژیکی و بیوشمیایی گیاه گزنه تحت تاثیر شرایط محیطی مختلف ناشی از تغییر ارتفاع محل رویش قرار گرفتند، به‌طوری‌که ارتفاعات بالا در دو استان مازندران و گلستان به خصوص منطقه له کوه بابل با ارتفاع ۲۲۵۰ متر از سطح دریا، صفات نامبرده دارای بیشترین تاثیرپذیری از افزایش ارتفاع بودند. با توجه به داده‌های هواشناسی (جدول۱) با افزایش ارتفاع، دما به طور محسوسی کاهش یافت به‌طوری‌که میانگین دمای سالیانه از ۱۷ درجه سانتی‌گراد در پایین‌ترین ارتفاع به ۸ درجه سانتی گراد در بالاترین ارتفاع رسید و از آنجایی که رشدونمو اندام‌های گیاهی در شرایط دمای پایین کاهش می‌یابد بسیاری از صفات مورفولوژیکی مورد بررسی در این مطالعه نظیر طول و عرض برگ، تعداد برگ و ارتفاع گیاه کاهش یافت. در بسیاری از گیاهان تاثیر دمای پایین در کاهش خصوصیات رویشی به اثبات رسیده است (امیدبیگی، ۱۳۷۹). همزمان با کاهش دما در ارتفاعات بالا میزان کلروفیل افزایش نشان داد، افزایش درصد کلروفیل در شرایط سرد نوعی مقاومت در برابر سرما محسوب می‌شود تا گیاه بتواند تا حدودی خسارات ناشی از کاهش فتوسنتز را جبران کند (Spearing and Karlander, 1979). میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئید کل با ارتفاع از سطح دریا ارتباط مثبت و معنی‌دار داشتند، به‌طوری که بیشترین میزان این ترکیبات در منطقه له کوه بابل مشاهده شد. با افزایش ارتفاع علاوه بر دما میزان رطوبت نسبی نیز کاهش یافت و به نظر می‌رسد کاهش دما و رطوبت از مهمترین عوامل تاثیرگذار در افزایش تولید ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی باشند، هر چند در منطقه له کوه مقدار مواد آلی نیز نسبت به سایر مناطق بیشتر بود. در اکثر مطالعات بر نقش رویشگاه به عنوان عامل تاثیر گذار در تجمع متابولیت‌های ثانویه تاکید شده است. مکان رشد گیاه می‌تواند از طریق تغییرات دمایی و رطوبتی بر فرآیند تشکیل مواد موثره تاثیرگذار باشد، مکانیسم تاثیرات محیط بر تجمع متابولیت‌های ثانویه به درستی روشن نیست، ولیکن این مطلب تایید شده است که محیط از طریق تاثیری که در فرایند تولید متابولیت‌ها و نیز آنزیم‌های مرتبط با آن دارد، در نوع و شدت واکنش‌های شیمیایی موثر است (Hemati et al., 2003; Srivastava and Shym, 2002). درجه حرارت

از جمله عوامل محیطی تاثیرگذار در تشکیل و تجمع متابولیت‌های ثانویه است. بررسی‌های اولیه نشان داد که در مناطقی با درجه حرارت پایین‌تر تجمع فلاونوئید بیشتر است (Davise and Albrigo 1994). Tajali و Khazaeipoor (۲۰۰۲) بیان کردند که میزان فنل و فلاونوئید گیاه *Cerateagus microphylla* در ارتفاعات بالا (۱۰۰۰ متری) دارای بیشترین سطح و در ارتفاعات پست دارای کمترین مقدار بوده است. Oomaha و Mazza (۱۹۹۶) نشان دادند که با افزایش ارتفاع بر میزان ترکیبات فلاونوئیدی در اندام‌های گیاهی افزوده می‌شود. ترکیبات فلاونوئیدی جاذب نور مانند فلاون‌ها و آنتوسیانین‌ها، در پاسخ به اشعه یو- وی و برای محافظت بافت‌های درونی ساقه و برگ از آسیب‌های ناشی از این اشعه، در سلول‌های اپیدرم تجمع پیدا می‌کنند. در این تحقیق ارتفاع جغرافیایی در میزان متابولیت‌های ثانویه مؤثر بود که یکی از دلایل آن می‌تواند کیفیت تشعشعات مخصوصاً UV-B در ارتفاعات می‌باشد. در این راستا اعلام شده است اشعه UV-B در ارتفاعات بالاتر بیشتر است و در نتیجه سبب تولید بیشتر بعضی از فلاونوئیدها می‌شود (Jaakola and Hohtola, 2010). نتایج همچنین نشان از اثر مثبت ارتفاع با مواد موثره اسید کلرژنیک ، اسید کافئیک و روتین می‌باشد و نشان داده شد که با افزایش ارتفاع از سطح دریا میزان این مواد هم افزایش یافتند به‌طوری‌که بیشترین سطح این مواد در ارتفاع ۲۲۰۰ تا ۲۲۵۰ متر مشاهده شد. البته میزان این تغییرات در استان مازندران بیشتر از استان گرگان بود. این نتایج با نتایج همتی و همکاران (۱۳۹۱) مطابقت داشت. این گروه اعلام نمودند میزان کوئرستین اندام‌های مختلف گیاه نمدار در منطقه کلاردشت مازندران در مقایسه با منطقه گرگان بیشتر بود و بر طبق داده‌های هواشناسی منطقه کلاردشت نسبت به گرگان از ارتفاع بیشتر و هوای خنک‌تر برخوردار بود. علاوه بر این با توجه به اینکه منطقه کلاردشت نسبت به جنگل شصت‌کلا گرگان در ارتفاع بالاتری قرار دارد و با توجه به نقش فلاونوئیدها در حفاظت گیاه در برابر نور فرابنفش، تراکم بیشتر ترکیبات فلاونوئیدی در منطقه کلاردشت توجیه‌پذیر است. تاثیر هوای خنک بر تجمع مواد موثره اندازه‌گیری شده، می‌تواند به طولانی بودن دوره تقسیم سلولی و فعالیت بافت گیاهی در مناطق خنک مرتبط باشد (همتی و همکاران، ۱۳۹۱). بررسی میزان دمای سالیانه مناطق نمونه گیری نشان داد که در مناطق استان مازندران دمای سالیانه نسبت به استان گلستان پایین تر و خنک تر بود. در همین رابطه تحقیقات انجام شده روی برخی فلاونوئیدهای مرکبات نشان داد که تولید این ترکیبات در مناطقی با آب و هوای خنک بیشتر ازمناطق گرم می‌باشد، زیرا طول دوره تقسیم سلولی بیشتر شده و در این مرحله عوامل تولید برخی فلاونوئیدها بیشتر می‌شود (Davise and Albrigo, 1994). Ghasemi و همکاران (۲۰۱۱) بیشترین میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی گیاه گردو را در منطقه آبعلی با بیشترین ارتفاع و کمترین میانگین دمای روزانه گزارش کردند.

نتیجه‌گیری نهایی

در بررسی اثر ارتفاع از سطح دریا بر ویژگی‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه گزنه مشخص گردید که بین دو استان مازندران و گلستان اختلاف معنی‌داری وجود نداشت اما اثر متقابل ارتفاع در استان بر صفات مورد مطالعه معنی‌دار بود. با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان چنین بیان داشت که ارتفاعات بالا باعث کاهش خصوصیات مورفولوژیکی گیاه گزنه شده و بر عکس در ارتفاعات بالا خصوصیات فیتوشیمیایی گیاه گزنه عملکرد بهتری را نشان داد. با توجه به نتایج به‌دست آمده ارتفاعات بالا خصوصاً

منطقه له کوه از نظر کمیت و کیفیت مواد موثره برای کشت و توسعه گیاه گزنه قابلیت بالایی دارد.

منابع

امیدبیگی، ر. (۱۳۸٤). تولید و فرآوری گیاهان دارویی. انتشارات آستان قدس رضوی. مشهد. جلد ۱. صفحه ۳٤۷.

امیدبیگی، ر. (۱۳۷۹). رهیافت‌های تولید و فرآوری گیاهان دارویی. انتشارات طراحان نشر. مشهد. جلد ۱. چاپ دوم. صفحه ۲۸۳.

جایمند، ک.، رضایی، م.، عصاره، م. و مشکی زاده، س. (۱۳۸۸). استخراج واندازه‌گیری ترکیب‌های فلاونوئیدی کامفرول و کوئرستین در گلبرگ ده ژنوتیپ از گل محمدی (*Rosa damascene* Mill) از مناطق غربی ایران. فصلنامه علمی- پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، جلد ۵. شماره ٤ . صفحات ۵۵-٤۷.

زرگری، ع. (۱۳۷٦). گیاهان دارویی. انتشارات دانشگاه تهران. جلد ٤، چاپ پنجم. صفحه ۹۷۰.

سحرخیز، م.ج. (۱۳۸۱). تأثیر زمان برداشت میوه گیاه دارویی آنیسون بر اسانس و مواد متشکله آن. پایان نامه کارشناسی ارشد باغبانی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس. صفحه ۷۷.

فارماکوپه گیاهی ایران. (۱۳۸۱). کمیته تدوین فارماکوپه گیاهی ایران. تهران: وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی. معاونت غذا دارو. چاپ اول.

قهرمان، ا. (۱۳۷۲). فلور رنگی ایران، جلد ۷. انتشارات موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع.

کریمی، آ.، قاسمی پیربلوطی، ع.، ملک پور، ف.، یوسفی، م. و گل‌پرور، ا.ر. (۱۳۸۹). بررسی تنوع اکوتیپی و شیمیوتیپی آویشن دنایی (*Thymus daenensis* Celak.) در استان‌های اصفهان و چهارمحال و بختیاری. فصل‌نامه داروهای گیاهی. شماره ۳. صفحات ۱۰-۱.

همتی، خ.، بشیری صدر، ز.، برزعلی، م. و کلاتی، ح. (۱۳۸٦). تاثیر اقلیم و اندام‌های مختلف روی برخی فلاونوئیدهای درختچه سرخ ولیک (*Crataegus monogyna*). مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی، جلد ۵. شماره ۱٤. صفحات ۱۰-۱.

همتی، خ.، قاسم‌نژاد، ع.، مشایخی، ک. و بشیری صدر، ز. (۱۳۹۱). مطالعه اثر رویشگاه بر میزان برخی از ترکیبات فلاونوئیدی درخت نمودار (*Tilia platifolia* L.). مجله پژوهش‌های تولید گیاهی، شماره ۲. صفحات ۱٤۸-۱٤۱.

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 Analaysis.10: 178-182.

Davise, F.S., and Albrigo, L.G. (1994). Citrus. CAB. International Press, Wallington, UK.P 9814.

Ghasemi, K., Ghasemi, Y., Ehteshamnia, A., Nabavi, M., Nabavi, F., Ebrahimzadeh, A. and Pourmand, F. (2011). Influence of environmental factors on antioxidant activity, phenol and flavonoid content of walnut. Medicinal Plant. 5(7): 1128-1133.

Hemati, K.H., Omidbeigi, R. and Bashiri Sadr, Z. (2003). Effect of climate and harvest time on the qualitative and quantitative characteristics of flavonoids of citrus varieties. PhD Thesis, Submitted to Modares University.

Jaakola, L., and Hohtola, A. (2010). Effect of latitude on flavonoid biosynthesis in plants. Plant Cell and Environmental. 11: 1239-1241.

Julia, E., Chrubasika, B.D.R., Hildebert, W. and Sigrum, C. (2007). A comprehensive review on the stinging nettle effect and efficacy profiles. Part I: Herba Urticae Phytomedicine. 14:423-35.

Mahmoudi, M., Ebrahimzadeh, M.A., Pourmorad, F. and Yasini, S. (2007). Antinociception and locomotors impairment induction by methanolic extract of *Urtica*

dioica. International Journal Biotechnology. 4(2): 181-185.

McDonald, S., Prenzler, P.D., Autolovich, M. and Robards, K. (2001). Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. Food Chemistry. 73:73-84.

Oomaha, B.D. and Mazza, G. (1996). Flavonoids and antioxidative activities in buckwheat. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 44(7): 1746-1750.

Santos-games, P.C., Seabra, R.M., Andrade, P.B. and Fernandes-Ferreira, M. (2003). Determination of phenolic antioxidant compounds produced by calli and cell suspensions of sage (*Salvia officinalis* L.). Journal Plant Physiology. 160: 1025-1032.

Spearing, A.M., and Karlander, E.P. (1979). Effects of light and low temperatures on chlorophyll content and metabolism of *Chlorella sorokiniana* Shihira and Krauss. Environmental and Experimental Botany. 19: 237-243.

Srivastava, A.W. and Shym, S. (2002). Citrus: Climate and soil. International Book Distributing Company. Pp: 559.

Tajali, A. and Khazaeipoor, M. (2002). Effect of height and organs on flavonoids of *Crataegus microphylla*. International Journal of Biosciences. 7: 54-58.

Trajtemberg, S.P., Apostolo, N.M. and Fernandez, G. (2006). Calluses *of Cunara cardunculus* Var. Cardunculus cardoon (Asteraceae): Determination of cynarine and cholorogenic acid by auyomated high-performance capillary electrophoresis. *In Vitro* Cellular Developmental Biology Plant. 42: 537-537.