

## Study of Micromorphology, Genetic Diversity, and Phytochemical Composition of *Rhamnus pallasii* (Rhamnaceae) in Northern Iran

G. R. Shahraki <sup>1</sup>, A. Sattarian <sup>2</sup>, E. Amini <sup>3\*</sup>, M. Salehi <sup>3</sup>, N. Atazadeh <sup>4</sup>

1 M.Sc. Graduate, Dept. Biology, Faculty of Sciences, Gonbad Kavous University, Gonbad, Iran.

2 Assoc. Prof., Faculty of Sciences, Gonbad Kavous University, Gonbad, Iran.

3 Corresponding Author: Assist. Prof., Dept. Biology, Faculty of Sciences, Gonbad Kavous University, Gonbad, Iran.

Email: Elham.amini@gonbad.ac.ir

4 Assist. Prof., Faculty of Sciences, Yasouj University, Yasouj, Iran.

Received: 22.05.2024

Accepted: 09.08.2024

### Extended Abstract

#### Background and Objectives:

The *Rhamnaceae* family is one of the largest flowering plant families, comprising 52-57 genera and around 950 species worldwide. Of these, 14 species are reported in China, while the remaining are found across Europe and tropical regions. In Iran, five genera of this family (occasionally six) are present and are among the most well-known trees in Iranian forests. Understanding the ecological and habitat conditions of native plant species is essential for researchers. This study aimed to investigate the micromorphology of the epidermis surface and fruits and to measure some phytochemical compounds, and molecular characteristics of eight *Rhamnus pallasii* populations.

#### Methodology:

This study examined the micromorphology, molecular characteristics, and phytochemical composition of eight *Rhamnus pallasii* populations. The epidermis surface, stomata, and fruit were analyzed using electron microscopy at the Razi Metallurgy Center in Tehran, Iran. Genetic diversity was assessed using ISSR markers across the eight populations. The extraction of samples was made using water and 80% ethanol solvents, then, the total phenol, flavonoid content, and antioxidant activity of extracts were measured.

#### Results:

In all populations, the stomata were irregular in shape, of the anomocytic type, with anticlinal walls that ranged from straight to curved. All samples exhibited simple, single-celled cover hairs with varying densities across populations. Molecular studies revealed significant genetic differences among the populations. Phytochemical analysis showed considerable variations in the levels of phenols, flavonoids, and antioxidant properties among the samples. Environmental factors such as altitude, soil, humidity, light, temperature, pressure, and latitude played a key role in plant growth, essential oil production, and the accumulation of secondary metabolites.

#### Conclusion:

Micromorphological analysis of the studied populations showed irregular shapes, with anomocytic stomata and straight-to-curved anticlinal walls. All populations displayed simple, single-celled trichomes, although hair density varied across populations. Molecular analysis indicated significant genetic differences among the populations, while phytochemical investigations revealed notable differences in phenolic, flavonoid, and antioxidant content. Environmental factors, including altitude, soil, humidity, light, temperature, pressure, and latitude, played an important role in plant growth, essential oil yield, and secondary metabolite accumulation.

**Keywords:** Anomocytic, Epidermis, Rhamnaceae, Metabolite, ISSR.

## مطالعه ریزریخت‌شناسی، تنوع ژنتیکی و ترکیبات فیتوشیمیایی گونه *Rhamnus pallasii* از (تیره عناب) در شمال ایران

غلامرضا شهرکی<sup>۱</sup>، علی ستاریان<sup>۲</sup>، الهام امینی<sup>۳\*</sup>، محمود صالحی<sup>۳</sup> و ندا عطازاده<sup>۴</sup>

۱ دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه و فنی مهندسی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس ایران

۲ دانشیار، دانشکده علوم پایه و فنی مهندسی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس ایران

۳\* نویسنده مسئول، استادیار، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس ایران

پست الکترونیک: [Elham.amini@gonbad.ac.ir](mailto:Elham.amini@gonbad.ac.ir)

۴ استادیار، دانشکده علوم پایه، دانشگاه یاسوج، یاسوج ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۳/۰۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۵/۱۹

### چکیده

#### سابقه و هدف:

تیره عناب دارای ۵۷-۵۲ سرده و حدود ۹۵۰ آرایه در سطح جهان می‌باشد که ۱۴ گونه آن در چین و بقیه در اروپا و نواحی استوایی گزارش شده است. در ایران پنج سرده از این تیره رویش داشته (در برخی منابع شش سرده) و جزو شناخته‌شده‌ترین درختان جنگل‌های ایران محسوب می‌شوند. شناخت شرایط اکولوژیکی و رویشگاهی گونه‌های گیاهی بومی می‌تواند برای محققان بسیار مفید باشد. هدف از این تحقیق، بررسی ریز ریخت‌شناسی سطح اپیدرم و میوه و اندازه‌گیری برخی از ترکیبات فیتوشیمیایی و ژن اکولوژی جمعیت‌های مختلف گونه *Rhamnus pallasii* می‌باشد.

#### مواد و روش‌ها:

در این پژوهش، میزان تنوع صفات ریز ریخت‌شناسی، ژنتیکی و فیتوشیمیایی جمعیت‌های مختلف گونه *Rhamnus pallasii* در شمال کشور مطالعه شد. برای بررسی میکروسکوپ الکترونی سطح اپیدرم، روزنه‌ها و میوه، نمونه‌های مورد نظر به مرکز متالوژی رازی تهران ارسال گردید. با استفاده از نشانگرهای ISSR، روی هشت جمعیت از نمونه‌ها، بررسی تنوع ژنتیکی انجام شد. همچنین عصاره‌گیری از نمونه‌ها با استفاده از حلال اتانول ۸۰ درصد انجام گردید و مقدار فنول و فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها اندازه‌گیری شد.

#### نتایج:

در تمام جمعیت‌ها، روزنه‌ها دارای شکل نامنظم، تیپ آنموسیتیک با دیواره آنتی‌کلینال راست تا خمیده موج‌دار بودند. علاوه بر این، همه نمونه‌ها دارای کرک‌های پوششی ساده، تک‌سلولی و با تراکم متفاوت در جمعیت‌ها بودند. نتایج مطالعات مولکولی اختلاف ژنتیکی معنی‌داری را در بین جمعیت‌ها نشان داد. نتایج بررسی فیتوشیمیایی نشان داد که اختلاف قابل ملاحظه‌ای در مقادیر فنل، فلاونوئید و خاصیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها وجود دارد. نتایج نشان داد که رویشگاه و عوامل محیطی از قبیل ارتفاع از سطح دریا، خاک، رطوبت، نور، دما، فشار و عرض جغرافیایی در رشد گیاه، میزان اسانس و تجمع متابولیت‌های ثانویه نقش بسیار مهمی ایفا می‌کنند.

## نتیجه‌گیری:

مطالعه اپیدرم جمعیت‌های مورد مطالعه نشان داد که شکل روزنه در تمام جمعیت‌های مورد مطالعه نامنظم و تیپ روزنه آنموسیتیک است. دیواره آنتی‌کلینال راست تا خمیده موج‌دار دیده می‌شود. مطالعه کرک نمونه‌ها نشان داد که همگی دارای کرک‌های پوششی از نوع ساده و تک‌سلولی هستند ولی تراکم کرک‌ها در جمعیت‌ها متفاوت بود. نتایج مطالعات مولکولی اختلاف ژنتیکی معنی‌داری را در بین جمعیت‌های مطالعه شده نشان داد. نتایج بررسی فیتوشیمیایی نشان داد که اختلاف قابل ملاحظه‌ای در مقادیر کل فنل، فلاونوئید و خاصیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های مختلف وجود دارد، به طوری که رویشگاه‌ها و عوامل محیطی مختلفی از قبیل ارتفاع از سطح دریا، خاک، رطوبت، نور، دما و فشار به عنوان عامل تأثیرگذار در رشد گیاه، میزان اسانس و تجمع متابولیت‌های ثانویه نقش بسیار مهمی ایفا می‌کنند.

واژه‌های کلیدی: آنموسیتیک، اپیدرم، عنایبان، متابولیت، ISSR

## مقدمه

کردند، در حالی که Soufiyan و Dinarvand (۲۰۰۷) در فلور ایران، هشت گونه و یک هیبرید را شرح داده‌اند. تاکنون مطالعات آناتومی سرده *Rhamnus* چندان مورد توجه قرار نگرفته است، به همین دلیل منابع موجود در این زمینه بسیار کم هستند. جمعی از محققان مطالعه ریخت‌شناسی آرایه‌های فرگونه‌ای دو گونه *R. cathartica* و *R. pallasii* L. را در شمال و شمال‌شرق ایران انجام دادند و دریافته‌اند که مهمترین صفات کیفی برای جدایی گونه‌ها و آرایه‌های فرگونه‌ای، شکل برگ و رنگ میوه است، اما این آرایه‌ها در صفات آناتومی تشابه نشان می‌دهند (Mahdiyani et al., 2016).

طی مطالعه انجام شده بر روی گونه *Ziziphus jujuba* Mill. در ایران، مشخص شده است اپیدرم از یک لایه سلول‌های بزرگ تشکیل شده است و روزنه از نوع آنیزوسیتیک می‌باشد (Dinarvand & Zarinkamar, 2006). نتایج حاصل از مطالعه آرایه‌های فرگونه‌ای دو گونه *R. cathartica* و *R. pallasii* توسط Mahdiyani و همکاران (۲۰۱۹)، نشان داد که سلول‌های اپیدرمی در دو شکل چند وجهی و نامنظم وجود دارند. الگوی دیواره آنتی‌کلینال راست تا کمانی و موج‌دار است. تیپ روزنه‌ها از نوع آملی‌استوماتیک بوده و شکل سلول‌های اپیدرمی و دیواره‌های آنتی‌کلینال آنها می‌تواند برای درک سیستماتیکی زیرگونه‌ها تا حدی مفید باشد (Mahdiyani et al., 2019).

تیره عنایبان (Rhamnaceae) یکی از تیره‌های گیاهان گلدار است که از نظر تیپ جنینی به تیره گل‌سرخیان (Rosaceae) و تیره شمشادیان (Buxaceae) و تیره گوشوارکیان (Celastraceae) شباهت کامل دارد (Soufiyan & Dinarvand, 2007). مطالعات تبارزایی انجام شده به روش مولکولی به مشخص شدن موقعیت تیره عنایبان (Rhamnaceae) و ارتباط بین ۵۰ سرده این تیره کمک شایانی کرده است (Islam & Simmons, 2006; Kellerman, 2007). این تیره دارای ۵۲-۵۷ سرده و حدود ۹۵۰ گونه در سطح جهان می‌باشد که ۱۴ گونه آن در چین و بقیه در اروپا و نواحی استوایی هستند. در ایران ۵ سرده از این تیره شامل *Paliurus*، *Frangula* Mill.، *Rhamnus* L.، *Sageretia* Brongn. و *Ziziphus* Mill. رویش داشته و جزو شناخته‌شده‌ترین درختان جنگل‌های ایران محسوب می‌شوند (Mobayen, 1996; Ghahreman, 2003). سرده *Rhamnus* یکی از بزرگ‌ترین و اصلی‌ترین سرده‌های تیره Rhamnaceae است (Mabberley, 1987). البته مرز آرایه‌شناختی گونه‌های این سرده به‌طور کامل مشخص نیست. لینه در سال ۱۷۵۳ برای نخستین بار این سرده را با ۱۱ گونه در کتاب Species Plantarum معرفی کرد و بعد Gleason و Cronquist (۱۹۹۱) تعداد ۱۰۰ گونه از این سرده را معرفی کردند. Browicz و Zielinski (۱۹۹۷) در فلور ایرانیکا، شش گونه و یک هیبرید از سرده *Rhamnus* را برای ایران معرفی

اختلاط، نسبت میزان پودر به حلال و اندازه ذرات پودر، بر میزان استخراج متابولیت‌های ثانویه تأثیر می‌گذارد (Davarinejad *et al.*, 2017).

گروهی از محققان، تنوع ژنتیکی *Rhamnus Moris persicifolia* را با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR، برای حفاظت از خزانه ژنتیکی این گونه بررسی کردند. بنابر نتایج این مطالعه، مشخص شد که سطوح نسبتاً بالایی از تنوع ژنتیکی در بین جمعیت‌های این گونه وجود دارد (Bacchetta *et al.*, 2011). پژوهشگران به بررسی ساختار ژنوم و تنوع بین گونه‌ای (و بین جمعیتی) در ۳ گونه از *Ziziphus* با استفاده از تکنیک مولکولی ISSR و REMAP پرداختند و جایگاه‌هایی را با مقدار بالای (1.00) Gst در این نشانگرها یافتند (Mohajer Kaboli *et al.*, 2023). جمعی از محققان نیز به بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های مختلف گیاه دارویی عناب (*Ziziphus jujuba*) با استفاده از نشانگرهای مولکولی AFLP پرداختند و مناطق مرکزی (قم، اصفهان) را به عنوان یکی از خاستگاه‌های عناب معرفی کردند (Shahhoseini *et al.*, 2012). برخی پژوهشگران به منظور بررسی تنوع ژنتیکی در ۲۹ اکوتیپ مختلف عناب، در ۱۵ استان کشور و تجزیه خوشه‌ای، اکوتیپ‌های جمع‌آوری شده را در سه گروه با منشأ اصفهانی، مازندرانی و خراسانی تفکیک نمودند (Khakdaman *et al.*, 2017).

Alijanpour و همکاران (۲۰۲۱b) با هدف بازنگری وضعیت طبقه‌بندی *Rhamnus L.* و *Atadinus Raf.* از تیره (Rhamnaceae) برای فلور ایران، نه گونه از جمله ۱۵ تاکسون شناخته شده، توصیف شده و با گونه‌های نزدیک خود مقایسه انجام دادند. در مطالعه دیگری که توسط Alijanpour و همکاران (۲۰۲۱a) انجام شد، مورفومتری نمونه‌ها به منظور تعیین حدود و رابطه بین آرایه‌های قابل انتقال به هریک از جنس‌های *Rhamnus* و *Atadinus* مشخص شد.

در این تحقیق سعی شده است با استفاده از مطالعات مربوط به ریز ریخت‌شناسی سطح اپیدرم و میوه و اندازه‌گیری برخی از ترکیبات فیتوشیمیایی، میزان تنوع صفات ریز ریخت‌شناسی و فیتوشیمیایی، جمعیت‌های مختلف گونه *Rhamnus pallasii* در شمال کشور مورد مطالعه و بررسی قرار گیرد. همچنین در بخش

شکل، اندازه، ساختار و موقعیت کرک و ترکیباتی که به وسیله آنها ترشح می‌شوند نیز می‌توانند تا حدودی برای مطالعات آرایه‌شناسی و شناسایی گونه‌های هیبرید و وابسته از اهمیت زیادی برخوردار باشد. از مطالعات انجام شده بر روی کرک اعضای این خانواده می‌توان به مطالعه Mahdiyani و همکاران (۲۰۱۹) اشاره کرد. آنان به این نتیجه رسیدند که آرایه‌های فرگونه‌ای دو گونه *R. cathartica* و *R. pallasii* با اینکه در نوع کرک تفاوتی نشان نمی‌دهند اما تراکم کرک‌ها در سطح برگ، دمبرگ و سرشاخه بین آرایه‌ها متفاوت می‌باشد؛ به طوری که در زیرگونه‌های *R. pallasii* زیرگونه (Bornm.) Browicz & *iranica* Ziel. دارای پوشش کرکی مترکم بوده است؛ اما در *R. spathulifoli* Fisch. & C.A.Mey سطح برگ و سرشاخه فاقد کرک است که از این لحاظ از بقیه آرایه‌ها متمایز می‌گردد که نداشتن کرک می‌تواند تا حدودی به جغرافیای پراکنش این هیبرید وابسته باشد (Mahdiyani *et al.*, 2019). در مطالعه‌ای که بر روی دو گونه *Rhamnus* انجام شد، نتایج نشان داد تزئینات سطحی دانه گرده برای جداسازی زیرگونه‌ها و وارته‌ها مفید است و طبقه‌بندی کلاسیک در مورد زیرگونه یا بخش را تأیید می‌کند؛ از سوی، اندوکارپ دانه صفت تاکسونومیک مناسبی برای تقسیم‌بندی زیرگونه‌ها نیست و صفات‌های بررسی شده بین آرایه‌ها بسیار مشابه هستند (Sattarian *et al.*, 2017). در پژوهشی دیگر، بر روی عصاره متانولی برگ گیاه عناب (*Ziziphus*)، از تیره Rhamnaceae، خاصیت ضد باکتریایی و ضد قارچی آن بررسی شد (Nisar *et al.*, 2010). این پژوهش بر روی شش باکتری و شش قارچ انجام شد که نتایج نشان‌دهنده خاصیت چشمگیر ضد باکتریایی برگ گیاه عناب بود اما برخلاف آن خاصیت ضدقارچی بالایی نشان نداد. در مطالعه‌ای دیگر، بررسی فیتوشیمیایی میوه، برگ، پوست و ریشه گیاه *Rhamnus* طی دوره‌های رویشی مختلف انجام شد (Taleghani *et al.*, 2022). گروهی از پژوهشگران اثر حلال‌های متانول، اتانول، استون و آب مقطر را بر روی خاصیت آنتی‌اکسیدانی میوه عناب با روش‌های DPPH و FRAP بررسی کردند. نتایج تحقیقات آنان نشان داد که تفاوت در نوع، خلوص و قطبیت حلال‌ها و تفاوت در جزئیات استخراج عصاره مانند زمان استخراج، سرعت

شمال کشور (شکل ۱ و ۲) جمع‌آوری و با کمک فلورا ایرانیکا (Browicz & Zielinski, 1977) شناسایی شدند. تمامی نمونه‌های مطالعه شده در هرباریوم دانشگاه گنبد کاووس (GKUH) نگهداری می‌شوند.

مولکولی، مطالعه ژن اکلوزی گونه *Rhamnus pallasii* برای تعیین میزان تنوع ژنتیکی در این گونه و تشخیص اینکه آیا جمعیت‌هایی که به لحاظ جغرافیایی از یکدیگر فاصله گرفته‌اند، به لحاظ ژنتیکی نیز واگرا از هم هستند، بررسی شد.

#### مواد و روش‌ها

##### تهیه و جمع‌آوری نمونه‌های گیاهی

در این مطالعه، هشت جمعیت از گونه *Rhamnus pallasii* بررسی شد (جدول ۱). این جمعیت‌ها از زیستگاه‌های مختلف



شکل ۱- محدوده منطقه مطالعاتی در استان‌های شمالی کشور

Figure 1. Location of the study area in the northern provinces of Iran



شکل ۲- اندام‌های مختلف *Rhamnus pallasii* A. گیاه کامل، B. ساقه، C. برگ‌ها، D. میوه

Figure 2. Different organs of *Rhamnus pallasii* (A: plant; B: stem; C: leaves; D: fruit)

جدول ۱- لیست جمعیت‌ها و زیرگونه‌های مورد مطالعه در *Rhamnus pallasii*

Table 1. List of stidoeed populations and subspecies of *Rhamnus pallasii*

No.	Species	Locality	Voucher no.
1	<i>R. pallasii</i> subsp. <i>pallasii</i> -1 Fisch. & C.A.Mey	Gilan, Loshan	802593-GKUH
2	<i>R. pallasii</i> subsp. <i>pallasii</i> -2	Golestan, Zaringol	802643-GKUH
3	<i>R. pallasii</i> subsp. <i>sintenisii</i> -1 (Rech.f.) Browicz & Ziel.	Golestan, Azadshahr	802628-GKUH
4	<i>R. pallasii</i> subsp. <i>sintenisii</i> -2	Mazandaran, Chaloos	802511-GKUH
5	<i>R. pallasii</i> subsp. <i>iranica</i> -1 (Bornm.) Browicz & Ziel.	Mazandaran, Royan	802613-GKUH
6	<i>R. pallasii</i> subsp. <i>iranica</i> -2	Golestan, Gonbad Kavous	802537-GKUH
7	<i>R. pallasii</i> subsp. <i>pallasii</i> -3	Mazandaran, Babolsar	802618-GKUH
8	<i>R. pallasii</i> subsp. <i>pallasii</i> -4	Mazandaran, Noshahr	802540-GKUH

و میوه به نمایندگی از هر جمعیت روی صفحه‌ها قرار داده شد، سپس سطح آن به مدت دو دقیقه با لایه نازکی از طلا پوشانده شد. تصاویری از نمای کلی و تزئینات آنها توسط میکروسکوپ الکترونی SEM مدل VEGA// TESCAN

مطالعات ریز ریخت‌شناسی میوه و اپیدرم برای مطالعه سطح اپیدرم و روزنه‌ها و میوه گونه مورد مطالعه با میکروسکوپ نوری و الکترونی، برگ‌ها و میوه‌های سالم از نمونه‌های هر بار یومی موجود از هر جمعیت و زیرگونه انتخاب و به مرکز متالوژی رازی تهران ارسال شد. یک برگ

۰/۵ میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase، ۱ میکرولیتر پرایمر، ۰/۵ میکرولیتر dNTP، ۰/۵ میکرولیتر  $MgCl_2$ ، ۲/۵ میکرولیتر محلول بافر PCR و ۱۸ میکرولیتر آب دو بار تقطیر شده استفاده شد. همچنین برنامه دمایی موجود در این واکنش در دستگاه ترموسایکلر مطابق با جدول ۳ انجام شد. پس از طی کردن مراحل ذکر شده، محصولات تکثیر شده در واکنش ISSR-PCR به صورت جداگانه روی ژل آگارز ۱ درصد با استفاده از دستگاه الکتروفورز افقی بررسی شدند. بعد از اتمام الکتروفورز، به منظور مشاهده باندها از دستگاه آشکارساز UV مدل UVItc BTS-15M استفاده شد. همچنین عکس‌برداری از ژل‌ها به کمک دستگاه Gel documentation انجام گردید.

LMU تحت ولتاژ ۲۲ KV، ۱۵ KV، مورد بررسی و تصویربرداری قرار گرفت.

#### مطالعات تنوع ژنتیکی بر مبنای نشانگر ISSR

مراحل استخراج DNA براساس دستورالعمل کیت شرکت تیان ژن انجام شد. در این مطالعه با استفاده از نشانگرهای ISSR، روی هشت جمعیت (از هر جمعیت ۳ تا ۵ فرد) از نمونه‌ها بررسی مولکولی انجام شد. تعداد چهار پرایمر (GA)9A، (GA)9C، (GA)9T، (CA)7GT (جدول ۲). پس از انجام مراحل استخراج DNA، به منظور بررسی کیفیت DNA، از ژل آگارز یک درصد استفاده شد. در هر واکنش زنجیرهای پلی‌مرز (PCR) برای حجم کل ۲۵ میکرولیتر محلول ذخیره، مقدار ۲ میکرولیتر محلول DNA،

جدول ۲- نام و توالی پرایمرهای مورد استفاده در ISSR

**Table 2. Name and sequence of primers used in ISSR**

Primer Name	Sequence
5' (GA)9A 3'	GAGAGAGAGAGAGAGAGAA
5' (GA)9C 3'	GAGAGAGAGAGAGAGAGAC
5' (CA)7GT 3'	CACACACACACACAGT
5' (GA)9T 3'	GAGAGAGAGAGAGAGAGAT

جدول ۳- برنامه دمایی مورد استفاده در ISSR-PCR

Table 3. Temperature program used in ISSR-PCR

Cycle Number	Temperature and Time	Step
1	94°C-5'	First denaturation
45	94°C-30"	Denaturation
45	54.6°C-30"	Annealing
45	72°C-2'	Extention
1	72°C-10'	Final extention

در دمای محیط سانتیفریز شد و بعد از آن، محلول رویی را جدا نموده و در یک پلیت ریخته و در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد در آون خشک شد. سپس وزن عصاره خشک اندازه‌گیری شد. با استفاده از فرمول زیر بازدهی استخراج بدست می‌آید.

$$\text{وزن خشک} \\ \text{وزن بودر برگ} \times 100 = \text{راندمان استخراج}$$

#### محاسبه میزان فنل کل عصاره گیاهی

ارزیابی میزان فنل کل گیاه با روش فولین-سیوکالتیو انجام می‌شود. به‌طور خلاصه ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره‌های گیاهی با غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به صورت جداگانه در لوله‌های آزمایش ریخته شد، سپس به ترتیب ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر، ۲ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۲ درصد و ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین به هریک از لوله‌ها اضافه شد. پس از ورتکس و نگهداری نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط، جذب نمونه‌ها در اسپکتوفتومتر با طول موج ۷۲۰ نانومتر محاسبه و با قراردادن آن در معادله منحنی استاندارد، میزان فنل کل گیاه محاسبه و به صورت میلی‌گرم اکی والان‌های گالیک اسید (GAE) به ازای هر گرم ماده خشک بیان شد.

#### سنجش میزان کل فلاونوئید عصاره گیاهی

این سنجش براساس روش رنگ‌سنجی آلومینیوم کلراید با اندکی تغییرات انجام شد. به‌طور خلاصه ۳۷۵ میکرولیتر از عصاره‌های گیاهی با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر

#### ارزیابی‌های حاصل از تنوع ژنتیکی (ISSR)

باند‌های مشاهده شده به صورت صفات دو حالتی کدگذاری شدند (حضور=۱، عدم حضور=۰). برای مشخص شدن تفاوت ژنتیکی معنی‌دار در بین آرایه‌های مورد مطالعه، آزمون (AMOVA) توسط نرم‌افزار GenAlex v. 6.4 انجام شد (Peakall & Smouse, 2006).

برای گروه‌بندی آرایه‌ها و جمعیت‌های مورد مطالعه، داده‌های حاصل از مطالعات تنوع ژنتیکی براساس مارکر ISSR با استفاده از تجزیه خوشه‌ای روش UPGMA و تجزیه به مولفه‌های هماهنگ اصلی (PCoA) (Principal coordinate analysis) ارزیابی شدند (Podani, 2000). آنالیزهای ذکر شده با استفاده از نرم‌افزارهای PAST ver 2.17 (Hammer *et al.*, 2012) و GenAlex6.4 (Peakall & Smouse, 2006) انجام شد.

#### مطالعات فیتوشیمی

مطالعه فیتوشیمیایی شامل اندازه‌گیری فنل کل، فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی (درصد مهار رادیکال آزاد) می‌باشد.

#### مرحله عصاره‌گیری :

ابتدا نمونه‌های گیاهی خشک شده با همزن برقی پودر شدند. آنگاه یک گرم پودر برگ را وزن کرده و در یک ارلن قرار داده و به آن ۲۵ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد اضافه شد و به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد همراه با شیک در انکوباتور قرار گرفت. بعد از رد کردن نمونه از صافی (کاغذ واتمن) محلول حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در ۴۵۰۰ rpm



## آنالیز داده‌های فیتوشیمی

داده‌های فیتوشیمی در نرم‌افزار Minitab 16.2 با استفاده از تجزیه واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) تجزیه و تحلیل گردید.

## نتایج

## مطالعات ریزریخت‌شناسی - اپیدرم

عکس‌برداری با میکروسکوپ الکترونی بر روی اپیدرم جمعیت‌های مورد مطالعه در این تحقیق نشان داد که اپیدرم برگ در این گونه، هم در سطح فوقانی و هم در سطح زیرین دارای سلول‌های روزنه هستند. شکل روزنه در همه جمعیت‌های مورد مطالعه نامنظم بود، به استثنای *R. pallasii* subsp. *pallasii* و *R. pallasii* subsp. *iranica* -2 که شکل روزنه در این دو زیرگونه به صورت چندوجهی دیده شد. تیپ روزنه نیز از نوع آنموسیتیک بوده، فقط در دو زیرگونه *R. pallasii* subsp. *pallasii* (شکل ۳ و ۴) و *R. pallasii* subsp. *sintensisii* (شکل ۵ و ۶) دو نوع تیپ روزنه آنموسیتیک و پاراسیتیک مشاهده گردید. دیواره آنتی‌کلینال راست تا خمیده موج‌دار بود. تصاویر ۳ تا ۹ عکس‌های میکروسکوپ الکترونی از اپیدرم جمعیت‌های مختلف را نشان می‌دهد.

اندازه‌گیری‌های انجام شده نشان داد که بیشترین میانگین طول و عرض روزنه در میان جمعیت‌های این گونه مربوط به زیرگونه 1- *R. pallasii* subsp. *iranica* (شکل ۷) به ترتیب با میانگین عرض ۲/۴۲ میکرومتر و میانگین طول ۷/۳۱ میکرومتر و کمترین میانگین طول و عرض، با میانگین عرض ۰/۷۱ میکرومتر و میانگین طول ۲/۶۷ میکرومتر متعلق به زیرگونه 3- *R. pallasii* subsp. *pallasi* (شکل ۸) بوده است. مقادیر اندازه‌گیری شده در این مطالعه در جدول ۴ قابل مشاهده است.

مطالعه کرک در جمعیت‌های گونه مورد مطالعه نشان داد که همگی دارای کرک‌های پوششی از نوع ساده و تک‌سلولی هستند. ولی تراکم کرک‌ها در جمعیت‌ها متفاوت بود، به طوری که کرک‌ها در زیرگونه *R. pallasii* subsp. *iranica* (شکل ۹) متراکم‌تر از جمعیت‌های دیگر بودند.

به طور جداگانه در لوله‌های آزمایش ریخته شد، سپس حجم تمامی آنها با اتانول ۷۰ درصد به ۲۰۰۰ میکرولیتر رسید. به هر لوله به ترتیب ۱۰۰ میکرولیتر آلومینیوم کلراید ۱۰ درصد، ۱۰۰ میکرولیتر استات پتاسیم ۱ مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر افزوده شد. پس از ورتکس کردن و قرار دادن نمونه‌ها به مدت ۴۰ دقیقه در دمای محیط، جذب محلول‌ها در طول موج ۴۱۵ نانومتر نسبت به نمونه شاهد (به جای عصاره حاوی ۳۷۵ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد می‌باشد) اندازه‌گیری شد. سپس با قرار دادن جذب نمونه‌ها در معادله استاندارد، میزان فلاونوئید کل عصاره‌های گیاهی محاسبه و برحسب میلی‌گرم برابر کوئرستین بر گرم وزن خشک گیاه گزارش شد.

ارزیابی میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها توسط معرف

## DPPH

در این روش میزان توانایی دهندگی الکترون یا از دست دادن هیدروژن عصاره‌ها از طریق میزان جمع‌آوری رادیکال آزاد ۱ و ۱- دی‌فنیل - ۲- پیکریل‌هیدرازیل (DPPH) اندازه‌گیری شد. ابتدا ۲ میلی‌لیتر از عصاره‌های گیاهی به لوله آزمایش ریخته شد، سپس به هر لوله ۲ میلی‌لیتر محلول DPPH (با غلظت ۰/۰۴ درصد در اتانول) اضافه شد. سپس لوله‌ها به خوبی تکان داده شده و به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار داده شدند. لوله کنترل شامل ۲ میلی‌لیتر از محلول DPPH به همراه ۲ میلی‌لیتر اتانول بود. سپس جذب نمونه‌ها و کنترل در ۵۱۷ نانومتر خوانش شد. با قرار دادن جذب هر نمونه در فرمول زیر، درصد جمع‌آوری رادیکال آزاد بدست می‌آید.

$$\%A = 1 + \left( \frac{A_c - A_s}{A_c} \right) \times 100$$

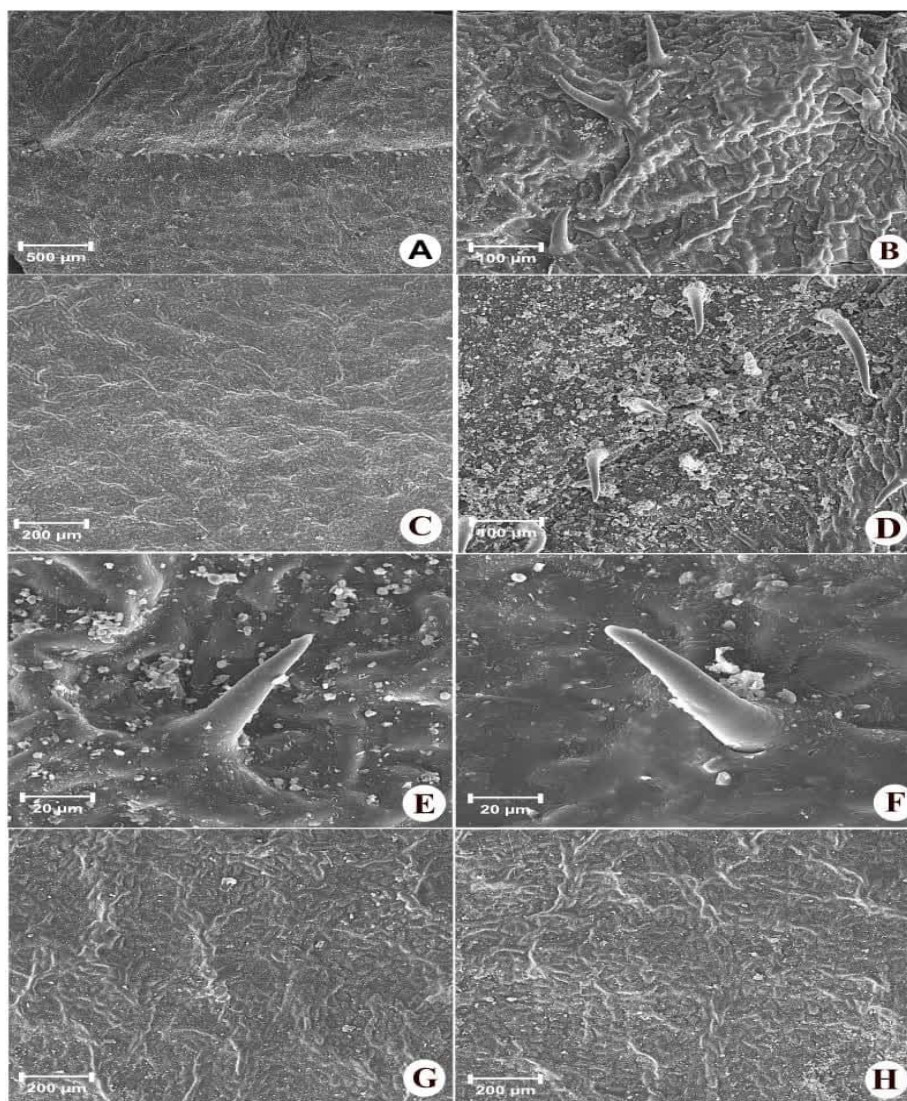
در این رابطه، A = درصد مهار رادیکال آزاد DPPH، A<sub>c</sub> =

جذب نوری شاهد و A<sub>s</sub> = جذب نوری نمونه برحسب نانومتر است.

جدول ۴- صفات اپیدرمی مورد مطالعه گونه *R. pallasii*

**Table 4. The studied epidermal characters of *R. pallasii***

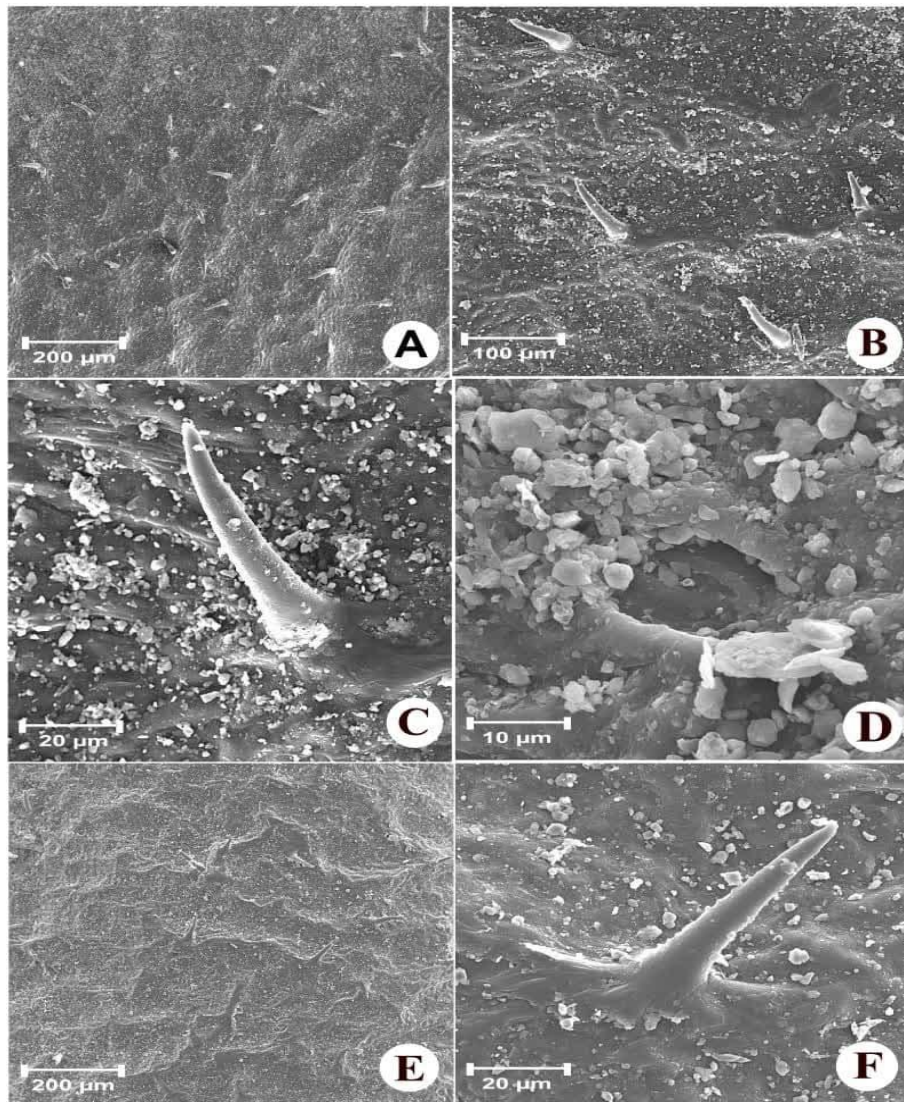
Species	Populations origin	Shape	Type of stomata	Anticlinal wall pattern	Stomata Width	SD Stomata width	Stomata Length	SD Stomata length	Stomata length to width ratio
<i>R. pallasii</i> subsp. <i>pallasii</i> -1	Gilan, Loshan	Irregular	Paracytic-Anomocytic	Wavy	2.29	0.49	6.32	0.78	2.75
<i>R. pallasii</i> subsp. <i>pallasii</i> -2	Golestan, Zaringol	Irregular	Anomocytic	Wavy	0.71	0.15	2.67	0.44	5.16
<i>R. pallasii</i> subsp. <i>sintensisii</i> -1	Golestan, Azadshahr	Irregular	Anomocytic	Straight to curved	1.23	0.26	3.55	0.34	2.07
<i>R. pallasii</i> subsp. <i>sintensisii</i> -2	Mazandaran, Chaloos	Irregular	Paracytic- Anomocytic	Wavy	0.98	0.21	3.95	0.15	4.03
<i>R. pallasii</i> subsp. <i>iranica</i> -1	Mazandaran, Royan	Irregular	Anomocytic	Wavy	2.42	0.41	7.31	1.72	3.53
<i>R. pallasii</i> subsp. <i>iranica</i> -2	Golestan to Gonbad Kavous	Polygonal	Anomocytic	Straight to curved	1.60	0.26	4.65	0.51	2.90
<i>R. pallasii</i> subsp. <i>pallasii</i> -3	Mazandaran, Babolsar	Polygonal	Paracytic- Anomocytic	Straight to curved	1.49	0.19	5.13	0.81	3.44
<i>R. pallasii</i> subsp. <i>pallasii</i> -4	Mazandaran, Noshahr	Irregular	Anomocytic	Wavy	1.18	0.25	3.25	0.68	2.75



شکل ۳- صفات ریزریخت‌شناسی سطح اپیدرم گونه *Rhamnus pallasii* subsp. *pallasii* (جمعیت لوشان)، انواع کرک A, C, G, H، تزئینات سطح اپیدرم

B, D, E, F

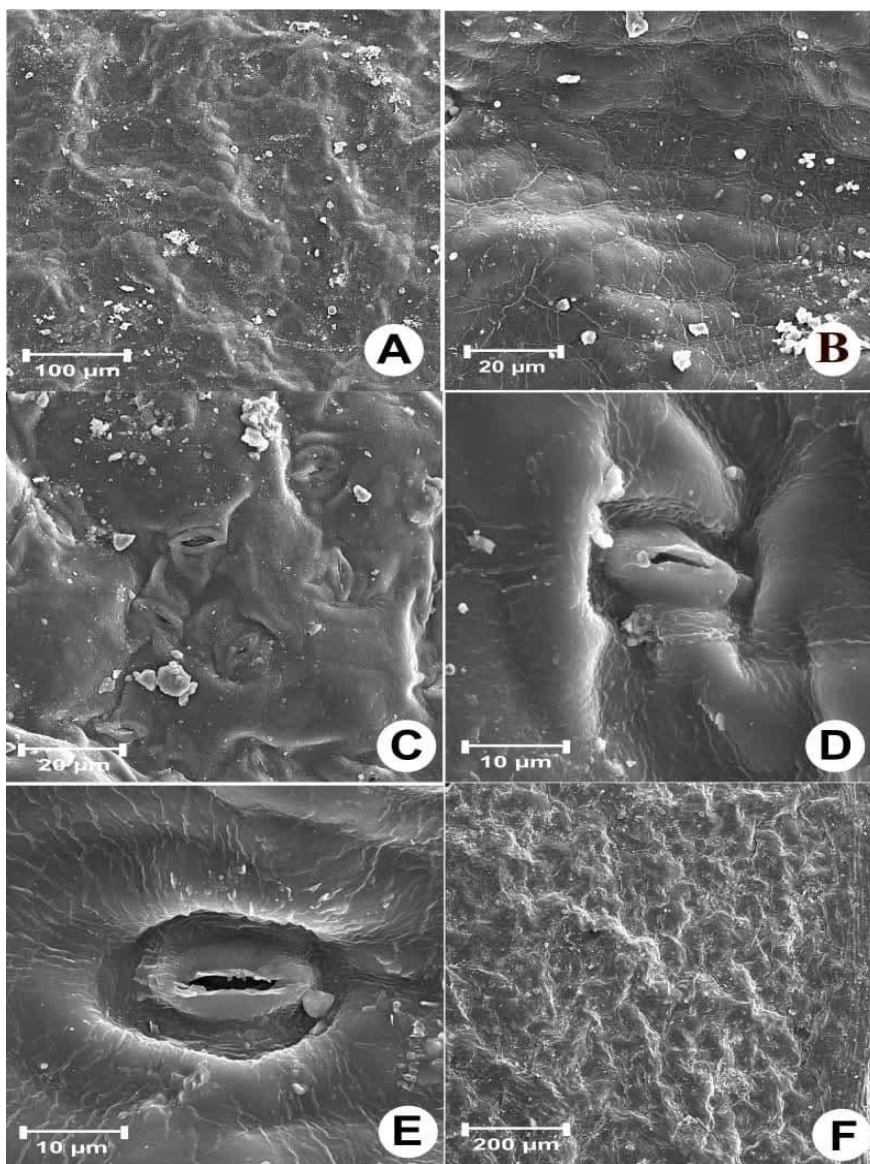
Figure 3. The micromorphological features of Epiderm surface in *Rhamnus pallasii* subsp. *pallasii* (Gilan Population). A, C, G and H: Epidermal surface ornamentation; B, D, E and F: Trichome Types.



شکل ۴- صفات ریزریخت‌شناسی سطح اپیدرم گونه *Rhamnus pallasii* subsp. *pallasii* (جمعیت زرین گل). انواع کرک A, B, C, F، روزنه E، تزئینات

سطح اپیدرم D

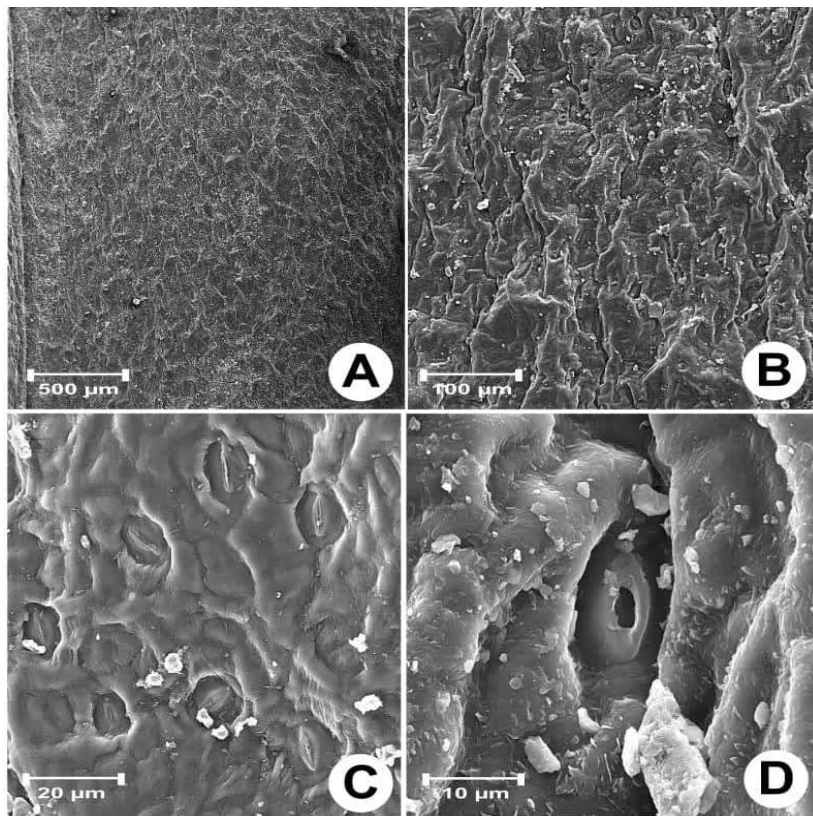
Figure 4. The micromorphological features of Epiderm surface in *Rhamnus pallasii* subsp. *pallasii* (Zaringol Population). A, B, C and F: Trichome Types; D: Epidermal surface ornamentation; E: Stomata.



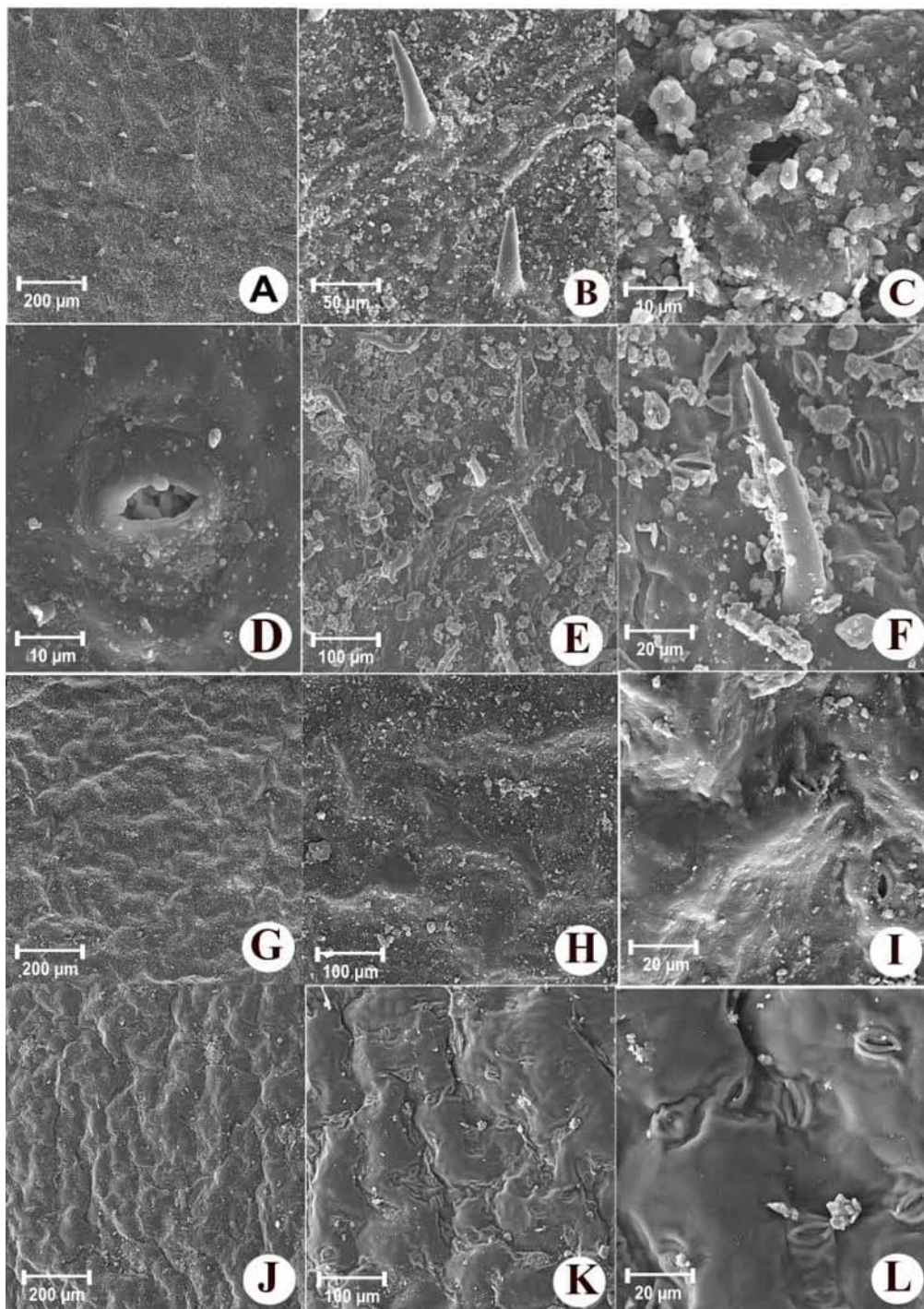
شکل ۵- صفات ریزریخت‌شناسی سطح اپیدرم گونه *Rhamnus pallasii* subsp. *sintenisii* (جمعیت آزادشهر). شکل روزنه C, D, E. تزئینات سطح اپیدرم

A, B, F

Figure 5. The micromorphological features of Epiderm surface in *Rhamnus pallasii* subsp. *sintenisii* (Azadshahr Population).  
A, B and F: Epidermal surface ornamentation; C, D and E: Stomata.



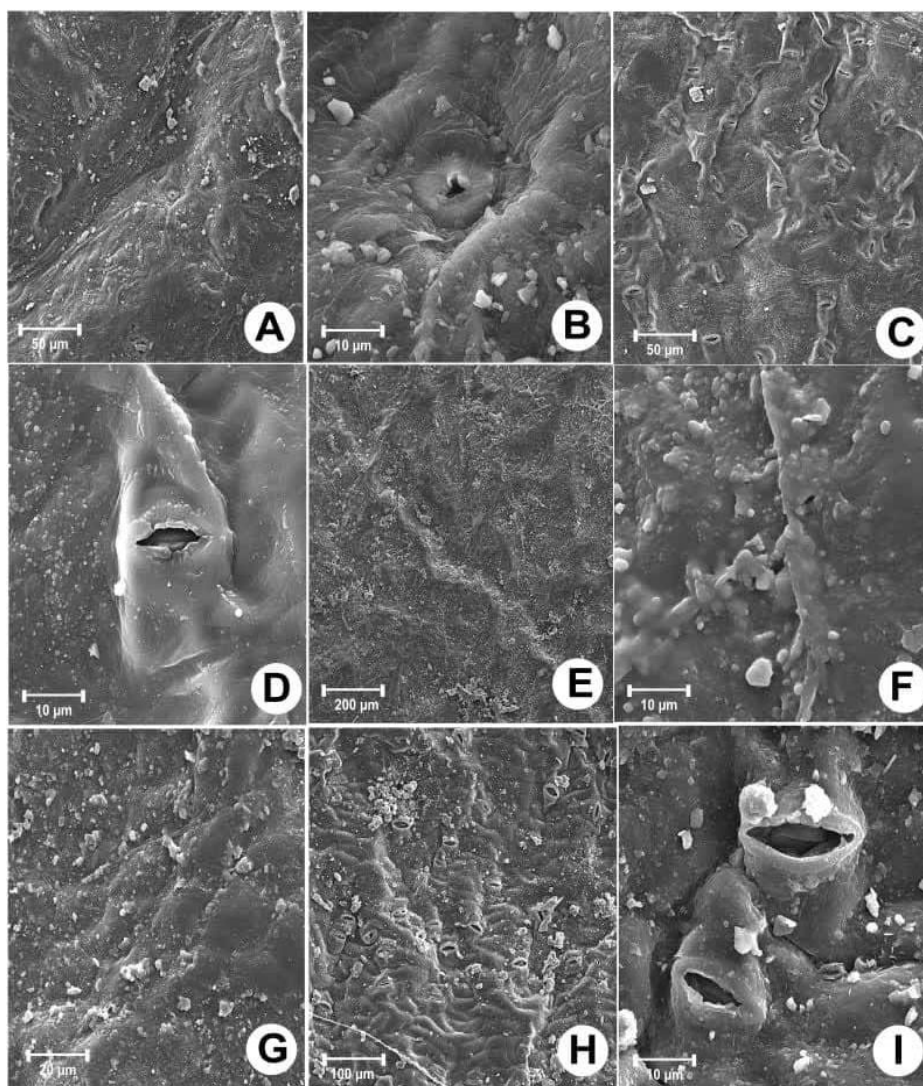
شکل ۶- صفات ریزریخت‌شناسی سطح اپیدرم گونه *Rhamnus pallasii* subsp. *sintenisii* (جمعیت چالوس). روزنه C و D، تزئینات سطح اپیدرم A و B  
Figure 6. The micromorphological features of Epiderm surface in *Rhamnus pallasii* subsp. *sintenisii* (Chaloos Population). A and B: Epidermal surface ornamentation; C and D: Stomata.



شکل ۷- صفات ریزریخت‌شناسی سطح اپیدرم گونه *Rhamnus pallasii* subsp. *iranica* (A-F: جمعیت رویان، G-L: جمعیت گنبدکاووس)، تزئینات سطح

اپیدرم G, H, J, K، روزنه C, D, I, L، انواع کرک A, B, E, F

**Figure 7. The micromorphological features of Epiderm surface in *Rhamnus pallasii* subsp. *iranica* (A-F: Royan Population. G-L: Gonbad kavous Population). A, B, E and F: Trichome Types C, D, I and L: Stomata; G, H, J and K: Epidermal surface ornamentation.**



شکل ۸- صفات ریزریخت‌شناسی سطح اپیدرم گونه *Rhamnus pallasii* subsp. *pallasii* (جمعیت بابلسر). تزئینات سطح اپیدرم A, E, F, G، روزنه B, C، D, H, I

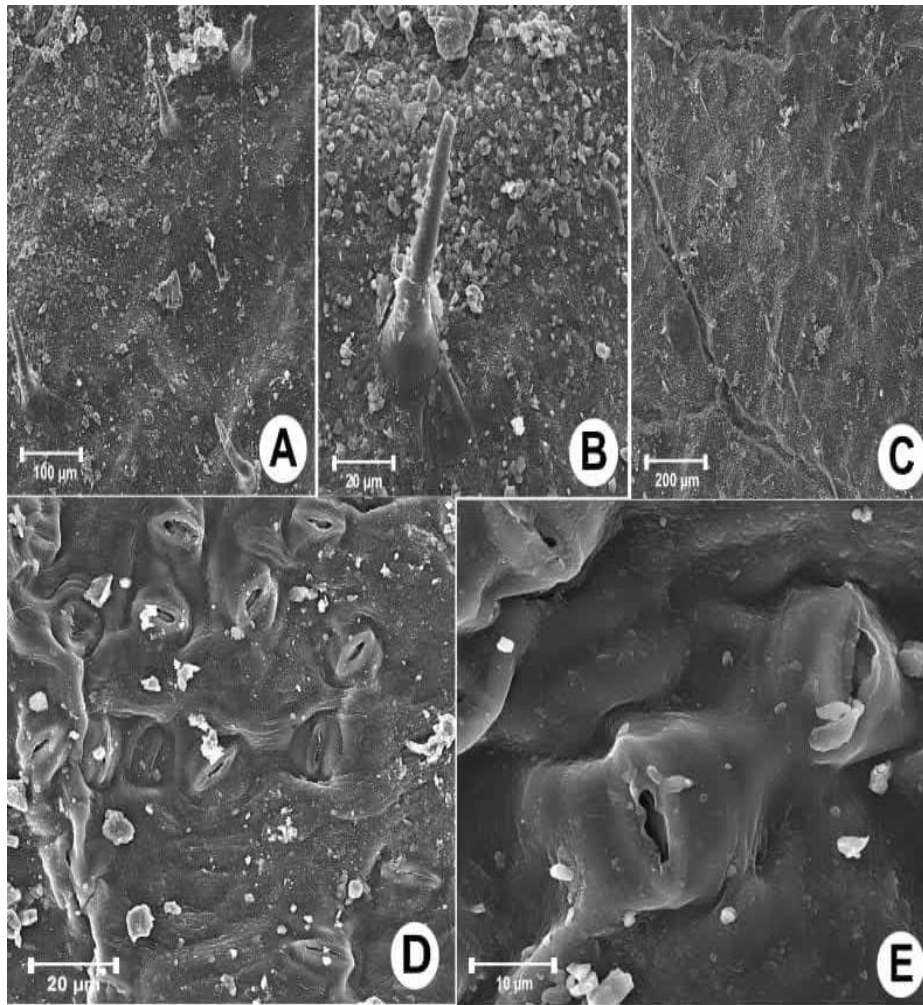
Figure 8. The micromorphological features of Epiderm surface in *Rhamnus pallasii* subsp. *pallasii* (Babolsar Population). B, C, D, H and I: Stomata; A, E, F and G: Epidermal surface ornamentation

*R. pallasii* subsp. 2 بود. کمترین این مقدار مربوط به *R. pallasii* subsp. *iranica* با میانگین عرض ۱۰/۴۸ و میانگین طول ۱۴/۳۱ میلی‌متر بوده است. تزئینات سطح میوه در زیرگونه‌های *R. pallasii* subsp. *sintensisii* و *pallasii* subsp. *pallasii* و دارای چروک‌های ریز است. سطح میوه در *R. pallasii* subsp. *sintensisii* و *R. pallasii* subsp. *iranica* آبله گونه و دارای چروک‌های ریز است. سطح میوه در *R. pallasii* subsp. *iranica* دارای ۳ شیار است (جدول ۵ و شکل ۱۰).

اندوکارپ (درون‌بر) میوه

میوه گونه *Rhamnus pallasii* و زیرگونه‌های آن در رویشگاه‌های مختلف شمال ایران، بوسیله میکروسکوپ نوری و الکترونی بررسی شد (شکل ۱۰). اندازه‌گیری‌های انجام شده در جدول ۵ آمده است. شکل میوه در تمام جمعیت‌ها واژ تخم‌مرغی و به رنگ قهوه‌ای روشن تا تیره بوده است. طبق اندازه‌گیری‌های انجام شده مشخص شد که بیشترین میانگین طول و عرض میوه به ترتیب با مقدار ۲۲/۸۱ و ۲۵/۱۹ میلی‌متر مربوط به زیرگونه *R. pallasii* subsp. *sintensisii* -





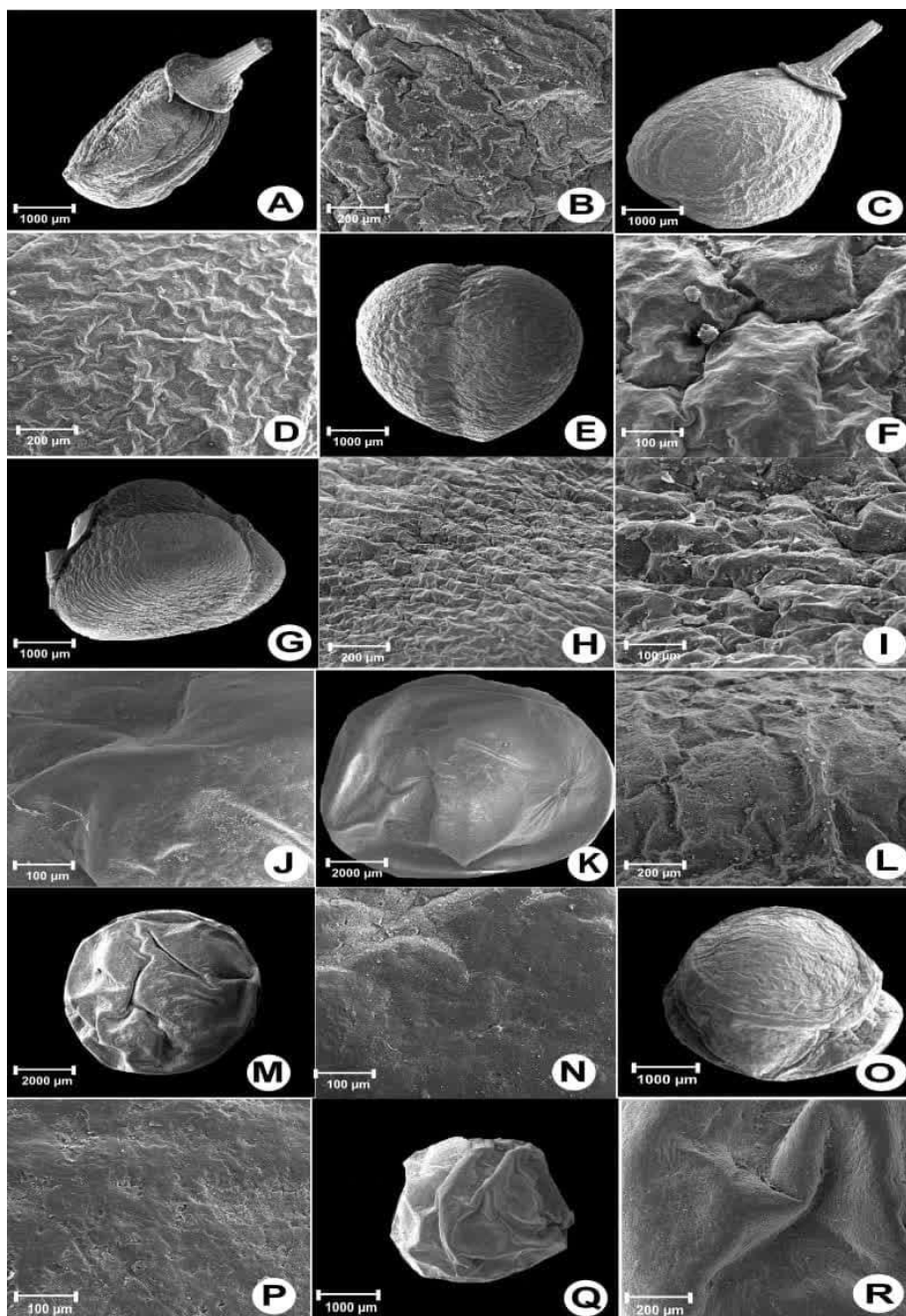
شکل ۹- صفات ریزریخت‌شناسی سطح اپیدرم گونه *Rhamnus pallasii* subsp. *pallasii* (جمعیت نوشهر). روزنه D, E، تزئینات سطح اپیدرم C، انواع کرک A, B

Figure 9. The micromorphological features of Epiderm surface in *Rhamnus pallasii* subsp. *pallasii* (Nowshahr Population). A Epidermal surface ornamentation; D and E: Stomata and B: Trichome Types; C:

جدول ۵ - میانگین طول و عرض میوه ها در زیر گونه‌های *R. Pallasii*

Table 5. Means of length and width of fruits in subspecies of *R. pallasii*.

Species	Population	Fruit width		Fruit length		LW ratio	Ornamentation
		(mm)	(mm)	(mm)	(mm)		
		Mean	SD	Mean	SD		
<i>R. pallasii</i> subsp. <i>pallasii</i> -1	Gilan, Loshan	16.13	1.16	18.62	0.15	1.15	Smallpox and wrinked
<i>R. pallasii</i> subsp. <i>pallasii</i> -2	Golestan, Zaringol	18.55	2.26	20.28	0.55	1.09	Smallpox and wrinked
<i>R. pallasii</i> subsp. <i>sintensisii</i> -1	Golestan, Azadshahr	17.72	1.78	19.32	0.94	1.09	Smallpox and wrinked
<i>R. pallasii</i> subsp. <i>sintensisii</i> -2	Mazandaran, Marzan abad	22.81	2.57	25.19	1.32	1.1	Smallpox and irregular
<i>R. pallasii</i> subsp. <i>iranica</i> -1	Mazandaran, Royan	18.09	2.02	21.45	0.72	1.18	Smallpox and irregular
<i>R. pallasii</i> subsp. <i>iranica</i> -2	Golestan, Gonbad Kavous	10.48	0.5	14.31	0.11	1.36	Smallpox and prominent



شکل ۱۰- صفات ریزریخت‌شناسی میوه در زیرگونه‌های *R. Pallasii*

**Figure 10. The micromorphological features of fruit in subspecies of *R. pallasii*.**

A, B, C: *R. pallasii* subsp. *pallasii* -1,  
D, E, F: *R. pallasii* subsp. *pallasii* -2,  
G, H, I: *R. pallasii* subsp. *sintensisii*-1,

J, K, L: *R. pallasii* subsp. *sintensisii* -2  
M, N, O: *R. pallasii* subsp. *iranica* -1  
P, Q, R: *R. pallasii* subsp. *iranica* -2

ارزش‌گذاری شدند. برای کاهش خطای ارزش‌گذاری، فقط باندهایی که دارای وضوح مناسب بودند ارزش‌گذاری شدند. پرایمرهای ISSR در مجموع ۲۱ باند (لوکوس) تولید کردند که در بین آنها تنها یک باند مونومورف وجود داشت و سایر

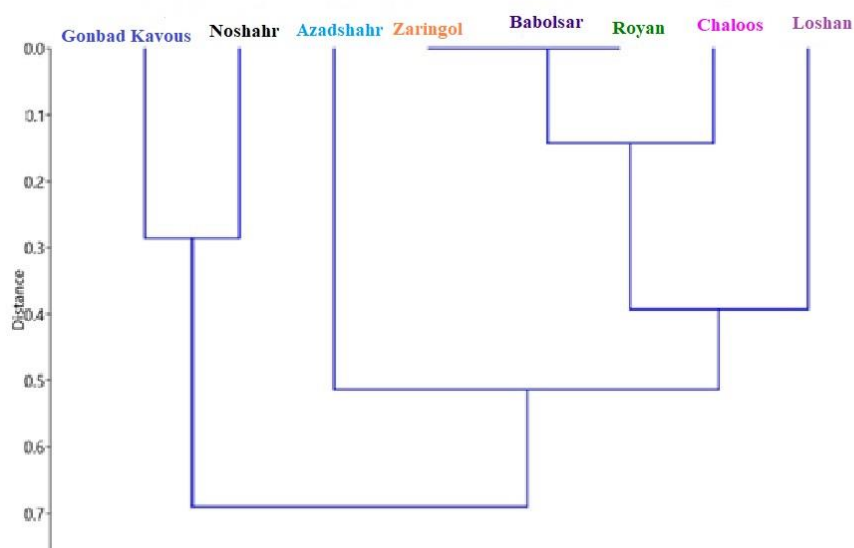
مطالعات تنوع ژنتیکی

برای بررسی تنوع و ساختار ژنتیکی جمعیت گونه *Rhamnus pallasii* از مارکر مولکولی ISSR استفاده شد. تمامی قطعاتی که در محدوده ۳۰۰ تا ۱۰۰۰ bp قرار داشتند،

داده‌های حاصل از مطالعات تنوع ژنتیکی براساس مارکر ISSR، با استفاده از روش‌های تجزیه خوشه‌ای (UPGMA) و تجزیه به مولفه‌های هماهنگ اصلی (PCOA) خوشه‌بندی شدند و در هر دو روش مطابقت در نتایج مشاهده شد. براساس نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای، دو خوشه اصلی مشاهده شد که در خوشه اول جمعیت‌های گنبدکاووس و نوشهر و در کنار هم قرار گرفتند. خوشه دوم، نیز دو زیر خوشه تقسیم شد که جمعیت آزادشهر به صورت یک زیر خوشه از ۴ جمعیت دیگر متمایز شد. جمعیت لوشان نیز در زیرخوشه‌ای دیگر از جمعیت‌های چالوس، رویان، بابلسر و زرین گل متمایز شد (شکل ۱۱).

باندها پلی‌مورف بودند. بیشترین تعداد باندها در جمعیت‌های ۱ و ۳ (۱۵) و کمترین تعداد در جمعیت‌های ۲ و ۶ (۲) مشاهده شد. در بین جمعیت‌های مطالعه شده تنها یک باند اختصاصی در جمعیت ۳ یافت شد و سایر باندها عمومی بودند.

آزمون AMOVA، اختلاف ژنتیکی معنی‌داری را در بین جمعیت‌های مطالعه شده نشان داد ( $P < 0.01$ ). بر این اساس، جمعیت‌ها از نظر ژنتیکی از هم متمایز شدند. طبق آزمون AMOVA، ۹۲ درصد از تفاوت‌های ژنتیکی، بین جمعیت‌ها و ۸ درصد درون جمعیت‌ها وجود دارد. بنابراین سطح بالایی از تنوع ژنتیکی در بین جمعیت‌ها روی داده است.

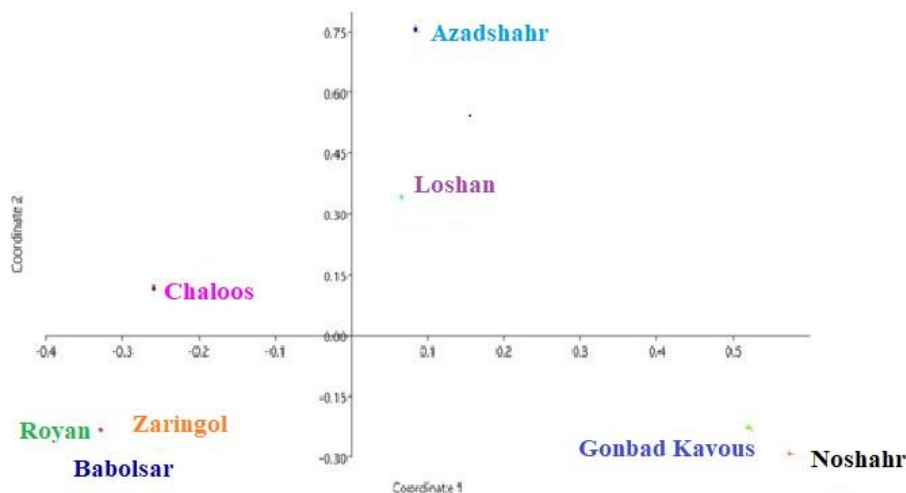


شکل ۱۱- دندروگرام تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA در جمعیت‌های گونه *Rhamnus pallasii* براساس داده‌های ISSR

Figure 11. Dendrogram of cluster analysis (UPGMA method) on populations of *Rhamnus pallasii* based on ISSR data

جمعیت‌های ذکر شده قرابت نشان دادند. جمعیت‌های گنبدکاووس و نوشهر نیز از لحاظ داده‌های ژنتیکی نزدیک به یکدیگر بودند. جمعیت آزادشهر و لوشان نیز تمایز ژنتیکی زیادی نسبت به سایر جمعیت‌ها نشان دادند (شکل ۱۲).

نتایج حاصل از پراکنش جمعیت‌ها در بای‌پلات تجزیه به مولفه‌های هماهنگ اصلی PCOA نیز نتایج نمودار UPGMA را تأیید کرد. در این بای‌پلات نیز جمعیت‌های رویان، بابلسر و زرین گل به عنوان یک گروه ژنتیکی نزدیک به یکدیگر قرار گرفتند و جمعیت چالوس نیز از نظر صفات ژنتیکی به

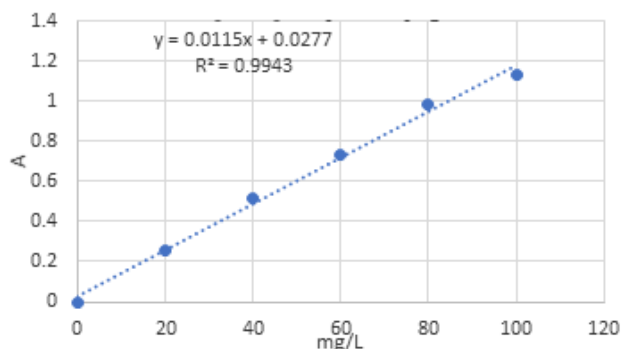


شکل ۱۲- پراکنش جمعیت‌های مطالعه شده (بای پلات) در تجزیه PCOA در گونه *Rhamnus pallasii* براساس داده‌های ISSR  
**Figure 12. The Biplot studied populations according to PCOA in *Rhamnus pallasii* based on ISSR data**

جدول ۶- جذب در برابر غلظت گالیک اسید در طول موج ۷۲۰ نانومتر

**Table 6. Absorption against the concentration of gallic acid at a wavelength of 720 nm**

Gallic acid	Absorption
0	0
20	0.255
40	0.513
60	0.737
80	0.981
100	1.129



شکل ۱۳- نمودار خطی جذب برحسب غلظت (میکروگرم بر میلی گرم) استاندارد گالیک اسید در طول موج ۷۲۰ نانومتر

**Figure 13. Linear graph of absorbance versus concentration (µg/mg) of standard gallic acid at wavelength 720 nm**

گالیک اسید (میکروگرم گالیک اسید بر میلی گرم عصاره) رسم و معادله خط محاسبه شد (شکل ۱۳). میزان فلاونوئید کل از روی جذب‌های به دست آمده برای غلظت‌های تهیه شده از استاندارد کوئرستین (جدول ۷)، نمودار خطی جذب برحسب غلظت (میکروگرم کوئرستین بر میلی گرم عصاره) رسم شده و معادله خط محاسبه گردید (شکل ۱۴).

#### مطالعات فیتوشیمیایی

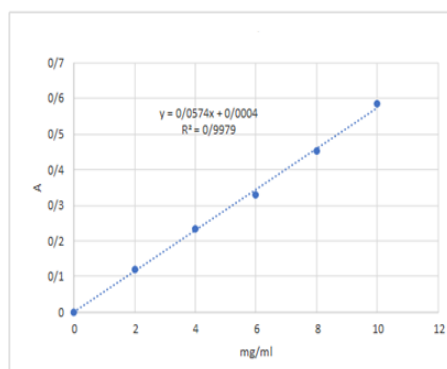
پس از عصاره‌گیری از برگ، فاکتورهای فنل کل، فلاونوئیدکل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی گونه *R. pallasii* اندازه‌گیری شد.

مقدار ترکیبات فنلی برابر با گالیک اسید موجود در عصاره متانولی، با استفاده از معرف فولین-سیوکالتیو و استاندارد گالیک اسید اندازه‌گیری شد (جدول ۶). براساس مقادیر جذب‌های به دست آمده، نمودار خطی جذب برحسب غلظت

جدول ۷- جذب در برابر غلظت کوئرستین در طول موج ۴۱۵ نانومتر

Table 7. Absorbance against quercetin concentration at 415 nm wavelength

Quercetin (µg /mg)	Absorption
0	0
2	0.121
4	0.235
6	0.33
8	0.451
10	0.586



شکل ۱۴- نمودار خطی جذب برحسب غلظت (میکروگرم بر میلی گرم) استاندارد

کوئرستین در طول موج ۲۱۵ نانومتر

Figure 14. Linear graph of absorbance according to concentration (µg/mg) of quercetin standard at 215 nm wavelength

مذکور دارد. فلاونوئیدها خاصیت ضداکسیدانی بالایی از خود نشان می‌دهند که دلیل آن هم، وجود گروه‌های هیدروکسیل در ساختار آنهاست و مهمترین سازوکار ضداکسیدانی فلاونوئیدها در مهار کردن رادیکال‌های آزاد می‌باشد.

مقایسه میانگین فعالیت آنتی‌اکسیدانی (میانگین درصد مهار) نشان داد که مقادیر این پارامتر در نمونه‌های مختلف متغیر بوده و بیشترین مقدار مهارکنندگی ۹۳ درصد است که مربوط به نمونه شماره ۱- *R. pallasii* subsp. *sintensis* است و کمترین مقدار آن ۴/۶۳ درصد است که مربوط به نمونه شماره *R. pallasii* subsp. *pallasii*-2 می‌باشد (جدول ۸).

با توجه به معادله خط به‌دست آمده برای گالیک اسید و بازده استخراج عصاره، بیشترین میزان برابر گالیک اسید برای ترکیبات فنلی موجود در عصاره برگ نمونه‌ها، ۱۳/۹۷ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم خشک گیاه محاسبه شد که مربوط به نمونه ۱- *R. pallasii* subsp. *sintensis* بود (جدول ۸).

با توجه به معادله خط به‌دست آمده برای کوئرستین و بازده استخراج عصاره، بیشترین میزان برابر کوئرستین برای ترکیبات فلاونوئیدی موجود در عصاره‌ها، ۲/۷۶ میلی‌گرم کوئرستین بر گرم وزن خشک گیاه محاسبه شد که مربوط به نمونه شماره ۴- *R. pallasii* subsp. *pallasii* بود (جدول ۸). نتایج حکایت از مقدار بالای این ترکیبات در عصاره برگ گیاه

جدول ۸- اطلاعات مربوط به مقادیر فنل کل، فلاونوئید کل و درصد مهارکنندگی نمونه‌های مختلف

Table 8. Information about the amount of total phenol, total flavonoid and inhibitory percentage of different samples

Species	Phenol (mg/g plant)	Flavonoids (mg/g plant)	Inhibition %
<i>R. pallasii</i> subsp. <i>pallasii</i> -1	8.62 ± 2.17	2.07 ± 0.02	89.4 ± 0.37
<i>R. pallasii</i> subsp. <i>pallasii</i> -2	2.12 ± 0.08	0.48 ± 0.00	63.4 ± 60
<i>R. pallasii</i> subsp. <i>sintensis</i> -1	13.97 ± 0.56	1.78 ± 0.14	93.04 ± 2.5
<i>R. pallasii</i> subsp. <i>sintensis</i> -2	7.19 ± 0.64	1.39 ± 0.12	77.2 ± 2.2
<i>R. pallasii</i> subsp. <i>iranica</i> -1	8.96 ± 0.68	1.93 ± 0.04	82.9 ± 0.7
<i>R. pallasii</i> subsp. <i>iranica</i> -2	8.59 ± 0.68	2.05 ± 0.03	76.9 ± 1.5
<i>R. pallasii</i> subsp. <i>pallasii</i> -3	4.78 ± 1.53	1.00 ± 0.01	64.0 ± 2.7
<i>R. pallasii</i> subsp. <i>pallasii</i> -4	8.93 ± 0.98	2.76 ± 0.09	74.5 ± 1.4

## بحث

به طور کلی از بررسی منابع چنین برمی آید که در گونه‌های مختلف سرده *Rhamnus* تحقیقات زیادی در زمینه خصوصیات مورفولوژیکی، تنوع ژنتیکی و فیتوشیمیایی به ویژه در رویشگاه‌های این سرده در ایران انجام نشده است و این مطالعه جزو معدود مطالعات روی گونه *R. pallasii* و زیرگونه‌های آن می‌باشد.

مطالعه سلول‌های اپیدرم نشان داد که شکل این سلول‌ها چندوجهی و نامنظم است و دیواره آنتی‌کلینال به صورت راست تا خمیده و موجدار است. از آنجایی که این ویژگی‌ها در جمعیت‌های مورد مطالعه تاحدودی متفاوت بود، می‌توان گفت که این ویژگی می‌تواند برای درک روابط سیستماتیکی بین زیرگونه‌ها تا حدی مفید باشد. سلول‌های همراه، سلول‌هایی هستند که نقش مهمی در باز و بسته شدن روزنه‌ها دارند و تعداد این سلول‌های همراه است که تیپ و نوع روزنه را مشخص می‌کند. در بیشتر جمعیت‌های مورد بررسی یک نوع تیپ روزنه و از نوع آنموسیتیک دیده شد؛ در تیپ آنموسیتیک، روزنه توسط تعداد زیادی از سلول‌های همراه احاطه شده است که معمولاً با سلول‌های اصلی اپیدرم تفاوت چندانی ندارند (Blunden & Jewers, 1973). ولی چند جمعیت دارای دو نوع تیپ روزنه شامل آنموسیتیک و پاراسیتیک بودند. گاهی ممکن است بیشتر از یک تیپ روزنه در سلول‌های اپیدرم مشاهده شود (Fahn, 1982). اندازه‌گیری‌های انجام شده نشان داد که بیشترین میانگین طول و عرض روزنه در میان جمعیت‌های این گونه مربوط به زیرگونه *R. pallasii* subsp. *iranica*-1 به ترتیب با میانگین عرض ۲/۴۲ و میانگین طول ۷/۳۱ و کمترین میانگین طول و عرض، با میانگین عرض ۰/۷۱ و میانگین طول ۲/۶۷ متعلق به زیرگونه *R. pallasii* subsp. *pallasii* بوده است که این نتایج با داده‌های Mahdiyani و همکاران (۲۰۱۶) مطابقت دارد. در مطالعه انجام شده توسط Mahdiyani و همکاران (۲۰۱۶)، بیان شد که نمونه‌های جمع‌آوری شده در منطقه ساحلی بابلسر، نشان‌دهنده آن است که در این منطقه با توجه به هیدرومورف بودن خاک و رطوبت نسبی بالای

محیط، گیاه در تنش کمبود اکسیژن ریشه بوده است و سعی نموده با افزایش تعداد روزنه نسبت به عامل تنش از خود مقاومت نشان بدهد. به طوری که تحقیقات مختلف نشان داده است که هر چقدر گیاه در تنش خشکی قرار می‌گیرد تراکم روزنه‌ها در آن کاهش می‌یابد، بنابراین نه تنها عوامل ژنتیکی، بلکه برخی شرایط محیطی نیز در تعداد و تراکم روزنه گیاهان تأثیرگذار هستند و روزنه می‌تواند علاوه بر عامل اصلی انجام تبادلات، یک سازوکار سازگاری با شرایط محیطی در نظر گرفته شود (Van de Roovaort & Fuller, 1935).

در این مطالعه، میوه گونه *Rhamnus pallasii* و زیرگونه‌های آن در رویشگاه‌های این گونه در نقاط مختلف ایران، بوسیله میکروسکوپ نوری و الکترونی بررسی شد. میوه در تمام جمعیت‌ها واژ تخم‌مرغی و به رنگ قهوه‌ای روشن تا تیره بوده است. طبق داده‌های بدست آمده مشخص شد که بیشترین میانگین طول و عرض میوه به ترتیب با مقدار ۲۲/۸۱ و ۲۵/۱۹ میلیمتر مربوط به زیرگونه *R. pallasii* subsp. *sintensisii* 2 (جمعیت چالوس) و بعد از آن با میانگین عرض ۱۸/۵۵ و میانگین طول ۲۰/۲۸ به گونه *R. pallasii* subsp. *pallasii* 2 (جمعیت زرین گل) مربوط بود. کمترین این مقدار مربوط به *R. pallasii* subsp. *iranica* 2 (جمعیت گنبدکاوس) با میانگین عرض ۱۰/۴۸ و میانگین طول ۱۴/۳۱ میلیمتر بوده است. تزئینات سطح میوه در زیرگونه‌های *R. pallasii* subsp. *pallasii* و *R. pallasii* subsp. *sintensisii* و *R. pallasii* subsp. *iranica* آبله گونه و دارای چروک‌های ریز بود که این نتایج با داده‌های مطالعه Mahdiyani و همکاران (۲۰۱۹) مطابقت دارد. سطح میوه در *R. pallasii* subsp. *sintensisii* و *R. pallasii* subsp. *iranica* دارای ۳ شیار و در *R. pallasii* subsp. *pallasii* دارای ۲ شیار در طول بوده است. Sattarian و همکاران (۲۰۱۷)، دانه‌های جمعیت‌های مورد مطالعه از این سرده را دارای یک شیار در سطح شکمی دانسته و بزرگترین شیار را مربوط به زیرگونه *R. × spathulifolia* و کوچکترین شیار را در *R. pallasii* subsp. *pallasii* بیان کردند و دانه‌ها را بیشتر مشابه دانسته و بیان کردند که صفات مورد بررسی

و یک گونه دورگه می‌باشد. علاوه بر این، یک گونه دورگه به‌عنوان یک گونه جدید معرفی شد و تعدادی از گونه‌های *Rhamnus* به سرده *Atadinus* منتقل شدند.

همچنین طبق داده‌های حاصل از مطالعات تنوع ژنتیکی براساس مارکر ISSR، با استفاده از روش‌های آماری متفاوت رسته‌بندی و خوشه‌بندی از قبیل PCO و UPGMA، جمعیت‌های مربوط به زیرگونه‌های گونه *R. pallasii*، بجز جمعیت‌های بابلسر) و زرین گل که هر دو مربوط به زیرگونه *pallasii* بودند و در زیرخوشه‌ای نزدیک به یکدیگر قرار گرفتند، سایر جمعیت‌های مربوط به سایر زیرگونه‌ها به صورت خوشه‌های پراکنده در بین یکدیگر قرار گرفتند. بنابراین داده‌های حاصل از مطالعات تنوع ژنتیکی براساس مارکر ISSR در این مطالعه جدایی زیرگونه‌های گونه *R. pallasii* را تأیید نمی‌کند.

با توجه به اندازه‌گیری متابولیت‌های برگ با حلال اتانول ۸۰ درصد، نتایج حاصل نشان داد که اختلاف قابل ملاحظه‌ای در مقادیر کل فنل، فلاونوئید و خاصیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های مختلف وجود دارد. همانطور که در جدول ۸ مشاهده می‌شود کمترین و بیشترین مقدار فنل کل ۲/۱۲ و ۱۳/۷۸ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک است که به ترتیب مربوط به نمونه‌های شماره 2-*pallasii* subsp. *pallasii* و *R. pallasii* subsp. *sintensisii* 1- می‌باشد. مقادیر فلاونوئید در محدوده بین ۸/۴۸ و ۲/۷۶ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک قرار گرفته است که به ترتیب متعلق به نمونه‌های شماره *R. pallasii* subsp. *pallasii* 2- و *R. pallasii* subsp. *pallasii* 4- (جدول ۸). این مقادیر نیز به‌طور قابل توجهی کمتر از مقادیر گزارش شده در مطالعه Mahmoodi و همکاران (۲۰۲۲) است که ۹۸ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک برگ می‌باشد. با مقایسه درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد عصاره‌های مختلف بدست آمده در جدول ۸، مشاهده می‌شود که بیشترین درصد مهارکنندگی مربوط به نمونه شماره *R. pallasii* subsp. *sintensisii* 1- با ۹۳ درصد مهارکنندگی و کمترین درصد مهارکنندگی مربوط به نمونه شماره *R. pallasii* subsp. *pallasii* 2- با ۶۳ درصد مهارکنندگی

در دانه نمی‌تواند برای شناسایی گونه‌ها و زیرگونه‌ها صفت مناسبی باشد.

در مورد تنوع ژنتیکی سرده *Rhamnus* با توجه به اینکه تاکنون مطالعه جامعی دال بر وجود ارتباط بین عوامل بوم‌شناختی زیستگاه‌های مختلف و تنوع ژنتیکی انجام نشده بود، بنابراین به دست آوردن اطلاعات در مورد تنوع، ساختار ژنتیکی و بررسی‌های ژن اکولوژی در گونه *R. pallasii* می‌تواند حائز اهمیت باشد. چه بسا ارزیابی تنوع ژنتیکی در بین جمعیت‌های این گونه بتواند در درک بهتر فرایندهای تکاملی و طبیعت آن کمک‌کننده باشد. در این مطالعه، سطح بالایی از تنوع ژنتیکی (۹۲ درصد) در بین جمعیت‌های این گونه مشاهده شد. آزمون AMOVA، اختلاف ژنتیکی معنی‌داری را در بین جمعیت‌های مطالعه شده نشان داد ( $P < 0.01$ ) و نتایج مشخص کرد که همه جمعیت‌های مطالعه شده کاملاً از لحاظ ژنتیکی متمایز هستند. این نتایج با نتایج مطالعه دیگری که تنوع ژنتیکی یکی دیگر از گونه‌های سرده *Rhamnus* به نام *Rhamnus persicifolia* را با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR و پیامدهای آن برای حفاظت از خزانه ژنتیکی این گونه مورد بررسی قرار داد مطابقت دارد. در مطالعه‌ای که توسط Bacchetta و همکاران (۲۰۱۱) انجام شد، سطوح نسبتاً بالایی از تنوع ژنتیکی در بین جمعیت‌های گونه *Rhamnus persicifolia* مشخص شد. در مطالعه‌ای که توسط Alijanpour و همکاران (۲۰۲۱b) انجام شد صفات کیفی و میانگین کمی از خصوصیات مورفولوژیکی در دو جنس، ۴۱ آرایه، ۵۲ جمعیت و ۹۱۷ فرد مطالعه و بررسی شدند تا مرز آرایه‌ها و ارتباط آنها تعیین شود. نتایج این مطالعه تا حدودی طبقه‌بندی‌های قبلی را تأیید می‌کند. وجود نمونه‌هایی با ویژگی‌های دو گونه مختلف ماهیت دورگه‌ای بودن آنها را تأیید می‌نمود. همچنین یک زیرگونه جدید در بین گونه‌ها قابل تشخیص بود. Alijanpour و همکاران (۲۰۲۱a) موقعیت تاکسونومیک *Rhamnus* و *Atadinus* را در فلور ایران بررسی کردند، ۹ گونه شامل ۱۵ آرایه شناسایی و توصیف شدند و با تاکسون‌های خویشاوند مقایسه گردیدند. نتایج مطالعه آنان شامل یک گونه جدید، یک زیرگونه جدید

قرار گیرد. همچنین در بخش مولکولی، مطالعه ژن اکولوژی گونه *Rhamnus pallasii*، برای تعیین میزان تنوع ژنتیکی در این گونه و تشخیص اینکه آیا جمعیت‌هایی که به لحاظ جغرافیایی از یکدیگر فاصله گرفته‌اند، به لحاظ ژنتیکی نیز واگرا از هم هستند، بررسی شد. پرواضح است که با توجه به مشکلات تاکسونومیکی که در گونه *R. pallasii* و به‌ویژه آرایه‌های فرگونه‌ای آن وجود دارد، نتایج حاصل از مطالعات ریزریخت‌شناسی و کلادوگرام‌های حاصل از مطالعات مولکولی همانند تنوع ژنتیکی در بسیاری از موارد ممکن است در توافق کامل با مطالعات ریخت‌شناسی و تاکسونومیکی نباشد. به این دلیل که طبقه‌بندی‌های تاکسونومیکی موجود در بسیاری از موارد ممکن است مصنوعی باشند. از این رو ادغام داده‌های ریخت‌شناسی، ریزریخت‌شناسی و فیتوشیمیایی با داده‌های مولکولی در درخت‌های تبارزایی با استفاده توالی‌های هسته‌ای و کلروپلاستی و مکان‌نگاری (Mapping) داده‌ها می‌تواند در آینده در حل طبقه‌بندی‌های موجود تا حدودی کمک‌کننده باشد. بنابراین داده‌های بدست آمده از این مطالعه نیز می‌تواند ضمن نشان دادن میزان بالای تنوع ژنتیکی این گونه در صفات ریزریخت‌شناسی، فیتوشیمیایی و تنوع ژنتیکی به عنوان بخشی از این داده‌های گنجینه علمی حاصل از این سرده به‌شمار رود و در کنار سایر داده‌ها مفید واقع شود. زیرا جمع‌آوری داده‌هایی از این دست می‌تواند به مرور یک دیتابیس قوی برای حل مشکلات تاکسونومیکی در این جنس فراهم نماید.

می‌باشد. با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان نتیجه‌گیری نمود که هر چقدر محتوای فنل و فلاونوئید گیاه بیشتر باشد خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی‌تر خواهد داشت. بنابراین فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد عصاره‌های برگ ممکن است نتیجه محتوای بالای فنل کل و فلاونوئید کل باشد که دارای قابلیت اهدای هیدروژن هستند.

رویشگاه‌ها و عوامل محیطی مختلفی از قبیل ارتفاع از سطح دریا، خاک، رطوبت، نور، دما، فشار و عرض جغرافیایی به عنوان عامل تأثیرگذار در رشد گیاه، میزان اسانس و تجمع متابولیت‌های ثانویه نقش بسیار مهمی ایفا می‌کنند (Azarkish et al., 2020). البته محل رشد گیاهان از طریق تغییر رطوبت و دما بر فرایند تشکیل مواد مؤثره می‌تواند تأثیر داشته باشد. تأثیر محیط بر سازوکار تجمع متابولیت‌های ثانویه به‌درستی آشکار نشده است اما این مطلب که تأثیر محیط در فرایند تولید متابولیت‌ها و آنزیم‌های مرتبط به آن، در نوع و شدت واکنش‌های شیمیایی تأثیرگذار است، مورد تأیید قرار گرفته است (Narimani et al., 2017).

#### نتیجه‌گیری

در این مطالعه سعی شده است با استفاده از مطالعات مربوط به ریزریخت‌شناسی سطح اپیدرم و میوه و اندازه‌گیری برخی از ترکیبات فیتوشیمیایی، میزان تنوع صفات ریزریخت‌شناسی و فیتوشیمیایی، جمعیت‌های مختلف گونه *Rhamnus pallasii* در شمال کشور مورد مطالعه و بررسی

#### References

- Alijanpour, B., Khodayari, H., Mehregan, I., Assadi M. and Rahiminejad, M. R. 2021a. Taxonomic circumscription and relationship in *Rhamnus* L. and *Atadinus* Raf. (Rhamnaceae) species in Iran based on morphological characters, Iranian Journal of Botany, 27 (1): 05-19.
- Alijanpour, B., Khodayari, H., Assadi, M. Rahiminejad, M. R. and Mehregan, H. 2021b. A taxonomic revision of *Rhamnus* L. and *Atadinus* Raf. (Rhamnaceae) in Iran, Phytotaxa, 521 (3): 127-158.
- Azarkish, P., Moghaddam, M., Ghasemi Pirbalouti, A., and Khakdan, F. 2020. Variability in the essential oil of different wild populations of *Prangos platychlaena* collected from Southwestern Iran. Plant Biosystems 155(6): 1100-1110.



- Bacchetta, G., Fenu, G., Mattana, E., Zecca, G., Grassi, F., Casazza, G. and Minuta, L., 2011. Genetic variability of the narrow endemic *Rhamnus persicifolia* Moris (Rhamnaceae) and its implications for conservation. *Biochemical Systematics and Ecology*, 39 (1): 477-484.
- Blunden, G. and Jewers, K., 1973. The comparative leaf anatomy of *Agave*, *Beschorneria*, *Doryanthes* and *Furcraea* species (Agavaceae: Agaveae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 66 (1): 157-179.
- Browicz, K. and Zielinski, J., 1977. *Flora Iranica*. Akademische Druck-U Verlagsanstalt G graz.
- Davarynejad, Gh., Taghizadeh, S.F. and Asili, J. 2017. Effect of Different Solvents on Total Phenolic Contents and Antioxidant Activity of *Zizyphus jujube* Miller Fruits. *Journal of Horticultural Science*, 31(1): 158-166. (In Persian).
- Dinarvand, M. and Zarinkamar, F., 2006. Anatomy-taxonomy of the genus *Zizyphus* in Iran. *The Iranian Journal of Botany*, 12(1): 36-41.
- Fahn, A., 1982. *Plant Anatomy*. 3rd Edition, Pergamon Press, Oxford.
- Ghahreman, A., 1979-2003. *Color flora of Iran*. Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, Iran. (In Persian).
- Gleason, H. A. and Cronquist, A., 1991. *Manual of vascular plants of the Northeastern United States and Adjacent Canada*. 2nd Ed. The New York Botanical Garden Press, New York.
- Hammer, Q., Harper, DAT., Ryan, PD., 2012. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol. Electron.* 4:9.
- Islam M. B. and Simmons M. P. 2006. A thorny dilemma: testing alternative intrageneric classifications within *Zizyphus* (Rhamnaceae). *Systematic Botany*, 31: 826–842.
- Kellerman, J., 2007. *The Australian stellate-haired Rhamnaceae: a systematic study of the tribe Pomaderreae*. PhD thesis. University of Melbourne, Australia.
- Khakdaman, H., Poormaidani, A. and Adnani, M., 2007. Study of genetic variation in Iranian Jujube (*Zizyphus jujuba* Mill.) ecotypes. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 14: 202-214. (In Persian).
- Mahdiyani, S., Sattarian, A., Habibi, M. and Amini T., 2016. An anatomical study of *Rhamnus cathartica* L. and *Rhamnus pallasii* Fisch. & C.A. Mey. (Rhamnaceae) in the north of Iran. *Nova Biologica Reperta*, 2 (4): 272 -285. (In Persian).
- Mahdiyani, S., Sattarian, A. and Habibi, M., 2019. A Morphometric Study of *Rhamnus Cathartica* and *Rhamnus Pallasii* in North of Iran. *Taxonomy and Biosystematics*, 11 (39): 31-54. (In Persian).
- Mabberley, D. G. 1987. *The Plant Book*, Cambridge University Press, Cambridge, England. UK. 858 p.
- Mahmoodi, S., Taleghani, A. Akbari, R. and Mokaber-Esfahani, M., 2022. *Rhamnus pallasii* subsp. *sintensisii* fruit, leaf, bark and root: Phytochemical profiles and biological activities. *Arabian Journal of Chemistry*, 15(7): 103924.
- Mobayen, S., 1996. *Flora of Iran 1980-1996*. Vol. 1-4, Tehran University Press, Tehran, Iran. (In Persian).
- Mohajer Kaboli, Z., Sheidai, M., Koohdar, F., 2023. Genetic fingerprinting of *Zizyphus jujuba* by using SCoT and REMAP molecular markers. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*, 21 (3): 248-253.
- Narimani, R., Moghaddam, M., Ghasemi Pirbaloti, A. and Shokouhi, D., 2017. The study of morphological diversity, total phenolic contents and antioxidant activity in different *Nepeta nuda* and *Nepeta crassifolia* populations in Ardabil and East Azerbaijan Provinces. *Eco-phytochemical of Medicinal Plants*, 23(6): 21-31. (In Persian).
- Nisar, M., Kaleem, W. A., Qayum, M., Hussain, A., Ali I. and Choudhary, M. I., 2010. Biological Screening of *Zizyphus Oxyphylla* Edgew Leaves, *Pakistan Journal of Botany*, 42: 4063-4069.
- Peakall, R., Smouse, P.E., 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6: 288-295.
- Sattarian, A., Mahdiyani S. and Habibi, M., 2017. Pollen Morphology & Endocarp Studies of *Rhamnus cathartica* L., and *Rhamnus pallasii* Fisch. & C. A. Mey (Rhamnaceae) in North of Iran. *Taxonomy and Biosystematics*, 9 (31): 43-60.

- Shahhoseini, R., Babaei, A., Kazemi, M. and Omidbaigi, R., 2012. A study on genetic variation in Iranian Jujube (*Zizyphus jujuba* Mill.) genotypes using molecular AFLP marker. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 20 (1): 55-68. (In Persian).
- Soufiyan, K. H. and Dinarvand, M., 2007. Flora of Iran. vol. 55: Rhamnaceae. Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran (In Persian).
- Taleghani, A., Mahmoudi, S. and Mokaber-Esfahani, M., 2022. Evaluation of phytochemical screening of *Rhamnus pallasii* parts at different phenological stages. Plant environmental physiology, 17 (68): 69-81.
- Van de Roovaaort, E. and Fuller., G. D. 1935. Stomatal frequency in cereals. Journal of Ecology, 16:278-279.