



## Correlation of *Ramalina farinacea* chemotypes with ecological factors in Iran using LC-ESI-MS/MS

Maryam Sharifi<sup>1</sup>, Iraj Mehregan<sup>1</sup>, Mohammad Sohrabi<sup>2\*</sup> , Kambiz Larijani<sup>3</sup>,  
Harrie Sipman<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

<sup>2</sup> The Museum of Iranian Lichens, Tehran, Iran, Email: sohrabi.mycolich@gmail.com

<sup>3</sup> Department of Chemistry, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

<sup>4</sup> Botanic Garden and Botanical Museum Berlin-Dahlem, Freie Universität, Berlin, Germany

| Article type:          | Abstract                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Research article       | This study aimed to identify specific phytochemical properties associated with five distinct lichen ecotypes of <i>Ramalina farinacea</i> from different regions in Iran: Golestan (Kordkooy, Gorgan), Mazandaran (Farim and Galugah), and Semnan (Shahrud, Kalpush region). In order to determine intraspecific chemotype diversity, qualitative differences in chemical profiles were investigated using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS). The following chemicals were identified based on LC-ESI-MS/MS results: (1) Atranol, (2) Divaric acid, (3) Evernic acid, (4) Ramalinaic acid, (5) Squamatic acid, (6) Sekikaic acid, (7) 4'-O-Methyl norsekikaic acid, (8) Glomellonic acid, (9) Conprotocetraric acid, (10) Usnic acid, (11) Nephrosterinic acid, (12) Dihydroxyoctadecenoic acid, (13) Hypoconstictic acid, and two unknown substances. Statistical analyses using Ward's method in SPSS were performed based on quantitative and qualitative traits. The dendrogram revealed two main clusters, with Farim and Galugah closely grouped in one subcluster, Gorgan in another subcluster, and Shahrud and Kordkooy in a separate cluster. Correlation coefficients between the studied traits showed a positive correlation of slope direction, altitude, humidity, maximum and mean temperature with the chemotypes. These findings confirm the observed variations in the chemical profiles of the lichen ecotypes. |
| <b>Article history</b> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Received: 2024-11-09   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Revised: 2025-04-03    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Accepted: 2025-04-08   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| <b>Keywords</b>        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Altitude               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Chemical profile       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Ecotype                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Lichen                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Phytochemistry         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Slope direction        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |

**Cite this article as:** Sharifi, M., Mehregan, I., Sohrabi, M., Larijani, K., Sipman, H. (2025). Correlation of *Ramalina farinacea* Chemotypes with Ecological Factors in Iran Using LC-ESI-MS/MS. *Eco-phytochemical Journal of Medicinal Plants*, 13(1): 1-16.



©The author(s)

Publisher: Islamic Azad University, Gorgan branch

Doi: <https://doi.org/10.71847/1w8p-v763/ejmp.2025.1189947>

## همبستگی شیموتایپ‌های *Ramalina farinacea* با عوامل اکولوژیکی

### در ایران با استفاده از LC-ESI-MS/MS

مریم شریفی<sup>۱</sup>، ایرج مهرگان<sup>۱</sup>، محمد سهرابی<sup>۲\*</sup>، کامبیز لاریجانی<sup>۳</sup>، هری سپین<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> گروه زیست شناسی، دانشکده علوم و فناوری‌های همگرا، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

<sup>۲</sup> موزه گلشنهای ایران، تهران، ایران، رایانامه: Sohrabi.mycolich@gmail.com

<sup>۳</sup> گروه شیمی، دانشکده علوم و فناوری‌های همگرا، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

<sup>۴</sup> باغ و موزه گیاه شناسی برلین، داهلم، آلمان

| نوع مقاله:   | چکیده                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| مقاله پژوهشی | در مطالعه حاضر، خواص فیتوشیمیایی را مشخص کردیم که به طور خاص در پنج اکوتیپ متمایز گلشنگی <i>Ramalina farinacea</i> از ایران گلستان: کردکوی و گرگان، مازندران: فریم و گلوگاه، سمنان: شاهرود، منطقه کالپوش مرتبط بودند تا تنوع شیموتایپ‌های درون گونه‌ها تشخیص داده شوند. تفاوت‌های کیفی بین پروفیل‌های شیمیایی با استفاده از کروماتوگرافی مایع-طیف‌سنجی جرمی (LC-ESI-MS/MS) در چند مرحله بررسی گردید. بر اساس نتایج LC-ESI-MS/MS، مواد شیمیایی زیر شناسایی شدند: متابولیت‌های (۱) Atranol، (۲) Divaric acid، (۳) Evernic acid، (۴) Ramalinaic acid، (۵) Squamatic acid، (۶) Sekikaic acid، (۷) 4'-O-Methyl Usnic acid، (۸) Glomellonic acid، (۹) Conprotocetraric acid، (۱۰) Usnic acid، (۱۱) Nephrosterinic acid، (۱۲) Dihydroxyoctadecenoic acid، (۱۳) Hypoconstictic acid و دو ماده ناشناخته. آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS به روش Ward بر پایه صفات کمی و کیفی صورت گرفت که دندروگرام با دو خوشه اصلی ایجاد شد و نزدیکی آرایه‌های فریم و گلوگاه باهم در یک زیر خوشه و در زیر خوشه دیگر گرگان، در خوشه‌ی دیگر هم نزدیکی شاهرود و کردکوی کاملاً مشهود است. همچنین ضرایب همبستگی صفات مورد مطالعه، همبستگی مثبت جهت شیب، ارتفاع، رطوبت، بیشینه و میانگین دما با شیموتایپ‌ها را نشان داده که میتواند تفاوت‌هایی که در پروفیل‌های شیمیایی اکوتیپ‌های گلشنگی مشاهده می‌شود را توجیه نماید. |

#### واژه‌های کلیدی:

ارتفاع

اکوتیپ

پروفیل شیمیایی

جهت شیب

فیتوشیمی

گلشنگی

استناد: شریفی، مریم؛ مهرگان، ایرج؛ سهرابی، محمد؛ لاریجانی، کامبیز؛ سپین، هری. (۱۴۰۴). همبستگی شیموتایپ‌های

*Ramalina farinacea* با عوامل اکولوژیکی در ایران با استفاده از LC-ESI-MS/MS. فصلنامه اکوفیتوشیمی گیاهان

دارویی، ۱۳(۱)، ۱-۱۶.

Doi: <https://doi.org/10.71847/1w8p-v763/ejmp.2025.1189947>

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان

© نویسندگان.



## مقدمه

گل‌سنگ‌ها ارگان‌سیم‌هایی حاصل از همزیستی قارچ (میکوبیونت) و جلبک و یا سیانوباکتر (فتوبیونت) می‌باشند که یک واحد سیستماتیکی مستقل و پایدار متعلق به سلسله‌ی قارچ‌ها و شاخه‌ی آسکومایکوتا را تشکیل می‌دهند (Boustie and Grube, 2005). فتوبیونت‌های گل‌سنگ‌ها به‌طور دائم با میکوبیونت‌های خود در تماس هستند و همزیستی گل‌سنگ یک ارتباط بلندمدت است (برخی از گل‌سنگ‌ها می‌توانند صدها سال زنده بمانند). فرض بر این است که تولید متابولیت‌های ثانویه خاص توسط میکوبیونت‌ها، عنصر کلیدی در حفظ هم‌نوشتاری در تال گل‌سنگ است، زیرا از رشد بیش‌ازحد بیومس فتوبیونت‌ها که می‌تواند منجر به عدم تعادل بین شرکای همزیست شود، جلوگیری می‌کند (Bačkor et al., 2024). قارچ نقش تأمین آب و مواد معدنی و محافظت مکانیکی ارگان‌سیم را ایفا می‌کند. شریک جلبکی فتوستتزر را انجام می‌دهد و ترکیبات آلی را برای همزیست قارچی فراهم می‌کند. همزیستی منجر به تولید ۸۰۰ تا ۱۱۰۰ ترکیب متنوع از میان رده‌های مختلف شده و ترکیبات حاوی نیتروژن، فسفر و گوگرد، پلی‌ال‌ها، کربوهیدرات‌ها، ترکیبات آلیفاتیک، سیکلوآلیفاتیک و آروماتیک، متا و پارادپسیدها، دپسیدون‌ها، دی‌بنزوفوران‌ها، دی‌فنیل‌اترها، نفتوپیران‌ها، بی‌فنیل‌ها، دی‌فنیل‌متان‌ها، نوستوکلیدها، گزانتون‌ها، کینون‌ها، نفتوکینون‌ها، اوسنیک اسید، استرها، ترپن‌ها، استروئیدها، ترفنیل‌کینون‌ها و مشتقات پولوینیک اسید و ... می‌باشند (Rundel, 1978; Huneck and Yoshimura, 1996; Oksanen, 2006). مطالعات Moreira و همکاران (۲۰۱۵) و همین‌طور Sahin و همکاران (۲۰۲۱) نشان داد که ترکیبات گل‌سنگ‌ها دارای فعالیت‌های زیستی مهم مانند آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی، ضد تومور و ضد التهابی می‌باشد.

گل‌سنگ‌ها در طب سنتی بیشتر برای درمان زخم‌ها، اختلالات پوستی، مشکلات تنفسی و گوارشی، و بیماری‌های زنان و زایمان مورد استفاده قرار می‌گیرند. این کاربردها هم به متابولیت‌های ثانویه گل‌سنگ‌ها و هم به کربوهیدرات‌های ذخیره‌ای آن‌ها وابسته هستند (Crawford, 2019).

جنس *Ramalina* در سراسر جهان گسترده است و بیش از ۲۴۰ گونه دارد (Wijayawardene et al., 2022) و از نظر تنوع، هجدهمین جنس متنوع در میان گل‌سنگ‌ها محسوب می‌شود (Lücking et al., 2016). این جنس تعداد قابل توجهی از گونه‌ها را دارد که پراکندگی جغرافیایی محدودی دارند (Pérez-Vargas & Pérez-Ortega, 2014; Sparrius et al., 2017). مطالعات این جنس، تنوعی از ترکیبات شیمیایی از جمله متابولیت‌های اولیه و ثانویه را نشان می‌دهد. در میان متابولیت‌های اولیه، کربوهیدرات‌ها بیشترین فراوانی را دارند. اسیدهای آمینه، گلیکولیپیدها، گلیکوسفنگولیپیدها و پلی‌ال‌ها نیز شناسایی شدند. از بین متابولیت‌های ثانویه، اوسنیک اسید حائز بیشترین اهمیت است که مشتقات این اسید شامل usimines (Lee et al., 2010; Paudel et al., 2011; Yim et al., 2011, 2010)، ایزواوسنیک اسید (González et al., 1992) و اوسنیک اسید (Asahina and Fuzikawa, 1932) نیز حضور دارند. سایر ترکیبات شیمیایی شامل دپسیدها، دپسیدون‌ها، اسیدهای چرب، استرول‌ها، تری‌ترین‌ها و ترکیبات آروماتیک منوسیکلیک نیز دیده می‌شود (Chi et al., 2021). برخی گونه‌های جنس *Ramalina* حاوی اوسنیک اسید با غلظت متغیر هستند (Culberson, 1967; Sheard, 1977; Culberson et al., 1993). ترکیبات مختلف شیمیایی دارای انواع متفاوتی (مانند مشتقات استیکتیک اسید یا سالازینیک اسید) با فعالیت‌های بیولوژیکی جالب مانند خواص ضد باکتریایی، ضد تکثیر (Lauterwein

جنگل‌های هیرکانی در شمال ایران، از پنج منطقه متفاوت کردکوی، شاهرود، گلگاه، گرگان و فریم طبق دستورالعمل‌ها و مقررات مربوط به سازمان حفاظت از ارقام گیاهی سازمان حفاظت محیط زیست ایران انجام گرفت. رویشگاه‌های مختلف برای این مطالعه انتخاب شدند به دلیل اینکه برخی محققان معتقد هستند که عوامل اکولوژیکی متنوع (مانند ارتفاع، رطوبت، دما، و جهت شیب) بر ترکیب‌های شیمیایی اکوتیپ‌های مختلف تاثیر گذار هست.

بررسی این تفاوت‌ها به درک تاثیر عوامل محیطی بر ترکیبات متابولیکی کمک می‌کند. این مناطق از جنگل‌های هیرکانی در شمال ایران انتخاب شده‌اند که دارای تنوع ارتفاعی و آب و هوایی بالایی هستند. تنوع این اکوتیپ‌ها در مکان‌های مختلف، زمینه‌ای برای مطالعه تفاوت‌های متابولیکی آنها فراهم می‌کند که می‌تواند ناشی از پاسخ‌های شیمیایی به شرایط زیستی باشد. جزئیات مکان‌ها و ویژگی‌های بوم‌شناسی رویشگاه‌ها در زیر آمده است (جدول ۱ و ۲)، همچنین نقشه پراکنش اکوتیپ‌های مربوطه در شکل ۱ نشان داده شده است. نمونه‌ها توسط متخصص مربوطه شناسایی گردید و نمونه‌های ووچر به موزه گل‌سنگ‌های ایران (IROST) تحویل داده شدند (<https://irost.org/museum>). تمام مواد شیمیایی و معرف‌های تجاری، از جمله استون تحلیلی برای استخراج، استونیتریل گرید LC-MS، آب با گرید LC-MS، اسید فرمیک، اسید گالیک، ۲۰۲ دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH)، اسید اسکوربیک و فولین سیکالتو از Merck (آلمان) خریداری گردید.

et al., 1995; Ingólfssdóttir, 2002) یا آنتی اکسیدانی (Lohézic-Le Dévéhat et al., 2007) می‌باشند.

علی رغم پراکنش گسترده *R. farinacea* در جهان، گزارش‌های پراکنده‌ای در مورد پروفیل فیتوشیمیایی این گونه وجود دارد (Bowler and Smith, 1976; Molho et al., 1979; Krog and Osthagen, 1980; Huneck and Yoshimura, 1996; Gasparyan and Sipman, 2016; Gazo et al., 2019). از سوی دیگر، انتظار می‌رود که شیموتایپ‌های متنوعی از متابولیت‌های ثانویه در اکوتیپ‌های مختلف یک گونه خاص به دلیل توزیع جغرافیایی، مطابق نتایج چندین مطالعه، وجود داشته باشد (Culberson, 1967; Fahselt and BeGora, 2001; Bjerke et al., 2003, 2005; Piercey-Normore, 2003, 2007). در این مطالعه، تفاوت بین اکوتیپ‌های *R. farinacea* که در مناطق مختلفی از ایران توزیع شده‌اند را، بر اساس تجزیه و تحلیل کیفی پروفیل‌های فیتوشیمیایی بررسی کردیم و نقش برخی پارامترهای اکولوژیکی را در ایجاد تغییرات در ویژگی‌های فیتوشیمیایی گل‌سنگ‌ها مورد بحث قرار دادیم. ما معتقدیم کروماتوگرافی مایع (LC) همراه با یونیزاسیون الکترواسپری طیف‌سنجی جرمی در چند مرحله (ESI-MS/MS)، می‌تواند یک روش قابل اعتماد برای آنالیزهای فیتوشیمیایی باشد که برای شناسایی دقیق متابولیت‌های ثانویه گل‌سنگ قابل استفاده است. بنابراین، در این مطالعه، برای اولین بار بر اساس LC-ESI-MS/MS، تلاش شد تا ترکیبات پنج اکوتیپ *R. farinacea* از ایران تعیین شود.

## مواد و روش‌ها

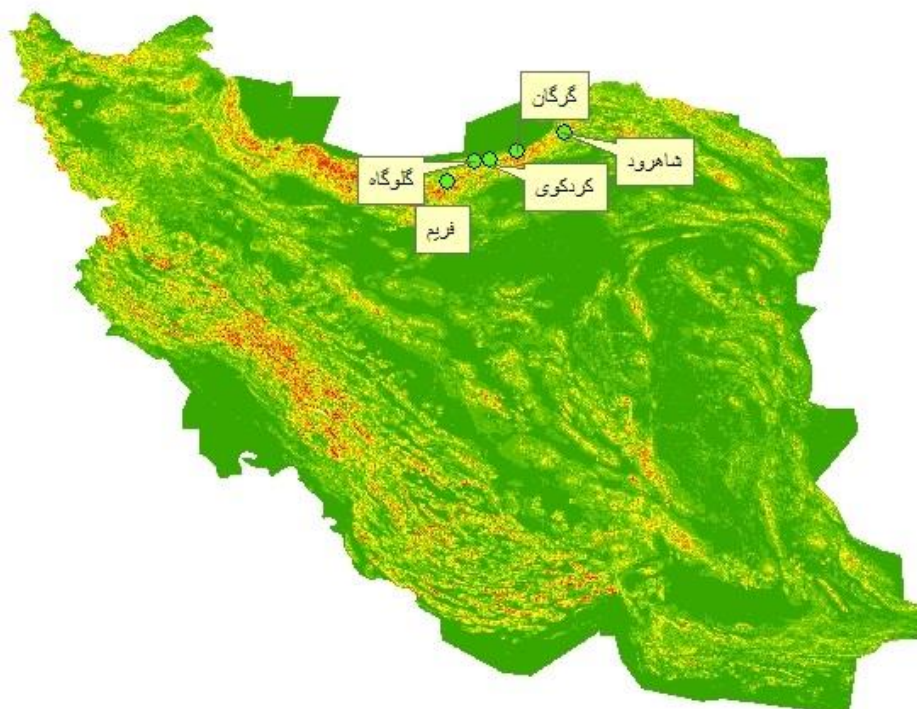
مواد و معرف‌های گل‌سنگ: جمع‌آوری نمونه‌ها از

جدول ۱: نمونه‌های گل‌سنگی مورد بررسی در این مطالعه: جزئیات مکان‌ها

| ردیف | جمعیت‌های <i>R. farinacea</i> | شماره هرباریوم | مختصات مکان‌ها         |
|------|-------------------------------|----------------|------------------------|
| ۱    | گلستان-کردکوی                 | ۳۱۳۵۵          | ۳۶.۶۶۷۸۹۶N, ۵۴.۱۶۴۵۳۷E |
| ۲    | سمنان-شاهرود                  | ۳۰۹۴۲          | ۳۷.۲۵۹۶۲۸N, ۵۵.۷۲۸۰۶۰E |
| ۳    | گلستان-گرگان                  | ۳۰۴۷۷          | ۳۶.۸۷۲۵۶۳N, ۵۴.۷۰۶۳۶۷E |
| ۴    | مازندران-فریم                 | ۳۰۲۱۷          | ۳۶.۲۲۰۰۸۴N, ۵۳.۲۷۲۴۳۴E |
| ۵    | مازندران-گلوگاه               | ۳۰۱۵۵          | ۳۶.۶۶۲۶۶N, ۵۳.۸۱۳۵۳E   |

جدول ۲: ویژگی‌های بوم‌شناسی رویشگاه‌ها

| رویشگاه         | ارتفاع | جهت شیب   | شیب   | بیشینه دما | میانگین دما | کمینه دما | بارندگی | رطوبت نسبی |
|-----------------|--------|-----------|-------|------------|-------------|-----------|---------|------------|
| گلستان-کردکوی   | ۲۵۰۰   | شمال غربی | ۲۲/۳۲ | ۳۲/۷۹      | ۲۲          | ۱۱/۹۱     | ۵۲۴     | ۶۶         |
| سمنان-شاهرود    | ۱۷۰۰   | غرب       | ۱۶/۷۵ | ۴۱/۶۹      | ۲۷          | ۱۲/۳۵     | ۵۸۶     | ۵۸         |
| گلستان-گرگان    | ۱۸۰    | غرب       | ۱/۹۱  | ۴۷/۳۵      | ۳۲          | ۱۶/۴۳     | ۶۶۵     | ۶۱         |
| مازندران-فریم   | ۹۲۰    | شمال      | ۱۹/۰۱ | ۳۸/۵       | ۲۶          | ۱۴/۱۹     | ۶۳۷     | ۶۲         |
| مازندران-گلوگاه | ۹۱۰    | جنوب شرق  | ۲/۸۲  | ۳۱/۸۷      | ۲۵          | ۱۸/۰۳     | ۸۷۳     | ۵۵         |



شکل ۱: نقشه پراکنش جغرافیایی اکوتیپ‌های مورد مطالعه

(۲۰۱۳) به شکل زیر انجام شد. پس از خشک شدن نمونه‌ها در هوا و تمیز کردن، مقدار ۱ گرم از هر گونه

عصاره گل‌سنگ: عصاره‌گیری به روش پیشنهادی Komaty و همکاران (۲۰۱۶) و Parrot و همکاران

با استفاده از ترازوی دیجیتالی توزین و با استفاده از هاون و دسته هاون و مقدار اندکی نیتروژن مایع به پودر یکنواختی تبدیل شد. سپس این پودر را با ۱۰ سی سی استون خالص درون فالکون حل کرده و مخلوط به مدت ۲ ساعت درون شیکر-انکوباتور مورد استخراج قرار گرفت. پس از سانتریفیوژ (۷۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد)، مایع رویی جدا شد، با کاغذ صافی واتمن درجه ۲ فیلتر و سپس در خلاء در دمای ۴۵ درجه سانتیگراد تغلیظ گردید. عصاره‌های خشک تا آنالیز بیشتر در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

**تعیین پروفیل شیمیایی جمعیت‌های *Ramalina farinacea* به وسیله LC-MS/MS:** آماده‌سازی نمونه: مقدار ۵ میلی گرم از عصاره استونی خشک هر نمونه در ۵ میلی لیتر متانول با درجه HPLC حل و در نهایت ۵ نمونه جهت آنالیز آماده شد.

**دستگاه کروماتوگرافی مایع مجهز به طیف سنجی جرمی LC-MS/MS:** دستگاه کروماتوگرافی مایع توسط شرکت واترز آمریکا ساخته شده و دارای اتوسمپلر، ستون ۱۰ سانتی متری آتلاتیس، مجهز به طیف سنجی جرمی بود.

**شرایط و ویژگی‌های به کار رفته برای کروماتوگرافی مایع (LC):** ستون ۱۰ سانتی متری آتلاتیس با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد مورد استفاده قرار گرفت. مرحله متحرک شامل استونیتریل و آب حاوی ۰/۱ درصد فرمیک اسید بود. مرحله متحرک طبق این برنامه گرادیانی مورد استفاده قرار گرفت: دقیقه صفر ۹۵ درصد آب و ۵ درصد استونیتریل که این حجم طی مدت ۲۰ دقیقه به ۵ درصد آب و ۹۵ درصد استونیتریل رسید و به مدت ۱۰ دقیقه به

صورت پایدار با همین میزان ادامه یافت. سرعت جریان مرحله متحرک ۰/۲۵ میلی لیتر بر دقیقه و حجم تزریق ۱۰ میکرولیتر از هر عصاره بود.

**شرایط و ویژگی‌های به کار رفته برای طیف سنجی جرمی (MS):** طیف سنجی جرمی مجهز به منبع یونیزاسیون افشانه الکترونی بود. آنالیز نمونه‌ها در حالت یون منفی و طبق این جزئیات صورت پذیرفت. ولتاژ روزنه ۳۰ ولت، ولتاژ لوله موئین ۳/۵ کیلوولت، دمای منبع یون ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد، انرژی برخورد ۳۰ الکترون ولت، گاز نیتروژن به عنوان افشاننده با جریان ۲۰۰ لیتر بر ساعت، دمای حذف حلال ۳۰۰ درجه سانتی گراد.

**تجزیه به مؤلفه‌های اصلی گونه‌های *Ramalina* بر اساس نتایج LC-MS/MS:** جهت ارزیابی تفاوت‌های فیتوشیمیایی موجود بین نمونه‌های مورد بررسی، روش LC-MS/MS انجام شد. سرانجام، ارزیابی داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار MZmine 2.53 انجام شد. پایگاه داده طیف‌های MS/MS متابولیت‌های گل‌سنگ (Olivier-Jimenez et al., 2019) که توسط GNPS میزبانی می‌شود، برای حاشیه‌نویسی اولیه برخی از ترکیبات شناسایی شده استفاده گردید.

**نقشه جهت شیب<sup>۱</sup>:** برای تولید نقشه جهت شیب ایران و مناطق مورد مطالعه، از داده‌های توپوگرافی ایران ارائه شده توسط ArcGIS Online استفاده کرده و سپس با استفاده از نرم‌افزار ArcGIS (ArcMap) 10.8، توانستیم داده‌های توپوگرافی را به یک مدل رقومی ارتفاعی (DEM) تبدیل کنیم. ابزارهای تحلیل فضایی<sup>۲</sup> برای تولید نقشه جهت شیب ایران از DEM مورد استفاده قرار گرفتند.

<sup>۱</sup> Aspect map

<sup>۲</sup> Spatial analyst tools

## آنالیزهای آماری

برای بررسی وجود یا نبود رابطه خطی بین متغیرهای مطالعه شده در سه تکرار، ضرایب همبستگی ساده پیرسون بین صفات محاسبه شد. تمامی تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار IBM SPSS Statistics 27 انجام گردید.

## نتایج

در این مطالعه، آنالیز فیتوشیمیایی پنج اکوتیپ *R. farinacea* انجام شد که اولین پروفیل‌سازی متابولیک این گونه در ایران با استفاده از LC-ESI-MS/MS منجر به شناسایی ۱۳ ترکیب شناخته شده و ۲ ترکیب ناشناخته شد (جدول ۳). مواد اصلی شناسایی شده در این اکوتیپ‌ها عمدتاً از نوع دیسیدها، دیسیدون‌ها و ترکیبات آروماتیک تک‌حلقه‌ای بودند. تنوع گسترده‌ای بین اکوتیپ‌ها مشاهده گردید. متنوع‌ترین پروفیل متابولیک برای اکوتیپ کردکوی تشخیص داده شد که نشان‌دهنده

حضور ۱۴ مورد از ۱۵ ترکیب شناسایی شده بود. بر اساس تنوعی که توصیف شد، می‌توانیم ادعا کنیم که تفاوت‌های اکولوژیکی تغییراتی را در پروفیل متابولیسم *R. farinacea* اعمال می‌کنند. با این حال، ما نیاز به مطالعه تأثیر عوامل محیطی مختلف و همچنین تغییرات ژنتیکی بین اکوتیپ‌ها داریم تا دلیل اصلی تفاوت‌های شیمیایی مشخص شود. علاوه بر این، ساختار و ماهیت ترکیب ناشناخته در  $m/z$  ۱۸۷ و ۲۸۰ باید با روش‌های بنیادی مطالعه شود.

تفاوت‌های کیفی (مانند وجود یا عدم وجود یک ترکیب خاص) بین پروفیل‌های فیتوشیمیایی برخی اکوتیپ‌ها، مانند عدم وجود Ramalinaic acid و Squamatic acid در اکوتیپ‌های فریم و گلوگاه یا وجود Evernic acid در اکوتیپ کردکوی و گلوگاه (جدول ۳)، می‌تواند به عنوان نوعی تغییر کمی توجیه شوند.



شکل ۲: نمودار نشان دهنده ارتباط بین اکوتیپ‌ها و متابولیت‌ها

جدول ۳: ویژگی‌های ترکیبات اصلی اکوتیپ‌های *R. farinacea* شناسایی شده با استفاده از LC-ESI-MS/MS

| شماره | فرمول مولکولی         | جرم مولکولی | $[M-H]^-$<br>$m/z$ | شناسایی                            | اکوتیپ<br>کردکوی | شاهرود | گرگان | فریم | گلوگاه |
|-------|-----------------------|-------------|--------------------|------------------------------------|------------------|--------|-------|------|--------|
|       | منوسیکلیک<br>آروماتیک |             |                    |                                    |                  |        |       |      |        |
| ۱     | $C_8H_7O_3$           | ۱۵۱         | ۱۵۱                | آترانول                            | +                | +      | +     | +    | +      |
| ۲     | $C_{10}H_{12}O_4$     | ۱۹۶/۲۰۲     | ۱۹۷                | دیواریک اسید                       | +                | +      | +     | +    | +      |
|       | دپسید                 | 389.236     |                    |                                    |                  |        |       |      |        |
| ۳     | $C_{17}H_{15}O_7$     | ۳۳۱/۳۰۰     | ۳۳۱                | اورنیک اسید                        | +                |        |       |      | +      |
| ۴     | $C_{18}H_{16}O_8$     | ۳۶۰/۳۱۸     | ۳۶۰                | رامالینیک اسید                     | +                | +      | +     |      |        |
| ۵     | $C_{19}H_{17}O_9$     | ۳۸۹/۳۳۶     | ۳۸۹                | اسکواماتیک<br>اسید                 | +                | +      | +     |      |        |
| ۶     | $C_{22}H_{27}O_8$     | ۴۱۹/۴۵۰     | ۴۱۸                | سکیکائیک اسید                      | +                | +      | +     |      |        |
| ۷     | $C_{21}H_{24}O_8$     | ۴۰۴/۴۱۵     | ۴۰۳                | ۴-O-متیل<br>نورسکیکائیک<br>اسید    | +                | +      | +     | +    |        |
|       | دپسیدون               |             |                    |                                    |                  |        |       |      |        |
| ۸     | $C_{25}H_{26}O_9$     | ۴۷۰/۴۷۴     | ۴۹۰                | گلوملونیک اسید                     | +                | +      | +     |      |        |
| ۹     | $C_{18}H_{16}O_9$     | ۳۷۶/۳۱۷     | ۳۷۶                | کنپروتوستراریک<br>اسید             | +                | +      | +     |      |        |
|       | دی بنزوفوران          |             |                    |                                    |                  |        |       |      |        |
| ۱۰    | $C_{18}H_{15}O_7$     | ۳۴۳/۳۱۱     | ۳۴۳                | اوسنیک اسید                        | +                | +      | +     | +    | +      |
|       | اسید چرب              |             |                    |                                    |                  |        |       |      |        |
| ۱۱    | $C_{17}H_{29}O_4$     | ۲۹۶/۳۹      | ۲۹۷                | نفروستربینیک<br>اسید               | +                | +      | +     |      |        |
| ۱۲    | $C_{18}H_{33}O_4$     | ۳۱۳/۴۵۸     | ۳۱۳                | دی هیدروکسی<br>اکتادسنوئیک<br>اسید | +                | +      | +     |      |        |
| ۱۳    | $C_{19}H_{15}O_9$     | ۳۸۷/۲۲۰     | ۳۸۷                | هیپوکانتیکتیک<br>اسید              | +                |        |       | +    | +      |
| ۱۴    |                       |             | ۱۸۷                | ناشناخته ۱                         |                  | +      | +     | +    | +      |
| ۱۵    |                       |             | ۲۸۰                | ناشناخته ۲                         | +                | +      | +     | +    | +      |

## بحث

(et al., 2022) که نتایج مطالعه اخیر هم حضور این

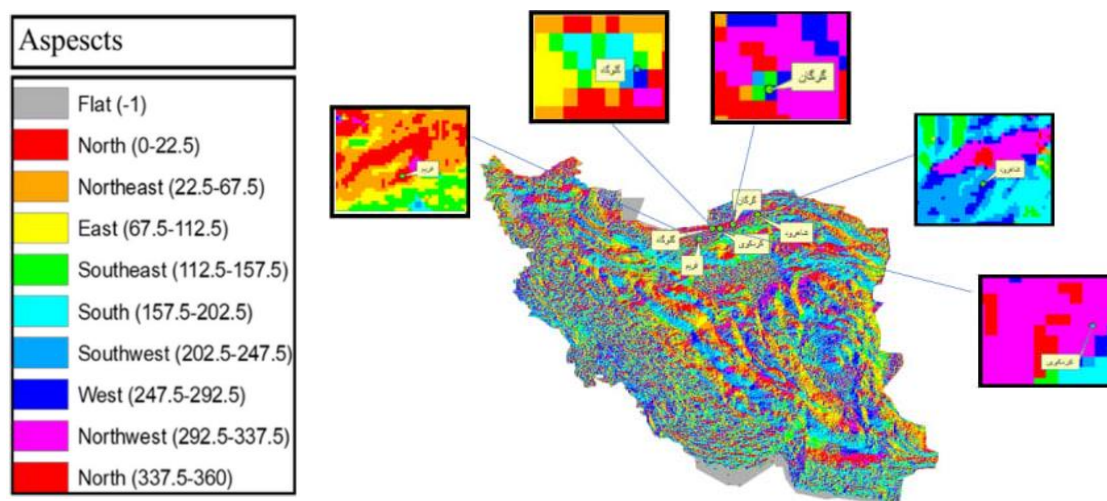
ترکیب را در تمامی اکوتیپ‌های مورد مطالعه  
*R. farinacea* نشان می‌دهد. مطالعات پیشین وجود  
Divaric acid را در *R. africana* (Shukla et al.,  
2004) و *R. americana* (Culberson et al., 1999)  
نشان می‌دهد، درحالی‌که در مطالعات ما در همه

نتایج ما تطابق قابل توجهی با نتایج گزارش شده  
در مطالعات دیگر در شناسایی Atranol نشان می‌دهد  
(Albornoz et al., 2022; Huneck and Yoshimura,  
1996; Musharraf et al., 2015; Shukla et al.,  
2004) در پژوهشی Kumar و همکاران، Atranol را  
در *R. conduplicans* Vain گزارش کردند (Kumar

- Yoshimura, 1996) و *Xanthoparmelia subincerta* (Elix, 2014) گزارش شده و نتایجی مبنی بر وجود این متابولیت در گلسنگ *Ramalina* تاکنون منتشر نشده تا اینکه نتایج این تحقیق حضور این ماده را در اکوتیپ‌های *R. farinacea* در کردکوی، شاهرود و گرگان نشان داد. Conprotocetraric acid پیش از این تنها برای گونه‌ی *Usnea trichodeoides* گزارش شده بود (Elix, 2014; Huneck and Yoshimura, 1996) و در این تحقیق برای اکوتیپ‌های کردکوی، شاهرود و گرگان *R. farinacea* بیان شد. گزارش‌های متعددی از حضور Usnic acid در گونه‌های متفاوت *Ramalina* مانند *R. africana* (Shukla et al., 2004)، *R. asahinae* (Culberson and Culberson, 1976) (Gasparyan and Sipman, 2016; Tay R. *farinacea* et al., 2004) و *R. panizzei* (Gasparyan and Sipman, 2016) و ... در دسترس است. متابولیت مذکور در تمامی اکوتیپ‌های مورد مطالعه یافت گردید. همچنین Nephrosterinic acid برای گونه *R. almquistii* Vain گزارش شده بود (Hirayama et al., 1980; Moreira et al., 2015; Shukla et al., 2004) که در مطالعه اخیر برای اکوتیپ‌های *R. farinacea* از کردکوی، شاهرود و گرگان دیده شد. در مطالعات پیشین Dihydroxyoctadecenoic acid برای جنس *Sticta* از شیلی و کلمبیا گزارش شده بود (Albornoz et al., 2022) و در این تحقیق برای اولین بار در ۳ اکوتیپ *R. farinacea* کردکوی، شاهرود و گرگان دیده شد. Hypoconstictic acid در جنس *sticta* در کلمبیا و شیلی معرفی شده بود (Albornoz et al., 2022) و هم اکنون در سه اکوتیپ کردکوی، فریم و گلوگاه مشاهده گردید. و در نهایت دو متابولیت شناخته نشده که در همه‌ی اکوتیپ‌ها حضور داشت نیز یافت شد. چنین انعطاف‌پذیری شیمیایی یک واکنش استراتژیک قابل اکوتیپ‌های مورد بررسی این ترکیب حضورداشت. حضور Evernic acid در گونه‌های متعددی از *Ramalina* مانند *pollinaria* R. *europaea* R. *obtusata* R. *fastigiata* R. *carpatica* R. *breviuscula* R. *labiosorediata* تأیید شد (Gasparyan et al., 2017; Gasparyan and Sipman, 2016; Sérusiaux et al., 2010) مطالعات اخیر تنها در دو اکوتیپ کردکوی و گلوگاه وجود دارد. حضور Ramalinaic acid در بررسی‌های متابولیت‌های جنس *Ramalina* (Moreira et al., 2015) و گونه‌ی *R. americana* تأیید شده بود (Elix, 1996) Huneck and Yoshimura, 2014. Squamatic acid در *R. sinensis* توسط Koopaie و همکاران (۲۰۲۳) نشان داده شد، پیش از آن این متابولیت در جنس *sticta* در کلمبیا و شیلی معرفی شده بود (Albornoz et al., 2022). Sekikaic acid در *R. peruviana* R. *glaucescens* R. *geniculata* (Walker and Lintott, 1997) *R. farinacea* (Molho et al., 1979) *R. dumeticola* (Stevens, 1983) *R. panizzei* و *R. calicaris* (Sipman, 2016) *R. calicaris* R. *intermedia* (Gasparyan et al., 2017) *R. crispans* R. *pusilla* R. *asahinae* R. *pitardii nodosa* (Spjut et al., 2020) دیده شده است. این سه متابولیت تنها در سه اکوتیپ کردکوی، شاهرود و گرگان وجود داشتند. 4'-O-Methyl norsekikaic acid برای *R. farinacea* (Unal et al., 2008) *R. luciae* (Molho et al., 1981) *R. dumeticola* (Stevens, 1983) گزارش گردیده است و در نتایج به دست آمده از این تحقیق هم این متابولیت در چهار اکوتیپ کردکوی، گرگان، شاهرود و فریم دیده شده است. Glomellonic acid تنها در دو تاکسون گلسنگی *Neofuscelia subincerta* (Huneck and Yoshimura, 1996) و *Xanthoparmelia subincerta* (Elix, 2014) گزارش شده و نتایجی مبنی بر وجود این متابولیت در گلسنگ *Ramalina* تاکنون منتشر نشده تا اینکه نتایج این تحقیق حضور این ماده را در اکوتیپ‌های *R. farinacea* در کردکوی، شاهرود و گرگان نشان داد. Conprotocetraric acid پیش از این تنها برای گونه‌ی *Usnea trichodeoides* گزارش شده بود (Elix, 2014; Huneck and Yoshimura, 1996) و در این تحقیق برای اکوتیپ‌های کردکوی، شاهرود و گرگان *R. farinacea* بیان شد. گزارش‌های متعددی از حضور Usnic acid در گونه‌های متفاوت *Ramalina* مانند *R. africana* (Shukla et al., 2004)، *R. asahinae* (Culberson and Culberson, 1976) (Gasparyan and Sipman, 2016; Tay R. *farinacea* et al., 2004) و *R. panizzei* (Gasparyan and Sipman, 2016) و ... در دسترس است. متابولیت مذکور در تمامی اکوتیپ‌های مورد مطالعه یافت گردید. همچنین Nephrosterinic acid برای گونه *R. almquistii* Vain گزارش شده بود (Hirayama et al., 1980; Moreira et al., 2015; Shukla et al., 2004) که در مطالعه اخیر برای اکوتیپ‌های *R. farinacea* از کردکوی، شاهرود و گرگان دیده شد. در مطالعات پیشین Dihydroxyoctadecenoic acid برای جنس *Sticta* از شیلی و کلمبیا گزارش شده بود (Albornoz et al., 2022) و در این تحقیق برای اولین بار در ۳ اکوتیپ *R. farinacea* کردکوی، شاهرود و گرگان دیده شد. Hypoconstictic acid در جنس *sticta* در کلمبیا و شیلی معرفی شده بود (Albornoz et al., 2022) و هم اکنون در سه اکوتیپ کردکوی، فریم و گلوگاه مشاهده گردید. و در نهایت دو متابولیت شناخته نشده که در همه‌ی اکوتیپ‌ها حضور داشت نیز یافت شد. چنین انعطاف‌پذیری شیمیایی یک واکنش استراتژیک قابل

(Bjerke et al., 2005; Culberson, 1967)، ارتفاع زیستگاه (Shukla et al., 2016) و نوسانات دمایی (Bjerke et al., 2003) باشد. بنابراین، تغییرات فیتوشیمیایی را در یک گونه تحت شرایط آب و هوایی مختلف انتظار داریم.

توجه گل‌سنگ‌ها به مناطق اکولوژیکی مختلف است. داده‌ها از تعدادی مطالعه تأیید می‌کنند که نوسانات متابولیت‌های ثانویه در تال گل‌سنگ‌ها، به ویژه در اکوتیپ‌های یک گونه خاص، می‌تواند تحت تأثیر عوامل مختلف محیطی مانند پراکنش جغرافیایی



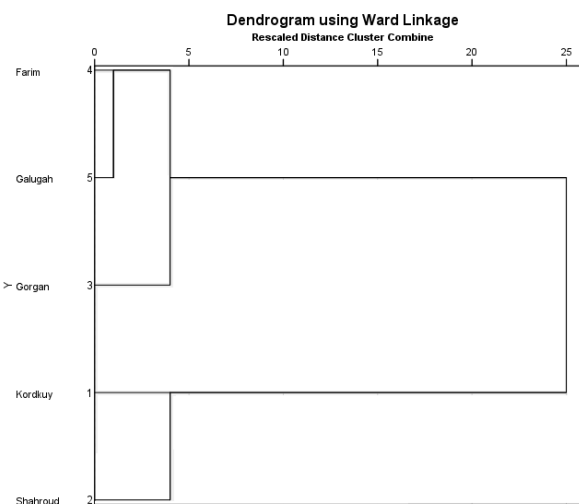
شکل ۳: نقشه جهت شیب ایران و محل‌های اکوتیپ‌های مورد مطالعه

شباهت اکوتیپ‌ها در وجود ترکیبات مشترک در همه آن‌ها می‌باشد که احتمالاً ترکیبات پایه‌ای و ضروری برای بقای *R. farinacea* هستند. تفاوت‌های مشاهده شده در برخی ترکیبات را می‌توان به عوامل اکولوژیکی مرتبط دانست. اکوتیپ‌هایی که در مناطق در جهت شیب نزدیک به هم شمال غربی (کردکوی) و غرب (شاهرود و گرگان) قرار دارند، الگوهای شیمیایی متفاوتی از مناطق در جهت شیب متفاوت شمال و جنوب شرقی (فریم و گلوگاه) دارند. همچنین وجود اورنیک اسید که تنها در کردکوی و گلوگاه و هیپوکانستیکتیک اسید که در کردکوی و فریم و گلوگاه مشاهده شده‌است می‌تواند به دلیل تأثیر دما باشد.

مطالعات ما نشان دادند که ترکیب‌های شیمیایی گل‌سنگ *R. farinacea* در اکوتیپ‌های مختلف متنوع بوده و الگوی مشخصی در پراکنش این متابولیت‌ها دیده می‌شود. ترکیبات به سه گروه اصلی تقسیم می‌شوند: ۱) ترکیبات مشترک بین همه اکوتیپ‌ها مانند آترانول، دیواریک اسید، اوسنیک اسید و ترکیب ناشناخته ۲؛ ۲) ترکیبات موجود در برخی اکوتیپ‌ها مانند رامالینیک اسید، اسکواماتیک اسید، سکیکائیک اسید، ۴-۵ متیل نورسکیکائیک اسید، گلومولونیک اسید، کنپروتوستراریک اسید، نفروسترینیک اسید، دی هیدروکسی اکتادسنوئیک اسید، ناشناخته ۱؛ ۳) ترکیبات منحصربه‌فرد در اکوتیپ‌های خاص مانند اورنیک اسید و هیپوکانستیکتیک اسید.

نیز در فاصله تاکسونومیکی حدود ۴ دارای دو شیموتایپ کردکوی و شاهرود می‌باشد. ضرائب همبستگی صفات اندازه‌گیری شده روی اکوتیپ‌های مورد مطالعه در جدول ۴ ارائه شده است. همانطور که مشاهده می‌شود شیموتایپ‌ها با جهت شیب، ارتفاع، رطوبت، بیشینه و میانگین دما همبستگی مثبت داشته و با جهت شیب، کمینه دما و میزان بارندگی همبستگی منفی دارند.

براساس تحلیل خوشه‌ای با روش Ward و با توجه به شرایط اکولوژیکی، شیموتایپ‌های *R. farinacea* در فاصله تاکسونومیکی ۲۵ در دو خوشه اصلی قرار دارند. خوشه اول در فاصله تاکسونومیک حدود ۴ به دو زیر خوشه تقسیم می‌شود که در زیر خوشه‌ی اول دو شیموتایپ فریم و گلوگاه با ضریب تشابه بالا قرار دارند و در زیر خوشه‌ی دوم شیموتایپ گرگان قرار گرفته است. خوشه اصلی دوم



شکل ۴: دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای به روش Ward

جدول ۴: ضریب همبستگی صفات مورد مطالعه برای اکوتیپ‌های *R. farinacea*

|             | Evermic_acid               | Ramalinaic_acid | Squamatic_acid | Sekikaic_acid | O_Methyl_norsekikaic_acid | Glomellonic_acid | Conproctetraric_acid | Nephrosterinic_acid | Dihydroxyoctadecenoic_acid | Hypoconstictic_acid | Unknown1 | slope_direction | altitude | slope | mau_tem | mean_tem | min_tem | precipitation | humidity |
|-------------|----------------------------|-----------------|----------------|---------------|---------------------------|------------------|----------------------|---------------------|----------------------------|---------------------|----------|-----------------|----------|-------|---------|----------|---------|---------------|----------|
| Correlation | Evermic_acid               | 1.000           | -.167          | -.167         | -.167                     | -.612            | -.167                | -.167               | -.167                      | -.667               | -.612    | -.910           | 482      | .001  | -.868   | -.726    | 135     | 287           | 022      |
|             | Ramalinaic_acid            | -.167           | 1.000          | 1.000         | 1.000                     | .612             | 1.000                | 1.000               | 1.000                      | -.667               | -.408    | 560             | 335      | 158   | 463     | 225      | -.531   | -.677         | 417      |
|             | Squamatic_acid             | -.167           | 1.000          | 1.000         | 1.000                     | .612             | 1.000                | 1.000               | 1.000                      | -.667               | -.408    | 560             | 335      | 158   | 463     | 225      | -.531   | -.677         | 417      |
|             | Sekikaic_acid              | -.167           | 1.000          | 1.000         | 1.000                     | .612             | 1.000                | 1.000               | 1.000                      | -.667               | -.408    | 560             | 335      | 158   | 463     | 225      | -.531   | -.677         | 417      |
|             | O_Methyl_norsekikaic_acid  | -.612           | .612           | .612          | .612                      | 1.000            | .612                 | .612                | .612                       | -.408               | -.250    | 772             | 208      | 572   | 572     | 215      | -.734   | -.914         | 726      |
|             | Glomellonic_acid           | -.167           | 1.000          | 1.000         | 1.000                     | .612             | 1.000                | 1.000               | 1.000                      | -.667               | -.408    | 560             | 335      | 158   | 463     | 225      | -.531   | -.677         | 417      |
|             | Conproctetraric_acid       | -.167           | 1.000          | 1.000         | 1.000                     | .612             | 1.000                | 1.000               | 1.000                      | -.667               | -.408    | 560             | 335      | 158   | 463     | 225      | -.531   | -.677         | 417      |
|             | Nephrosterinic_acid        | -.167           | 1.000          | 1.000         | 1.000                     | .612             | 1.000                | 1.000               | 1.000                      | -.667               | -.408    | 560             | 335      | 158   | 463     | 225      | -.531   | -.677         | 417      |
|             | Dihydroxyoctadecenoic_acid | -.167           | 1.000          | 1.000         | 1.000                     | .612             | 1.000                | 1.000               | 1.000                      | -.667               | -.408    | 560             | 335      | 158   | 463     | 225      | -.531   | -.677         | 417      |
|             | Hypoconstictic_acid        | .667            | -.667          | -.667         | -.667                     | -.408            | -.667                | -.667               | -.667                      | 1.000               | -.408    | -.840           | 316      | 310   | -.864   | -.776    | .067    | 218           | 198      |
|             | Unknown1                   | -.612           | -.408          | -.408         | -.408                     | -.250            | -.408                | -.408               | -.408                      | -.408               | 1.000    | 343             | -.798    | -.573 | 492     | 874      | 569     | 583           | -.753    |
|             | slope_direction            | -.910           | 560            | 560           | 560                       | 772              | 560                  | 560                 | 560                        | -.840               | 343      | 1.000           | -.264    | .066  | 924     | 705      | -.336   | -.525         | 157      |
|             | altitude                   | 482             | 335            | 335           | 335                       | 208              | 335                  | 335                 | 335                        | 316                 | -.798    | -.264           | 1.000    | 790   | -.571   | -.824    | -.790   | -.583         | 450      |
|             | slope                      | .001            | 158            | 158           | 158                       | 572              | 158                  | 158                 | 158                        | 310                 | -.573    | .066            | 790      | 1.000 | -.294   | -.641    | -.912   | -.777         | 638      |
|             | mau_tem                    | -.868           | 463            | 463           | 463                       | 572              | 463                  | 463                 | 463                        | -.864               | 482      | 924             | -.571    | -.294 | 1.000   | 917      | 024     | -.244         | 014      |
|             | mean_tem                   | -.726           | 225            | 225           | 225                       | 215              | 225                  | 225                 | 225                        | -.776               | 674      | 705             | -.824    | -.641 | 917     | 1.000    | 420     | 152           | -.260    |
|             | min_tem                    | 135             | -.531          | -.531         | -.531                     | -.734            | -.531                | -.531               | -.531                      | .067                | 569      | -.336           | -.790    | -.912 | 024     | 420      | 1.000   | 923           | -.635    |
|             | precipitation              | 287             | -.677          | -.677         | -.677                     | -.914            | -.677                | -.677               | -.677                      | 218                 | 583      | -.525           | -.583    | -.777 | -.244   | 152      | 923     | 1.000         | -.804    |
|             | humidity                   | 022             | 417            | 417           | 417                       | 726              | 417                  | 417                 | 417                        | 198                 | -.753    | 157             | 450      | 638   | 014     | -.260    | -.635   | -.804         | 1.000    |

a. Determinant = .000

b. This matrix is not positive definite.

## نتیجه‌گیری

حال، برای مشخص شدن علت اصلی این تفاوت‌های شیمیایی، مطالعه‌ی اثرات عوامل محیطی مختلف و همچنین بررسی تفاوت‌های ژنتیکی بین اکوتیپ‌ها ضروری است. علاوه بر این، ساختار و ماهیت ترکیبات ناشناخته با جرم مولکولی ( $m/z$  187, 280) باید با روش‌های بنیادی مورد بررسی قرار گیرد.

## سپاسگزاری

بدین وسیله از آقای هومن نوروزی به دلیل مشاوره‌های ارزشمندشان در بحث شیمی قدردانی می‌گردد. تعارض منافع تعارض منافعی بین نویسندگان وجود ندارد.

در این مطالعه، اولین پروفایل متابولیکی از *R. farinacea* با استفاده از LC-ESI-MS/MS منجر به شناسایی پانزده ترکیب شد. تغییرات گسترده‌ای در میان اکوتیپ‌ها مشاهده شد و متنوع‌ترین پروفایل متابولیکی مربوط به اکوتیپ کردکوی بود که ۱۴ مورد از ۱۵ ترکیب شناسایی شده را در خود داشت. بر اساس این تغییرات، می‌توان نتیجه گرفت که تفاوت‌های اکولوژیکی از جمله جهت شیب، ارتفاع، رطوبت، بیشینه و میانگین دما و... تغییراتی را در پروفایل متابولیکی *R. farinacea* ایجاد می‌کنند. با این

## References

- Albornoz, L., Torres-Benítez, A., Moreno-Palacios, M., Simirgiotis, M. J., Montoya-Serrano, S. A., Sepulveda, B., Stashenko, E., García-Beltrán, O., and Areche, C. (2022). Phylogenetic studies and metabolite analysis of *Sticta* species from Colombia and Chile by Ultra-High Performance Liquid Chromatography-High Resolution-Q-Orbitrap-Mass Spectrometry. *Metabolites*, 12(2): 156. <https://doi.org/10.3390/metabo12020156>
- Asahina, Y., and Fuzikawa, F. (1932). Untersuchungen über flechtenstoffe, XI. Mitteil.: Über die konstitution der obtusatsäure. *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft (A and B Series)*, 65(4): 580–583. <https://doi.org/10.1002/cber.19320650415>
- Bačkor, M., Kecsey, D., Drábová, B., Urminská, D., Šemeláková, M., Goga, M. (2024). Secondary metabolites from Australian lichens *Ramalina celastri* and *Stereocaulon ramulosum* affect growth and metabolism of photobiont *Asterochloris erici* through allelopathy. *Molecules*, 29: 4620. <https://doi.org/10.3390/molecules29194620>
- Bjerke, J. W., Zielke, M., and Solheim, B. (2003). Long- term impacts of simulated climatic change on secondary metabolism, thallus structure and nitrogen fixation activity in two cyanolichens from the Arctic. *New Phytologist*, 159(2): 361–367. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00812.x>
- Bjerke, W., Elvebakk, A., Domínguez, E., and Dahlback, A. (2005). Seasonal trends in usnic acid concentrations of Arctic, Alpine and Patagonian populations of the lichen *Flavocetraria nivalis*. *Phytochemistry*, 66: 337–344. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.12.007>
- Boustie, J., and Grube, M. (2005). Lichens—a promising source of bioactive secondary metabolites. *Plant Genetic Resources*, 3(2): 273–287. <https://doi.org/10.1079/PGR200572>
- Bowler, P. A., and Smith, C. W. (1976). *Ramalina farinacea* in Hawaii. *Bryologist*, 79: 499–501.
- Chi, H. B. L., Linh, N. T. T., Hanh, L. H., Linh, P. H., Tuyen, P. N. K., Phat, N. T., and Tuyet, N. T. A. (2021). Triterpenoids and steroids from the lichen *Ramalina peruviana* Arch. *Vietnam Journal of Chemistry*, 59(4): 451–456. <https://doi.org/10.1002/vjch.202000174>
- Crawford, S. (2019). Lichens used in traditional medicine. In: *Lichen Secondary Metabolites*, pp. 31–97. (2nd ed.) ed. B. Ranković. Cham. Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-16814-8\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-030-16814-8_2)
- Culberson, C. F., LaGreca, S., Johnson, A., and Culberson, W. L. (1999). Trivariic acid, a new tridepside in the *Ramalina americana* chemotype complex (Lichenized Ascomycota: Ramalinaceae). *The Bryologist*, 102(4): 595. <https://doi.org/10.2307/3244249>

- Culberson, W. L. (1967). Analysis of chemical and morphological variation in the *Ramalina siliquosa* Species Complex. *Brittonia*, 19(4): 333. <https://doi.org/10.2307/2805533>
- Culberson, W. L., and Culberson, C. F. (1976). *Ramalina asahinae*, a new boninic acid-producing species from Mexico. *The Journal of Japanese Botany*, 51: 374–376.
- Culberson, W. L., Culberson, C. F., and Johnson, A. (1993). Speciation in Lichens of the *Ramalina siliquosa* Complex (Ascomycotina, Ramalinaceae): Gene Flow and Reproductive Isolation. *American Journal of Botany*, 80(12): 1472. <https://doi.org/10.2307/2445677>
- Elix, J. A. (2014). *A catalogue of standardized chromatographic data and biosynthetic relationships for lichen substances* (3rd ed). Research School of Chemistry, Australian National University.
- Fahselt, D., BeGora, M. (2001). Usnic acid and atranorin concentrations in lichens in relation to bands of UV irradiance. *Bryologist*, 104: 134–140.
- Gasparyan, A., Sipman, H. J. M., and Lücking, R. (2017). *Ramalina europaea* and *R. labiosorediata*, two new species of the *R. pollinaria* group (Ascomycota: Ramalinaceae), and new typifications for *Lichen pollinarius* and *L. squarrosus*. *Lichenologist*, 49(4): 301–319. <https://doi.org/10.1017/S0024282917000226>
- Gasparyan, A., and Sipman, H. J. M. (2016). The epiphytic lichenized fungi in Armenia: diversity and conservation. *Phytotaxa*, 281(1): 1. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.281.1.1>
- Gazo, S. M. T., Santiago, K. A. A., Tjitrosoedirdjo, S. S., and Dela Cruz, T. E. E. (2019). Antimicrobial and herbicidal activities of the fruticose lichen *Ramalina* from Guimaras Island, Philippines. *Biotropia*, 26(1): 23–32.
- González, A., Barrera, J., Pérez, E., and Padrón, C. (1992). Chemical Constituents of the Lichen *Ramalina hierrensis*. *Planta Medica*, 58(02): 214–218. <https://doi.org/10.1055/s-2006-961433>
- Hirayama, T., Fujikawa, F., Kasahara, T., Otsuka, M., Nishida, N., and Mizuno, D. (1980). Anti-tumor activities of some lichen products and their degradation products. *Yakugaku Zasshi*, 100: 755–759.
- Huneck, S., and Yoshimura, I. (1996). *Identification of Lichen Substances*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-85243-5>
- Ingólfssdóttir, K. (2002). Usnic acid. *Phytochemistry*, 61(7): 729–736. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00383-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00383-7)
- Komaty, S., Letertre, M., Duong Dang, H., Jungnickel, H., Laux, P., Luch, A., Carrié, D., Conanec, O. M., Bazureau, J. P., Gauffre, F., Tomasi, S., and Paquin, L. (2016). Sample preparation for an optimized extraction of localized metabolites in lichens: Application to *Pseudevernia furfuracea*. *Talanta*, 150: 525–30. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.12.081>
- Koopae, M., Karimi, H., Sohrabi, M., and Norouzi, H. (2023). Cytotoxic, anti-proliferative, and apoptotic evaluation of *Ramalina sinensis* (Ascomycota, Lecanoromycetes), lichenized fungus on oral squamous cell carcinoma cell line; in-vitro study. *BMC Complementary Medicine and Therapies*. 23(1): 296. <http://dx.doi.org/10.1186/s12906-023-04118-1>
- Krog, H., and Osthagen, H. (1980). The genus *Ramalina* in the Canary Island. *Norwegian Journal of Botany*, 27: 255–296.
- Kumar, T. K., Siva, B., Anand, A., Anusha, K., Mohabe, S., Reddy, A. M., Le Devehat, F., Tiwari, A. K., Boustie, J., and Babu, K. S. (2022). Comprehensive Lichenometabolomic Exploration of *Ramalina conduplicans* Vain Using UPLC-Q-ToF-MS/MS: An Identification of Free Radical Scavenging and Anti-Hyperglycemic Constituents. *Molecules*, 27(19): 6720. <https://doi.org/10.3390/molecules27196720>
- Lauterwein, M., Oethinger, M., Belsner, K., Peters, T., and Marre, R. (1995). In vitro activities of the lichen secondary metabolites vulpinic acid, (+)-usnic acid, and (-)-usnic acid against aerobic and anaerobic microorganisms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(11): 2541–2543. <https://doi.org/10.1128/AAC.39.11.2541>
- Lee, S. G., Koh, H. Y., Oh, H., Han, S. J., Kim, I.-C., Lee, H. K., and Yim, J. H. (2010). Human dermal fibroblast proliferation activity of usimine-C from Antarctic lichen *Ramalina*

- terebrata*. *Biotechnology Letters*, 32(4): 471–475. <https://doi.org/10.1007/s10529-009-0191-2>
- Lohézic-Le Dévéhat, F., Tomasi, S., Elix, J. A., Bernard, A., Rouaud, I., Uriac, P., and Boustie, J. (2007). Stictic acid derivatives from the lichen *Usnea articulata* and their antioxidant activities. *Journal of Natural Products*, 70(7): 1218–1220. <https://doi.org/10.1021/np070145k>
- Lücking, R., Hodkinson, B.P., Leavitt, S.D. (2017). The 2016 classification of lichenized fungi in the Ascomycota and Basidiomycota– Approaching one thousand genera. *The Bryologist*, 119: 361–416.
- Molho, D., Bodo, B., Culberson, W. L., and Culberson, C. F. (1981). A chemically distinctive new *Ramalina* from Fiji. *The Bryologist*, 84(3): 396. <https://doi.org/10.2307/3242860>
- Molho, L., Bodo, B., and Molho, D. (1979). L'acide 6 O-méthyl-4' norsékikaïque, nouveau meta-depside isolé, d'un lichen du genre *Ramalina*. *Phytochemistry*, 18(12): 2049–2051. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)82741-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)82741-7)
- Moreira, A., Braz-Filho, R., Mussi-Dias, V., and Vieira, I. (2015). Chemistry and biological activity of *Ramalina* lichenized fungi. *Molecules*, 20(5): 8952–8987. <https://doi.org/10.3390/molecules20058952>
- Musharraf, S. G., Kanwal, N., Thadhani, V. M., and Choudhary, M. I. (2015). Rapid identification of lichen compounds based on the structure–fragmentation relationship using ESI-MS/MS analysis. *Analytical Methods*, 7(15): 6066–6076. <https://doi.org/10.1039/C5AY01091H>
- Oksanen, I. (2006). Ecological and biotechnological aspects of lichens. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73(4): 723–734. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0611-3>
- Olivier-Jimenez, D., Chollet-Krugler, M., Rondeau, D., Beniddir, M. A., Ferron, S., Delhaye, T., Allard, P.-M., Wolfender, J.-L., Sipman, H. J. M., Lücking, R., Boustie, J., and Le Pogam, P. (2019). A database of high-resolution MS/MS spectra for lichen metabolites. *Scientific Data*, 6(1): 294. <https://doi.org/10.1038/s41597-019-0305-1>
- Parrot, D., Jan, S., Baert, N., Guyot, S., and Tomasi, S. (2013). Comparative metabolite profiling and chemical study of *Ramalina Siliquosa* complex using LC-ESI-MS/MS approach. *Phytochemistry*, 89: 114–24. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.02.002>
- Paudel, B., Bhattarai, H. D., Koh, H. Y., Lee, S. G., Han, S. J., Lee, H. K., Oh, H., Shin, H. W., and Yim, J. H. (2011). *Ramalina* novel nontoxic antioxidant compound from the Antarctic lichen *Ramalina terebrata*. *Phytomedicine*, 18(14): 1285–1290. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.06.007>
- Piercey-Normore, M. (2003). A field survey of the genus *Cladonia* (Ascomycotina) in Manitoba, Canada. *Mycotaxon*, 86: 233–247.
- Piercey-Normore, M. (2007). The genus *Cladonia* in Manitoba: exploring taxonomic trends with secondary metabolites. *Mycotaxon*, 101: 189–199.
- Pérez-Vargas, I., Pérez-Ortega, S. (2014). A new endemic *Ramalina* species from the Canary Islands (Ascomycota, Lecanorales). *Phytotaxa*, 159: 269–278.
- Rundel, P. W. (1978). The ecological role of secondary lichen substances. *Biochemical Systematics and Ecology*, 6(3): 157–170. [https://doi.org/10.1016/0305-1978\(78\)90002-9](https://doi.org/10.1016/0305-1978(78)90002-9)
- Sahin, E., Dabagolu, S., Avan, I., Candan, M., Sahinturk, V., Kopara, A. T. (2021). Lichen- derived physodic acid exerts cytotoxic and anti- invasive effects in human lung cancer. *Rendiconti Lincei. Scienze Fisiche e Naturali*. <https://doi.org/10.1007/s12210-021-00996-0>
- Sérusiaux, E., van den Boom, P., and Ertz, D. (2010). A two-gene phylogeny shows the lichen genus *Niebla* (Lecanorales) is endemic to the New World and does not occur in Macaronesia nor in the Mediterranean basin. *Fungal Biology*, 114(7): 528–537. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2010.04.002>
- Sheard, J. W. (1977). Paleogeography, chemistry and taxonomy of the lichenized Ascomycetes *Dimelaena* and *Thamnia*. *Bryologist*, 80: 100–118.

- Shukla, V., Negi, S., Rawat, M. S. M., Pant, G., and Nagatsu, A. (2004). Chemical study of *Ramalina africana* (Ramalinaceae) from the Garhwal Himalayas. *Biochemical Systematics and Ecology*, 32(4): 449–453. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2003.08.010>
- Shukla, V., Patel, D. K., Bajpai, R., Semwal, M., and Upreti, D. K. (2016). Ecological implication of variation in the secondary metabolites in *Parmelioid* lichens with respect to altitude. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(2): 1391–1397. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5311-z>
- Sparrius, L.B., Aptroot, A., Sipman, H.J.M., Pérez-Vargas, I., Matos, P., Gerlach, A., Vervoort, M. (2017). Estimating the population size of the endemic lichens *Anzia centrifuga* (Parmeliaceae) and *Ramalina* species (Ramalinaceae) on Porto Santo (Madeira archipelago). *Bryologist*, 120: 293–301.
- Spjut, R., Simon, A., Guissard, M., Magain, N., and Sérusiaux, E. (2020). The fruticose genera in the Ramalinaceae (Ascomycota, Lecanoromycetes): their diversity and evolutionary history. *Mycokeys*, 73: 1–68. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.73.47287>
- Stevens, G. N. (1983). Tropical-subtropical Ramalinae in the *Ramalina farinacea* complex. *The Lichenologist*, 15(3): 213–229. <https://doi.org/10.1017/S0024282983000365>
- Tay, T., Türk, A. Ö., Yılmaz, M., Türk, H., and Kıvanç, M. (2004). Evaluation of the antimicrobial activity of the acetone extract of the lichen *Ramalina farinacea* and its (+)-usnic acid, norstictic acid, and protocetraric acid constituents. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 59(5–6): 384–388. <https://doi.org/10.1515/znc-2004-5-617>
- Unal, D., Senkardesler, A., and Sukatar, A. (2008). Absciscic acid and polyamine contents in the lichens *Pseudevernia furfuracea* and *Ramalina farinacea*. *Russian Journal of Plant Physiology*, 55(1): 115–118. <https://doi.org/10.1134/S1021443708010147>
- Walker, J. R. L., and Lintott, E. A. (1997). A phytochemical register of New Zealand lichens. *New Zealand Journal of Botany*, 35(3): 369–384. <https://doi.org/10.1080/0028825X.1997.10410162>
- Wijayawardene, N., Hyde, K., Dai, D., Sánchez-García, M., Goto, B., Saxena, R., Erdoğan, M., Selçuk, F., Rajeshkumar, K., Aptroot, A., Błaszowski, J., Boonyuen, N., da Silva, G., de Souza, F., Dong, W., Ertz, D., Haelewaters, D., Jones, E., Karunarathna, S., ... and Thines, M. (2022). Outline of fungi and fungus-like taxa – 2021. *Mycosphere*, 13(1): 53–453. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/13/1/2>
- Yim, J. H., Kim, I. C., Lee, S. G., Kim, D. K., Han, S. J., Lee, H. S., Seok, K. H., Kim, S. J., Kim, T. K., and Kang, P. S. (2011). Pharmaceutical composition for the treatment of inflammatory disease or immune disease containing *Ramalina*. WO 2,011,152,671 A2.
- Yim, J. H., Lee, H. K., Bhattarai, H. D., Babita, P., Kim, I. C., Hong, S. G., Kim, D. K., Lee, Y. K., Gu, S., and Oh, H. C. (2010). Antioxidant activities of *Ramalina* isolated from *Ramalina terebrata* extracts. WO 2,010,053,327 A2.

