

بررسی تکامل و مکانیسم تکوین پرچم در *Salvia hypoleuca* Benth. (Lamiaceae) و گونه‌های نزدیک با بررسی‌های میکروسکوپ الکترونی و فیلوژنی مولکولی

مریم سادات اسداللهی^۱، طاهر نژادستاری^۱، علی سنبلی^۲ و ایرج مهرگان^{۱*}
^۱ گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
^۲ گروه زیست‌شناسی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده

سرده *Salvia* به خاطر داشتن گل‌های دو پرچمی و ریخت‌شناسی خاص پرچم‌ها از سایر سرده‌های نعنایان متمایز است. گروه‌های طبیعی درون این سرده شامل گونه‌هایی است که هر یک نوع مشخصی از پرچم را نشان می‌دهند. در پژوهش حاضر، جایگاه تکاملی و مراحل تکوین پرچم در گونه *S. hypoleuca* Benth. و گونه‌های خویشاوند بررسی شد. نتایج به دست آمده نشان داد که گل دارای دو پرچم است و در هر یک آنها دو نیمه پشتی بساک رشد نیافته است اما دو انتهای عقبی به صورت یک ساختار پیچیده به هم متصل شده است که دسترسی کرده‌افشان به شهد را دشوار می‌سازد. تمامی این گونه‌ها در شاخه‌ای تک‌نیا با درجه حمایت بالا قرار گرفتند. بررسی تکوین پرچم *S. hypoleuca* نشان داد که ظهور و نمو نیمه‌های زایای بساک‌ها پیش از سایر اندام‌های زایشی است و رشد نهایی پرچم در این گونه پیش از باز شدن گل اتفاق می‌افتد، به طوری که گل‌های باز شده مرحله نهایی تکوین پرچم و دستگاه زایشی را نشان می‌دهد. با توجه به نتایج به دست آمده، چنین به نظر می‌رسد که مراحل تکوین پرچم در گونه‌های نزدیک به هم، مشابه باشد.

واژه‌های کلیدی: تکوین، فیلوژنی، نعنایان، *Salvia hypoleuca* Benth.

مقدمه

زیرتیره تقسیم شده است و سرده *Salvia* L. با حدود ۱۰۰۰ گونه در مناطق مختلف دنیا، به زیرتیره Nepetoideae، طایفه Mentheae تعلق دارد (Walker and Sytsma, 2007). همچنین، دو سرده *Lepechinia* Willd. و *Melissa* L. به این سرده بسیار نزدیک هستند و در کنار یکدیگر گروهی تک‌نیا را درون طایفه

تیره نعنایان (Lamiaceae/Labiatae) با بیش از ۲۳۰ سرده و ۷۰۰۰ گونه در دنیا (Stevens, 2001) و بیش از ۳۵ جنس و ۳۷۰ گونه در ایران یکی از مهم‌ترین تیره‌های گیاهان گل‌دار به شمار می‌آید (Jamzad, 2012; Kharazian, 2009). این تیره به ۷

هستند. برخی گونه‌های این سرده دارای بساک پشتی کاهش یافته است که یا به میزان ناچیزی دانه‌گرده تولید می‌کنند یا هیچ‌گاه دانه‌گرده تولید نمی‌کنند. در این گروه، پرچم دارای بساک بادبزنی شکل است و دو بساک پشتی ممکن است کاملاً به هم متصل باشد یا به آسانی از هم جدا شوند. در این گروه، بساک‌های پشتی با رشد در خارج از محور بساک، تخت شده و این وضعیت به ایجاد بساک‌های بادبزنی شکل که از گلویی جام گل بیرون زده بودند منجر می‌شود. ممکن است نیمه‌های دو بساک مجاور کاملاً با هم ممزوج شوند، حتی اگر مانع دسترسی جانوران گرده‌افشان به شهد نشود. تنوع ریخت‌شناسی پرچم‌ها ارتباط نزدیکی با نوع گرده‌افشانی در گونه‌های مختلف این سرده دارد و به همین علت به عنوان عنصری کلیدی در فرآیند گونه‌زایی سازشی در نظر گرفته می‌شود (Claßen-Bockhoff *et al.*, 2003; 2004a;b). فرآیند تکامل شکل‌های مختلف ریخت‌شناسی بساک در سرده *Salvia* کاملاً مورد توافق نیست. در حالی که Claßen-Bockhoff و همکاران (۲۰۰۴a) برای این فرآیند نوعی هم‌ساختی با منشأ یکسان را در نظر می‌گیرند، مطالعات Walker و Sytsma (۲۰۰۷) نشان می‌دهد که فرآیند تغییرات ریخت‌شناسی رابط بساک‌ها دارای حداقل سه منشأ مستقل از یکدیگر بوده و باعث شباهت ظاهری برخی شکل‌ها (تکامل موازی) شده است. در هر دو دیدگاه، گونه‌های نزدیک به هم دارای ریخت‌شناسی یکسان بساک هستند. در مطالعه حاضر، تکوین پرچم و جایگاه تکاملی گونه *S. hypoleuca* Benth. بررسی شده است. مطالعات مولکولی، جایگاه تکاملی آن را در گروه *Salvia* مشخص خواهد نمود. به علاوه، مراحل مختلف تکوین پرچم در این گونه با بررسی‌های میکروسکوپ

Mentheae تشکیل می‌دهند. Bentham (۱۸۴۸) سرده *Salvia* را به ۱۲ بخش تقسیم کرد. علیرغم تنوع زیادی که در شکل رویشی، ترکیب شیمیایی متابولیت‌های ثانویه، ریخت‌شناسی گل و مکانیسم گرده‌افشانی گونه‌های مختلف *Salvia* مشاهده می‌شود، تا مدت‌ها همه آنها به دلیل داشتن صفت مشترک داشتن دو پرچم، هر یک با رابط طویل شده بین دو نیمه بساک به عنوان یک گروه تک‌نیای طبیعی شناخته می‌شدند (Walker *et al.*, 2004). با این وجود، مطالعه Walker و همکاران (۲۰۰۴) و همچنین مطالعه Walker و Sytsma (۲۰۰۷) نشان داد که گونه‌های این سرده گروهی طبیعی و تک‌نیا نیستند.

گروه‌های تشخیص داده شده درون سرده *Salvia* ارتباطی مشخص با پرچم نشان می‌دهد (Walker and Sytsma, 2007). شکل اجدادی ریخت‌شناسی بساک را می‌توان به صورت پرچمی به نیمه‌های بساک به هم پیوسته در نظر گرفت. در برخی گونه‌ها، دو نیمه پشتی بساک رشد یافته، اما به هم متصل نشده‌اند. در گروهی دیگر، دو نیمه پشتی بساک رشد نیافته، اما دو انتهای عقبی به صورت یک ساختار پیچیده به هم متصل شده‌اند که دسترسی گرده‌افشان‌ها به شهد گل را دشوار می‌سازد. در گروهی دیگر، نیمه‌های پشتی بساک وجود دارد اما به هم متصل نشده‌اند. در برخی گونه‌ها، دو نیمه بساک پشتی عقیم است و به طور کامل به هم متصل نیستند یا اتصال کوچکی دارند. در بخش *Calosphace* Epling (Benth.) از این سرده، به طور معمول دو نیمه بساک نازا توسط رابط اتصال‌دهنده به هم متصل هستند. در زیر سرده *Audibertia* (Benth.) Epling بلند است؛ در برخی گونه‌ها نیمه‌های بساک پشتی عقیم، در بعضی دیگر نیمه‌های بساک پشتی کامل تحلیل رفته

مدت ۲۴ ساعت در محلول FAA تثبیت و پس از آن به مدت ۲۴ ساعت با آب جاری شستشو داده شد. نمونه‌ها پس از شستشو با آب جاری و آب مقطر، برای آب‌زدایی در شیب‌های مختلف الکلی: ۳۰، ۵۰، ۷۰، ۹۰ و ۱۰۰ درجه، هر کدام به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه قرار داده شد. نمونه‌ها پس از آب‌زدایی با لایه‌ای از طلا پوشانده شد و با میکروسکوپ الکترونی اسکن (SEM) عکسبرداری شد. نمونه‌های بررسی شده شامل غنچه‌های گل *S. hypoleuca* از بدو تشکیل تا پیش از باز شدن کامل گل بود. در هر مورد غنچه‌ها با سوزن تشریح باز شد و از اندام‌های مختلف عکسبرداری شد. برای مقایسه، نمونه‌ها گل باز شده این گونه در کنار گونه‌های نزدیک به آن یعنی: *S. candidissima* Vahl، *S. chloroleuca*، *S. lachnocalyx* Hedge, Rech. f. and Aellen و *S. limbata* C. A. Mey. و *S. sahendica* Bross. and Bushe مطالعه شد.

الکترونی مشخص خواهد شد. همچنین در ایران چندین گونه *Salvia* با ریخت‌شناسی نزدیک به *S. hypoleuca* رویش دارد که پژوهش حاضر در نظر دارد تا جایگاه فیلوژنتیک آنها و ارتباطشان را با یکدیگر مشخص کند. این مطالعه به بررسی این گروه کوچک از گونه‌های ایرانی *Salvia* پرداخته است و فرآیند احتمالی تکوین پرچم در آنها را مشخص کرده است.

مواد و روش‌ها

مطالعات ریخت‌شناسی: نمونه‌های بررسی شده در مطالعه حاضر اغلب به صورت تازه از رویشگاه‌های طبیعی آن جمع‌آوری شد (جدول ۱). بخش‌های مورد نیاز برای مطالعات تکوینی، بلافاصله پس از جمع‌آوری در محلول تثبیت‌کننده FAA (الکل ۷۰ درجه به میزان ۸۵ درصد حجمی، فرم‌آلدئید ۳۷ یا ۳۰ درجه به میزان ۱۰ درصد حجمی و استیک اسید گلاسیال به میزان ۵ درصد حجمی) (Azizian et al., 2000) قرار داده شد. غنچه‌های گل در مراحل مختلف تکوینی حداقل به

جدول ۱- مشخصات رویشگاهی و هرباریومی نمونه‌های مطالعه شده از گونه *Salvia hypoleuca* و گونه‌های نزدیک به آن

نام گونه	محل و مشخصات جمع‌آوری	جمع‌آوری کننده	شماره هرباریومی
<i>Salvia candidissima</i>	ایران: آذربایجان، ارومیه	سنبللی	SN (MPH)
<i>S. chloroleuca</i>	ایران: خراسان، بجنورد، راین، کوه‌های آلاداغ، ۱۷۰۰ متر	سنبللی، کنعانی، قلی پور	MPH-1742
<i>S. hypoleuca</i>	ایران: تهران، پارک کوهسار، ۱۶۰۰ متر	اسداللهی	20 (IAUH)
<i>S. hypoleuca</i>	ایران: مازندران، تونل کندوان به سمت پل زنگوله، ۲۶۳۵ متر	اسداللهی	21 (IAUH)
<i>S. hypoleuca</i>	ایران: از سمنان به شاهرود، گردنه آهوان، ۱۷۷۰ متر	مهرگان	22 (IAUH)
<i>S. hypoleuca</i>	ایران: مازندران، از هراز به سمت فیروزکوه، ۷ کیلومتر مانده به لاسم، ۲۴۰۰ متر	مهرگان	23 (IAUH)
<i>S. hypoleuca</i>	ایران: تهران، کاشکوک، ۱۹۲۰ متر	اسداللهی	24 (IAUH)
<i>S. lachnocalyx</i>	ایران: فارس، اقلید، چغورسیاه، ۲۰۰۰ متر	کنعانی	MPH-674
<i>S. limbata</i>	ایران: کردستان، سنندج، ۱۸ کیلومتر به سمت کامیاران، ۱۵۰۰ متر	سنبللی	MPH-106
<i>S. sehendica</i>	ایران: آذربایجان، تبریز، بستان‌آباد، ۱۵۸۹ متر	سنبللی	MPH-1592

ثانیه تقلیب در دمای ۹۴ درجه، ۳۰ ثانیه اتصال در دمای ۵۵ درجه و ۱ دقیقه طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد، به علاوه یک دوره اتصال اضافه به مدت ۷۸ ثانیه در دمای ۵۵ درجه سانتیگراد و یک دوره طویل شدن نهایی به مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد بود.

پس از توالی‌یابی ترادف ناحیه ITS، کروماتوگرام‌های حاصل از تعیین توالی DNA برای اطمینان و تصحیح اشتباهات احتمالی با کمک توالی‌های معکوس در نرم‌افزار Sequencher به صورت چشمی بررسی شدند. برای مقایسه توالی به دست آمده با توالی ناحیه ITS گونه‌های دیگر سرده *Salvia* و سرده‌های نزدیک، از توالی‌های موجود در بانک ژن استفاده شد. هم‌ردیف‌سازی ترادف‌ها با استفاده از نرم‌افزار Mac Clade (Maddison and Maddison, 2002) انجام شد. ماتریس داده‌های هم‌ردیف‌سازی شده در نرم‌افزار PAUP 4 (Swofford, 2002) با روش بیشینه صرفه‌جویی (Maximum Parsimony) آنالیز شد. به علاوه، داده‌ها پس از تعیین مدل تکاملی توسط نرم‌افزارهای PAUP و Modeltest 3.7 (Posada, 2008) در نرم‌افزار MrBayes (Ronquist and Huelsenbeck, 2003) با روش بایسین (Bayesian Analysis) آنالیز شد.

نتایج

مطالعات ریخت‌شناسی: مراحل مختلف تکوین گل گونه *S. hypoleuca* در شکل ۱ نشان داده شده است. شکل ۱-۱ A- غنچه باز نشده گل و شکل ۱-۱ B-

مطالعات مولکولی: برای مطالعات مولکولی از برگ گیاهان تازه خشک شده با سیلیکاژل و نمونه‌های هرباریومی استفاده شد. در مجموع، ژنوم کامل تعداد ۴ نمونه گونه *S. hypoleuca* جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ایران، در کنار نمونه‌هایی از *S. ahendica*، *S. candidissima* و *S. limbata* استخراج شد. استخراج ژنوم کامل با روش CTAB تغییر یافته و با کیت استخراج DNeasy Plant mini kit (شرکت Qiagen، آلمان) انجام شد. همانندسازی و تکثیر ناحیه ITS هسته‌ای (شامل فاصله‌انداز ITS1، ناحیه کد کننده 5.8S و فاصله‌انداز ITS2) در یک واکنش PCR و با استفاده از زوج پرایمر عمومی ITSA (5' GGA AGG AGA AGT CGT AAC AAG (3' G CTT TTC CTC CGC TTA | ITSB و ITSA (Blattner, 1999) (5' CCT TMT CAT YTA GAG GAA (3' TTTG ATA TG یا زوج پرایمر ITS18S (5' CCT TMT CAT YTA GAG GAA (3' GGA G CTT ATT | ITS28S و ITSA (Muir and Schlotterer, 1999) (5' KAT ATG CTT AAA (3' پروتکل PCR برای زوج پرایمر ITSA و ITSB شامل تقلیب اولیه به مدت ۳ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد، ۳۰ چرخه دمایی شامل ۳۰ ثانیه تقلیب در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد، ۴۵ ثانیه اتصال در دمای ۵۵ درجه سانتیگراد و ۶۰ ثانیه طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد و طویل شدن نهایی به مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد بود.

پروتکل PCR برای زوج پرایمرهای ITS18S و ITS28S شامل تقلیب اولیه به مدت ۳ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد، سپس ۳۵ چرخه دمایی شامل ۱۸

تشخیص هستند. قطر تخمدان نیز بیشتر شده، به حدود ۱/۵ میلی متر رسیده است. رابط اتصال دهنده در حال تشکیل است اما هنوز رابط دو پرچم به هم متصل نیستند، هر چند که نسبت به مرحله قبل، فاصله کمتری از یکدیگر دارند. با رسیدن طول غنچه به حدود ۶ و عرض حدود ۴-۴/۵ میلی متر و پیش از شکوفایی گل، همه اندام‌ها شکل نهایی خود را یافته، به طور کامل تشکیل شده‌اند (شکل F-۱). نیمه‌های زایای بساک در شکل و اندازه نهایی خود، رابط اتصال دهنده به طور کامل تشکیل شده و در انتهای آن نیمه‌های نازای بساک دیده می‌شود. خامه گل کاملاً رشد یافته و به شکل و اندازه نهایی خود رسیده، در انتهای آن کلاله دو شاخه قابل مشاهده است.

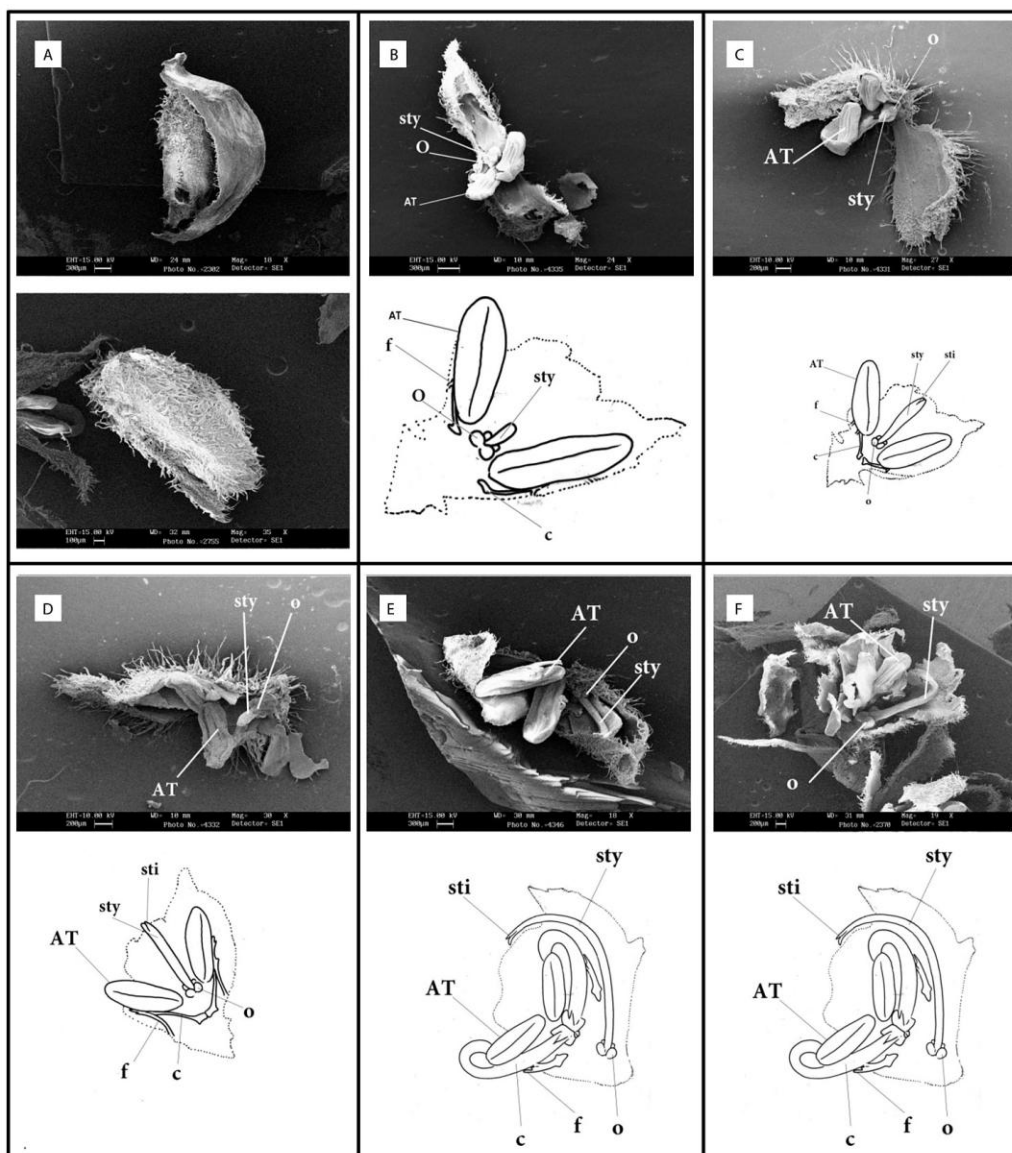
بررسی گل بالغ در گونه‌های *S. candidissima*، *S. limbata*، *S. lachnocalyx*، *S. chloroleuca* و *S. sahendica* نشان داد که ساختار پرچم در این گونه‌ها با ساختار پرچم در گونه *S. hypoleuca* مشابه است. در تمامی این گونه‌ها، بساک‌ها دارای رابط طولی هستند که نیمه زایای گل را به نیمه نازای آن متصل می‌کند و نیمه‌های نازای دو پرچم در انتها به یکدیگر متصل شده‌اند (شکل ۲).

مطالعات مولکولی: در آنالیز مولکولی داده‌های حاصل از ناحیه ITS در مجموع ۴ نمونه از گونه *S. hypoleuca* همراه با نمونه‌هایی از *S. candidissima*، *S. limbata* و *S. sahendica* برای نخستین بار تعیین ترادف شد. در کنار این نمونه‌ها، ترادف ناحیه ITS از ۱۴۷ گونه *Salvia*، دو گونه از *Lepechinia* Willd.، دو گونه از *Perovskia* Kar.

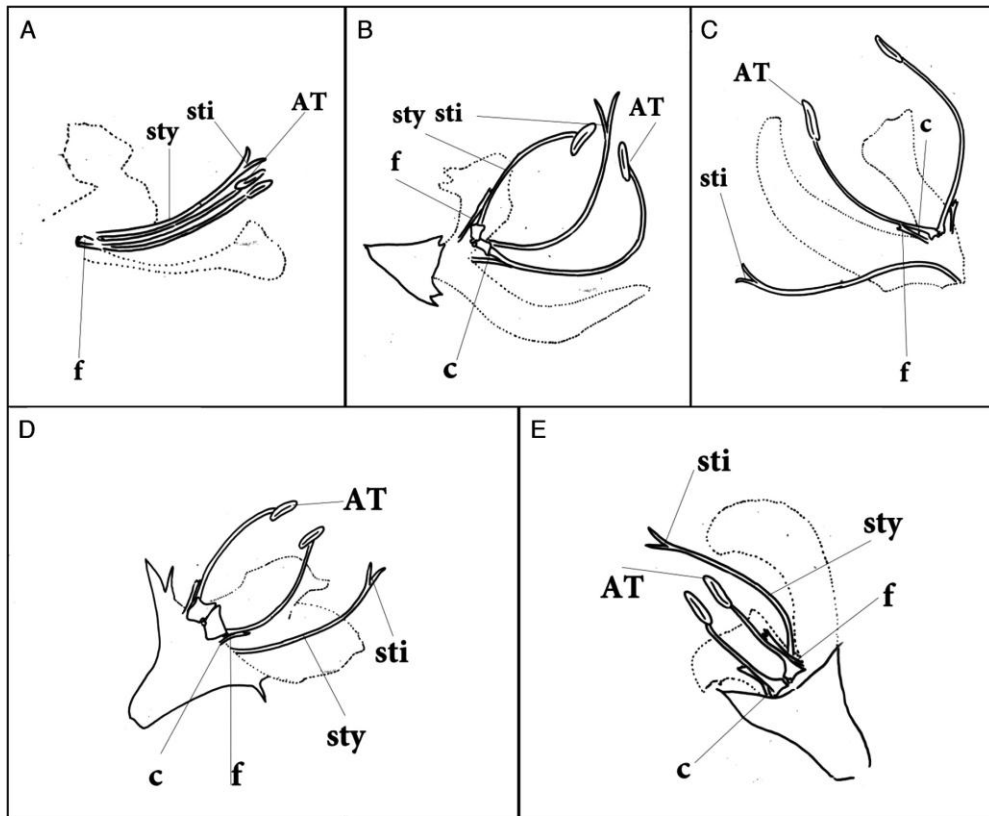
غنچه باز شده همان گل را نشان می‌دهد. در این مرحله غنچه ۲ تا ۲/۵ میلی متر طول و حدود ۰/۵ میلی متر عرض دارد و نیمه‌های زایای بساک شکل گرفته‌اند. اما در این مرحله هنوز رابط اتصال دهنده و میله پرچم تکوین نیافته و قابل مشاهده نیست (شکل B-۱). خامه گل بسیار کوتاه، با طولی حدود ۰/۵ میلی متر است. به علاوه، دیواره میانی تخمک‌ها شکل گرفته، چهار برجستگی کوچک تخمدان قابل مشاهده است. با رشد گل و رسیدن طول غنچه به حدود ۳ و عرض حدود ۱ میلی متر، اندازه نیمه‌های زایای بساک افزایش یافته، هنوز رابط و میله پرچم قابل مشاهده نیست (شکل C-۱). در این مرحله خامه گل رشد یافته و طول آن به حدود یک میلی متر رسیده است. تخمدان نیز رشد کرده، حدود ۰/۵ میلی متر قطر دارد. از این مرحله به بعد شکاف کلاله قابل مشاهده است. افزایش رشد غنچه گل و رسیدن آن به طول حدود ۴ و عرض حدود ۲ میلی متر، نیمه‌های زایای بساک بزرگتر شده، میله پرچم به طول ۰/۵ تا ۱ میلی متر و رابط اتصال دهنده قابل مشاهده است اما هنوز از دو انتهای بخش نازا به هم متصل نشده‌اند (شکل D-۱). به علاوه، در این مرحله، طول خامه گل به حدود ۲ میلی متر و قطر تخمدان به حدود یک میلی متر رسیده است. با افزایش ابعاد غنچه گل و رسیدن طول آن به حدود ۵ و عرض حدود ۳ میلی متر، نیمه‌های زایای بساک تقریباً به شکل و اندازه نهایی خود می‌رسند (شکل E-۱). در این مرحله، طول میله پرچم به حدود ۱ تا ۲ میلی متر رسیده است. خامه گل طویل تر شده (حدود ۳ میلی متر)، لوب‌های آن به سختی قابل

نظر پارسیمونی غیر اطلاعاتی و ۲۸۷ جایگاه از نظر پارسیمونی اطلاعاتی بودند. درخت اجماع قاطع حاصل از تحلیل پارسیمونی از ترکیب ۵۰۰۰ از کوتاه‌ترین درختان تشکیل شد که ۲۰۲۲ گام طول داشت و دارای شاخص ثبات ۰/۳۲۶ بود. برای تعیین درجه حمایت شاخه‌ها، آزمون بوت استرپ با روش سریع با ۲۰۰۰۰ تکرار انجام شد.

یک گونه *Rosmarinus L.*، یک گونه *Zhumeria*، یک گونه *Dorystaechas*، *Rech.f. and Wendelbo*، یک گونه *Bioss. and Helder. ex Benth.* و یک گونه *Meriandra Benth.* در کنار نمونه‌ای از *Melissa officinalis L.* به عنوان برون گروه آنالیز شد. مجموعه داده‌های حاصل از تعیین ترادف ناحیه ITS شامل ۶۶۵ باز بود که از آن میان ۲۸۷ جایگاه ثابت، ۹۱ جایگاه از



شکل ۱- مراحل مختلف تکوین پرچم در گونه *Salvia hypoleuca* (A) غنچه باز نشده *S. hypoleuca* (B) غنچه باز شده به طول ۲ میلی‌متر؛ (C) غنچه باز شده به طول ۳ میلی‌متر؛ (D) غنچه باز شده به طول ۴ میلی‌متر؛ (E) غنچه باز شده به طول ۵ میلی‌متر؛ (F) غنچه باز شده به طول ۶ میلی‌متر (AT: نیمه‌های جلویی بساک؛ C: رابط اتصال‌دهنده؛ f: میله؛ o: تخمدان؛ sti: کلاله؛ sty: خامه).



شکل ۲- مورفولوژی پرچم در گونه‌های نزدیک به *Salvia hypoleuca* (A پرچم در *S. sahendica*؛ B پرچم در *S. limbata*؛ C پرچم در *S. candidassimi*؛ D پرچم در *S. cloroleuca*؛ E پرچم در *S. lachnocalyx*؛ AT: نیمه‌های جلویی بساک؛ C: رابط اتصال‌دهنده؛ f: میله؛ o: تخمدان؛ sti: کلاله؛ sty: خامه).

از شاخه‌های آن نشان داده شده است (پیوست ۱). درخت اجماع قاطع حاصل از تحلیل پارسیمونی کاملاً با درخت حاصل از آنالیز بایسین مطابق بود که در اینجا به صورت درختی مجزا آورده نشده است. نتایج حاصل از بوت استرپ درخت حاصل از تحلیل پارسیمونی در پیوست ۱ مشخص شده است.

در پیوست ۱ نشان داده شده است که گونه‌های مختلف *Salvia* در گروه‌های مختلفی قرار گرفته‌اند. دو گونه سرده *Perovskia* در موقعیت خواهری نسبت به گروه اصلی با حمایت بوت استرپ ۸۶ درصد و احتمال پسین ۰/۹۹ دیده می‌شود. بخش عمده‌ای از گروه‌های

برای انجام آنالیز بایسین ابتدا آزمونی برای تعیین مدل تکاملی DNA انجام شد که نتایج آن به این شرح است: نوع مدل تکاملی: GTR+I+G؛ نرخ جانمایی: بازها برای A-C برابر با ۱/۲۶۸۶، A-G برابر با ۳/۷۱۲۳، A-T برابر با ۲/۶۵۶۹، C-G برابر با ۰/۵۳۲۷، C-T برابر با ۵/۳۰۸۴ و G-T برابر با ۱/۰۰۰۰ بود؛ سهم جایگاه‌های ثابت برابر با ۰/۳۱۳۱۶ و شاخص شکل پراکنش گاما ۰/۹۰۸۴ چهار زنجیره محاسبه‌ای مونت کارلو با ۳۰۰۰۰۰ نسل انجام شد و یک چهارم آغازی نسل‌ها حذف شدند. در پایان محاسبه، درخت اجماع ۵۰ درصدی تشکیل شد که احتمال‌های پسین روی هر یک

در این گونه پیش از باز شدن گل اتفاق می افتد و گل های باز شده مرحله نهایی تکوین پرچم و دستگاه زایشی را نشان می دهد.

تیپ های ریخت شناسی پرچم در سرده *Salvia*:

در تیپ A نیمه های پشتی بساک رشد یافته اند. اما به هم متصل نشده اند. در تیپ B دو نیمه پشتی بساک رشد نیافته اند اما دو انتهای عقبی به صورت یک ساختار پیچیده به هم متصل شده اند که دسترسی کرده افشان را به شهد دشوار می سازد. در تیپ N نیمه های پشتی بساک اندکی رشد یافته یا کاملاً عقیم است به طوری که یا دانه کرده تولید نمی کنند یا بسیار اندک تولید می کنند. این نوع پرچم شکلی شبیه بادبزن دارد. در این تیپ، بساک های پشتی با رشد در سمت خارج از محور بساک تخت شده و این وضعیت به ایجاد بساک های بادبزنی شکل که از گلویی جام گل بیرون زده بودند منجر می شوند، دو بساک مجاور ممکن کاملاً به درون یکدیگر نفوذ کرده، ممکن است کاملاً به هم متصل باشند یا به آسانی از هم جدا شوند، در صورتی که ممکن است دسترسی به شهد حتماً بلوک نشده باشد. در تیپ E نیمه های پشتی بساک عقیم هستند و توسط رابط اتصال دهنده به هم متصل شده اند. در تیپ H نیمه های پشتی بساک عقیم هستند و بازوی اتصالی وجود دارد. در تیپ F دو نیمه پشتی بساک عقیم هستند و نیمه های عقبی بساک یا اصلاً به هم متصل نشده اند یا کمی به هم متصل شده اند. در تیپ I نیمه های پشتی بساک تحلیل رفته اند (پیوست ۱). با توجه به فیلوژنی سرده *Salvia*، ارتباط نزدیک بین ریخت شناسی پرچم و فیلوژنی کاملاً آشکار است. در واقع هر یک از گروه های دارای ریخت شناسی پرچم یکسان، متشکل از گونه هایی با منشأ یکسان از نظر فیلوژنی هستند. گونه های ایرانی که در مطالعه حاضر بررسی شده اند

تشکیل شده دارای میزان حمایت پایین است. با این وجود، اعضای هر یک از شاخه های تشکیل شده دارای نوع پرچم یکسانی هستند. تیپ های مختلف پرچم با ریخت شناسی بساک و رابط خاص خود به چندین گروه تقسیم می شوند. گروه های پایه ای دارای رابط های کوتاه (تیپ های C، D، L، K و J در پیوست ۱). در گروه های تاجی رابط بساک ها بلندتر و نیمه های بساک غیر همسان بوده (تیپ های A، B، E، H، F و I) در برخی گروه ها یکی از نیمه ها نازا یا کاملاً تحلیل رفته است.

گونه های مطالعه شده در تحقیق حاضر همگی در یک شاخه با حمایت بوت استرپ ۸۸ درصد و احتمال پسین ۰/۹۵ قرار گرفته اند (شاخه B1). اعضای این شاخه مانند سایر اعضای گروه B دارای ریخت شناسی پرچم از تیپ B هستند. در همه این گونه ها، یکی از نیمه های بساک نازا و در دو پرچم مجاور به هم متصل شده، رابط بساک ها بلندتر از میله پرچم است. نتایج این تحلیل نشان داد که ریخت شناسی پرچم ارتباط مشخصی با نتایج حاصل از فیلوژنی نشان می دهد.

بحث و نتیجه گیری

گل بالغ در گونه *S. hypoleuca* دارای دو پرچم است که در هر یک آنها دو نیمه پشتی بساک رشد نیافته است اما دو انتهای عقبی به صورت یک ساختار پیچیده به هم متصل شده است که به صورت مانعی در برابر نفوذ آسان جانوران کرده افشان عمل می کند. بررسی مراحل تکوین و رشد پرچم در این گونه نشان داد که ظهور و نمو نیمه های زایای بساک ها پیش از سایر اندام های زایشی است. به علاوه، رشد نهایی پرچم

Salvia را نمایان ساخت. به همین دلیل، با توجه به قرابت این گونه‌ها در نتایج به دست آمده از بررسی فیلوژنی این سرده، چنین به نظر می‌رسد که مراحل تکوین پرچم در آنها نیز مشابه باشد.

سپاسگزاری

پژوهش حاضر بخشی از نتایج پایان‌نامه کارشناسی ارشد است. نگارندگان از کارکنان هرباریوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران (IAUH) و هرباریوم پژوهشکده گیاهان دارویی دانشگاه شهید بهشتی (MPH) سپاسگزاری می‌نمایند.

(شامل *S. chloroleuca*، *S. candidissima*، *S. limbata*، *S. lachnocalyx*، *S. hypoleuca* و *S. sahendica* همگی دارای ریخت‌شناسی پرچم مشابه هستند (شکل ۲). در این گونه‌ها همانند سایر گونه‌های متعلق به تیپ B، دو نیمه پشتی بساک رشد نیافته است اما دو انتهای عقبی به صورت یک ساختار پیچیده به هم متصل شده‌اند که مانع دسترسی کرده افشان به شهد می‌شود (پیوست ۱). نتایج حاصل از این پژوهش مطالعات پیشین (Claßen-Bockhoff et al., 2003; 2004a; b) را تأیید نمود و ارتباط تنگاتنگی بین فیلوژنی و ریخت‌شناسی پرچم در گونه‌های سرده

منابع

- Azizian, D., Khatamsaz, M. and Kasaian, J. (2000) The taxonomic significance of leaf anatomy in the genus *Onosma* L. (Boraginaceae) in Iran. *Iranian Journal of Botany* 8: 167-180.
- Benthams, G. (1848) Labiatae. In: *Prodromus systematis naturalis regni vegetabilis* (Ed. De Candolle, A.) vol. 12. Treuttel et Wurtz, Paris.
- Blattner, F. R. (1999) Direct amplification of the entire ITS region from poorly preserved plant material using recombinant PCR. *Biotechniques* 27: 1180-1186.
- Claßen-Bockhoff, R., Crone, M. and Baikova, E. (2004a) Stamen development in *Salvia*: homology reinvestigated. *International Journal of Plant Science* 165: 475-498.
- Claßen-Bockhoff, R., Speck, T., Tweraser, E., Weraser, E., Wester, p., Thimm, S. and Reith, M. (2004b) The staminal lever mechanism in *Salvia*: a key innovation for adaptive radiation? *Organisms Diversity and Evolution* 4: 189-205.
- Claßen-Bockhoff, R., Wester, P. and Tweraser, E. (2003) The staminal lever arm mechanism in *Salvia*-a review. *plant Biology* 5: 33-41.
- Jamzad, Z. (2012). Lamiaceae: In: *Flora of Iran* (Eds. Assadi, M., Massoumi, A. A. and Mozaffarian, V.) vol. 74. Research Institute for Forest and Rangelands, Tehran (in Persian).
- Kharazian, N. (2009) Taxonomy and morphology of *Salvia spinosa* L. (Lamiaceae) in Iran. *Taxonomy and Biosystematics* 1(1): 9-20 (in Persian).
- Maddison, W. P. and Maddison, D. R. (2002) *MacClade: Analysis of phylogeny and character evolution*. Version 4. Sinauer, Sunderland, Massachusetts.
- Muir, M. and Schlotterer, C. (1999) Limitations to the phylogenetic use of ITS sequences in closely related species and population, a case study in *Quercus peteraea* (Matt) Liebl. Retrieved from: <http://webdoc.gwdg.de/ebook/y/1999/whichmarker/m11/Chap11.htm>. On: 28 August 2013.
- Posada, D. (2008) Modeltest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25: 1253-1256.
- Ronquist, F. and Huelsenbeck, J. P. (2003) MRBAYES3: Bayesian phylogenetic inference under

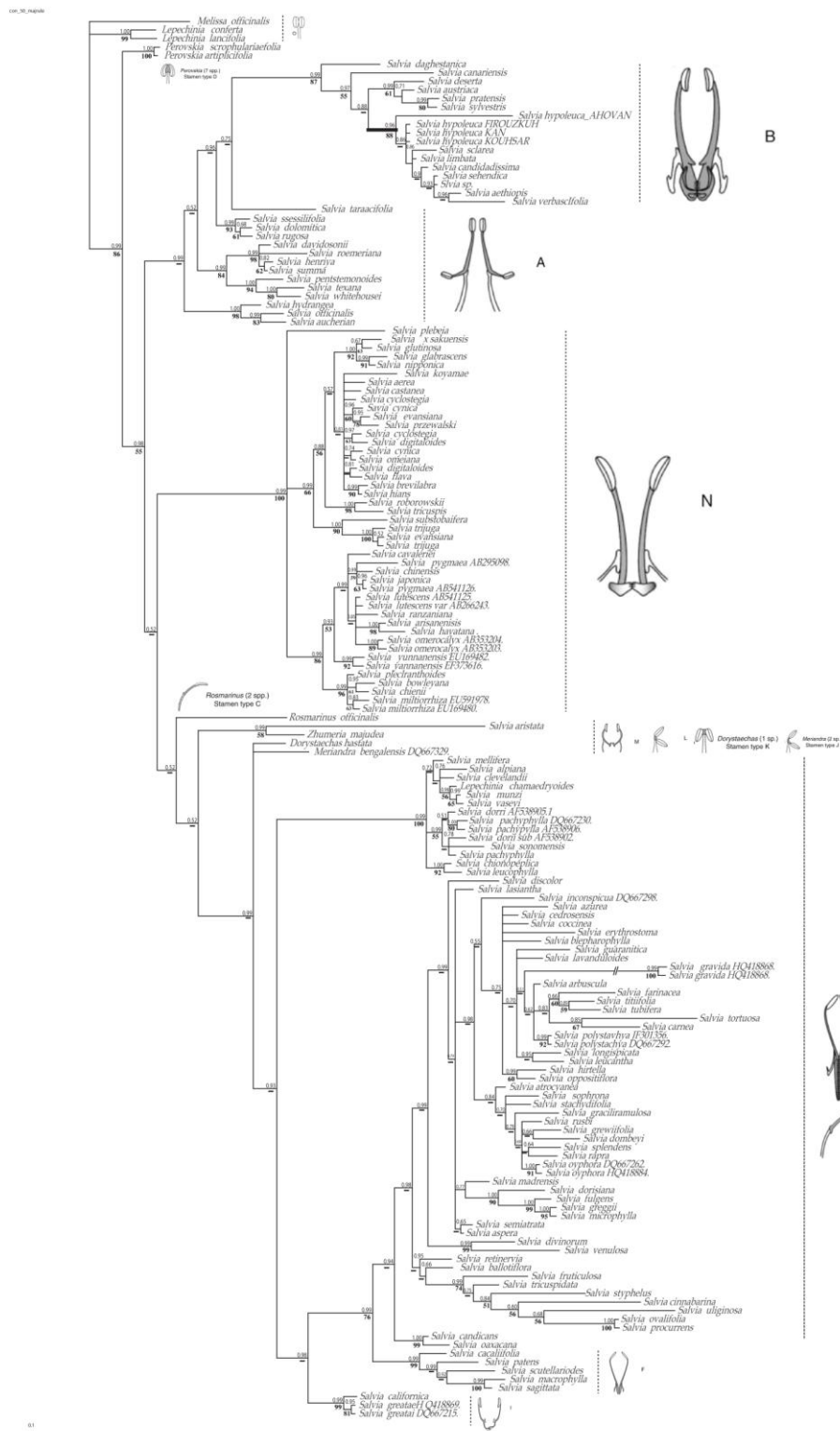
mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.

Stevens, P. F. (2001 onwards) Angiosperm phylogeny website. version 12, July 2012 [and more or less continuously updated since]. Retrieved from: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>. On: 28 August 2013.

Swofford, D. L. (2002) *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (PAUP)*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Walker, J. and Sytsma, K. (2007) Staminal evolution in the genus *Salvia* (Lamiaceae): molecular phylogenetic evidence for multiple origins of the staminal lever. *Annals of Botany* 100: 375-391.

Walker, J. B., Sytsma, K. J., Treutlein, J. and Wink, M. (2004) *Salvia* is not monophyletic: implications for the systematics, radiation, and ecological specializations of *Salvia* and tribe Menthaeae. *American Journal of Botany* 91: 1115-1125.



پیوست ۱- درخت اجماع ۵۰ درصد حاصل از آنالیز بایسین (Bayesian Analysis) داده‌های حاصل از ITS گونه‌های مختلف از تیره Lamiaceae سرده *Salvia* و خویشاوندان. اعداد بالای شاخه‌ها احتمال پسین (Posterior Probability) و اعداد پایین شاخه‌ها حمایت بوت‌استرپ شاخه‌هایی را نشان می‌دهد که در آنالیز بیشینه صرفه‌جویی (Maximum Parsimony) به صورت گروه‌های تک‌نیا با حمایت بالاتر از ۵۰ درصد به دست آمدند. ریخت‌شناسی پرچم در گروه‌های مختلف گونه‌ای در سرده *Salvia* سمت راست آنها رسم شده است.

**Study of evolution and developmental mechanism of stamen
in *Salvia hypoleuca* Benth. (Lamiaceae) and related taxa
using Electron Microscopy and molecular phylogenetic tools**

Maryam-Sadat Asadollahi ¹, Taher Nejad-Sattari ¹, Ali Sonboli ² and Iraj Mehregan ^{1*}

¹ Department of Biology, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran

² Department of Biology, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

Abstract

The genus *Salvia* L. includes a group of plants having two stamens with a special morphology. Natural groups within this genus consist of species with special type of stamen morphology. In this paper, phylogenetic placement and developmental stages of stamen of *S. hypoleuca* Benth. were studied. Examination of this and related species showed that each flower had two stamens with posterior thecae not expressed and the distal posterior ends of the adjacent connectives were fused into a complex structure blocking access to nectar. All species with such type of stamens grouped into a monophyletic clade with robust support. Study of stamen development in *S. hypoleuca* showed that normal, anterior thecae were evolved before the other organs and that the stamen found its final matured form before flower opened. In an opened flower, stamen and reproductive organs could be found in their final mature stage. In addition, it seemed that stamen development in related species should be similar.

Key words: Development, Phylogeny, Lamiaceae, *Salvia hypoleuca* Benth.

* iraj@daad-alumni.de