

بررسی مقایسه‌ای دانه گرده زیر گونه‌های کاکوتی کوهی (*Ziziphora clinopodioides* Lam.) از تیره Lamiaceae در ایران

علی مصلح^۱، جمیل واعظی^۲، عاطفه پیرانی^۳، زهراسادات طباطبائی نیا^۴

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران. amosleh42@gmail.com

۲- دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران. vaezi@um.ac.ir

۳- استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران. apirani@um.ac.ir

۴- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران. za.tabatabaei@mail.um.ac.ir

چکیده:

در این مطالعه ریز ریخت‌شناسی دانه گرده در زیر گونه‌های *Ziziphora clinopodioides* Lam. بررسی شد. هدف از این مطالعه استفاده از صفات قابل بررسی در دانه گرده برای شناسایی و تمایز زیر گونه‌ها است. دانه‌ی گرده زیر گونه‌ها از نمونه‌های هرباریومی دانشگاه فردوسی مشهد، به روش Erdtman استولایز شدند. سپس عکس‌برداری با میکروسکوپ نوری و میکروسکوپ الکترونی نگاره انجام شد. صفاتی کمی مانند: طول محور قطبی (P)، طول محور استوایی (E)، نسبت طول محور قطبی به طول محور استوایی، ضخامت اگزین، میانگین بیشترین طول لومن، فاصله بین دو لومن و صفات کیفی مانند: شکل دانه گرده و تزیینات سطح اگزین مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان می‌دهد دانه گرده در زیرگونه‌های مورد مطالعه به صورت شش شیاری، منفرد، جور قطب و تزیینات سطح اگزین دو بار شبکه‌ای است. همچنین نتایج حاصل از آنالیز داده‌های مربوط به صفات دانه گرده نشان داد که صفاتی مانند ضخامت اگزین، فاصله بین دو لومن و تزیینات سطح اگزین تفاوت معنی داری را در بین زیرگونه‌ها نشان ندادند ولی سایر صفات مورد بررسی تفاوت معنی داری را نشان دادند و می‌توانند در تفکیک زیرگونه‌های مورد بررسی حائز اهمیت باشند.

کلمات کلیدی:

کاکوتی کوهی، میکروسکوپ الکترونی، دانه گرده، Erdtman

۱. مقدمه:

تیره نعناع (Lamiaceae) با ۲۳۶ جنس و ۷۲۰۰-۶۹۰۰ گونه در جهان از ناحیه مدیترانه و شرق آسیا تا آسیای مرکزی پراکنش دارد (Harley et al., 2004). این تیره در ایران ۵۹ جنس و بیش از ۵۰۰ گونه و زیرگونه دارد. و ۳۰ درصد از گونه‌های آن، انحصاری ایران است (Jamzad et al., 2003). Erdtman (1945) تیره نعناع را بر اساس ویژگی‌های دانه‌ی گرده به دو زیر تیره Lamioideae با دانه گرده سه شیاری و دو هسته‌ای و Nepetoideae با دانه گرده شش شیاری و سه هسته‌ای تقسیم نمود. *Ziziphora* L. با نام عامیانه کاکوتی، یکی از جنس‌های تیره Lamiaceae زیر تیره Nepetoideae و طایفه Mentheae می‌باشد که شامل گیاهانی یکساله و چندساله است. این جنس دارای ۴۰ گونه در مدیترانه، منطقه ایران و تورانی و به ویژه مرکز آسیا بوده و چهار گونه در ایران دارد (Rechinger, 1984). کاکوتی کوهی یا آویشن برگ باریک با نام علمی *Ziziphora clinopodioides* Lam. گیاهی چندساله با قاعده چوبی، بوته‌ای با ساقه‌های متعدد، از قاعده منشعب؛ با شاخه‌های ساده و بدون انشعاب، گاهی در ناحیه گل آذین با انشعاب‌های متقابل، ۵ تا ۵۰ سانتی متر، افراشته، خیزان، خمیده، خوابیده و یا خیزنده؛ پوشیده از کرک‌های کوتاه به طرف پایین خمیده و یا کرک‌های گسترده در ناحیه گل آذین و یا کم و بیش بدون کرک؛ برگ‌های بدون دمبرگ و یا دمبرگ‌های کوتاه؛ پهنک به طول ۴ تا ۲۲ و به عرض ۱ تا ۹ میلی متر، خطی، سر نیزه‌ای، بیضوی، تخم مرغی تا کم و بیش دایره‌ای با نوک تیز، حاشیه صاف و بدن دندانه، تقریباً بدون کرک تا کرک‌های ساده با تراکم متفاوت و غده‌های ترشحی چسبیده و براق و تیره، در سطح تحتانی با تراکم بیشتر؛ برگ‌های گل آذینی خطی، سرنیزه‌ای مستطیلی، تخم مرغی به طول ۶ تا ۱۱ و به عرض ۱ تا ۵ میلی متر؛ گل آذین متشکل از گل‌های متعدد بدون دمگل و یا با دمگل‌های به طول ۴ میلی متر، به شکل کپه‌ای - انتهای؛ کاسه گل به طول ۳/۵ تا ۷ میلی متر، لوله‌ای، به رنگ سبز یا بنفش، دندانه‌های کوتاه و

نزدیک به هم تقریباً بدون کرک تا پوشیده از کرک‌های ساده با تراکم متفاوت و غده‌های ترش‌چی چسبیده براق؛ جام گل سفید، صورتی تا بنفش، به طول ۵ تا ۱۱ میلی‌متر، لوله جام گل کم و بیش درون کاسه مخفی، لبه بالایی راست، لبه پایینی با سه لوب کم و بیش مساوی، لوب میانی دارای خال‌های تیره؛ فندقه به طول ۱/۵ و به عرض ۰/۴ میلی‌متر، مستطیلی، با سطح صاف، قهوه‌ای کم رنگ؛ زمان گلدهی تابستان است (جم‌زاد، ۱۳۸۸). در فلورا ایرانیکا (Rechinger, ۱۹۸۴) گونه کاکوتی کوهی بر اساس تنوع ریخت شناسی به ۹ زیرگونه تقسیم می‌شود (جدول ۱).

۲. مواد و روش‌ها:

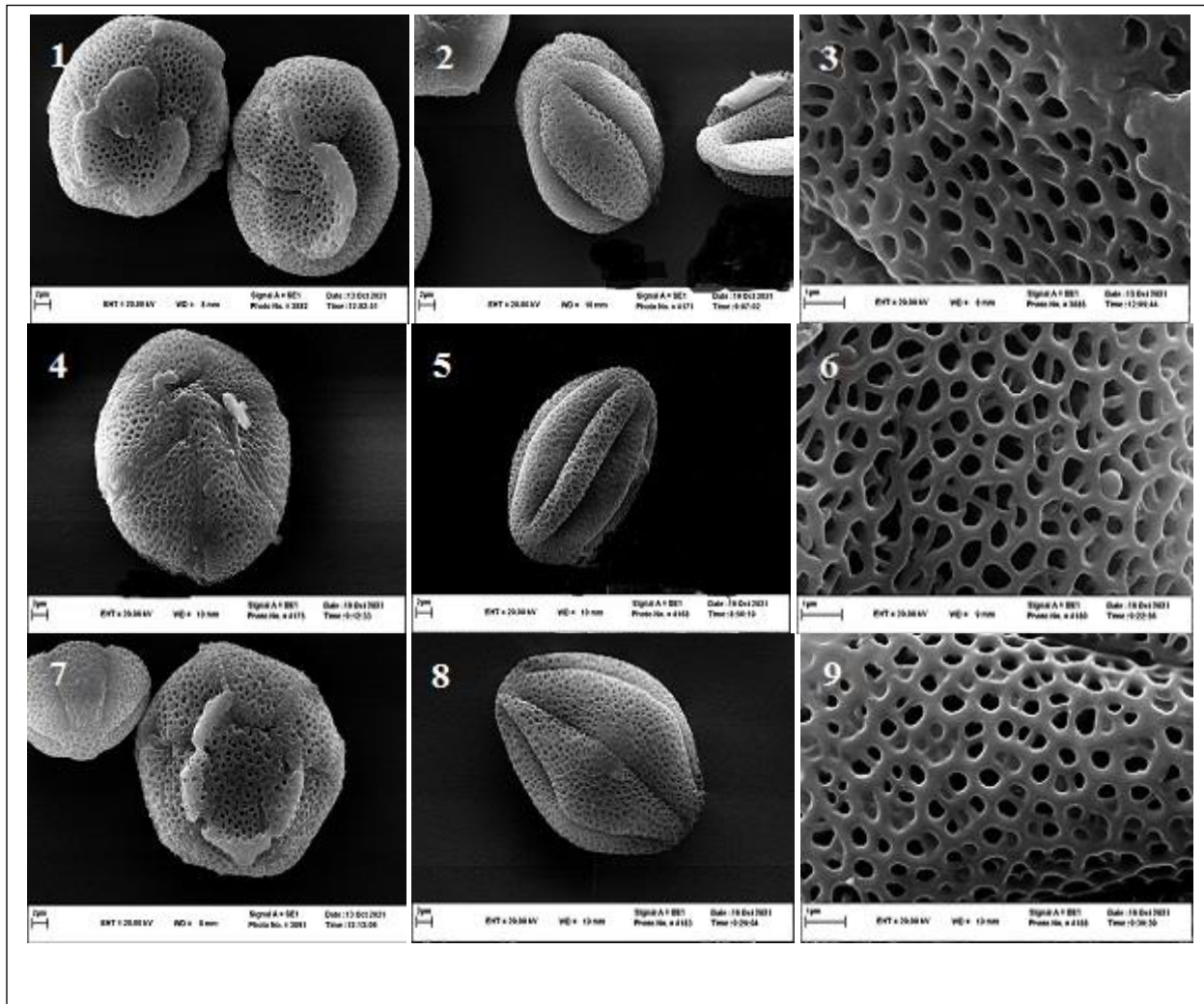
برای مطالعه دانه گرده زیر گونه‌های کاکوتی کوهی از نمونه‌های هرباریومی دانشگاه فردوسی مشهد (FUMH) و نمونه‌های تازه جمع آوری شده، استفاده شد. ابتدا بساک‌های بالغ از گل‌ها در زیر استرئومیکروسکوپ جدا شده و دانه‌های گرده با استفاده از سوزن تشریح از بساک خارج و به میکروتیوپ ۱/۵ میلی لیتری منتقل شد. دانه‌های گرده در استیک اسید ۳۰٪ به مدت ۳ دقیقه با ۴۰۰۰ دور سانتیفریوژ شده و محلول رویی به آرامی و با دقت تخلیه شد. سپس طبق روش اردتمن (۱۹۶۰) در این مرحله محلول استولایز تازه تهیه شده (۹ واحد استیک اسید و ۱ واحد سولفوریک اسید) به نمونه افزوده و ۳ الی ۵ دقیقه در حمام آب گرم در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد قرار گرفت، زمانی که محلول حاوی دانه‌های گرده قهوه‌ای رنگ شد، به مدت ۳ دقیقه با ۴۰۰۰ دور سانتیفریوژ و محلول رویی مجدداً با احتیاط تخلیه شد (برای بررسی با میکروسکوپ نوری در این مرحله به دانه‌های گرده رنگ سافرانین اضافه شد). در انتها برای از بین بردن اثر استولایز دو مرحله شست و شو با الکل ۳۰٪ و ۵ مرتبه شست و شو با آب مقطر و هر مرحله سانتیفریوژ با ۳۰۰۰ دور انجام شد. برای تصویربرداری با میکروسکوپ نوری نمونه‌ها روی لام قرار گرفتند و عکسبرداری با بزرگنمایی های ۲۰X، ۴۰X، ۱۰۰X انجام شد. همچنین برای تصویر برداری با میکروسکوپ الکترونی نگاره، نمونه‌ها روی استاپ‌های آلومینیومی قرار داده شد. سپس به مدت ۳ دقیقه در دستگاه Sputter coater با لایه‌ای از جنس طلا و پالادیوم روکش شدند. از نمونه‌ها با میکروسکوپ الکترونی LEO 1450 VP با قدرت تفکیک ۲/۵ نانومتر و ولتاژ ۳۵ کیلو وات با بزرگنمایی ۱۰۰۰X، ۸۰۰۰X، ۴۰۰۰۰X تصویربرداری انجام شد. از تصاویر میکروسکوپ الکترونی برای مطالعه شکل کلی و نوع تزئینات سطح اگزین استفاده شد. برای توصیف الگوی سطح دانه گرده از اصطلاحات توصیفی اردتمن (۱۹۶۶) استفاده شد. همچنین اندازه‌گیری‌ها با استفاده از نرم افزار ImageJ-win64 صورت گرفت.

۳. نتایج:

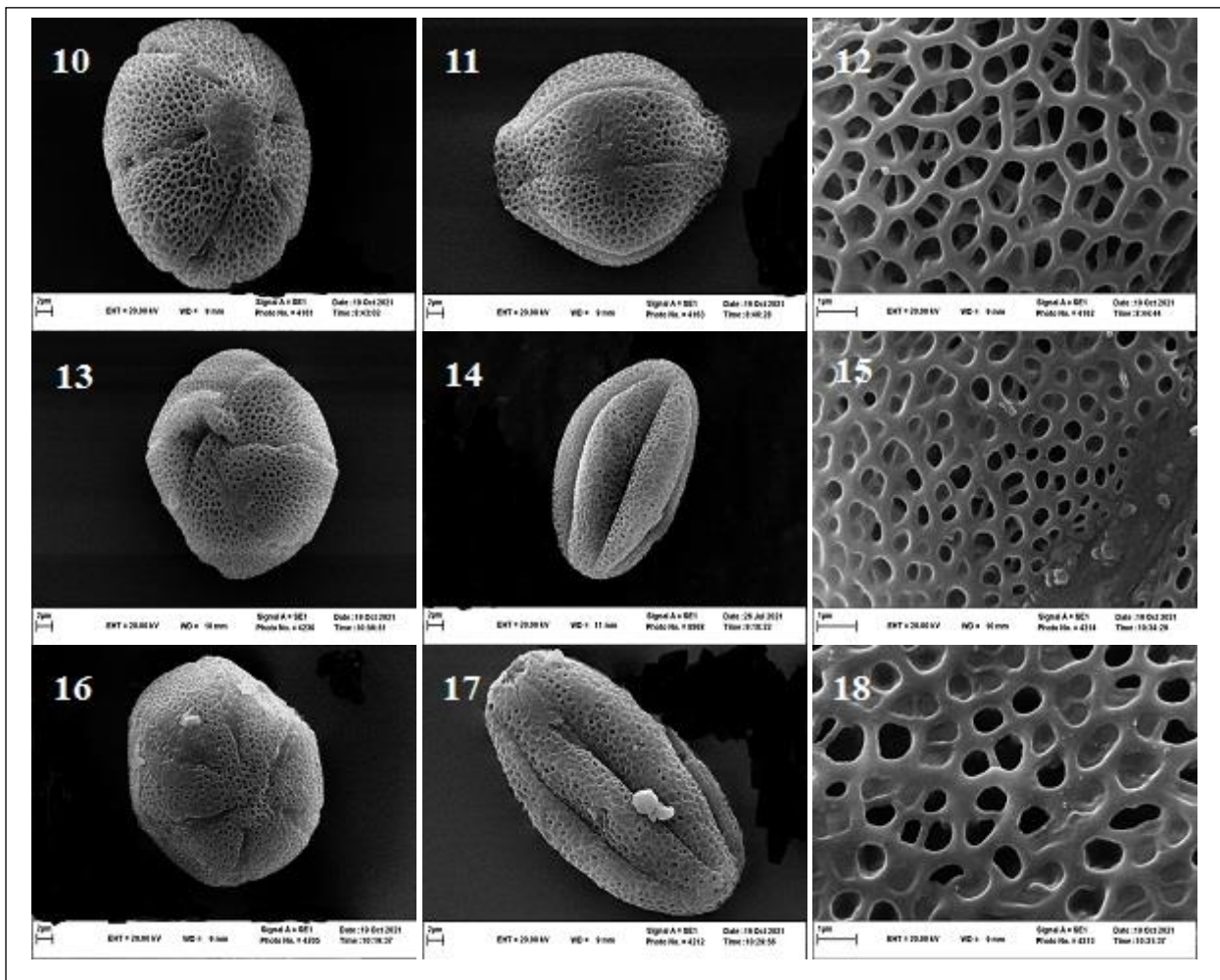
در این مطالعه صفاتی کمی مانند: طول محور قطبی (P)، طول محور استوایی (E)، نسبت طول محور قطبی به طول محور استوایی، ضخامت اگزین، میانگین بیشترین طول لومن، فاصله بین دو لومن و صفات کیفی مانند: شکل دانه گرده و تزئینات سطح اگزین مورد ارزیابی قرار گرفتند. دانه گرده در زیرگونه‌های مورد مطالعه به صورت شش‌شیری، منفرد، جور قطب و تزئینات سطح اگزین دو بار شبکه‌ای است. شکل کلی دانه گرده در زیرگونه *ronnigeri* و *bungeana* بصورت prolate و در زیرگونه *pseudodasyantha* بصورت subprolate و در بین سایر زیر گونه‌ها بصورت prolate-spheroidal بود. همچنین تزئینات سطح اگزین در بین تمام زیرگونه‌های مورد مطالعه به صورت دو بار شبکه‌ای (bireticulate) بود. بزرگترین دانه گرده مربوط به زیر گونه *rigida* (طول محور قطبی ۲۷/۷ و طول محور استوایی ۲۶/۸۱) و کوچکترین دانه گرده مربوط به زیر گونه *bungeana* (طول محور قطبی ۲۲/۷ و طول محور استوایی ۱۶/۳) است (جدول ۱). شکل دانه‌های گرده مربوط به زیر گونه‌های مورد بررسی در دید قطبی به صورت کروی (گرد) و در دید استوایی بصورت بیضوی تا دوکی است. آنالیز داده‌های مربوط به صفات دانه گرده نشان داد که صفاتی مانند ضخامت اگزین، فاصله بین دو لومن و تزئینات سطح اگزین تفاوت معنی داری را در بین زیرگونه‌ها نشان ندادند. سایر صفات مورد بررسی تفاوت معنی داری را نشان دادند و میتوانند در تفکیک زیرگونه‌های مورد بررسی حائز اهمیت باشند.

جدول ۱. نتایج حاصل از مطالعه ریز ریخت شناسی سطح دانه گرده (اندازه ها بر حسب میکرومتر و داده ها به صورت میانگین هستند).

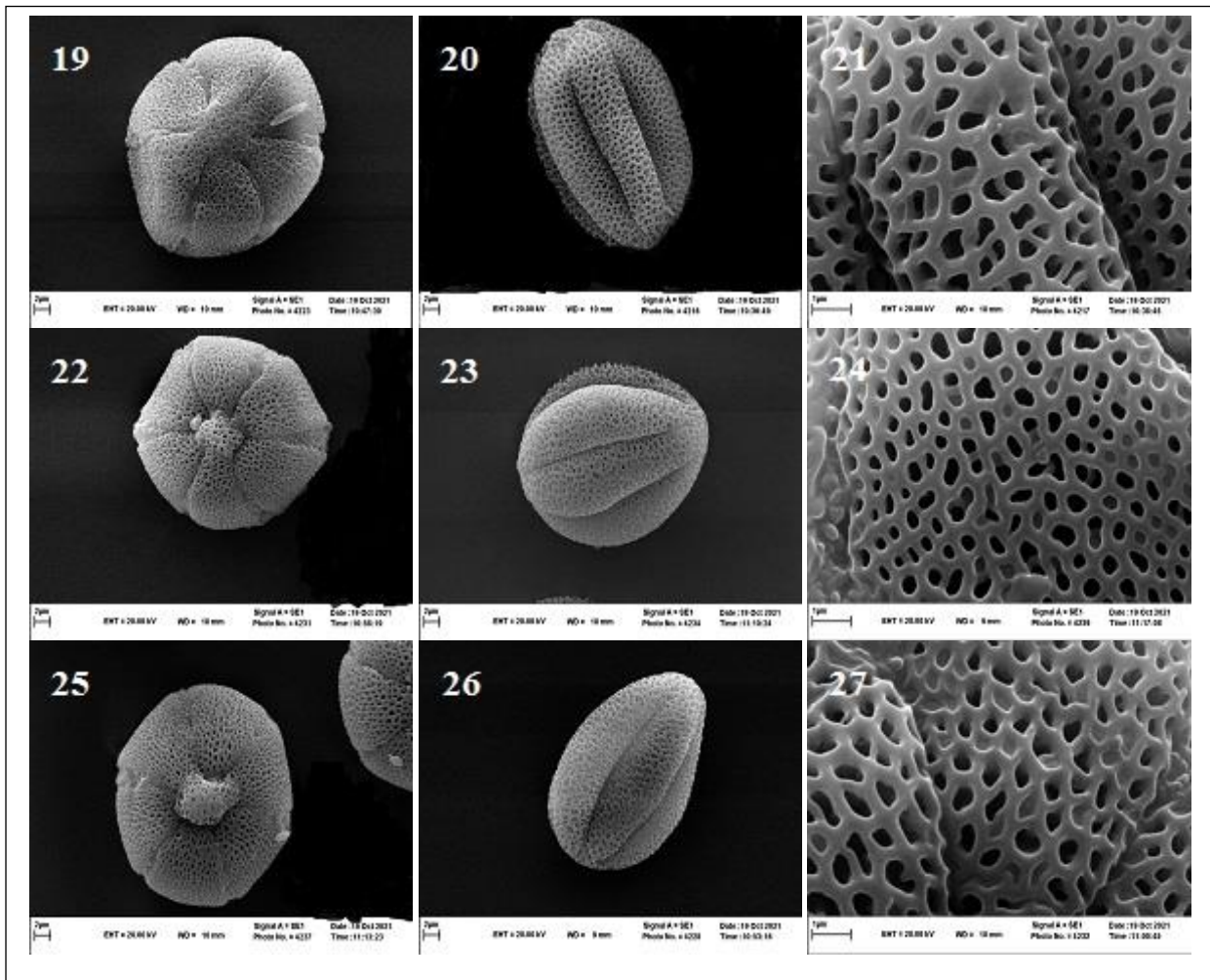
نام زیر گونه	طول محور قطبی (P)	طول محور استوایی (E)	نسبت طول قطبی به استوایی	ضخامت اگزین در نمای قطبی	اندازه بیشترین طول لومن	فاصله بین دو لومن	شکل گرده	تزئینات سطح گرده
<i>Z. clinopodioides</i> subsp. <i>filicaulis</i>	24.61	22.61	1.08	2.19	0.66	0.308	prolate-spheroidal	bireticulate
<i>Z. clinopodioides</i> subsp. <i>ronnigeri</i>	24.58	17.78	1.37	2.17	0.57	0.308	prolate	bireticulate
<i>Z. clinopodioides</i> subsp. <i>bungeana</i>	23.50	16.5	1.42	2.26	0.54	0.296	prolate	bireticulate
<i>Z. clinopodioides</i> subsp. <i>pseudodasyantha</i>	26.75	22.77	1.17	2.02	0.63	0.325	subprolate	bireticulate
<i>Z. clinopodioides</i> subsp. <i>szowitsi</i>	25.43	22.60	1.12	2.17	0.61	0.304	prolate-spheroidal	bireticulate
<i>Z. clinopodioides</i> subsp. <i>rigida</i>	26.78	26.38	1.01	2.20	0.69	0.324	prolate-spheroidal	bireticulate
<i>Z. clinopodioides</i> subsp. <i>afghanica</i>	27.21	24.41	1.11	2.31	0.55	0.340	prolate-spheroidal	bireticulate
<i>Z. clinopodioides</i> subsp. <i>curdica</i>	24.86	24.29	1.02	2.16	0.50	0.320	prolate-spheroidal	bireticulate
<i>Z. clinopodioides</i> subsp. <i>elbursensis</i>	26.24	25.00	1.05	2.11	0.63	0.310	prolate-spheroidal	bireticulate



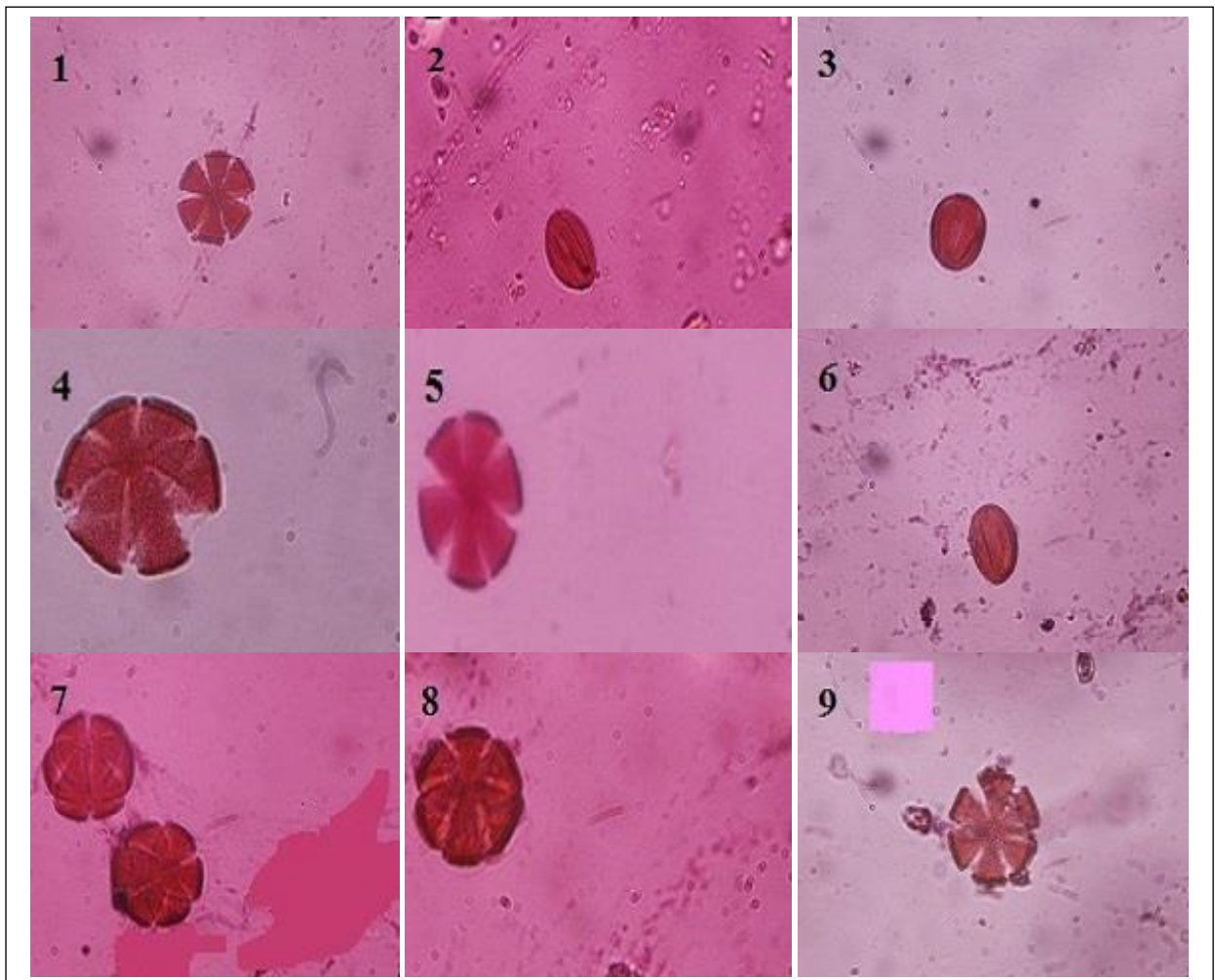
شکل ۱. میکروگراف میکروسکوپ الکترونی نگاره از نمای قطبی و استوایی دانه گرده با بزرگنمایی $8000\times$ و تزیینات سطح اگزین با بزرگنمایی $4000\times$.
Z. clinopodioides subsp. *filicaulis* (1-3), *Z. clinopodioides* subsp. *ronnigeri* (4-6), *Z. clinopodioides* subsp. *bungeana* (7-9).



شکل ۲. میکروگراف میکروسکوپ الکترونی نگاره از نمای قطبی و استوایی دانه گرده با بزرگنمایی $8000\times$ و تزئینات سطح اگزین با بزرگنمایی $40000\times$.
Z. clinopodioides subsp. *pseudodasyantha* (10-12), *Z. clinopodioides* subsp. *szowitzi* (13-15), *Z. clinopodioides* subsp. *rigida* (16-18).



شکل ۳. میکروگراف میکروسکوپ الکترونی نگاره از نمای قطبی و استوایی دانه گرده با بزرگنمایی ۸۰۰۰X و تزیینات سطح اگزین با بزرگنمایی ۴۰۰۰۰X. *Z. clinopodioides* subsp. *afghanica* (19-21), *Z. clinopodioides* subsp. *curdica* (22-24), *Z. clinopodioides* subsp. *elbursensis* (25-27).



شکل ۴. میکروگراف میکروسکوپ نوری از نمای قطبی و استوایی دانه گرده با بزرگنمایی ۴۰x و مقیاس ۵ میکرومتر —
نمای قطبی (1, 4, 5, 7, 8, 9)، نمای استوایی (2, 3, 6).

Z. clinopodioides subsp. *filicaulis* (1), *Z. clinopodioides* subsp. *ronnigeri* (2), *Z. clinopodioides* subsp. *bungeana* (3),
Z. clinopodioides subsp. *pseudodasyantha* (4), *Z. clinopodioides* subsp. *szowitsi* (5), *Z. clinopodioides* subsp. *rigida* (6),
Z. clinopodioides subsp. *afghanica* (7), *Z. clinopodioides* subsp. *curdica* (8), *Z. clinopodioides* subsp. *elbursensis* (9).

۴. بحث:

Rechinger (1984) در فلورا ایرانیکا گونه *Z. clinopodioides* را بر اساس ویژگی‌های ریخت شناسی به صورت نه زیرگونه معرفی کرده است (*Z. clinopodioides* subsp. *rigida*, *Z. clinopodioides* subsp. *curdica*, *Z. clinopodioides* subsp. *afghanica*, *Z. clinopodioides* subsp. *bungeana*, *Z. clinopodioides* subsp. *elbursensis*, *Z. clinopodioides* subsp. *filicaulis*, *Z. clinopodioides* subsp. *ronnigeri*, *Z. clinopodioides* subsp. *szowitsi*, *Z. clinopodioides* subsp. *pseudodasyantha*). Moon و همکاران (۲۰۰۸) ریخت شناسی دانه‌های گرده در زیر طایفه *Menthinae* را مطالعه کردند. آنها ۵۸ گونه از ۴۲ جنس از جمله گونه *Z. clinopodioides* را مورد بررسی قرار دادند. همچنین پیشنهاد کردند که دانه‌های گرده این گونه *Hexacolpate*، از نوع کوچک و تزئینات اگزین به صورت دو بار شبکه‌ای است. کشاورزی و همکاران (۲۰۰۸) گزارش داد که دانه‌های گرده *Z. clinopodioides* به صورت شش شیاری، و به شکل *prolate*, *prolate-spheroidal* و *spheroidal* است. تزئینات سطح اگزین نیز به صورت دوگانه است. همچنین *Z. clinopodioides* subsp. *elbursensis* به طور مشخص از سایر زیر گونه‌های مورد مطالعه جدا نشده است. با این حال، مشخص شد که زیرگونه‌های *szowitsii*, *rigida* و *pseudodasyantha* به وضوح از هم جدا شده است. سلوی و همکاران (۲۰۱۳) پیشنهاد کردند که دانه‌های گرده *Z. clinopodioides* شش شیاری، متقارن، هم‌قطب، به شکل کروی تا دوکی هستند و تزئینات اگزین به صورت دوگانه است. نتایج پژوهش حاضر تا حدود زیادی مطالعات فوق را تایید کرد. دانه گرده همه زیر گونه‌های مورد بررسی به صورت شش شیاری، منفرد، جور قطب و تزئینات سطح اگزین دو بار شبکه‌ای هستند. بر اساس ویژگی‌های ریخت شناسی و ریز ریخت شناسی دانه گرده، *Z. clinopodioides* subsp. *rigida*, *Z. clinopodioides* subsp. *afghanica*, *Z. clinopodioides* subsp. *bungeana*, *Z. clinopodioides* subsp. *ronnigeri*, *Z. clinopodioides* subsp. *szowitsi*, *Z. clinopodioides* subsp. *pseudodasyantha* به طور کامل از هم تفکیک میشوند. سایر زیر گونه‌ها در یک گروه قرار گرفتند و نمیتوان آنها را بطور قطعی تفکیک کرد.

۵. نتیجه گیری:

بحث‌های زیادی در مورد طبقه بندی درون گونه‌ای *Z. clinopodioides* وجود دارد. بدین منظور، زیرگونه‌های مختلفی برای آن در فلورهای مختلف مشخص شده است. این زیرگونه‌ها از نظر ریخت شناسی بسیار مشابه هم هستند. بنابراین، از صفات مربوط به دانه گرده برای شناسایی و تفکیک زیر گونه‌های کاکوتی کوهی استفاده شد. مطالعه حاضر نشان داد که ویژگی‌هایی گرده شناسی می‌تواند تا حدود زیادی برای تفکیک زیر گونه‌ها در *Z. clinopodioides* مفید تلقی شوند. دانه گرده همه زیر گونه‌های مورد بررسی به صورت شش شیاری، منفرد، جور قطب و تزئینات سطح اگزین دو بار شبکه‌ای هستند. بر اساس ویژگی‌های ریخت شناسی و ریز ریخت شناسی دانه گرده، *Z. clinopodioides* subsp. *rigida*, *Z. clinopodioides* subsp. *afghanica*, *Z. clinopodioides* subsp. *bungeana*, *Z. clinopodioides* subsp. *ronnigeri*, *Z. clinopodioides* subsp. *szowitsi*, *Z. clinopodioides* subsp. *pseudodasyantha* به طور کامل از هم تفکیک میشوند. سایر زیر گونه‌ها در یک گروه قرار گرفتند و نمیتوان آنها را بطور قطعی تفکیک کرد.

منابع

- [1] زیبا جم زاد، ۱۳۸۸. آویشن و مرزه‌های ایران، انتشارات موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، ص ۱۷۱.
- [2] Harley, R.M., S. Atkins, A. L., Budantsev, P. D., Cantino, B.J., Conn, R. Grayer, M. M., Harley, R., De kok, T. Krestovskaja, R. Morales, A. Paton, O. and T. Upson. (2004). Labiateae. In: The families and genera of Vascular plants, flowering plants: dicotyledons (lamiales axcept Acanthaceae including Avicenniaceae) Kadereit, J. W (ed). Vol VII. Berlin and Heidelberg. Springer Verlag.
- [3] Jamzad, Z., Ingrouille, M. and Simmonds, M. S. J. (2003). Three new species of *Nepeta* (Lamiaceae) from Iran. *Taxon*, 52: 93-98.
- [4] Erdtman, G. (1945). Pollen Morphology and Plant Taxonomy. IV. Labiatae, Verbenaceae and Avicenniaceae. *Svensk Bot. Tidskr.*, 39: 279-285.
- [5] Rechinger, K. H. 1984. *Flora Iranica*. 150 (2): 480-493, Graz.

- [6] Moon, H.K., Vinckier, S., Smets, E. and Huysmans, S. (2008). Palynological evolutionary trends within the tribe Mentheae with special emphasis on subtribe Menthinae (Nepetoideae: Lamiaceae). *Plant Systematics and Evolution*. 275: 93–108.
- [7] Keshavarzi, M., Jahandideh, R. and Bokaei, ZN. (2008). Morphological and anatomical studies on *Ziziphora clinopodioides* Lam. (Labiatae). *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 11: 599–605.
- [8] Selvi, S., Satil, F., Martin, E., Celenk S. & Dirmenci T. (2013). Some evidence for infrageneric classification in *Ziziphora* L. (Lamiaceae:Mentheae), *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*. Official Journal of the Societa Botanica Italiana.