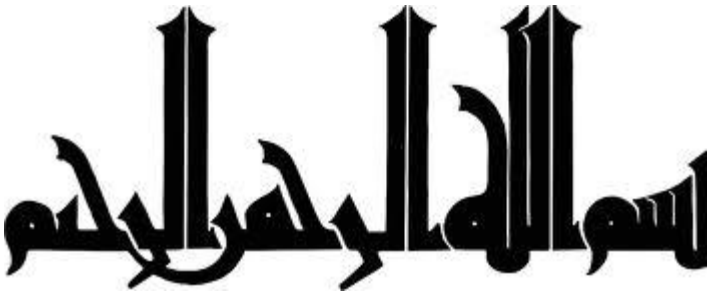
بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده کشاورزی

پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد رشته‌ی بیوتکنولوژی گرایش کشاورزی

عنوان پایان‌نامه

آنالیز فیلوژنتیکی گونه‌های جنس *Stachys* L. در ناحیه زاگرس مرکزی ایران با بهره‌گیری از توالی‌یابی نواحی DNA ITS ریبوزومی و trnL - trnF کلروپلاستی

استادان راهنما:
دکتر بهروز شیران
دکتر نواز خرازیان

پژوهشگر:
مریم علیان

اسفند ماه ۱۳۹۲

دانشکده کشاورزی

گروه بیوتکنولوژی و اصلاح نباتات

پایان‌نامه سرکار خانم مریم علیان جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی گرایش کشاورزی با عنوان : آنالیز فیلوژنتیکی گونه‌های جنس *Stachys* L. در ناحیه زاگرس مرکزی ایران با بهره‌گیری از توالی‌یابی نواحی DNA ITS ریبوزومی و trnL-trnF کلروپلاستی در تاریخ ۱۳۹۲/۱۲/۷ با حضور هیأت داوران زیر بررسی و با نمره ۱۹/۷۰ مورد تصویب نهایی قرار گرفت.

۱. **استادان راهنمای پایان‌نامه**

آقای دکتر بهروز شیران (استاد) .....

خانم دکتر نواز خرازیان (استادیار) .....

۲. **استادان مشاور پایان‌نامه**

....

۳. **استادان داور پایان‌نامه**

آقای دکتر نصرالله پیرانی (دانشیار) .....

آقای دکتر سعدالله هوشمند (دانشیار) .....

دکتر سید حسن طباطبایی

معاون پژوهشی و تحصیلات تکمیلی

دانشکده کشاورزی

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات

و نوآوری‌های ناشی از تحقیق موضوع این پایان‌نامه

متعلق به دانشگاه شهرکرد است.

تشکر و قدردانی

افتادگی آموز اگر طالب فیضی هرگز نخورد آب زمینی که بلند است

سپاس و ستایش بیکران به درگاه ایزدمنان که توفیق تلاش برای دانستن را به من عطا فرمود. اکنون که به یاری خداوند متعال رساله‌ی خود را در مقطع کارشناسی ارشد به پایان رسانده‌ام به مصداق آیهٔ شریفهٔ ﴿**مَنْ لَمْ یَشکُرِ المَخْلوق لَمْ یَشکُرِ الخالِق**﴾ بر خود لازم می‌دانم از کلیه‌ی سرورانی که در مراحل مختلف این پژوهش مرا یاری نمودند صمیمانه تشکر و قدردانی نمایم.

تمام احساس قلبی و بهترین سپاس‌ها را نثار خانواده عزیزم بویژه پدر و مادر مهربانم می کنم که هرچه دارم نتیجه تلاش، ایثار و دعای خیر آن‌هاست.

از اساتید بزرگوارم، جناب آقای دکتر بهروز شیران و خانم دکتر نواز خرازیان که راهنمایی این پایان نامه را بر عهده داشتند نهایت تشکر را دارم و کمک‌های ایشان را سپاس می‌دارم.

از آقایان دکتر نصرالله پیرانی و دکتر سعدالله هوشمند که قلم تصحیح بر پایان نامه اینجانب گذاشتند، سپاسگزارم.

از سرکارخانم فرح ناز توکلی مسئول محترم آزمایشگاه بیوتکنولوژی و همچنین آقای مهندس صادق موسوی و خانم مهندس میترا وندا و فاطمه شفیع زاده و

سایر دوستان عزیزم که هر کدام به نحوی در این راه یاری‌گرم بودند قدردانی نموده و موفقیتشان را در تمام لحظات زندگی آرزو می‌کنم.

این ناچیز را اگر قدری است

تقدیم می‌کنم به :

پدر و مادر مهربانم

که معنای تلاش را به من آموختند و سروش هستی را در جانم سروده و با دعایشان آینده‌ام را روشنی بخشیدند.

و

خواهران و برادران عزیزم وجیهه، نفیسه، علی‌رضا و محمد

و

تقدیم به آنانکه با چشمانی نیک به زندگانی می‌نگرند و با امید به آینده پیش می‌روند.

چکیده

جنس *Stachys* L. (تیره Lamiaceae، زیرتیره Lamioideae) به طور تقریبی با داشتن ۳۰۰ گونه در زمره بزرگ-ترین و ارزشمندترین جنس‌های خانواده نعناعیان (Lamiaceae) محسوب می‌شود که هر یک از گونه‌های آن از لحاظ دارویی و اقتصادی دارای اثرات مثبت فراوانی می‌باشند. ایران با داشتن ۳۴ تا ۳۵ گونه از این جنس که ۱۷ گونه آن بومی این کشور بوده به عنوان یکی از مراکز اصلی پراکنش این گیاه محسوب می‌شود که پراکنش آن بیشتر در سمت شمال غربی کشور است. *Stachys* تک‌پایه و شامل گیاهان چند ساله و یک ساله می‌باشد و تغییرات گسترده‌ای را در خصوصیات مورفولوژیکی و سیتولوژیکی از خود نشان می‌دهند. گونه‌های این جنس به صورت خزنده تا بالا رونده یا درختچه‌های پشته‌ای رشد می‌نمایند. این گیاهان در شرایط اکولوژیکی مختلفی می‌رویند. بیشتر گونه‌های این جنس ترجیح می‌دهند که در مناطق با ارتفاع زیاد و دامنه کوه‌ها زندگی کنند. به دلیل مقدار زیاد ترکیبات ثانویه، چندین گونه‌ی آن از قدیم الایام به طور سنتی به عنوان دارو مورد مصرف قرار می‌گرفته است. برخی از گونه‌های آن در ایران به دلیل از بین بردن و دست‌کاری زمین‌های دست نخورده در معرض خطر نابودی قرار گرفته‌اند درحالی‌که برخی دیگر به دلیل مقاومت نسبت به چرا گسترش یافته‌اند. وضعیت موجود در این جنس به لحاظ پراکنش و تاکسونومی پیچیده گونه‌های آن در ایران نا مشخص بوده و حدود گونه‌های آن به دلیل خویشاوندی بالا و تبادلات ژنی مخدوش گردیده است. شناسایی گونه‌ها و زیرگونه‌های این جنس بر اساس علائم فنوتیپی کاری دشوار است. از این رو در این مطالعه پس از جمع‌آوری ۲۸۰ جمعیت از مناطق مختلف زیستگاه‌های طبیعی زاگرس مرکزی ایران به منظور شناسایی گونه-های موجود این جنس در این ناحیه از طریق بررسی‌های مورفولوژیکی، ۱۳ گونه به همراه ۳ زیر گونه شناسایی شد که در شش بخش *Ambleia*، *Aucheriana*، *Eriostomum*، *Fragilicaulis*، *Setifolia* و *Zeitenia* قرار گرفته‌اند. به منظور بررسی روابط فیلوژنی موجود در بین گونه‌ها، از روش قدرتمند توالی‌یابی نواحی ITS (Internal Transcribed Spacer) هسته‌ای و trnL-F کلروپلاستی بهره گرفته شد. علاوه بر وجود توالی‌های به دست آمده از گونه‌های شناسایی شده، پنج توالی دیگر مربوط به هر یک از این نواحی نیز از بانک ژن NCBI گرفته شد و تمامی آنالیزها به همراه این توالی‌ها صورت گرفت. در این بررسی همچنین *Marrubium crassidens* Boiss (Lamiaceae) به عنوان Out-group انتخاب شد. فیلوگرام‌های مربوطه توسط نرم افزار MEGA5. و PAUP4.0b4 بر اساس روش Maximum Parsimony با استفاده از مدلkimura 2-parameter رسم گردید. نتایج حاصل نشان داد نواحی کلروپلاستی همچون trnL intron و trnL-trnF intergenic spacer می‌توانند در جداسازی گونه‌های این جنس در سطح بخش نسبت به ناحیه ITS هسته‌ای بهتر عمل نمایند، به طوری که توانسته‌اند گونه‌های دو بخش *Fragilicaulis* و *Eristomum* را به خوبی جدا نمایند و تفاوت‌های موجود درون بخش‌های non-monophyletic را نشان دهند. علاوه بر آن مشخص شد که بخش *Setifolia* یک بخش non-monophyletic می‌باشد و همچنین هیبریداسیون شدیدی ما بین اجداد گونه‌های متعلق به بخش‌های *Setifolia* و *Ambleia* و *Zeitenia* می‌تواند رخ داده باشد. اما به منظور تأیید قطعی تغییرات تاکسونومیکی گفته شده، از نظر فیلوژنتیکی نیازمند انجام آنالیزهای گسترده‌ای در سطح مولکولی می‌باشد که به طور کامل تمامی تاکسون‌های *Stachys* متعلق به ناحیه زاگرس مرکزی ایران را شامل شود.

کلمات کلیدی: *Stachys*، Lamiaceae، ITS، trnL-F، زاگرس مرکزی ایران، فیلوژنی مولکولی

فهرست مطالب

عنوان شماره صفحه

فصل اول مقدمه ۱
۱-۱ کلیات ۱
۱-۲ اهداف مطالعه ۳
۱-۴ ساختار پایان نامه ۳
فصل دوم بررسی منابع ۴
۲-۱ ساختار فلوریستیک ایران ۴
۲-۲ خصوصیات گیاه‌شناسی تیره Lamiaceae ۵
۲-۳ مورفولوژی جنس *Stachys* ۷
۲-۳-۱ *Stachys* ۷
۲-۳-۲ مشخصات مورفولوژیکی هر یک از گونه‌های مورد مطالعه ۸
أ. *S. cretica* ۸
ب. *S. setifera* ۸
ج. *S. megalodonta* ۸
د. *S. ballotiformis* ۹
ه. *S. benthamiana* ۱۰
و. *S. kurdica* ۱۰
ز. *S. asterocalyx* ۱۱
ح. *S. acerosa* ۱۱
ط. *S. aucheri* ۱۲
ی. *S. pilifera* ۱۲
ک. *S. multicaulis* ۱۳
ل. *S. lavandulifolia* ۱۳
م. *S. inflata* ۱۴
۲-۴ تاکسونومی جنس *Stachys* ۱۴
۲-۵ استفاده‌های درمانی ازجنس *Stachys* L. ۱۸
۲-۶ تنوع ژنتیکی ۱۸
۲-۶-۱ هیبریداسیون و اینتروگرسیون ۱۹
۲-۷ فیلوژنی مولکولی ۲۰
۲-۷-۱ درخت‌های فیلوژنتیک ۲۱
۲-۷-۲ نواحی DNAی کلروپلاستی و ژنومی مورد مطالعه ۲۱
۲-۷-۲-۱ نواحی DNAی کلروپلاستی (cpDNA) ۲۲
۲-۷-۲-۲ ناحیه DNA ژنومی ۲۳
۲-۸ مروری بر پژوهش‌های انجام شده ۲۴
۲-۸-۱ مطالعات تاکسونومی ۲۵

۲-۸-۲ مطالعات مولکولی..... ۲

فهرست مطالب

عنوان شماره صفحه

فصل سوم مواد و روشها..... ۳۲
۳-۱ جمع‌آوری نمونه..... ۳۲
۳-۲ بررسی‌های مورفولوژیکی..... ۳۴
۳-۳ بررسی‌های مولکولی..... ۳۴
۳-۳-۱ استخراج DNA..... ۳۴
۳-۳-۲ تعیین کمیت و کیفیت DNA..... ۳۶
۳-۳-۳ تکثیر ناحیه ITS هسته‌ای و trnL-F کلروپلاستی با استفاده از PCR..... ۳۷
۳-۳-۴ خالص سازی محصولات PCR..... ۴۰
۳-۳-۵ ساخت مخلوط واکنش اتصال (ligation) ۴۱
۳-۳-۶ تهیه سلول‌های کامپتنت..... ۴۱
۳-۳-۷ تراریخت نمودن سلول‌های کامپتنت..... ۴۳
۳-۳-۸ PCR کلونی..... ۴۳
۳-۳-۹ آماده سازی کلون‌های مورد نظر برای فرستادن به شرکت ماکروژن کره جنوبی به‌منظور توالی‌یابی..... ۴۵
۳-۳-۱۰ آنالیز داده‌ها..... ۴۵
فصل چهارم نتایج و بحث..... ۴۸
۴-۱ نتایج حاصل از انجام آنالیزهای مورفولوژی..... ۴۸
۴-۱-۱ بخش *Fragilicaulis*..... ۴۸
۴-۱-۱-۱ *St. benthamiana*..... ۴۸
۴-۱-۱-۲ *St. megalodonta*..... ۴۸
۴-۱-۱-۳ *S. ballotiformis*..... ۴۹
۴-۱-۱-۴ *S. kurdica*..... ۴۹
۴-۱-۱-۵ *S. asterocalyx*..... ۴۹
۴-۱-۲ سکشن *Aucheriana*..... ۴۹
۴-۱-۲-۱ *S. pilifera*..... ۴۹
۴-۱-۲-۲ *S. aucheri*..... ۴۹
۴-۱-۲-۳ *S. acerosa*..... ۴۹
۴-۱-۲-۴ *S. multicaulis*..... ۵۰
۴-۱-۳ بخش *Setifolia*..... ۵۰
۴-۱-۳-۱ *S. setifera*..... ۵۰
۴-۱-۴ بخش *Eriostomum*..... ۵۰
۴-۱-۴-۱ *S.cretica*..... ۵۰
۴-۱-۵ بخش *Zietenia*..... ۵۰
۴-۱-۵-۱ *S. lavandulifolia*..... ۵۰

۴-۱-۶ بخش *Ambleia* ۵۱

فهرست مطالب

عنوان شماره صفحه

۴-۱-۶-۱ *S. inflata* ۵۱
۴-۲ تجزیه و تحلیل داده‌های مولکولی ۵۱
۴-۲-۱ استخراج DNA ۵۱
۴-۲-۲ تعیین کیفیت و کمیت DNA ژنومی ۵۴
۴-۲-۳ تکثیر ناحیه کلروپلاستی trnL-F و ناحیه هسته‌ای ITS ۵۴
۴-۲-۴ تراریخت نمودن سلول‌های کامپتنت ۵۸
۴-۳ تنوع و فیلوژنی مولکولی در *Stachys* ۶۲
۴-۳-۱ محاسبات آماری تنوع مولکولی گونه‌های *Stachys* براساس هر یک از نواحی مورد بررسی ۶۲
۴-۳-۱-۱ نتایج حاصل از ناحیه trnL-F ۶۴
۴-۳-۱-۲ نتایج حاصل از ناحیه trnL intron (trnL5′-trnL3′) ۶۶
۴-۳-۱-۳ نتایج حاصل از ناحیه trnL-trnF intergenic spacer ۶۹
۴-۳-۱-۴ نتایج حاصل از ناحیه ITS (Internal Transcribed Spacer) ۷۱
۴-۳-۲ رابطه فیلوژنتیکی بین گونه‌های جنس *Stachys* ۷۶
۴-۳-۲-۱ رابطه فیلوژنتیکی گونه‌های جنس *Stachys* با استفاده از توالی‌های ناحیه trnL-F ۷۶
۴-۳-۲-۲ رابطه فیلوژنتیکی گونه‌های جنس *Stachys* با استفاده از توالی‌های ناحیه nrDNA مورد بررسی (ITS) ۸۴
۴-۴ بحث و نتیجه‌گیری کلی ۸۶
۴-۴-۱ بحث ۸۶
۴-۴-۲ نتیجه‌گیری کلی ۹۰
۴-۴-۳ پیشنهادات ۹۱
پیوست ۱ (استخراج DNA با استفاده از کیت Bio Flux) ۹۲
پیوست ۲ (نحوه تهیه بافرها و محلول‌های مورد نیاز) ۹۴
پیوست ۳ (محاسبه insert مورد نیاز در ساخت مخلوط واکنش اتصال) ۹۷
پیوست ۴ (فیلوگرام‌های حاصل از روش Neighbor Joining) ۹۸
فهرست منابع ۱۰۲

فهرست جداول

عنوان شماره صفحه

جدول۲-۱ تعداد گونه‌های *Stachys* در مناطق مختلف جغرافیایی (سلمکی و همکاران، ۲۰۱۲).....۱۶
جدول ۲-۲ خلاصه‌ای از تاریخچه تاکسونومی *Stachys* (سلمکی و همکاران، ۲۰۱۲).....۱۷
جدول ۳-۱ نمونه‌های جمع‌آوری شده از برخی مناطق زاگرس مرکزی ایران.....۳۳
جدول ۳-۲ نوع و مقدار مواد مورد استفاده در واکنش PCR به‌منظور تکثیر توالی هسته‌ای ITS.....۳۸
جدول ۳-۳ نوع و مقدار مواد مورد استفاده در واکنش PCR به‌منظور تکثیر توالی کلروپلاستی trnL-F.....۳۹
جدول ۳-۴ سیکل گرمایی استفاده شده در واکنش PCR به‌منظور تکثیر توالی هسته‌ای ITS.....۳۹
جدول ۳-۵ سیکل گرمایی استفاده شده در واکنش PCR به‌منظور تکثیر توالی کلروپلاستی trnL-F.....۴۰
جدول ۳-۶ پرایمرهای استفاده شده در PCR کلونی.....۴۴
جدول ۳-۷ نوع و مقدار مواد مورد استفاده در واکنش PCR کلونی به‌منظور تکثیر insert مورد نظر.....۴۴
جدول ۳-۸ سیکل گرمایی استفاده شده در واکنش PCR به‌منظور تکثیر توالی موجود در کلون‌های انتخابی.....۴۵
جدول ۳-۹ لیست گونه‌های مورد استفاده به همراه شماره دستیابی بانک ژن.....۴۷
جدول ۴-۱ اندازه گیری کیفیت و کمیت DNA استخراج شده به روش تغییر یافته CTAB، با استفاده از دستگاه اسپکتوفوتومتر.....۵۵
جدول ۴-۲ ترکیب پرایمری مورد استفاده در هر یک از گونه‌های مورد نظر.....۵۸
جدول ۴-۳ اطلاعات مربوط به توالی‌های تراز شده و آنالیز آماری Maximum Parsimony.....۶۳
جدول ۴-۴ برآورد الگوی جایگزینی نوکلئوتیدی در تمامی گونه‌های جنس *Stachys* با توجه به ناحیه trnL-F.....۶۶
جدول ۴-۵ واگرایی تکاملی بین گونه‌های مورد مطالعه با استفاده از ناحیه trnL-F کلروپلاستی.....۶۷
جدول ۴-۶ واگرایی ژنتیکی محاسبه شده با استفاده از ناحیه trnL-F کلروپلاستی درون هر بخش.....۶۸
جدول ۴-۷ واگرایی ژنتیکی محاسبه شده و خطای معیار آن با استفاده از ناحیه trnL-F کلروپلاستی مابین بخش‌های مورد بررسی.....۶۸
جدول ۴-۸ واگرایی ژنتیکی محاسبه شده و خطای معیار آن با استفاده از ناحیه trnL-F کلروپلاستی، مابین بخش‌های مورد بررسی که تنها گونه‌های متعلق به زاگرس مرکزی را شامل شده اند. ۶۸
جدول ۴-۹ واگرایی تکاملی بین تمامی گونه‌های جنس *Stachys* مورد مطالعه با استفاده از ناحیه اینترونی trnL ۷۰
جدول ۴-۱۰ واگرایی تکاملی بین تمامی گونه‌های جنس *Stachys* مورد مطالعه با استفاده از داده‌های ناحیه trnL-trnF intergenic spacer.....۷۲
جدول ۴-۱۱ واگرایی تکاملی بین تمامی گونه‌های جنس *Stachys* مورد مطالعه با استفاده از داده‌های ناحیه ITS...۷۴
جدول ۴-۱۲ واگرایی ژنتیکی محاسبه شده درون هر بخش با استفاده از ناحیه ITS.....۷۵
جدول ۴-۱۳ واگرایی ژنتیکی محاسبه شده با استفاده از ناحیه ITS هسته‌ای مابین بخش‌های مورد بررسی.....۷۵
جدول ۴-۱۴ واگرایی ژنتیکی محاسبه شده با استفاده از ناحیه ITS هسته‌ای مابین بخش‌های مورد بررسی که تنها گونه‌های متعلق به زاگرس مرکزس را شامل شده اند.....۷۵
جدول ۴-۱۵ موقعیت نواحی ایندل و جایگزینی‌های نوکلئوتیدی اتفاق افتاده (نوکلئوتیدهای قرمز رنگ) در طول توالی کلروپلاستی trnL-F گونه‌های مورد مطالعه.....۸۰

فهرست شکل‌ها

عنوان شماره صفحه

شکل ۳-۱- موقعیت و توالی پرایمرهای استفاده شده در تکثیر ناحیه ITS هسته‌ای در *Stachys*.....۳۷
شکل ۳-۲- موقعیت و توالی پرایمرهای استفاده شده در تکثیر ناحیه trnL-F کلروپلاستی در *Stachys*.....۳۸
شکل ۴-۱- عکس‌های متعلق به برخی از گونه‌های جنس *Stachys*.....۵۲
شکل ۴-۲- ژل تعیین کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از روش تغییر یافته CTAB.....۵۴
شکل ۴-۳- محصولات PCR ناحیه ITS هسته‌ای بارگذاری شده بر روی ژل آگارز ۱٪.....۵۶
شکل ۴-۴- محصولات PCR ناحیه trnL-F کلروپلاستی بارگذاری شده بر روی ژل آگارز ۱٪.....۵۶
شکل ۴-۵- خالص‌سازی محصولات PCR ناحیه ITS هسته‌ای بارگذاری شده بر روی ژل آگارز ۱٪.....۵۷
شکل ۴-۶- خالص‌سازی محصولات PCR ناحیه trnL-F کلروپلاستی بارگذاری شده بر روی ژل آگارز ۱٪.....۵۸
شکل ۴-۷- محصول PCR کلونی ناحیه ITS از کلون‌های انتخابی سفید به دست آمده از تراریخت نمودن باکتری DH5α.....۶۰
شکل ۴-۸- محصول PCR کلونی ناحیه trnL-F از کلون‌های انتخابی سفید به دست آمده از تراریخت نمودن باکتری DH5α.....۶۰
شکل ۴-۹- مثالی از کروماتوگرام به دست آمده از ناحیه ITS.....۶۱
شکل ۴-۱۰- مثالی از کروماتوگرام به دست آمده از ناحیه trnL-F.....۶۱
شکل ۴-۱۱- قسمتی از هم‌ترازی توالی‌های حاصل از ناحیه ITS گونه‌های جنس *Stachys*.....۶۲
شکل ۴-۱۲- قسمتی از هم‌ترازی توالی‌های حاصل از ناحیه trnL-F گونه‌های جنس *Stachys*.....۶۲
شکل ۴-۱۳- فیلوگرام حاصل از توالی‌های کل ناحیه trnL-F گونه‌های جنس *Stachys*.....۸۱
شکل ۴-۱۴- فیلوگرام حاصل از توالی‌های ناحیه trnL intron گونه‌های جنس *Stachys*.....۸۲
شکل ۴-۱۵- فیلوگرام حاصل از توالی‌های ناحیه trnL-trnF intergenic spacer گونه‌های جنس *Stachys*.۸۳
شکل ۴-۱۶- فیلوگرام حاصل از توالی‌های ناحیه ITS1-5.8S-ITS2 گونه‌های جنس *Stachys*.....۸۵

فصل اول

مقدمه

۱-۱ کلیات

از هزاران سال پیش، بشر از مواد طبیعی به عنوان یکی از منابع مهم برای درمان بیماری‌ها استفاده می‌کرده است و در این میان گیاهان همیشه نقش مهمی را در درمان و سلامت جوامع بشری ایفا کرده‌اند (آنی‌نام، ۱۹۹۵؛ لیو و عمار، ۲۰۰۰). گیاهان دارویی از منابع ارزشمند در گستره وسیع منابع طبیعی ایران هستند که شناخت و کشت و پرورش علمی آن‌ها می‌تواند نقش مهمی در سلامت جامعه، اشتغال‌زایی، جلوگیری از فرسایش ژنتیکی گونه‌های دارویی ارزشمند به علت برداشت غیراصولی آن‌ها از رویشگاه‌های طبیعی و صادرات غیر نفتی داشته باشد (موسوی و همکاران، ۱۳۹۰).

فلور ایران توسط کارل هینز رشینگر در سال ۱۹۶۳ ویرایش و منتشر شد. ایران به دلیل داشتن ساختار جغرافیایی و آب و هوایی خاص خود در مقایسه با کشورهای همسایه پس از ترکیه دارای بالاترین تنوع زیستی در شرق خاورمیانه می‌باشد. بنابراین، تنوع زیستی ایران محققین داخلی و خارجی زیادی را مجذوب خود کرده است. علی‌رغم این که این فلور کامل‌ترین مجموعه از گیاهان موجود در این سرزمین را تشکیل می‌دهد، تا به امروز تاکسون‌های جدیدی به این فلور اضافه شده‌اند و همچنین تغییراتی در سطوح تاکسونومیکی این فلور صورت گرفته‌است. تقریباً تمام این مطالعات بر پایه خصوصیات مورفولوژیکی و گاهی اوقات تاکسونومیکی انجام شده است. در واقع این مطالعات می‌توانند بسیار مفید و رضایت بخش برای درک سطح تاکسونومیکی یک نمونه مورد مطالعه قرار گیرند (یاوری و شاه‌گلزاری، ۲۰۱۰). با این وجود استفاده از خصوصیات مورفولوژیکی به منظور درک صحیح از طبقه‌بندی برخی از تاکسون‌ها مناسب نمی‌باشد به این دلیل که خصوصیات مورفولوژیکی به شدت تحت تأثیر محیط قرار می‌گیرند (کی و همکاران، ۱۹۹۹). این تفاوت‌های مورفولوژیکی بین نمونه‌های گیاهی می‌تواند سبب استدلال غلط در طول مطالعات طبقه‌بندی گیاهان شود. به منظور رفع این مشکل و ساخت درخت فیلوژنی قابل اعتماد، تاکسونومیست‌ها باید سیستم-های جدید طبقه‌بندی و مطالعات بازنگری بیشتری را انجام دهند (دیزکریسی، ۲۰۱۲).

تکنیک‌های مولکولی مختلف، روش‌های قابل اعتمادی را برای مطالعات تاکسونومیکی و تکاملی بر روی گونه‌های گیاهی و جانوری فراهم آورده‌اند. برای مطالعات فیلوژنتیکی علاوه بر نشانگرهایی همچون RFLP و AFLP (تنسکسلی و همکاران، ۱۹۸۹)، توالی‌یابی چندین نقطه ژنوم (زانگ و همکاران، ۲۰۰۸؛ بلاتنر، ۲۰۰۴) و همچنین نواحی ژنوم کلروپلاستی (پترسون و سیبرگ، ۱۹۹۷) نسبت به دیگر روش‌ها ترجیح داده می‌شود. به این دلیل به طور گسترده در شناسایی روابط فیلوژنتیکی به خصوص در سطح تیره استفاده می‌شوند (تابرلت و همکاران، ۱۹۹۱؛ کلچنر، ۲۰۰۰). نواحی غیرکد شونده ژنوم کلروپلاستی به عنوان یک روش مولکولی مؤثر در سطوح پایین‌تر تاکسونومیکی به دلیل سرعت سریع تکامل توالی این ناحیه در مقایسه با نواحی کد شونده مورد استفاده قرار می‌گیرد. نرخ بالای درج و حذف (insertion/deletion) و جایگزینی نوکلئوتیدی در میان نواحی غیر کد شونده DNAی کلروپلاستی سبب نرخ بالای تکامل گردیده است (کلگ و ژوراسکی، ۱۹۹۲). از آنجا که ناحیه ITS در گیاهان عالی دارای توالی طولانی است که حاوی واحدهای تکراری پشت سر هم و توالی بسیار حفاظت شده می‌باشد، در شناسایی روابط فیلوژنتیکی در بین گونه‌های گیاهی و همچنین مطالعات تکاملی بسیار مناسب و کارا تشخیص داده شده است (اپلز و دیوراک، ۱۹۸۲). استفاده مؤثر از این دو ناحیه تاکنون در چندین جنس از جمله *Gaura* L. (هوگارد و همکاران، ۲۰۰۴)، *Lophozia* s. str . Dumort. (ویلنت و همکاران، ۲۰۰۸)، *Leymus* Hochst. (لیو و همکاران، ۲۰۰۸)، *Muhlenbergiinae* (کلومبوس و همکاران، ۲۰۱۰)، *Muros* L. (نپال، ۲۰۱۲) و *Astragalus* L. (دیزکریسی، ۲۰۱۲) انجام شده است.

جنس *Stachys* L. (تیره Lamiaceae، زیرتیره Lamioideae) در زمره بزرگ‌ترین و ارزشمندترین جنس‌های خانواده نعناعیان (Lamiaceae) محسوب می‌شود که هر یک از گونه‌های آن از لحاظ دارویی دارای اثرات مثبت فراوانی می‌باشند. این جنس دارای ۲۷۵ (باتاشارجی، ۱۹۸۰) تا ۴۵۰ (مابرلی، ۲۰۰۸) گونه در سرتاسر دنیا به غیر از استرالیا و نیوزلند بوده که از این میان ۳۴ (قهرمان، ۱۳۷۳) تا ۳۵ گونه در فلور ایران وجود دارد که ۱۳ (رشینگر، ۱۹۸۲) الی ۱۷ (سلمکی و همکاران، ۲۰۱۲) گونه آن بومی ایران می‌باشد. روابط و محدودیت‌های عمومی موجود در خانواده Lamiaceae به طور ضعیفی شناخته شده است. ایران یکی از مراکز اصلی پراکنش این گیاهان محسوب می‌شود که پراکنش این جنس بیشتر در سمت شمال غربی کشور می‌باشد (باتاشارجی، ۱۹۸۰). *Stachys* با داشتن بیشترین تعداد گونه در تیره Lamiaceae یکی از پیچیده‌ترین و مشکل‌سازترین جنس‌های این تیره محسوب می‌شود (سلمکی و همکاران، ۲۰۱۲). گونه‌های این جنس از نظر مورفولوژیکی بسیار مشابه یکدیگر می‌باشند در حالی‌که تنوع گسترده‌ای را از این نظر نیز نشان می‌دهند به طوری که چند شکلی شدیدی در سطح درون گونه‌ای دیده شده است (سلمکی و همکاران، ۲۰۰۸a). به همین دلیل تمایز گونه‌های خویشاوند از یکدیگر بسیار مشکل‌ساز می‌باشد. *Stachys* به دلیل نشان دادن محدوده گسترده‌ای از تنوع، تا کنون از نظر دورن جنسی چندین طبقه‌بندی را شامل شده است (باتاشارجی، ۱۹۸۰). با وجودی که، اعضای *Stachys* از دیگر جنس‌های موجود در تبار Stachydeae با داشتن جفت پرچم‌های قدامی که پس از گرده افشانی به سمت بیرون خم می‌شوند، تفکیک می‌گردند (سلمکی و همکاران، ۲۰۱۳) اما هنوز از نظر چیدمان بخش‌هایش در طبقه‌بندی‌های مختلف، متغییر است (سلمکی و همکاران، ۲۰۰۹؛ کوچیوا و همکاران، ۲۰۰۶). پراکندگی و پیچیدگی تاکسونومیکی در این جنس نشان دهنده تنوع کروموزومی قابل توجهی بین گونه‌های آن است. تعداد کروموزوم درون این جنس محدوده-

ای بین 2n = 10 تا 2n= 102 را شامل می‌شود (مولیگان و مانرو، ۱۹۸۹). عدم قطعیت طبقه‌بندی گونه‌های *Stachys* و ناکافی بودن آنالیز کلادیستیک بر پایه ویژگی‌های مورفولوژیکی این جنس نشان دهنده این است که به مطالعات مولکولی نیازمند می‌باشد. بنابراین در مطالعه حاضر از دو ناحیه DNAی کلروپلاستی (trnL-F) و هسته‌ای (ITS) به منظور روشن ساختن روابط فیلوژنتیکی و تکاملی گونه‌های مورد مطالعه موجود در شش بخش (*Ambleia*، *Aucheriana*، *Eriostomum*، *Fragilicaulis*، *Setifolia* و *Zeitenia*) استفاده شده است.

۱-۲ اهداف مطالعه

۱-۲-۱ بررسی روابط فیلوژنتیکی و تکاملی بین گونه‌ای بین و درون شش بخش (*Ambleia*، *Aucheriana*، *Eriostomum*، *Fragilicaulis*، *Setifolia* و *Zeitenia*) جنس *Stachys* که به‌طور طبیعی در منطقه زاگرس مرکزی ایران توزیع یافته‌اند با استفاده از ناحیه trnL-F DNAی کلروپلاستی و ناحیه ITS (internal transcribed spacers) DNAی هسته‌ای.

۱-۲-۲ مقایسه و آزمون سودمندی آنالیز توالی‌های به دست آمده از نواحی ژنوم هسته‌ای و کلروپلاستی گونه‌های جنس *Stachys*.

۱-۲-۳ فراهم آوردن اطلاعات و دیدگاه‌های جدید برای محققین و تاکسونومیست‌ها به وسیله داده‌های به دست آمده از تنوع مولکولی به منظور ارزیابی طبقه‌بندی تاکسونومیکی گونه‌های *Stachys* که از لحاظ رابطه بسیار به‌یکدیگر نزدیک بوده و دارای برخی از مشکلات طبقه‌بندی می‌باشند.

۱-۴ ساختار پایان‌نامه

پس از ارائه کلیاتی در فصل اول، سه فصل دیگر به‌ترتیب با عنوان بررسی منابع، مواد و روش‌ها، نتایج و بحث، پیوست‌ها و در آخر فهرست منابع ، مشاهده می‌شود. فصل دوم مشتمل بر سه بخش اصلی می‌باشد، به طوری که در بخش اول به‌ترتیب به معرفی، تاکسونومی و تاریخچه و جنبه دارویی گیاهان *Stachys* پرداخته شده است. در بخش دوم ابتدا در مورد تنوع، فرآیند هیبریداسیون و اینتروگرسیون و فیلوژنی مولکولی توضیحاتی ارائه شده است و سپس کاربرد نواحی کلروپلاستی و هسته‌ای در تشخیص روابط فیلوژنتیکی مورد بررسی قرار گرفته است. در نهایت در بخش سوم به پژوهش‌های اخیری که بر روی این جنس و جنس‌های دیگر از نظر مورفولوژیکی و مولکولی صورت گرفته‌است، اشاره‌ای شده است. فصل سوم مشتمل بر سه بخش اصلی می‌باشد. در بخش اول در مورد جمع‌آوری و بررسی مورفولوژیکی نمونه‌های مورد بررسی توضیحاتی آورده شده است. در بخش دوم بررسی‌های مولکولی انجام شده ارائه گردیده است. در بخش سوم نیز در مورد روش کار و چگونگی آنالیز داده‌ها توضیحاتی آورده شده است. فصل چهارم نیز به چهار بخش اصلی تقسیم شده است؛ به طوری که در بخش اول ابتدا به نتایج مورفولوژیکی به دست آمده اشاره گردیده و در بخش دوم نتایج مولکولی آورده شده است که خود به سه قسمت نتایج آزمایشگاهی، نتایج آماری و نتایج حاصل از رسم درختان فیلوژنی تقسیم شده است. بخش سوم بحث در مورد نتایج این پژوهش و مقایسه با نتایج دیگران انجام شده است. در انتهای فصل چهارم نتیجه گیری کلی از تحقیق و پیشنهاداتی در راستای تکمیل نتایج این مطالعه ارائه گردیده است. سپس ذکر چهار پیوست، که در پیوست ۱ چگونگی استخراج DNA به روش

کیت Bio FLUX، در پیوست ۲ ساخت محلول‌ها و بافرهای مورد نیاز، در پیوست ۳ محاسبه insert مورد نیاز در ساخت مخلوط واکنش اتصال و در پیوست ۴ دندروگرام‌های حاصل از روش Neighbor Joining آورده شده است. در نهایت فهرست منابع ذکر شده است.

فصل دوم

بررسی منابع

۲-۱ ساختار فلوریستیک ایران

ایران با داشتن سازه‌های توپولوژی، جغرافیایی و زمین‌شناسی خاص و منحصر به فرد خود و همچنین با قرار گرفتن در منطقه ایران – تورانی و مدیترانه‌ای دارای انواع اقلیم‌های آب و هوایی مختلف می‌باشد که سبب شده است تا در زمره یکی از بهترین مناطق جهان در زمینه رشد گیاهان دارویی قرار گیرد (یاوری و شاه‌گلزاری، ۲۰۱۰). اگر چه این منطقه بسیار گسترده و غنی از گونه‌های علفی و چندساله است، درک صحیحی از ساختار آن به دلیل مشکلات شناسایی برخی از جنس‌ها ناقص می‌باشد. جنس‌های *Artemisia* L.، *Rosaceae* Juss.، *Quercus* L.، *Astragalus* L.، *Potentilla* L. و *Stachys* از جمله جنس‌های پیچیده می‌باشند که دارای بیشترین غنای گونه‌ای‌اند (دیزکریسی، ۲۰۱۲ و سلمکی و همکاران، ۲۰۱۲). منطقه زاگرس یکی از منابع ژنتیکی با ارزش و پایه اصلی تغییر و تنوع زیستی در تاکسون‌های گیاهی می‌باشد. در این منطقه تنوع زیستی گیاهی حاوی یک منبع غنی از تنوع ژنتیکی و مرکز گونه‌زایی برای گونه‌های مختلف گیاهی محسوب می‌شود. در نتیجه به دلیل این که این منطقه یکی از زیستگاه‌های مهم گیاهان *Stachys* بوده، شناخت صحیح از ساختارهای فیلوژنتیکی و روابط پیچیده این جنس نه‌تنها برای شناخت تنوع گیاهی فیتوژئوگرافیکی ناحیه سودمند بوده بلکه برای بازنگری فلور ایران نیز مفید می‌باشد.

ساختار فلوریستیک ایران به دلیل وجود تنوع گیاهی گسترده‌اش همیشه مورد توجه گیاه‌شناسان بوده است. تعداد گونه‌های گیاهان آوندی در ایران تاکنون ۸۰۰۰ عدد برآورد شده است که از این تعداد ۱۹۲۲ عدد بومی می‌باشند (امامی و آقاآذری، ۲۰۰۴). ایران نه‌تنها دارای تنوع غنی گیاهی بلکه دارای دو مرکز تنوع ژنتیکی مهم (شرق خاورمیانه و موقعیت مدیترانه ای) نیز می‌باشد (واویلوف، ۱۹۵۱). غنای فلور ایران منبعی

بسیار با ارزش برای ما محسوب می‌شود تا از این گیاهان برای اهداف مختلف استفاده نمائیم. بسیاری از این گیاهان قابلیت این را دارند تا به عنوان غذا برای انسان و دام معرفی شوند و همچنین پتانسیل این را دارند تا به عنوان مواد خام اولیه در ساخت انواع مختلف داروها مورد استفاده قرار گیرند (کایا و همکاران، ۱۹۹۷).

از مهمترین مطالعات پیرامون ساختار فلوریستیک ایران می‌توان به فلورا ایرانیکا (Flora Iranica) که توسط رشینگر (۲۰۰۵-۱۹۶۳) تهیه شده است، اشاره نمود. این فلور عمدتاً به زبان لاتین و شامل فلور ایران، افغانستان، غرب پاکستان، بخشی از جمهوری آذربایجان، ترکمنستان و شمال عراق است که در ۱۷۱ مجلد تنظیم شده است. همچنین نمونه دیگر ''مجموعه فلور رنگی ایران'' نوشته احمد قهرمان (۱۳۷۳) می‌باشد که به زبان فارسی چاپ و منتشر شده است. پس از انتشارچندین کتاب در این زمینه مشخص شد که در تشریح برخی از گونه‌ها و یا حتی برخی از جنس‌ها مشکلات تاکسونومیکی عمده‌ای وجود دارد. این مشکلات در طول آماده سازی فلور ایران به دلیل محدودیت زمانی و مواد کاربردی ظهور یافتند. برخی از این مشکلات قبل از انتشار بیان شده بودند اما هیچ راه حلی برای برطرف نمودن آن‌ها در آن زمان یافت نشده بود. به همین خاطر به منظور وجود منابع بهتر و قابل اعتمادتر برای گیاه‌شناسان انتخاب نمونه‌های مشکوک و بیرون کشیدن آن-ها بود و یا قبل از این که بخواهند مطالعاتی بر روی آن‌ها انجام دهند دوباره نمونه‌های مشکوک مورد بازنگری قرار می‌گرفتند (دیزکریسی، ۲۰۱۲).

گاهی اوقات تاکسونومیست‌ها با همدیگر در تعیین حدود یک گونه به توافق نمی‌رسیدند. صفات آناتومیکی و مورفولوژیکی برای شناخت سطح یک نمونه در سلسله مراتب طبقه‌بندی مورد استفاده قرار می‌گیرد. با این وجود گاهی مواقع ممکن است این خصوصیات به دلیل پیچیدگی و یا داشتن ساختار یکسان، سودمند نباشند. تا به امروز کاملترین طبقه‌بندی توسط باتاشارجی (۱۹۸۰) بر روی جنس *Stachys* صورت گرفته است که به عنوان یک چارچوب برای بهبود روابط سیستماتیک در این جنس استفاده شده است (رشینگر، ۱۹۸۲؛ هاروی و دیمیسو، ۱۹۹۴؛ ایلچیم و همکاران، ۲۰۰۸؛ پول و همکاران، ۲۰۰۷). اما از نظر مولکولی طبقه‌بندی او چندان حمایت نشده است و تنها به طور محدودی بررسی شده است (لیندکوئیست و آلبرت، ۲۰۰۲؛ شین و همکاران، ۲۰۱۰؛ بندیکسبی و همکاران ۲۰۱۱a؛ سلمکی و همکاران، ۲۰۱۳) *Stachys* با داشتن بیشترین تعداد گونه در تیره Lamiaceae یکی از پیچیده‌ترین و مشکل‌سازترین جنس‌های این تیره محسوب می‌شود. ایران با داشتن ۳۴ گونه پس از ترکیه (۶۰) دارای بیشترین تعداد گونه از این جنس می‌باشد (سلمکی و همکاران، ۲۰۱۲). بنابراین گیاه‌شناسان و دیگر محققین نیازمند به یک بازنگری دقیق در درون این جنس می‌باشند. اخیراً کاربرد تکنیک‌های مولکولی به منظور روشن ساختن برخی از مسائل حل نشده در طول مطالعات سیستماتیک گیاهی به عنوان یک پروسه بسیار رایج در علوم بیولوژی شناخته شده است. یکی از مهمترین اهداف این تحقیق شناخت و تعیین روابط فیلوژنی مولکولی بین و درون شش بخش (*Ambleia*، *Aucheriana*، *Eriostomum*، *Fragilicaulis*، *Setifolia* و *Zeitenia*) جنس .*Stachys* L با بهره‌گیری از مناطق مختلف DNAی ژنومی وکلروپلاستی می‌باشد.

۲-۲ خصوصیات گیاه‌شناسی تیره Lamiaceae

راسته Lamiales که در برخی کتب گیاه‌شناسی آن را Vernebales نیز نامیده‌اند شامل تیره‌های نعناع، شاه‌پسند، Mioporaceae، Globolariaceae، Vilantaginaceae و ... است. تیره نعناع دارای صفات و

خصوصیات بسیار با اهمیت است. این ویژگی‌ها به قدری روشن و قابل تشخیص‌اند که این تیره را باید از اولین تیره‌های مشخص شناخته شده توسط گیاه‌شناسان دانست. ساقه این گیاه معمولاً ایستاده و مقطع آن چهار گوش است. برگ‌های آن‌ها متقابل و گل‌هایشان در گرزن‌های پانیکول و چرخه‌ای متراکم غالباً به صورت کروی و گویچه‌ای مجتمع هستند. صفاتی مانند نامنظم بودن جام و دولبه‌ای بودن آن‌ها با لبه‌هایی که غالباً تا ۲/۳ طول جام امتداد دارند، داشتن نافه چهار پرچمی و دی‌دینام و همچنین مادگی دو برچه‌ای و دو تخمکی که هر خانه آن بر اثر دیواره‌بندی ثانویه به دو خانه کوچک‌تر تقسیم می‌شود و هر یک محتوی یک تخمک است و بالاخره جدا شدن این خانه‌ها از یک دیگر به صورت چهار مریکارپ یا فندقه (تتراکن) و نیز دارا بودن کرک‌های ترشح کننده ویژه و محتوی اسانس از صفات بارز این تیره به شمار می‌آیند (قهرمان، ۱۳۷۳).

تیره نعناع دارای ۲۳۶ جنس و متجاوز از ۷۰۰۰ گونه است که به صورت پراکنده در نقاط مختلف کره زمین به خصوص نواحی مدیترانه‌ای گسترش یافته‌اند (هارلی و همکاران، ۲۰۰۴؛ شین و همکاران، ۲۰۱۰؛ بندیکس‌بی و همکاران، ۲۰۱۱). این تیره از لحاظ تعداد و غنای اشکال یکی از ده تیره بزرگ گیاهان محسوب می‌شود. گیاهان تیره نعناع عموماً علفی، درختچه‌ای و به ندرت درختی یا بالا رونده هستند (بقالیان و نقدی-بادی، ۱۳۷۹؛ زرگری، ۱۳۷۲؛ گوود، ۱۹۷۸). اغلب این گیاهان با خشکی سازش پیدا کرده و برگ‌های آن‌ها از کرک پوشیده شده‌اند تا از تعرق زیاد جلوگیری به عمل آورند، همچنین این گیاهان در سطح خود دارای غدد ترشحی می‌باشند که حاوی مواد معطرند (بقالیان و نقدی‌بادی، ۱۳۷۹؛ زرگری، ۱۳۷۲).

گیاهان تیره نعناع معمولاً علف‌هایی یک ساله یا پایا و ایستاده‌اند (قهرمان، ۱۳۷۳). برگ‌ها عموما متقابل، گاهی ساقه آغوش بوده و آرایش چرخه‌ای در این تیره بسیار نادر است (قهرمان،۱۳۷۳؛ زرگری ۱۳۷۲؛ طباطبایی، ۱۳۶۵). وضع برگ‌های متقابل آن به نحوی است که معمولا هر دو برگ متقابل، سطحی عمود بر دو برگ دیگر به وجود آورده‌اند. پهنک برگ این گیاهان دارای اشکال مختلف ولی در هر حال ساده است. برگ‌ها دارای حاشیه دندانه‌دار و گاهی بریدگی‌هایی کم و بیش عمیق است ولی این بریدگی‌ها عموما برگ را به صورت مرکب در نمی‌آورد. برگ‌ها فاقد گوشواره و دارای انواع دمبرگ و بدون دمبرگ هستند (زرگری ۱۳۷۲؛ طباطبایی، ۱۳۶۵). ساقه آن‌ها چهارگوش بوده که از ویژگی‌های مهم این خانواده است (قهرمان،۱۳۷۳؛ زرگری ۱۳۷۲؛ طباطبایی، ۱۳۶۵). در تیره نعناع تکثیر رویشی به وسیله استولون یا بن ریشه زای ساقه که به صورت پاجوش انجام می‌گیرد، تقریباً امری معمولی است (قهرمان، ۱۳۷۳).

گل‌ها به صورت منفرد بر روی ساقه در کنار برگ‌ها ظاهر شده و گل‌آذین معمولا به صورت چرخه‌های کاذب است (قهرمان،۱۳۷۳؛ زرگری ۱۳۷۲؛ فاطمی و قاسمی، ۱۳۷۱) و از دو گرزن دو سویه در کنار هر یک از دو برگ متقابل پدید می‌آیند. در برخی همانند *Salvia* L. گرزن‌ها به سه گل کاهش می‌یابند (قهرمان، ۱۳۷۳). غالبا چرخه‌های گل هر چه به انتهای ساقه نزدیک می‌شوند به علت کوتاه شدن میان‌گره‌ها و تحلیل رفتن برگ‌ها گل‌آذین حالت سنبله مانند پیدا می‌کند. طرز قرار گرفتن برگ‌ها در طرفین هر یک از دستجات گل به صورت فلس‌های کوچک می‌باشد (قهرمان،۱۳۷۳؛ زرگری ۱۳۷۲؛ فاطمی و قاسمی، ۱۳۷۱). گل‌ها کامل و نر- ماده (بر اثر تحلیل یکی از اندام‌های جنسی) هستند و تمایل شدید به نامنظم شدن داشته و با تقارن سطحی تمایل شدید به گرده افشانی با حشرات دارند (قهرمان،۱۳۷۳؛ زرگری ۱۳۷۲؛ طباطبایی، ۱۳۶۵).

کاسه گل دارای ۲ لب و غالباً پایا و دارای رگه‌های برجسته‌ای است که گاهی پوشیده از کرک است (زرگری، ۱۳۷۲). تعداد رگه‌های کاسه و یا نحوه پیوستگی رگه‌ها با هم در شناخت گونه‌های این تیره نقش مهمی دارد. جام گل همیشه پیوسته، گلبرگ نامنظم و شامل لوله‌ای کم و بیش دراز و یا خمیده‌ای است که دارای دو لب می‌باشد که غالباً مجهز به کرک و منتهی به پهنکی با ۵ دندانه است که در دو لبه قرار می‌گیرند.

۲-۳ مورفولوژی جنس *Stachys*

در این قسمت پس از توضیح مختصری در مورد جنس *Stachys* خصوصیات مورفولوژیکی هر یک از گونه-های مورد بررسی توضیح داده شده است.

۲-۳-۱ *Stachys*

Stachys دارای توزیع جهانی با مرکزیت نواحی گرم مدیترانه‌ای و جنوب غربی آسیا، آفریقای جنوبی، شمال و جنوب آمریکا می‌باشد. بیشترین پراکنش این جنس در نواحی گرم و معتدل مدیترانه‌ای و جنوب غربی آسیا است، ایران یکی از مراکز اصلی پراکنش این گیاه محسوب می‌شود که پراکنش آن بیشتر در سمت شمال غربی کشور می‌باشد (باتاشارجی، ۱۹۸۰). در حدود ۱۱۵ تاکسون از این جنس در جنوب غربی آسیا گزارش شده است که به طور نسبی در ۲۰ بخش از ۲۳ بخش شناسایی شده (به استثنای *Betonica* L.) قرار گرفته‌اند. از این نواحی، ترکیه و ایران به ترتیب ۶۰ و ۳۴ گونه را شامل می‌شوند. بنابراین این دو کشور دو مرکز مهم تنوع در مقیاس جهانی می‌باشند (جدول۱) (سلمکی و همکاران، ۲۰۱۲). این جنس تک‌پایه و شامل گیاهان چند ساله و یک ساله می‌باشد (تیلور، ۲۰۱۱) و گیاهچه‌های آن تغییرات گسترده‌ای را در خصوصیات مورفولوژیکی و سیتولوژیکی از خود نشان می‌دهند (لندکویست و آلبرت، ۲۰۰۲). گونه‌های این جنس به صورت خزنده تا بالا رونده یا این که به صورت درختچه‌های پشته‌ای رشد می‌نمایند. بیشتر گونه‌های این جنس ترجیح می‌دهند که در مناطق با ارتفاع زیاد و دامنه کوه‌ها زندگی کنند. این جنس در شرایط اکولوژیکی مختلفی همچون مناطق سنگلاخی، استپ‌های کوهی (*S. annua*)، کناره رودخانه‌ها (*S. setifera*) و گاهی اوقات در جنگل‌ها (*S. sylvatica*) می‌رویند (باتاشارجی، ۱۹۸۰؛ سلمکی و همکاران، ۲۰۰۸*a*). برخی از آن‌ها به دلیل کاسموفیت بودن نیازمند شرایط ریزاقلیمی می‌باشند به همین خاطر در مناطق سنگلاخی همچون شکاف کوه‌ها می‌رویند که غالباً نیز بومی محسوب می‌شوند (سلمکی و همکاران، ۲۰۱۲). بذر افشانی این گیاه در اوایل بهار زمانی که خاک هنوز سرد و مرطوب است رخ می‌دهد. گل‌های آن بسته به نوع آب و هوای منطقه و دیگر شرایط در زمان‌های مختلفی شکوفه می‌کنند. بیشترین زمان گل‌دهی آن از اواسط اردیبهشت تا اوایل مرداد می‌باشد (باتاشارجی، ۱۹۸۰؛ رشینگر ۱۹۸۲). کل گیاه از جنبه دارویی و اقتصادی نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد (کریمی، ۱۳۸۸). به دلیل مقدار زیاد ترکیبات ثانویه، چندین گونه-ی آن (همچون *S. lavandulifolia* Vahl. و *S. pilifera* Benth.) از قدیم الایام به طور سنتی به عنوان دارو مورد مصرف قرار می‌گرفته است. در ایران برخی از گونه‌های آن (همانند *S. persepolitana* Boiss.) به دلیل از بین بردن و دست‌کاری زمین‌های دست نخورده در معرض خطر نابودی قرار گرفته‌اند درحالی‌که برخی از آن‌ها (همچون *S. acerosa* Boiss.). به دلیل مقاومت نسبت به چرا گسترش یافته‌اند (سلمکی و همکاران، ۲۰۱۲).

۲-۳-۲ مشخصات مورفولوژیکی هر یک از گونه‌های مورد مطالعه

أ. *S. cretica* L.

گیاهی چندساله با ساقه راست به ارتفاع ۱۰۰- ۶۰ سانتی‌متر، قوی با شاخه‌های بلند، میانگره‌های طویل در قسمت‌های بالایی با انشعابات کوتاه و محکم، برگ‌های مربوط به شاخه‌های عقیم مستطیلی –سرنیزه‌ای،