بررسی مراحل نموی و امکان رویان زایی از میکروسپور آویشن‌دنایی (*Thymus daenensis*)

امین حیدری، جواد هادیان*، محمد حسین میرجلیلی، علیرضا کرمی و محمد رضا کنعانی

تهران، دانشگاه شهید بهشتی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی

تاریخ دریافت: ۹۴/۸/۶ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۱/۱۶

چکیده

آویشن دنایی (*Thymus daenensis* Celak) به دلیل داشتن تیمول بالا در اسانس به عنوان یکی از گیاهان با ارزش دارویی شناخته می‌شود. به همین جهت، اهلی کردن و ایجاد ارقام مرغوب و همگن از آن جهت کشت و تولید تجاری ضروری می‌باشد. هدف از تحقیق حاضر بررسی امکان باززایی گیاهان هاپلوئید از کشت میکروسپور این گیاه بوده است. از آنجا که بیشتر گونه‌های گیاهی در مرحله تک‌هسته‌ای نمو میکروسپور بهترین پاسخ را می‌دهند، در تحقیق حاضر ابتدا مراحل نموی میکروسپور تعیین شد. نتایج بدست آمده گواه بر این بود که غنچه‌های دارای میانگین قطر۱/۳ تا۱/۴ میلی‌متر و میانگین طول ۳/۸ تا ۴/۴ میلی‌متر حاوی میکروسپور تک هسته ای می‌باشند. به منظور القاء جنین زایی، تاثیر پیش تیمارهای مختلف دمایی (۳۰ و ۴ درجه سانتی-گراد)، هورمونی(۲۵، ۳۵ و ۴۵ پی پی ام از 2,4-D) و سه محیط کشت FHG، NLN-13، B5 بر جنین زایی میکروسپور بررسی شد. نتایج نشان داد که تفاوت معنی داری بین محیط‌های القاء، پیش تیمارها و همچنین اثر متقابل محیط القاء و پیش تیمار وجود دارد. بیشترین تعداد ساختار چند سلولی در محیط NLN-13 و پیش تیمار گرما به مدت ۸ روز و پیش تیمار 2,4-D با غلظت ۲۵ پی‌پی‌ام مشاهده شد. در نهایت فقط در محیط FHG و پیش تیمار گرما به مدت ۸ روز جنین‌ها تا مرحله‌ی قلبی شکل نمو یافتند. مطالعات بیشتر برای افزایش تعداد ساختارهای چند سلولی و نمو جنین‌ها به گیاه هاپلوئید نیاز است.

واژه های کلیدی: اصلاح، گیاهان هاپلوئید، میکروسپور تک هسته ای، جنین زایی

*نویسنده مسئول، تلفن ۰۲۱۲۹۹۰۴۰۴۷، پست الکترونیکی: j_hadian@sbu.ac.ir

مقدمه

آویشن دنایی (*Thymus daenensis* Celak) گیاهی معطر با ساقه‌های خشبی، چند ساله، متعلق به تیره نعناییان (Lamiaceae) است که در مناطق مختلف کشور از جمله استان‌های البرز، قزوین، ایلام، اصفهان، همدان، کهکلویه و بویر احمد، فارس، لرستان و غیره پراکنش دارد (۵ و ۷). اسانس آویشن دنایی غنی از ترکیب دارویی با ارزش تیمول می‌باشد و با توجه به سازگاری مناسب این گیاه به شرایط محیطی مختلف، دارای پتانسیل اقتصادی و اکولوژیکی بالایی جهت اهلی کردن و کشت تجاری می-باشد (۲، ۴ و ۷). در هر برنامه اهلی سازی انجام کار اصلاحی در جهت دستیابی به رقم واجد ویژگی‌های مطلوب فیتوشیمیایی و زراعی ضروری است (۲۴). در گیاهان دارویی در مقایسه با گیاهان زراعی فعالیت های به نژادی و یا ژنتیکی خیلی کمی انجام شده است. بدلیل ناهمگنی ژنتیکی بالای جمعیت‌های گیاهان دارویی و در نتیجه ناهمگنی مواد اولیه تولید شده از آنها، یکنواختی تولید ترکیبات دارویی به خوبی قابل تامین نیست (۹ و ۱۳). به دلایل مورد اشاره، توسعه سیستم های به‌نژادی در گیاهان دارویی بسیار سودمند بوده و منجر به تولید ارقام با عملکرد یکنواخت می‌شود. برای تولید یک رقم جدید با

Archive of SID

www.SID.ir

استفاده از روش‌های معمول اصلاحی زمان خیلی زیادی صرف می‌شود. امروزه باززایی گیاهان دابل هاپلوئید به دلیل مزایای متعدد از قبیل کوتاه کردن برنامه‌های اصلاحی، دستیابی به لاین‌های کاملا خالص و متعاقبا کاهش هزینه های تولید رقم جایگاه ویژه‌ای در برنامه‌های اصلاحی گیاهان دگرگشن پیدا کرده است (۶، ۱۰ و ۱۳). چنین لاین‌های خالصی می‌توانند به عنوان مواد گیاهی اولیه برای تولید واریته‌های هیبرید و سینتتیک مورد استفاده قرار گیرند. گیاهان دابل هاپلوئید همچنین امکان انتخاب لاین های با سطوح بالایی از عملکرد مواد دارویی مهم را فراهم می‌سازند (۱۳ و ۲۸). این روش در سال‌های اخیر در مورد گونه های دارویی متعددی چون فلفل (*Capsicum annum*)، زیره اروپایی(*Carum carvi*) با موفقیت همراه بوده است (۱۴).

از عوامل بسیار مهم و اولیه برای موفقیت در باززایی گیاهان هاپلوئید از کشت میکروسپور، انتخاب گل‌های حاوی میکروسپور با مرحله نموی مناسب است. در بیشتر گونه‌های گیاهی مرحله نموی مناسب، مرحله تک هسته‌ای است که در این مرحله سلول از لحاظ تمایز آزادانه عمل می‌کند و بیشترین پاسخ را به نرزایی دارد. همچنین مشخص شده است که بین اندازه گل و مرحله نموی میکروسپور همبستگی وجود دارد (۳، ۱۸). علاوه بر مرحله نموی میکروسپور فاکتورهای متعدد دیگری از قبیل ژنوتیپ، شرایط محیطی رشد گیاه مادری و محیط کشت میکروسپور با نسبت مناسب ترکیبات تشکیل دهنده در موفقیت کشت میکروسپور جهت باززایی گیاهان هاپلوئید موثرند (۱۲). در اکثر مطالعات از پیش تیمارهای تنشی جهت تغییر فاز میکروسپور از زایشی به رویشی و القای جنین زایی استفاده می شود. این تنش ها دارای انواع متفاوتی هستند که از رایج‌ترین آنها می توان تنش‌های سرمایی، گرمایی، کمبود مواد غذایی، کلشیسین و هورمونی را نام برد (۲۶).

در این تحقیق پس از تعیین مرحله نموی دانه گرده و ارتباط آن با اندازه گل، تاثیر پیش تیمارهای مختلف و محیط‌های القاء متفاوت بر جنین‌زایی از میکروسپور گیاه دارویی با ارزش و اندمیک آویشن دنایی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

تهیه مواد گیاهی: مواد گیاهی از گیاهان آویشن دنایی (کلون TDI 174) کشت شده (شکل ۱) در مزرعه تحقیقاتی پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی تهیه گردید. نمونه هرباریومی تایید شده این گیاه با شماره MPH-1942 در هرباریوم پژوهشکده نگهداری می‌شود.

شکل ۱- گیاهان آویشن دنایی (کلون TDI 174) مورد استفاده جهت تهیه میکروسپور

Archive of SID

www.SID.ir

مطالعه مراحل نموی گل: گیاهان از اواخر خرداد شروع به گلدهی کردند. گل‌ها در مراحل مختلف نمو از زمانی که گلبرگ‌ها پیدا نبودند تا مرحله‌ای که گل‌ها کاملا باز شده بودند برای تعیین مرحله نموی میکروسپور جمع‌آوری شدند. بعد از بررسی مورفولوژیکی، گل‌ها به منظور رنگ آمیزی و مشاهده هسته با استفاده از تثبیت کننده کارنوی تثبیت شدند. بعد از ۲۴ ساعت حضور در محلول کارنوی در دمای یخچال، ماده تثبیت کننده با آب مقطر شستشو داده شد. برای تعیین مرحله نموی، بساک‌ها از گل‌های تثبیت شده (از مراحل مختلف نمو گل) جدا شده و درون شیشه ساعتی حاوی چند قطره استوکارمن قرار داده شدند و شیشه ساعتی حاوی بساک و رنگ به مدت ۲ دقیقه روی بشر حاوی آب ۸۰ تا ۹۰ درجه سانتی‌گراد به طور غیر مستقیم حرارت داده شد و در ادامه بمدت زمان‌های مختلف در محلول رنگ استوکارمن قرارداده شدند. بعد از این مرحله، بساک ها از محلول رنگی خارج و روی لام قرار داده شدند. سپس چند قطره استیک اسید ۴۵ درصد روی لام ریخته و بعد از گذاشتن لامل روی آن با ضربات آرام نوک سوزن تشریح شدند. اسلایدهای تهیه شده با میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت (۱).

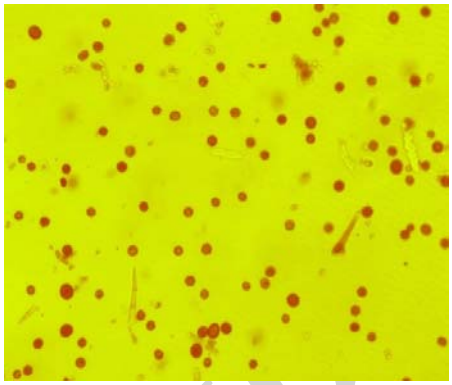
جداسازی میکروسپور: جهت جداسازی میکروسپور، غنچه گل‌ها در مرحله نموی تک هسته‌ای جمع آوری شدند. برای ضدعفونی ابتدا غنچه‌ها به مدت ۳۰ ثانیه درون الکل ۷۰ درصد سپس به مدت ۴ دقیقه درون هیپوکلرید سدیم ۲/۵ درصد قرارگرفتند. در ادامه غنچه ها سه بار(۳، ۵ و ۷ دقیقه) با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. جهت جدا سازی میکروسپور، از ساکارز ۱۳ درصد استفاده شد (۲۳). ابتدا حدود ۳۰ غنچه استریل را داخل بشر حاوی ۵ سی‌سی ساکارز ۱۳ درصد ریخته و با استفاده از پیستون سرنگ به خوبی له شدند تا میکروسپورها آزاد شوند. پس از له کردن غنچه‌ها، سوسپانسیون حاصل ابتدا از فیلتر با مش ۴/۰میلی متر، سپس از فیلتر با مش ۴۵ میکرومتر عبور داده شد. محلول بدست آمده در فالکون-های ۱۵ سی‌سی ریخته شد و برای جداسازی میکروسپور-ها در دور ۹۰۰ به مدت۳ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس فالکون‌ها را به زیر هود برده و روشناور بیرون ریخته شد (اگر در این مرحله رسوب حاصله دارای مواد ناخواسته ای بود، مجدداً چند سی سی ساکارز ۱۳ درصد ریخته و دوباره سانتریفیوژ می‌شوند) و از رسوب میکروسپور ته فالکون برای عملیات کشت استفاده شد.

کشت میکروسپور: از ۳ نوع محیط کشت NLN-13 (۱۱)، FHG (۲۳) و B5 (۲۱) استفاده شد. همچنین پیش تیمارهای تنشی مختلفی از قبیل گرما با دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴، ۸ و ۱۲ روز، سرما با دمای ۴ درجه سانتی گراد بمدت ۳، ۶ و ۹ روز و گرسنگی کربن B5 (Carbon starvation B5 medium)(دارای ۶۵ میلی‌گرم در لیتر از KCl، ۶۰۰ میلی‌گرم در لیتر از KH_2PO_4، ۱۲۵ میلی‌گرم در لیتر از $MgSO_4,7H2O$، ۴۵/۶۵ میلی‌گرم در لیتر از مانیتول و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر $Ca(NO_3)_2,4H_2O$) (۲۵) بمدت ۵، ۱۰ و ۱۵روز، همچنین تیمار هورمونی 2,4-D با غلظت‌های مختلف ۲۵، ۳۵ و ۴۵ میلی‌گرم در لیتر به مدت ۳۰ دقیقه در قالب فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی بررسی شدند. جهت کشت میکروسپور، حدود ۳ سی‌سی از محیط کشت مورد نظر روی رسوب میکروسپور ته فالکون بدست آمده در مرحله قبل، اضافه شد. سپس به میزان ۵۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون حاصل به پتری دیش‌های حاوی ۲۰ سی‌سی محیط کشت افزوده و با پارافیلم درزگیری شدند. جهت اعمال تیمارهای دمایی، پتری‌های کشت شده به دماهای مورد نظر در انکوباتور و یخچال منتقل شدند. برای اعمال تیمار گرسنگی، به میزان ۱۰ سی‌سی محیط گرسنگی و برای تیمار هورمونی، ۱۰ سی‌سی محلول 2,4-D در غلظت‌های مورد نظر به رسوب میکروسپور ته فالکون‌ها اضافه شده و به مدت ۳۰ دقیقه در اتاق کشت در شرایط تاریکی نگهداری شدند. در نهایت فالکون‌ها سانتریفیوژ شده، محلول رویی را بیرون ریخته و حدود ۳ سی‌سی از محیط کشت مورد نظر روی رسوب ته

Archive of SID

www.SID.ir

فالکون اضافه شد و سوسپانسیون حاصل جهت کشت استفاده شد (شکل ۲).



شکل ۲- میکروسپورهای آویشن دنایی در محیط کشت.

بعد از اعمال تیمارهای مربوط، تمامی کشت‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و شرایط تاریکی نگهداری شدند. تشکیل ساختارهای چند سلولی و جنین زایی در دوره های زمانی مختلف مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج و بحث

مراحل نموی میکروسپور: در ابتدا از استوکارمن در دوره-های زمانی مختلف (۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ دقیقه) برای رنگ آمیزی هسته سلول جهت تعیین مراحل نموی میکروسپور استفاده شد. مشخص شد که زمان ۴۵ دقیقه بهترین زمان برای رنگ آمیزی هسته سلول میکروسپور آویشن دنایی می‌باشد. تعداد زیادی از محققین از قبیل اورلیا و همکاران (۲۰۰۷) و همچنین ایوا و همکاران (۲۰۱۱) از استوکارمن برای رنگ آمیزی هسته سلول استفاده کرده اند (۸ و ۱۷) که نتایج مشابه گزارش شده است.

همانطور که در مطالعات مختلف گزارش شده است، بین اندازه گل و مرحله نمو میکروسپور ارتباط وجود دارد به نحوی که می توان با توجه به اندازه گل، مرحله نموی میکروسپور را پیش بینی نمود. نتایج این بررسی (جدول ۱) نشان داد که در گل‌هایی که اندازه طول آنها بین ۳/۸ تا ۴/۴ میلی‌متر و قطرشان بین ۱/۳ تا ۱/۴ میلی‌متر بودند، میکروسپورها غالبا در مرحله تک هسته‌ای و اواخر تک هسته‌ای می‌باشند (شکل۳) و از این گل‌ها باید جهت کشت میکروسپور استفاده کرد.

جدول۱- مراحل نموی میکروسپور و رابطه آن با اندازه گل‌های آویشن دنایی

	مرحله نموی	میانگین طول گل(میلی متر)	میانگین قطرگل(میلی متر)
A	تتراد	۳/۵-۳/۶	۱-۱,۲
B	تک هسته ای	۳/۸-۴/۴	۱/۳-۱/۴
C	اواخر تک هسته ای	۴/۵	۱/۴
D	دو هسته ای	۵/۰	۱/۵

رویان زایی از میکروسپور: چهار هفته بعد از کشت، ساختارهای دایره ای شکل بزرگتر از میکروسپورها در محیط کشت ظاهر شدند که هیچ گونه نمو بعدی در آنها مشاهده نشد (شکل ۴). این ساختارها در واقع ساختارهای شبه جنینی کاذب می‌باشند که منشا آن‌ها از سلول‌های اپیدرمی است. در بسیاری از گزارشات چاپ شده در زمینه کشت میکروسپور به اشتباه این ساختارها به عنوان ساختار های چند سلولی که از میکروسپور حاصل شده اند نام برده می شود. سطح گل اکثر گیاهان با یکسری کرک‌ها با نقش و شکل‌های گوناگون پوشیده شده است که در حین جداسازی میکروسپورها شکسته و وارد محیط کشت می شوند. سلول‌های اپیدرمی این اندام ها در محیط کشت شروع به تقسیم کرده و این ساختارهای چند سلولی کاذب را به وجود می‌آورند (۳۱).

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر محیط کشت، پیش تیمار و اثر متقابل این دو بر تشکیل ساختارهای چند سلولی

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
محیط کشت	۲	۱۸,۰۳۷۰۳۷**
پیش تیمار	۱۱	۸,۵۰۱۶۸۳۵**
محیط کشت* پیش تیمار	۲۲	۱,۹۹۶۶۳۳۰۰**
خطا	۷۰	۰,۴۵۲۱۱۶۴

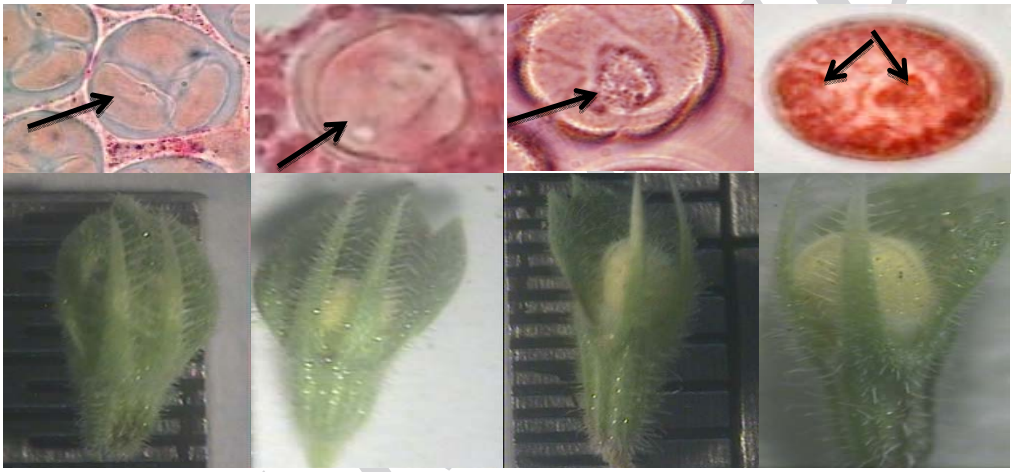
** تفاوت معنی دار در سطح ۱ درصد

اولین ساختارهای چند سلولی حقیقی بین ۳۰ تا ۴۰ روز

Archive of SID

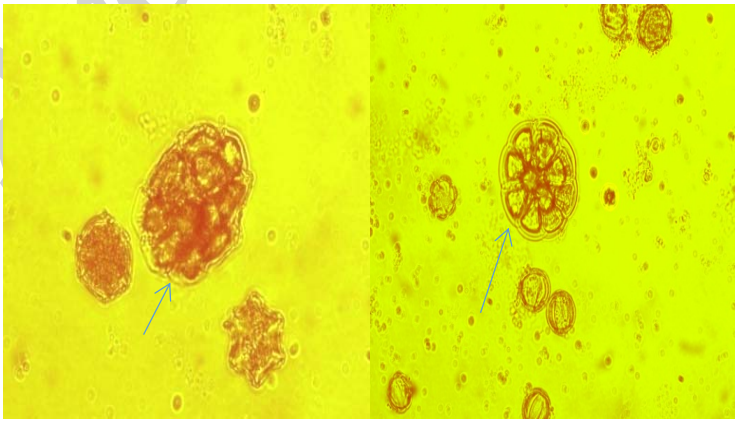
www.SID.ir

بعد از کشت در بعضی از تیمارها مشاهده شد. تفاوت این ساختارها با ساختارهای کاذب در شکل آنهاست به نحوی که ساختارهای حقیقی برخلاف ساختارهای کاذب که دایره‌ای و توخالی اند، کشیده و تو پر هستند (۳۱). تعداد ساختارهای چند سلولی ایجاد شده در کشت میکروسپور در هر تیمار حدود ۲ ماه بعد از کشت ثبت و آنالیز شد. همانطور که نتایج جدول ۲ نشان می‌دهد اثر محیط کشت، اثر پیش تیمارهای مختلف و همچنین اثر متقابل بین محیط کشت و پیش تیمار بر میانگین تعداد ساختارهای چند سلولی در سطح ۱ درصد معنی دار بود. طبق نتایج مقایسه میانگین‌ها بین محیط‌های مختلف، بیشترین تعداد ساختار چند سلولی در محیط کشت NLN-13 بدست آمد (شکل ۵). همچنین در بین پیش تیمارهای مختلف، در پیش تیمار دمایی ۳۰ درجه به مدت ۸ روز و 2,4-D غلظت ۲۵ پی‌پی‌ام نسبت به سایرین بیشترین تعداد ساختار چندسلولی تشکیل شد. بررسی اثر متقابل محیط کشت و پیش تیمار نیز نشان داد که در دو محیط FHG و NLN-13 بیشترین تعداد ساختار چندسلولی زمانی ایجاد می‌شود که میکروسپورها با دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۸ روز انکوبه شوند یا با هورمون 2,4-D به غلظت ۲۵ پی‌پی‌ام تیمار شوند.



(A) (B) (C) (D)

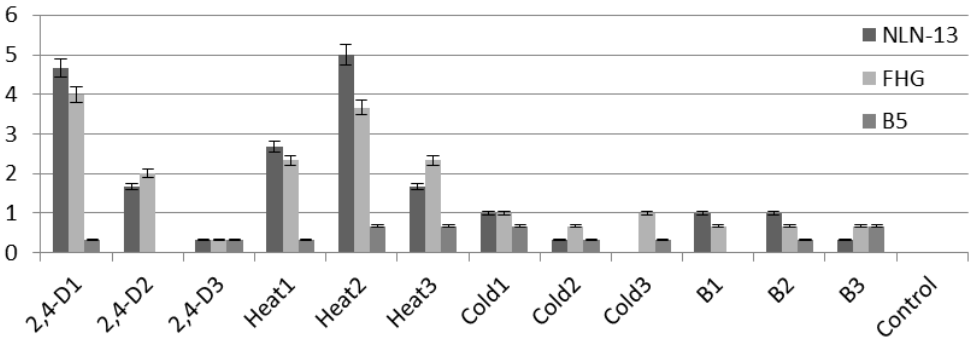
شکل۳- مراحل مختلف نموی میکروسپور آویشن دنایی و ارتباط آن با اندازه گل: A) مرحله تتراد، B) مرحله تک هسته ای C) اوخر تک هسته ای D) مرحله دو هسته ای



(A) (B)

شکل۴- (A) ساختار چندسلولی حقیقی (B) ساختار چند سلولی کاذب (ساختارهای حقیقی برخلاف ساختارهای کاذب که دایره‌ای و توخالی اند، کشیده و توپر هستند).

www.SID.ir



شکل۵- اثر متقابل محیط کشت و پیش تیمار بر تعداد ساختارهای چند سلولی در کشت میکروسپور آویشن دنایی

2,4-D1, 2, 3: به ترتیب ۲۵، ۳۵ و ۴۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون 2,4-D

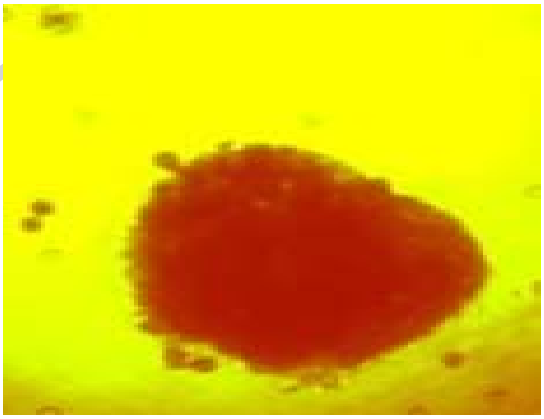
Heat1, 2, 3: به ترتیب تیمار دمایی ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴، ۸ و ۱۲ روز

Cold1, 2, 3: تیمار دمایی ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳، ۶ و ۹ روز

B1, 2, 3: تیمار گرسنگی کربن به ترتیب به مدت ، ۵، ۱۰، ۱۵ روز

Control: شاهد

ساختارهای چندسلولی در ادامه نمو به ساختارهای جنینی قلبی شکل تبدیل می شوند. این نوع ساختار در مطالعه حاضر فقط در محیط FHG با پیش تیمار گرما به مدت ۸ روز مشاهده شد (شکل ۶).



شکل ۶- ساختار جنینی قلبی شکل حاصل از نمو میکروسپور آویشن دنایی در محیط FHG با پیش تیمار گرما به مدت ۸ روز

در فرایند رویان زایی از میکروسپور، برای خاموش شدن مرحله گامتوفیتی(زایشی) و شروع مرحله اسپروفیتی(رویشی) میکروسپور، به تنش فیزیکی یا شیمیایی احتیاج است (۲۰ و ۲۵). نوع پیش تیماری که برای القای جنین زایی میکروسپور استفاده می‌شود مهمترین نقش را در موفقیت جنین زایی میکروسپور دارا است (۱۴).

استفاده از تنش های دمایی از روش های رایج می باشد. اگرچه پاسخ به گونه گیاهی بستگی دارد، در اکثر موارد چنانکه در تحقیق حاضر مشاهده شد، تنش دمای بالا نسبت به تنش دمایی پایین موثرتر بوده است. این امر بر روی گیاه فلفل (*Capsicum annum*) توسط تئودورا و همکاران (۲۰۱۱) همچنین روی گیاه *Lupinus angustifolia* توسط کامیلا و همکاران (۲۰۰۹) نشان داده شده است(۳۰ و ۱۸). با این حال در مواردی چون گیاه زیره اروپایی (*Carum carvi*) تنش دمای پایین از دمای بالا در القاء جنین زایی از میکروسپور موثرتر بوده است (۱۷). نوع دیگری از پیش تیمار نیز وجود دارد که در آن قبل از اینکه کشت میکروسپور انجام شود جوانه‌های گل را تحت تنش دمایی قرار می‌دهند. در مورد گیاه فلفل (*Capsicum annum*)، سوپنا و همکاران (۲۰۰۶) در روشی متفاوت برای القای جنین‌زایی میکروسپور، غنچه های برداشت شده را بطور مستقیم به مدت‌های زمانی مختلف در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار دادند. نتایج نشان داد که در اکثر ژنوتیپ‌ها اگر غنچه ها به مدت ۳ روز در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار بگیرند، بیشترین پاسخ را به القای جنین زایی می‌دهند (۲۵).

Archive of SID

www.SID.ir

کیم و همکاران (۲۰۰۸) در مورد گیاه فلفل (*Capsicum annum*) گزارش کردند که پیش تیمار دمایی ۳۰ درجه به مدت ۳ روز در محیط گرسنگی (کمبود) کربن نقش مهمی در جنین زایی میکروسپور و باززایی گیاهچه از جنین داشته است(۲۰).

در این مطالعه با اعمال پیش تیمارهای مختلف، ساختار های چند سلولی از میکروسپور ها ایجاد شد. با این حال در جهت افزایش تعداد این ساختارها می توان تاثیر پیش تیمارهای رایج دیگر چون کلشیسین، اشعه گاما، pH بالای محیط، فلزات سنگین، الیگو ساکارید کاراگینن و غیره را برای تحریک جنین‌زایی بررسی کرد (۲۹ و ۱۳).

محیط های کشت مختلف نیز در القاء جنین زایی نقش دارند. گو و پولی (۲۰۰۰) محیط‌های متفاوتی را برای القای جنین‌زایی میکروسپور گیاه *Secale cereale* بررسی کردند که محیط PG-96M با موفقیت همراه بوده است (۱۶). همچنین فری و همکاران (۲۰۰۵) شش نوع محیط مختلف را برای القای جنین زایی میکروسپور رازیانه (*Foeniculum vulgare*) و زیره (*Carum carvi*) آزمون کردند که از بین آنها محیط های NLN-13 و AT-3 را به ترتیب برای رازیانه و زیره بر اساس تعداد ساختار چند سلولی ایجاد شده انتخاب کردند (۱۵). در مطالعه کاسنر و همکاران (۲۰۱۷) علی رغم اعمال تیمارهای مختلف ساختارهای چند سلولی کمی در کشت میکروسپور بادرنجبویه مشاهده شدو این ساختارها سایر مراحل نموی را طی ننموده و از بین رفتند (۱۹).

در ادامه تحقیق حاضر مناسب است محیط های کشت مختلف دیگر از قبیل PG-96 وAT3 نیز جهت دست‌یابی به تعداد بیشتر جنین از میکروسپور آویشن دنایی که قادر به طی مراحل نموی تا گیاه کامل باشند، مورد بررسی قرار گیرند.

علاوه بر عوامل مورد بررسی در این مطالعه، عوامل متعدد دیگری نیز در موفقیت رویان زایی از میکروسپور دخیل اند. شرایط رشد گیاه مادری دهنده میکروسپور نقش مهمی در تشکیل جنین از میکروسپور و همچنین باززایی گیاهچه از جنین دارد (۳۲). کیم و همکاران (۲۰۰۸) در مورد گیاه فلفل(*Capsicum annum*) گزارش کردند که شرایط دمایی ۲۵ درجه روز و ۲۰ درجه شب، همچنین فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نقش مهمی در جنین زایی میکروسپور و باززایی گیاهچه از جنین داشته است(۲۰). تاثیر شرایط رشد گیاهان مادری نیز می تواند در کشت میکروسپور آویشن دنایی مورد بررسی قرار گیرد.

نتیجه گیری

جنین زایی میکروسپور یکی از کارآمد ترین روش‌های تولید گیاهان دابل هاپلوئید می‌باشد که بر مبنای توانایی سلول منفرد هاپلوئید میکروسپور در جهت تمایز و باززایی به گیاه کامل می باشد. همانطور که از داده های حاصل از این بررسی به دست آمد، بیشترین تعداد ساختار چند سلولی در دو محیط FHG و NLN-13 و همچنین پیش تیمار گرما به مدت ۸ روز و پیش تیمار هورمونی 2,4-D به مقدار ۲۵ میلی گرم در لیتر مشاهده شد و محیط B5 محیط مناسبی برای کشت میکروسپور این گیاه نبود. این نتایج، اطلاعات اولیه جهت باززایی گیاهان هاپلوئید از کشت میکروسپور آویشن دنایی را فراهم نمود. در ادامه لازم هست تاثیر سایر عوامل بر جنین زایی از میکروسپور آویشن دنایی بررسی شود تا بتوان با القاء تعداد کافی جنین، شرایط مناسب جهت نمو گیاه کامل هاپلوئید را نیز بهینه نمود. در صورتی که سیستم کشت میکروسپور بهینه شود، با تولید گیاهان هموزیگوت دابل هاپلوئید، دستیابی به ارقام هیبرید یا سینتتیک مناسب در مدت زمان کوتاه و با هزینه کم امکان پذیر خواهد بود.

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

۱. افضلی فر م. ۱۳۹۱. بررسی روش های مختلف تکثیر و آندروژنز در مرزه خوزستانی و مرزه رشینگری. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه شهید بهشتی.

۲. اکبرنیا ا. و میرزا م.۱۳۸۷. شناسایی ترکیبات معطرگیاه دارویی آویشن دنایی کشت شده در قزوین. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی قزوین. ۳(۴۸): ۶۲-۵۸.

۳. بقایی فر ز، مفیدی نیا چهرگانی راد ع. ۱۳۹۵. میکروسپورزایی و مگاسپورزایی در گیاه شکرتیغال.*Echinops ilicifolius* L. مجله پژوهش های سلولی و مولکولی ۲۹، ۳۴۹-۳۵۸.

۴. برازنده م م و باقرزاده ک.۱۳۸۶. بررسی ترکیبات شیمیایی روغن فرار آویشن دنایی (*Thymus daenensis*) جمع آوری شده از چهار منطقه مختلف استان اصفهان.فصلنامه گیاهان دارویی. ۶(۲۳):۱۹-۱۵.

۵. جم زاد ز. ۱۳۸۸.آویشن ها و مرزه های ایران.انتشارات مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور. ۱۷۱ صفحه.

۶. عبداللهی م.ر. ۱۳۹۳. مطالعه روند رویان زایی میکروسپورهای کلزا رقم پی اف (PF704) در شرایط درون شیشه ای با استفاده از میکروسکوپ الکترونی. مجله پژوهش های سلولی و مولکولی ۲۷، ۸۸-۹۸.

۷. هادیان ج، کریمی ا، شوریابی م، نجفی ف، کنعانی م، ۱۳۹۵. بررسی تنوع مورفولوژیکی و تحلیل ضرایب مسیر بازده اسانس در جمعیت های آویشن دنایی(*Thymus daenensis* Celak). فناوری تولیدات گیاهی. ۱۶(۱) :۵۶-۴۱

8. Aurelia S, Aleksandra P (2007) The effect of physical medium state on anther culture response in polish cultivated Oat. Acta Biologica Cravoviensia: Series Botanica, 49(2): 27-31.

9. Bal U, Touraev A (2009) Microspore Embryogenesis in Selected Medicinal and Ornamental Species of the Asteraceae. In: Touraev A, Forster BP, Jain SM. Advances in Haploid Production in Higher Plants. Springer, Dordrecht United Kingdom, pp. 219-229.

10. Bozorgipour R (2008) Haploidy and its application in plant breeding. Proceeding of international workshop, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII).

11. Carlos DS (2000) Effect of incubation temperature regimes and culture medium on broccoli microspore culture embryogenesis. Kluwer Academic Publishers, 119(3): 389–394.

12. Ferrie AMR (2007) Doubled haploid production in nutraceutical species. Euphytica, 158(3):347–357.

13. Ferrie, AMR (2009) Current status of doubled haploids in medicinal plants. In: Touraev A, Forster BP, Jain SM. Advances in Haploid Production in Higher Plants. Springer, Dordrecht United Kingdom, pp. 209-217.

14. Ferrie A and Caswell K (2011) Isolated microspore culture techniques and resent progress for haploid and doubled haploid plant production. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 104(3): 301-309.

15. 13- Ferrie AMR, Bethune T, Kernan Z (2005) An overview of preliminary studies on the development of doubled haploid protocols for nutraceutical species. Acta Physiologiae Plantarum, 27(4):735–741

16. Guo Y and Pulli D (2000) Isolated microspore culture and plant regeneration in rye (*Secale cereale* L.). Journal of Plant Cell Reports, 19(9): 875–880.

17. Iva S, Jiri H, Michaela K (2011) Inductin condition for somatic and microspore drived structure and detection of haploid status by isozyme analyses in anther culture of caraway. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 48(1): 30-39.

18. Kamila K, Renata G, Mohammad TW, Ewa S (2011) Anther culture of Lupines angustifolius: callus formation and the development of multicellular and embryo-like structure. Plant Growth Regulations, 66(2):145-153.

19. Kästner U, Kittler J, Marthe F (2016) Comparison of in vitro haploid induction in balm (Melissa officinalis). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 126(3): 561-566.

20. Kim M, Jang IC, Kim JA, Park E J, Yoon M, Lee Y (2008) Embryogenesis and plant regeneration of hot pepper (*Capsicum annuum* L.) through isolated microspore culture. Plant Cell Reports, 27 (3): 425-434

21. Lantos C, Ge´mes Juha´sz A, Somogyi Gy, O¨ tvo¨s K, Va´gi P, Miha´ly R,Kristo´f Z, Somogyi N, Pauk J (2009) Improvement of isolated microspore culture of pepper

Archive of SID

www.SID.ir

(*Capsicum annuum L.*) via co-culture with ovary tissues of pepper or wheat. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 97(3):285–293

22. Maraschin SF, Spaink H, Wang M (2005) Androgenic switch: an example of plant embryogenesis from the male gametophyte perspective. Journal of Experimental Botany, 56(417): 1711–1726.
23. Maluszynski M, Kasha K, Forster BP, Szarejko I (2003) Doubled Haploid Production in Crop Plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 428 pp.
24. Nemeth E (2000) Needs, problems and achievements of introduction of wild growing medicinal plants in to the agriculture. 1th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries. Institute for Medicinal Plant Research "Dr Josif Pancic" and Federal Institute for plant and animal Genetic Resources, Belgrade.
25. Rezvanfar MA, Sadrkhanlou A, Ahmadi H, Shojaei-Sadee MA (2008) Protection of cyclophosphamide-induced toxicity in reproductive tract histology, sperm characteristics and DNA damage by an herbal source; evidence for role of free-radical toxic stress. Human & Experimental Toxicology, 27(12): 901-910.
26. Shariatpanahi ME, Bal U, Heberle-Bors E, Touraev A (2006) Stresses applied for the reprogramming of plant microspores towards in vitro embryogenesis. Physiologia Plantarum, 127(4): 519–534.
27. Supena ED, Suharsono S, Jacobsen E, Custers J (2006) Successful development of a shed-microspore culture protocol for doubled haploid production in Indonesian hot pepper (*Capsicum annuum* L.). Plant Cell Report, 25(1):1–10.
28. Thomas WTB, Forster BP, Gertsson B (2003) Doubled haploids in breeding. In: Doubled haploid production in crop plants, Maluszynski M, Kasha KJ, Forster BP, Szarejko I, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 337-349
29. Touraev A, Forster BP, Jain SM, Mohan S (2009) Advances in Haploid Production in Higher Plants. Springer Science, 348 pp.
30. Teodora I, Stanislava G (2011) Anther culture in peper (*Capsicum annum*) in vitro. Acta Physiologiae Plantarum, 33(5): 1559-1570.
31. Ugur A, Shariatpanahi ME, Antonio J, Delphine E, Christophe C, Dehestani M, Mozaffari K, Touraev A (2012) Pseudo-embryogenic Structures in Anther and Isolated Microspore Cultures in vitro. Journal of Plant Breeding, 48 (2): 51–60.
32. Wolyn DJ, Nichols B (2003) Asparagus microspore and anther culture. In: Maluszynski M, Kasha KJ, Forster BP, Szarejko I. Doubled Haploid Production in Crop Plants. Springer, Dordrecht, pp. 265-273.

Archive of SID

www.SID.ir

Study of developmental stages and embryogenesis of *Thymus daenensis* microspors

Heydari A., Hadian J., Mirjalili M.H., Karami A.R. and Kanani M.R.

Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Thymus daenensis Celak is a valuable medicinal plant containing high thymol content in the essential oil. The domestication and breeding of high quality and homogenous varieties is necessary for its commercial production. The purpose of this study was to regenerate haploid plants from microspore culture. Since, most plant species show the best embryogenesis response at the uninuclear stage of microspore development, in the present study microspore developmental stages were determined. Based on the obtained results, the buds with uninuclear microspores were those of with 1.3-1.4 mm in diameter and 3.8-4.4 mm in length. In order to induce microspore embryogenesis, different pretreatments of temperature (30 and 4°C), hormones (2,4-D: 25, 35 and 45 ppm) and different media (NLN-13, FHG, B5) were investigated. The results indicated that there was a significant difference in response of microspores to different induction media, pre-treatments and their interactions. The highest numbers of multi-cellular structures were observed in the NLN-13 medium and temperature treatment of 30 ºC for 8 days and 2, 4-D treatment of 25 mg/l. Finally, heart shaped embryos were only observed in FHG medium with heat pretreatment for 8 days. Future studies are needed to increase the number of multi-cellular structures and successful regeneration of haploid plants.

Key words: Breeding, Embryogenesis, Haploid plants, Uninuclear Microspores

Archive of SID

www.SID.ir