

بررسی نرزاری دو گونه گیاه دارویی مرزه خوزستانی

(S. rechingeri Jamzad) و مرزه رشینگری *(Satureja khuzistanica Jamzad)*مصطفی افضل‌ی فر^۱، جواد هادیان^{۱*}، محمد حسین میرجلیلی^۱ و مهران عنایت شریعت پناهی^۲^۱ ایران، تهران، دانشگاه شهید بهشتی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، گروه کشاورزی^۲ ایران، کرج، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی

تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۱/۱۶

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۰/۲۷



چکیده

در این تحقیق کشت بساک و میکروسپور دو گونه گیاه دارویی مرزه خوزستانی و مرزه رشینگری با هدف باززایی گیاهان هاپلوئید مورد مطالعه قرار گرفت. در ابتدا مرحله نموی تک هسته‌ای میکروسپورها با رنگ‌آمیزی استوکارمن مشخص و ارتباط آن با اندازه غنچه گل تعیین گردید. در کشت بساک، تأثیر پیش تیمارهای دمایی، تیمارهای هورمونی و نوع کربوهیدرات (مالتوز، ساکارز) در محیط القای N6 بررسی شد. تراز پلوئیدی کالوسهای باززایی شده با استفاده از فلوسایتومتری تعیین گردید. کشت میکروسپور نیز در سه محیط کشت A2-60، FHG و NLN-13 با کاربرد پیش تیمارهای تنشی مختلف (دمایی، هورمونی و گرسنگی) انجام شد. در هر دو گونه، بیشترین درصد کالوس‌زایی بساک در ترکیب هورمونی ۰/۵ میلی گرم در لیتر از بنزیل آدنین، توفوردی و کیتین و پیش تیمار دمایی ۳۰ درجه‌سانتی‌گراد به مدت ۳ روز حاصل شد. نتایج آنالیز فلوسایتومتری این کالوسها نشان داد که اکثر آنها از نظر تراز پلوئیدی مشابه گیاهان مادری بودند و هاپلوئیدی فقط در گونه مرزه رشینگری در کالوس حاصل از ترکیب هورمونی ۰/۵ میلی گرم در لیتر از بنزیل آدنین، توفوردی و کیتین مشاهده شد. در محیط باززایی (MS)، کالوسها تنها تولید ریشه کردند و شاخه‌زایی مشاهده نشد. نتایج کشت میکروسپور نشان داد که در هر دو گونه بیشترین تعداد ساختارهای چند سلولی در محیطهای FHG و NLN-13 با پیش تیمار دمایی ۳۰ درجه‌سانتی‌گراد به مدت ۸ روز به دست آمد. ساختارهای چند سلولی فقط در محیط القایی NLN-13 توانستند به ساختارهای شبه جنینی قلبی شکل نمو یابند. نتایج این تحقیق اطلاعات مناسبی برای نرزاری در این دو گونه فراهم آورد.

واژه‌های کلیدی: مرزه خوزستانی، مرزه رشینگری، کشت بساک، کشت میکروسپور، اصلاح

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

مقدمه

کننده همچنین به عنوان دمنوش و ادویه مورد استفاده قرار می‌گیرند. در سالهای اخیر مطالعات گسترده‌ای روی جنبه‌های فیتوشیمیایی همچنین اثرات بیولوژیکی و دارویی این گیاهان از جمله خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی، ضد دیابت، ضد درد، ضد تورم و ضد چربی آنها انجام و نتایج جالب توجهی به دست آمده است (۳، ۴، ۵، ۱۴، ۳۴، ۳۵ و ۴۳). این گونه‌ها به دلیل داشتن کارواکرول بالا در اسانس

مرزه خوزستانی (*Satureja khuzistanica Jamzad*) و مرزه رشینگری (*S. rechingeri Jamzad*) از گونه‌های انحصاری جنس مرزه در ایران، متعلق به خانواده نعناعیان (Lamiaceae) می‌باشند که در مناطق خشک، آفتابی و خاکهای سنگلاخی آهکی جنوب غرب ایران در استانهای لرستان، ایلام و خوزستان رشد می‌کنند (۱، ۲، ۱۸ و ۱۹). هر دو گونه در طب سنتی به عنوان مسکن و ضد عفونی

و اسیدهای فنولی آزاد به ویژه رزمارینیک اسید در عصاره از نظر تجاری (کاربرد های دارویی، غذایی، آرایشی، بهداشتی) حائز اهمیت بوده و در سالهای اخیر در سطح بیش از ۲۰ هکتار به صورت تجاری مورد کشت و کار قرار گرفته اند (۲، ۳، ۸، ۱۶، ۱۳، ۳۱ و ۳۲).

با توجه به پراکنش محدود دو گونه مرزه خوزستانی و مرزه رشینگری در رویشگاههای طبیعی و گسترش تقاضا برای مواد اولیه گیاهی، ایجاد ارقام مرغوب و همگن جهت کشت در نظام کشاورزی و تأمین مواد اولیه گیاهی مورد نیاز صنایع دارویی

ضروری می‌باشد (۱۵ و ۱۶). بررسیهای اولیه نشان داده است که تنوع قابل توجهی از نظر صفات شیمیایی و تولیدی درون و بین رویشگاهها وجود دارد (۱۵ و ۱۶). به دلیل دگرگشتن بودن این گونه ها، حفظ کلونهای برتر شناسایی شده فقط از طریق تکثیر رویشی امکان پذیر است که هزینه بالایی نسبت به تکثیر با بذر را در بر دارد. به همین دلیل جهت توسعه کشت تجاری این دو گونه، اصلاح رقم بذری همگن و مرغوب مد نظر می‌باشد (۱۵ و ۱۶).

تولید لاینهای خویش‌آمیز به عنوان اولین مرحله در تولید بذور هیبرید و سنتتیک از طریق روشهای سنتی نیاز به چندین نسل خویش‌آمیزی دارد که فرآیندی وقت گیر و هزینه بر است و در نهایت هموزیگوسیتی کامل نیز به دست نمی‌آید (۲۷). در مقابل، با دستیابی به فنون تولید گیاهان هاپلوئید مضاعف شده خالص از طریق کشت بساک یا کشت میکروسپور، این فرآیند در زمان کوتاه و با صرف هزینه کم قابل انجام بوده و گیاهان به دست آمده ۱۰۰ درصد خالص خواهند بود (۹، ۱۷ و ۲۷). عوامل چندی از جمله ژنوتیپ، شرایط رشدی گیاهان مادری، مرحله نموی دانه گرده، پیش تیمارهای تنشی و ترکیب محیط کشت در موفقیت نرزیایی مؤثر هستند (۱۰، ۲۲ و ۳۹). یکی از عوامل تعیین کننده در موفقیت نرزیایی زمان

برداشت بساکها می‌باشد که مناسب‌ترین بساکها آنهايي هستند که حاوی میکروسپور تک هسته‌ای باشند (۳۸). میکروسپورها در حالت طبیعی یا در شرایط معمول کشت درون شیشه‌ای، مسیر طبیعی تکامل فردی (Ontogeny) خود در فاز زایشی را سپری کرده و به دانه گرده رسیده تبدیل می‌شوند. این مسیر را می‌توان از طریق اعمال تنش مناسب به فاز رویشی تغییر داده و از میکروسپورهای جدا شده تولید جنین نمود (۹ و ۳۶).

کشت بساک و میکروسپور تا کنون در گونه‌های مختلف گیاهی مورد بررسی قرار گرفته که در بسیاری از موارد موفقیت آمیز بوده است (۹، ۱۰، ۱۲، ۲۰، ۲۹ و ۳۹). مطالعات نرزیایی در گونه‌های مختلف گیاهان دارویی محدود بوده، با این حال، در سالهای اخیر چنین مطالعاتی رو به افزایش است (۱۱، ۲۴، ۴۲ و ۴۳). در مطالعه نرزیایی از گونه‌های مختلف نعنائیان چون زوفا، ریحان، اسطوخودوس، رزماری، مرزه تابستانه و آویشن موفقیتی گزارش نشده است (۹ و ۱۱). با این حال، نرزیایی در مورد گیاهانی چون بادرنجبویه از خانواده نعنائیان (۲۱)، سرخارگل از خانواده کاسنی (۴۵)، زیره سیاه اروپایی از خانواده چتریان (۹) گزارش شده است.

این تحقیق با هدف دستیابی به شرایط بهینه جهت نرزیایی دو گونه مرزه خوزستانی و مرزه رشینگری انجام شد. در ابتدا مراحل نموی دانه گرده و ارتباط آن با اندازه گل در هر دو گونه مرزه خوزستانی و مرزه رشینگری تعیین شد. سپس تأثیر برخی تیمارها بر نرزیایی از کشت بساک و میکروسپور هر دو گونه مورد بررسی قرار گرفت. این اولین گزارش در مورد نرزیایی در این گونه‌ها است که می‌تواند اطلاعات مفید و مؤثری برای ادامه تحقیقات در این زمینه باشد تا نهایتاً با ایجاد لاینهای هاپلوئید مضاعف و تولید ارقام مناسب، کشت تجاری این گونه‌ها با صرفه اقتصادی بیشتر توسعه یابد.

مواد و روشها

مواد گیاهی: به منظور استفاده از مواد گیاهی همگن در این آزمایش، از دو کلون برتر مرزه خوزستانی (A 28) و مرزه رشینگری (Khaz 8) از نظر ویژگیهای تولیدی و فیتوشیمیایی که در مطالعات قبلی شناسایی شده استفاده شد. گیاهان مادری این کلونها در مزرعه تحقیقاتی کشکان متعلق به شرکت داروسازی خرمان واقع در خرم‌آباد کشت شده‌اند. در اواخر پاییز، قلمه‌های هر یک از کلونها از این مزرعه تهیه و پس از انتقال به گلخانه پژوهشکده گیاهان دارویی، دانشگاه شهید بهشتی در بستر ماسه در گلدانهای استکانی کشت و پس از ریشه‌زایی کامل در اواخر اردیبهشت ماه به گلدانهای بزرگتر با بستر ماسه، خاک باغچه و کود دامی پوسیده به نسبت ۲: ۱: ۱ منتقل شدند. گلدانها تا زمان گلدهی در گلخانه نگهداری و هر ۵ روز یکبار آبیاری شدند. گیاهان از اواسط شهریور شروع به گلدهی کردند که گلهای جهت انجام آزمایشات از هر یک از کلونها برداشت شدند. از هریک از کلونها یک نمونه هرباریومی در هرباریوم پژوهشکده گیاهان دارویی، دانشگاه شهید بهشتی ثبت گردید.

تعیین مراحل نمو میکروسپور: به منظور تعیین مرحله نمو میکروسپور و ارتباط آن با اندازه گل، غنچه‌ها در اندازه‌های مختلف (از هر مرحله رشدی ۲۰ غنچه) از هرگونه برداشت و پس از بررسی ریخت‌شناسی، در محلول کارنوی تثبیت و در اتانول ۷۰ درصد نگهداری شدند. در ادامه، بساکها با پنس از گل خارج، با آب مقطر شسته شده و با یک قطره محلول استوکارمن در مقابل حرارت غیر مستقیم (بخار آب) رنگ آمیزی و به وسیله میکروسکوپ نوری بررسی شدند (۲۱ و ۲۳).

کشت بساک: گلهای هر گونه با توجه به اندازه غنچه‌ها در مرحله نمو مناسب (انتهای تک هسته‌ای) جهت کشت بساک جمع‌آوری شدند. جهت سترون‌سازی، غوطه‌وری در اتانول ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه، شستشو با آب مقطر

سترون، همزدن در هیپوکلیت سدیم ۳ درصد به مدت ۶ دقیقه به آرامی و در نهایت سه بار شستشو با آب مقطر سترون هر بار به مدت ۴ دقیقه انجام شد (۲۱، ۴۵).

جهت القای کالوس از بساک، با توجه به تجربیات مختلف محققین در مطالعه نرزاری (۴، ۶، ۱۱، ۲۰، ۲۲، ۲۵، ۲۸، ۲۹ و ۴۲)، تأثیر نوع کربوهیدرات (مالتوز، ساکارز)، تیمارهای هورمونی (A: ۰/۵ میلی گرم در لیتر بنزیل آدنین، ۰/۵ میلی گرم در لیتر ۲ و ۴ دی کلرو فنوکسی استیک اسید و ۰/۵ میلی گرم در لیتر کیتین، B: ۱ میلی گرم در لیتر بنزیل آدنین، ۰/۵ میلی گرم در لیتر ۲ و ۴ دی کلرو فنوکسی استیک اسید و ۰/۳۶ میلی گرم در لیتر کیتین، C: ۱ میلی گرم در لیتر بنزیل آدنین، ۱ میلی گرم در لیتر ۲ و ۴ دی کلرو فنوکسی استیک اسید و صفر میلی گرم در لیتر کیتین، D: شاهد) و پیش تیمارهای دمایی (دماهای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ روز، ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ روز و ۲۴ درجه سانتی‌گراد به عنوان شاهد) در محیط کشت N6 (۶) مورد بررسی قرار گرفت. درون هر پتری-دیش ۱۲ بساک قرار داده شد که پس از اعمال پیش تیمارها، در شرایط تاریکی و دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از ۲۵ روز درصد کالوس‌زایی در تیمارهای مختلف بررسی و ثبت شد و کالوسها به منظور باززایی به محیط کشت MS (۳۰) با ترکیبات مختلف دو هورمون BA (۰، ۰/۳، ۰/۵، ۱، ۱/۵ میلی گرم در لیتر) و NAA (۰، ۰/۱، ۰/۳، ۰/۵، ۰/۷ میلی گرم در لیتر) در شرایط دمایی ۲۴ درجه سانتی‌گراد، ۱۶ ساعت روشنائی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند. در طول این دوره نیز تغییرات (تغییر رنگ کالوس، شاخه‌زایی، ریشه‌زایی) ثبت شد. این آزمایشها به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی در سه تکرار اجرا و تجزیه واریانس داده‌های به دست آمده در سطح ۵ درصد با استفاده از نرم افزار SAS انجام شد.

تعیین تراز پلویدی کالوسها: برای تعیین تراز پلویدی

کالوس‌های حاصل از کشت بساک، از دستگاه فلوسایتومتری (UV-arc (pA 1 Partec, Germany) مجهز به لامپ UV-arc پژوهش‌کننده بیوتکنولوژی کشاورزی کرج استفاده شد (۴۰). بدین منظور تعداد ۲۰ نمونه کالوس به طور تصادفی از هر تیمار انتخاب و برای تعیین تراز پلوئیدی مورد استفاده قرار گرفت. نمونه کالوس داخل یک پتری‌دیش دارای ۴۰۰ میکرولیتر محلول استخراج هسته سلولی، به قطعات کوچک تقسیم گردید و نمونه‌ها از صافیهای ۵۰ میکرومتری عبور داده شد. سپس با ۱۶۰۰ میکرولیتر از محلول رنگ‌آمیزی DNA به نام DAPI رنگ‌آمیزی شدند و پس از مدت ۲ الی ۳ دقیقه نمونه‌ها درون دستگاه قرارداده شدند. با توجه به تراز پلوئیدی دو گونه مرزه خوزستانی (2CDNA= 1.446 pg) و مرزه رشینگری (2CDNA= 1.456 pg) (۳۷)، برای سنجش تراز پلوئیدی کالوسها از گیاه جعفری (*Petroselinum sativum*) (2n=22) (2c=4.48 pg) به عنوان گیاه استاندارد استفاده شد.

کشت میکروسپور: پس از جمع‌آوری گلها در مرحله نموی مناسب (انتهای تک‌هسته‌ای) و ضدعفونی آنها، جدا سازی میکروسپور (له کردن غنچه‌ها در شرایط استریل در محیط جدا سازی با پیستون سرنگ، عبور از فیلتر با مش ۴۵ میکرومتر سپس سانتریفیوژ با ۹۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳ دقیقه و جدا نمودن رسوب میکروسپور از ته فالكون) انجام شد. به این منظور از دو محیط جداسازی AB (۲۳) و ساکارز ۱۳ درصد (۱۰) با pH=۶ استفاده شد. با توجه به نتایج بهتر محیط جداسازی ساکارز ۱۳ درصد، در ادامه از این محیط جداسازی استفاده شد.

کشت میکروسپور در سه محیط کشت جنین‌زایی شامل A2-60 (۳۹)، FHG (۱۷) و NLN-13 (۲۵) انجام شد. جهت تغییر فاز نموی میکروسپورها از زایشی (گامتوفیتی) به رویشی (اسپوروفیتی) از پیش تیمارهای مختلف گرسنگی کربن B (دارای ۶۵ میلی‌گرم در لیتر از KCl، ۶۰۰ میلی‌گرم در لیتر از KH_2PO_4 ، ۱۲۵ میلی‌گرم در لیتر از

در شرایط استریل زیر هود، ۱۵ غنچه ضدعفونی شده در ۴ تا ۵ میلی‌لیتر محیط جداسازی با استفاده از پیستون سرنگ استریل له شده و از الک آزمایشگاهی ۴۵ میکرومتری عبور داده شدند. سوسپانسیون حاصل به فالكون‌های ۱۵ میلی‌لیتری منتقل و دو بار به مدت ۳ دقیقه با ۹۰۰ دور در دقیقه در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. در ادامه ۲ سی‌سی محیط کشت جنین‌زایی به رسوب ته فالكون اضافه و همزده شد تا سوسپانسیون یکنواختی تشکیل شود. سپس ۳۰۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون به پتری‌دیشهای حاوی محیط جنین‌زایی اضافه و با پارافیلیم درزگیری شد. تراکم نهایی حدود ۲۰۰۰۰ میکروسپور در میلی‌لیتر بود. پس از اعمال پیش تیمارها همه پتریها به اتاق کشت با دمای ۲۵ درجه و شرایط تاریکی منتقل شد و هر ۴ روز یکبار محیطها جهت بررسی وضعیت میکروسپورها به وسیله میکروسکوپ اینورت (BXS1, Olympus, Japan) بررسی و تغییرات (تقسیمات سلولی) ثبت شدند.

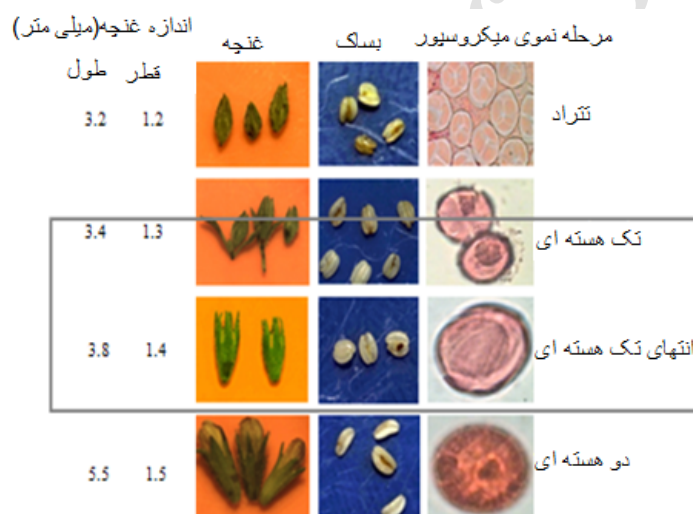
آنالیز آماری: تجزیه واریانس و مقایسه میانگین (آزمون دانکن) صفات بررسی شده به وسیله نرم افزار SAS ver. 9.1 و رسم نمودارها به وسیله نرم افزار Exelex انجام شد.

نتایج

تعیین مراحل نموی میکروسپور: میانگین طول گل‌های مورد بررسی در هر دو گونه بین ۳ تا ۵/۵ میلی‌متر بود.

بررسی بساک مربوط به غنچه‌های با اندازه‌های مختلف، چهار مرحله نمودی متفاوت میکروسپور را مشخص نمود. در شکل ۱ ارتباط بین اندازه گل و مرحله نمودی میکروسپور در مرزه خوزستانی نشان داده شده است. در گونه مرزه رشینگری نیز الگوی مشابه مشاهده شد. نتایج نشان داد که در هر مرحله مشخص شده، غالب میکروسپورهای داخل بساک در مرحله نمودی مشابه بودند. جوانترین گل‌های مورد بررسی دارای میانگین طول ۳/۲ میلی‌متر و قطر ۱/۲ میلی‌متر و حاوی بساکهایی با دیواره نازک و به رنگ سبز متمایل به زرد هستند که بیش از ۸۰ درصد میکروسپورهای موجود در آنها در مرحله نمودی تتراد قرار داشتند (شکل ۱- الف). گل‌های با میانگین طول ۳/۴ تا ۳/۸ میلی‌متر و میانگین قطر ۱/۳ تا ۱/۴ میلی‌متر استفاده شد.

بررسی بساکهای بزرگتر با رنگ روشن‌تر داشتند و حاوی میکروسپورهای با مرحله نمودی تتراد تا تک‌هسته‌ای بودند که غالب آنها (بیش از ۶۰ درصد) در مرحله نمودی تک-هسته‌ای قرار داشتند (شکل ۱- ب و ج). در این مرحله نمودی، هسته ابتدا در مرکز قرار دارد و با نزدیک شدن به انتهای این مرحله هسته به سمت دیواره میکروسپور نقل مکان می‌کند. بررسی بساکهای مربوط به گل‌های با میانگین طول ۵/۵ میلی‌متر نشان داد که اکثر میکروسپورهای موجود در آنها در مرحله نمودی پیشرفته‌تر (دو هسته‌ای) می‌باشند (شکل ۱- د). طبق این نتایج، جهت نرزاری در هر دو گونه از گل‌های با میانگین طول ۳/۴ تا ۳/۸ میلی‌متر که دارای میکروسپور با مرحله نمودی تک‌هسته‌ای می‌باشند، استفاده شد.



شکل ۱- ارتباط بین اندازه گل و مرحله نمودی میکروسپور

کالوسها طی ده روز به رنگ سبز تغییر رنگ دادند (شکل ۲- ب) و ۴ هفته بعد در برخی کالوسها ریشه تشکیل شد (شکل ۲- ج). نهایتاً، دوهفته پس از تشکیل ریشه، کالوسها شروع به قهوه‌ای شدن کردند و از بین رفتند (شکل ۲- د). نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که از نظر درصد کالوس‌زایی اختلاف معنی‌داری بین گونه‌ها، نوع کربوهیدرات، پیش‌تیمار دمایی و ترکیب‌های هورمونی وجود داشت (جدول ۱). همچنین بین اثرات متقابل گونه و

کشت بساک: تأثیر فاکتورهای مختلف گونه، پیش-تیمارهای مختلف دمایی و هورمونی و نوع کربوهیدرات جهت القای کالوس‌ها پلویید از کشت بساک مورد مطالعه قرار گرفت. ۱۵ روز پس از اعمال تیمارها، تشکیل کالوسهای سفید رنگ و فشرده (شکل ۲- الف) در برخی از آنها مشهود بود. ۲۵ روز پس از اعمال تیمارها درصد کالوس‌زایی در تیمارهای مختلف ثبت و کالوسها به محیط بازرایی منتقل شدند. پس از انتقال به محیط بازرایی،

زایی در محیط حاوی قند ساکارز و ترکیب هورمونی A به دست آمد (شکل ۳-ب). اثر متقابل پیش‌تیمار دمایی و ترکیبات هورمونی نیز نشان داد که بیشترین درصد کالوس-زایی در ترکیب هورمونی A و پیش‌تیمار دمایی ۳۰ درجه-سانتی‌گراد به مدت ۳ روز حاصل شد (شکل ۳-ث).

جدول ۱- اثر ساده گونه، نوع کربوهیدرات، تیمارهای هورمونی و پیش‌تیمارهای مختلف بر درصد کالوس‌زایی ۲۵ روز بعد از کشت

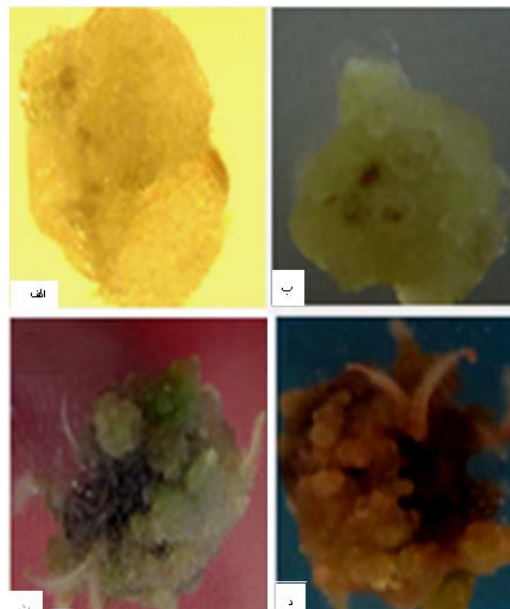
درصد کالوس زایی	تیمارها
	گونه
16.2b*	مرزه خوزستانی
22.3a	مرزه رشینگری
	منبع کربوهیدرات
22.5a	مالتوز
16.7b	ساکارز
	پیش‌تیمار دمایی
15.9b	۷ روز ۴ درجه سانتی‌گراد
28.3a	۳ روز ۳۰ درجه سانتی‌گراد
15.0b	شاهد (۲۴ درجه سانتی‌گراد)
	ترکیبات هورمونی (mg/l)
26.6a	0.5 BA + 0.5 2,4-D + 0.5 Kin :A
18.7b	1 BA + 0.5 2,4-D + 0.36 Kin :B
12.5c	1 BA + 1 2,4-D + 0 Kin :C
0.7d	D: شاهد

*حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار می‌باشند.

بررسی تراز پلویدی کالوسها: نتایج به دست آمده از آنالیز فلوسایتومتری کالوسها نشان داد که اکثر کالوسها در تیمارهای مختلف از نظر سطح پلویدی مشابه گیاهان مادری (شکل ۴-الف) بودند. فقط در دو نمونه از گونه مرزه رشینگری (در ترکیب هورمونی A و پیش‌تیمار دمایی ۳۰ درجه‌سانتی‌گراد به مدت ۳ روز) کالوسهای هاپلوئید (شکل ۴-ب) مشاهده شد و در چند نمونه پیکهای متفاوتی از کالوس به دست آمد (شکل ۴-ج).

کشت میکروسپور: اثر سه نوع محیط کشت و پیش‌تیمارهای مختلف بر میکروسپور در دو گونه بررسی شد.

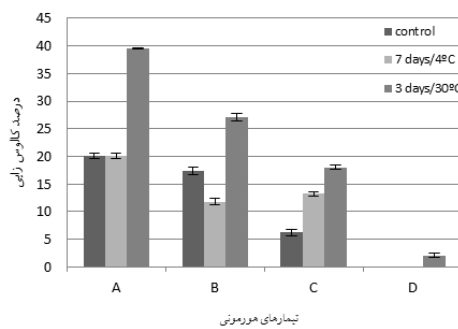
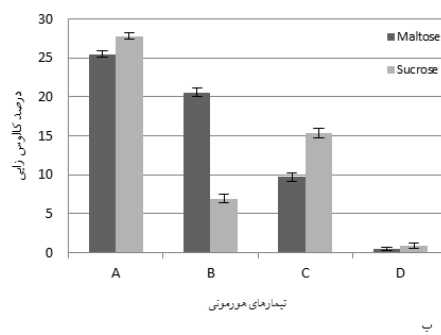
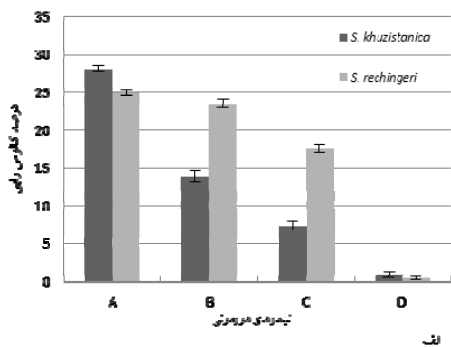
ترکیبات هورمونی، کربوهیدرات و ترکیبات هورمونی، پیش‌تیمار دمایی و ترکیبات هورمونی (شکل ۳) اختلاف معنی‌داری وجود داشت.



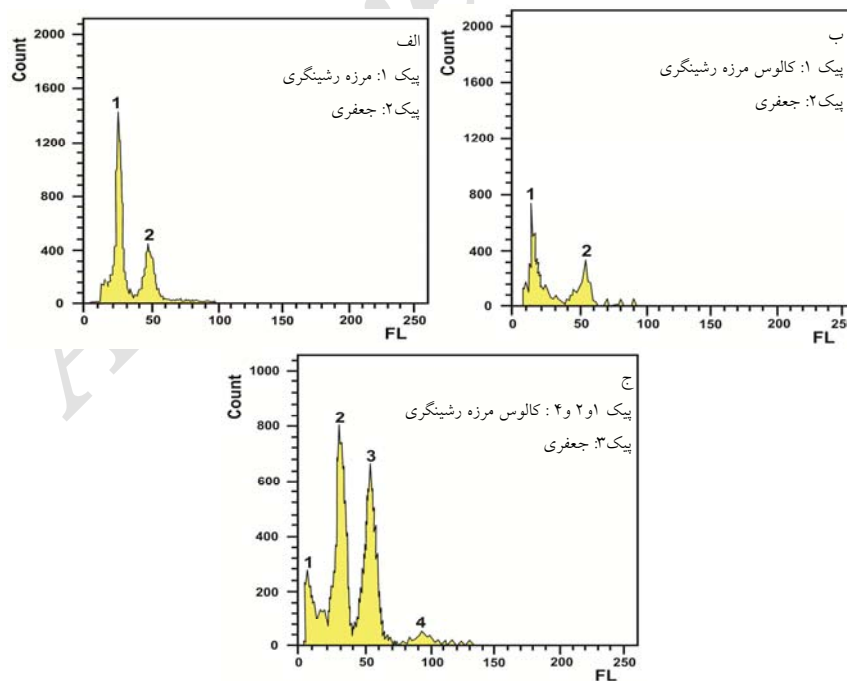
شکل ۲- مراحل مختلف القاء و نمو کالوس از بساک (الف: تشکیل کالوس ۱۵ روز بعد از کشت، ب: تغییر رنگ کالوسها ۱۰ روز بعد از انتقال به محیط باززایی، ث: تشکیل ریشه در محیط باززایی ۴ هفته بعد از انتقال به محیط باززایی، د: قهوه‌ای شدن کالوسها ۶ هفته بعد از انتقال به محیط باززایی)

بررسی اثرات ساده فاکتورهای مورد بررسی نشان داد که بین گونه‌ها، مرزه رشینگری؛ بین نوع کربوهیدرات، مالتوز؛ بین پیش‌تیمارهای دمایی، دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و بین ترکیبات هورمونی، ترکیب A (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین) بیشترین درصد کالوس‌زایی را داشتند (جدول ۱).

اثر متقابل گونه و ترکیبات هورمونی نشان داد که در ترکیب هورمونی A مرزه خوزستانی بیشترین درصد کالوس‌زایی را دارد در حالی که در سایر ترکیبهای هورمونی، مرزه رشینگری درصد کالوس‌زایی بالاتری از مرزه خوزستانی دارد (شکل ۳-الف). در بررسی اثر متقابل کربوهیدرات و ترکیبات هورمونی، بیشترین درصد کالوس-

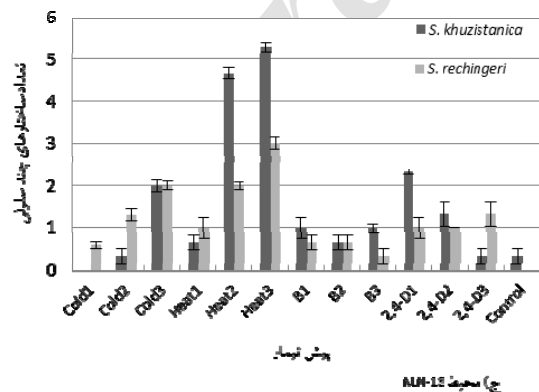
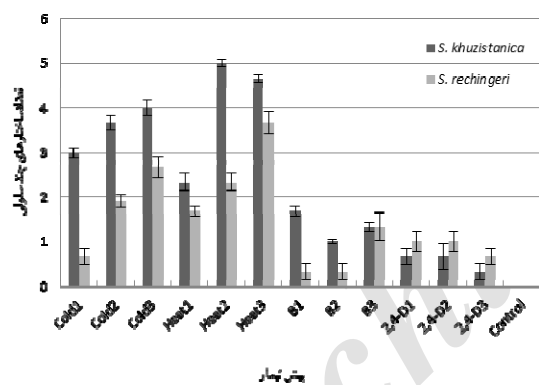
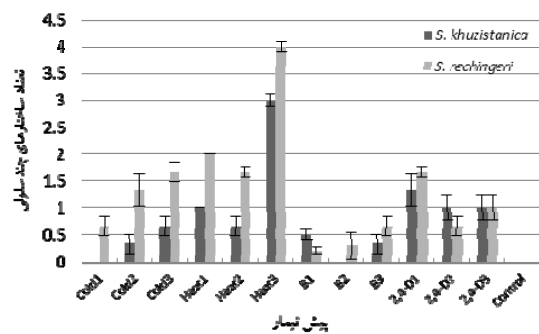


شکل ۳- اثر متقابل ترکیبات هورمونی با الف) گونه، ب) کربوهیدرات، ج) پیش تیمار دمایی بر درصد کالوس زایی ۲۵ روز بعد از کاشت (ترکیبات هورمونی A) (0.5 BA + 0.5 2,4-D + 0.5 Kin)، B) (1 BA + 0.5 2,4-D + 0.36 Kin)، C) (1 BA + 1 2,4-D + 0 Kin) و D) (شاهد))



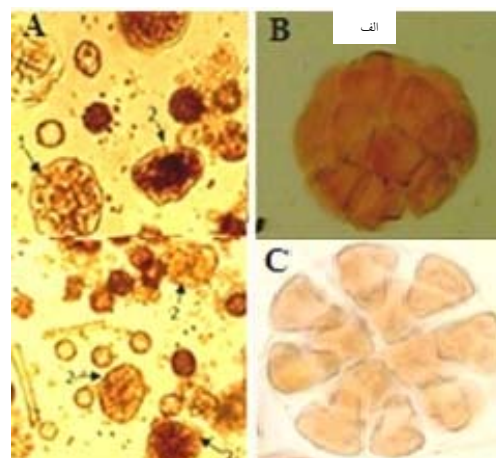
شکل ۴- نمونه ای از هیستوگرام‌های حاصل از آنالیز فلوسایتومتری الف- گیاه مادری مرزه رشینگری ب) کالوس دیپلوئید مرزه رشینگری ج) کالوس هاپلوئید و دیپلوئید مرزه رشینگری در مقایسه با گیاه استاندارد جعفری

مدت ۸ روز به دست آمد (شکل ۶). در محیط‌های FHG و NLN-13 با پیش‌تیمار ذکر شده بیشترین تعداد این ساختارها در مرزه خوزستانی (۵ مورد) حاصل شد و در مرزه رشینگری در محیط FHG و محیط NLN-13 به ترتیب تعداد ۳/۶ و ۳ ساختار چند سلولی نمود یافت (شکل ۶). این ساختارهای چند سلولی فقط در محیط NLN-13 تبدیل به ساختارهای شبه جنینی شدند (شکل ۷).



شکل ۶- اثر متقابل گونه، گرسنگی کربن B و پیش‌تیمار دمایی بر تعداد ساختارهای چند سلولی در محیط الف (A2-60) ب) FHG ج) NLN-13 cold1-3) به ترتیب ۰.۷، ۱۰ روز دمایی ۴ درجه سانتی-

چهار هفته بعد از کشت، ساختارهای دایره‌ای شکل بزرگتر از میکروسپورها در محیط کشت ظاهر شدند ولی هیچ نموی بعدی در آنها مشاهده نشد (شکل ۵). حدود هفت هفته بعد از کشت، اولین ساختارهای چند سلولی در برخی تیمارها ظاهر شدند. این ساختارها از تقسیمات میکروسپور در محیط کشت به وجود آمده، کشیده و توپر بودند (شکل ۵).



شکل ۵- ساختارهای شبه جنینی کاذب و چند سلولی حاصل از میکروسپور الف: تصویر تهیه شده با میکروسکوپ اینورت (۱): ساختارهای شبه جنینی کاذب، ۲: ساختارهای چند سلولی (ب و ج: به ترتیب ساختارهای چند سلولی حقیقی و ساختارهای شبه جنینی کاذب رنگ آمیزی شده با استوکارمن)

در هر تیمار تعداد ساختارهای چند سلولی ۹ هفته بعد از کشت ثبت و آنالیز شد. طبق نتایج به دست آمده، اثر گونه بر میانگین تعداد ساختارهای چند سلولی معنی‌دار نبود اما اثر محیط کشت، پیش‌تیمار دمایی و اثرات متقابل آنها به جز اثر متقابل گونه و پیش‌تیمار دمایی بر میانگین تعداد ساختارهای چند سلولی معنی‌دار بود. با توجه به معنی‌دار بودن اثرات متقابل سه گانه فاکتورهای مورد بررسی، تنها نتایج مقایسه میانگین این اثرات آورده شده است. مقایسه میانگین اثرات متقابل سه‌گانه گونه، محیط کشت و پیش‌تیمار مشخص نمود که بیشترین تعداد ساختارهای چند-سلولی در مرزه رشینگری (۴ مورد) و مرزه خوزستانی (۳ مورد) در محیط A2-60 و پیش‌تیمار دمایی ۳۰ درجه به

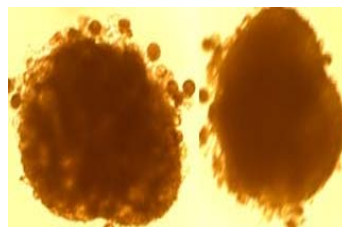
ب
ج

ساکارز مؤثرتر است. این امر ممکن است به دلیل تأخیر در تبدیل مالتوز به گلوکز و القای تنش گرسنگی، همچنین عدم تأثیر بازدارنده آن نسبت به سایر منابع قندی باشد (۳۶) و (۳۸). با این حال در مواردی چون کشت بساک زیره سیاه اروپایی (*Carum carvi*)، گزارش شده است که محیط دارای ساکارز به تنهایی یا همراه مالتوز از محیط دارای مالتوز در القای کالوس جنین‌زا مؤثرتر عمل کرده است (۴۰).

ترکیبات هورمونی نیز تأثیر زیادی بر القای کالوس داشتند چنان‌که با کاهش میزان اکسین نسبت به سیتوکینین (همانند ترکیب هورمونی A)، درصد کالوس زایی افزایش یافت. در مطالعه کشت بساک گیاه سرخارگل (*Echinacea purpurea*)، گزارش شده است که محیط N6 محیطی مناسب‌تر از محیط MS می‌باشد. همچنین ترکیب هورمونی بنزیل‌آدنین و نفتالین‌استیک اسید (به ترتیب ۲۲ میکرومول و ۰/۰۵۴ میکرومول) از 2,4-D در القای کالوس مؤثرتر بود. در مطالعه کشت بساک زیره سیاه اروپایی درصد بالای باززایی کالوس در محیط B5 با ترکیب هورمونی نفتالین‌استیک اسید و بنزیل‌آدنین (به ترتیب ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر) به دست آمد (۴۵).

در نرزیایی، برای خاموش شدن مرحله گامتوفیتی و شروع مرحله اسپروفیتی میکروسپور به تنش فیزیکی یا شیمیایی احتیاج است (۲۵، ۳۱، ۳۵ و ۴۲). اعمال پیش‌تیمار دمایی مناسب می‌تواند عامل کلیدی در موفقیت نرزیایی باشد. در کشت بساک، پیش‌تیمار دمایی بالا نسبت به پیش‌تیمار دمایی پایین اثر بهتری داشت و کالوس‌های باززایی شده بیشتر از درون بساک (میکروسپورها) بود (شکل ۲- الف). در کشت بساک زیره سیاه اروپایی، القای کالوس در همه دماهای آزمون شده ۶، ۲۷ و ۳۱ درجه سانتی‌گراد امکان‌پذیر بود. با این حال، پس از انتقال به دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد، فراوانی کالوس‌های جنین‌زا در بساک‌های تیمار شده با دمای ۶ درجه سانتی‌گراد بیشتر بود (۴۰).

گراد، heat 1-3 به ترتیب ۳، ۵، ۸ روز دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، B1-3 به ترتیب گرسنگی کربن ۱، ۳، ۵ روز، 1-3-D 2,4 به ترتیب غلظت‌های ۲۵، ۳۵، ۴۵ میلی‌گرم در لیتر)



شکل ۷- ساختارهای شبه جنینی قلبی شکل حاصل از کشت میکروسپور (میکروسکوپ اینورت)

بحث

از عوامل بسیار مهم و اولیه برای موفقیت در نرزیایی انتخاب گلهای دارای میکروسپور با مرحله نموی مناسب است. در گونه‌های گیاهی مختلف مرحله نموی انتهای تک هسته‌ای (مرحله قبل از اولین تقسیم میتوز دانه‌گرده) به عنوان مرحله مناسب ذکر شده است چرا که در این مرحله سلول از لحاظ تمایز آزادانه عمل می‌کند و بیشترین پاسخ را به نرزیایی دارد (۴، ۲۴، ۳۸). بهترین شاخص در این زمینه تعیین ارتباط بین اندازه گل با مرحله نموی میکروسپور برای هر گونه است (۷، ۱۰). در مطالعه حاضر اندازه گل و ارتباط آن با مرحله نموی میکروسپور مشخص شد که از این نظر بین دو گونه تفاوتی وجود نداشت و غنچه‌های با میانگین قطر ۱/۳ تا ۱/۴ میلی‌متر و میانگین طول ۳/۴ تا ۳/۸ میلی‌متر حاوی میکروسپورهایی مناسب (تک هسته‌ای میانی تا انتهایی) برای نرزیایی بودند.

نرزیایی از طریق کشت بساک و میکروسپور زمانی موفقیت‌آمیز است که ترکیب مناسبی از شرایط کشت و تنش‌ها در شرایط درون شیشه‌ای برای بساک یا میکروسپورهای ایزوله شده مهیا باشد تا میکروسپورها به راحتی از مسیر گامتوفیتی به مسیر اسپروفیتی تغییر جهت دهند (۱۰ و ۳۶). در این مطالعه، مشابه نتایج مهشوری (۲۶)، نتایج کشت بساک نشان داد که استفاده از قند مالتوز نسبت به

که طی جداسازی میکروسپورها با سوسپانسیون گرده‌ها وارد محیط کشت می‌شوند، شروع به تقسیم کرده و این ساختارها را به وجود می‌آورند (۴۴). سطح اپیدرم در این دو گونه از کرکهای بسیار ریزی پوشیده شده که می‌تواند منشاء تشکیل این ساختارهای چند سلولی کاذب در کشت میکروسپور باشد.

در هر دو گونه بیشترین ساختارهای چند سلولی در محیط FHG و NLN-13 مشاهده شد. این ساختارهای چند سلولی فقط در محیط NLN-13 تبدیل به ساختارهای شبه جنینی قلبی شکل شدند. در هر سه محیط کشت بررسی شده، بیشترین تعداد ساختارهای چند سلولی در پیش‌تیمار دمایی ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸ روز به دست آمد. می‌توان نتیجه گرفت که همانند آنچه در مورد برخی گونه‌های دیگر (۶، ۲۰ و ۴۲) نیز گزارش شده است، در دو گونه مورد مطالعه دمای بالا نسبت به دمای پایین اثر بهتری در تحریک جنین‌زایی از میکروسپور دارد. مشابه با نتایج گزارش شده در مطالعه نرزاری گیاه بادرنجبویه (۲۱)، با وجود تشکیل ساختارهای چند سلولی و شبه جنینی قلبی شکل، مراحل نمو جنینها تا رسیدن به گیاه کامل طی نشده و جنینها از بین رفتند.

علی‌رغم پیچیدگی تکنیکی کشت میکروسپور در مقایسه با کشت بساک، باززایی گیاهان صرفاً هاپلوئید از مزایای این روش می‌باشد. با توجه به نتایج به دست آمده، امکان دسترسی به تعداد زیادی میکروسپور نرزا از طریق دستکاری و بهینه‌سازی شرایط کشت وجود خواهد داشت. با توجه به موفقیت پیش‌تیمارهای دمایی در تشکیل ساختارهای جنینی به ویژه در محیط NLN-13، پیشنهاد می‌شود تیمارهای دمایی طولانی‌تر اعمال شود. همچنین عواملی چون تراکمهای مختلف کشت میکروسپور و پیش‌تیمارهای تغذیه‌ای گیاهان مادری نیز مورد بررسی قرار گیرد.

شش هفته پس از انتقال کالوسها به محیط باززایی، رشد و نمو آنها متوقف و کالوسها از بین رفتند. این امر نشان می‌دهد که محیط باززایی کالوسها مناسب نبوده (۲۱) و لازم است انواع دیگر محیط باززایی و ترکیبات هورمونی مختلف جهت ادامه رشد و نمو کالوسها و باززایی مورد بررسی قرار گیرد. در کشت بساک سرخارگل، شاخه‌زایی از کالوس در محیط MS دارای ۲/۲۲ میکرومول BA و غلظتهای مختلف NAA انجام شد و غلظت ۰/۲۷ میکرومول NAA بیشترین درصد باززایی (۹۵/۲ درصد) را داشت (۴۵).

نتایج آنالیز فلوسایتومتری کالوسها نشان داد که در کشت بساک ساختارهای با تعداد کروموزومهای گامتوفیتی، اسپروفیتی همچنین با تراز پلوئیدی متفاوت به وجود می‌آیند که به وجود آمدن بافتهای با تراز مختلف پلوئیدی دور از انتظار نیست (۷، ۱۷، ۲۷ و ۲۸). بسته به منشاء کالوس، کشت بساک ممکن است منجر به بوجود آمدن جنین یا گیاهانی با تراز پلوئیدی متفاوت گردد که می‌تواند ناشی از بافتهای بدنی بساک، امتزاج هسته‌ها، اندومیتوز داخل میکروسپور، شکل‌گیری نامتعارف گرده در اثر اختلالات میوزی، همچنین در اثر شکل‌گیری ناقص دیواره سلولی بین هسته رویشی و زایشی باشد (۷ و ۲۷). با این حال در شرایط مناسب امکان باززایی گیاهان هاپلوئید وجود داشته و در مورد گونه‌های گیاهی مختلف چون فلفل و سرخارگل گزارش شده است (۴۱، ۴۲ و ۴۵). با توجه به نتایج به دست آمده از کشت بساک مرزه خوزستانی و مرزه رشینگری، با بهینه‌سازی شرایط باززایی از نظر نوع محیط کشت و ترکیب هورمونی، امکان ایجاد گیاهان هاپلوئید وجود خواهد داشت.

در کشت میکروسپور ساختارهای مدور چهار هفته بعد از اعمال پیش‌تیمارها در محیط کشت ظاهر شدند (شکل ۵ ج). که منشاء آنها به احتمال زیاد سلولهای اپیدرمی است

منابع

- ۲- دوستی ب. (۱۳۹۵) مقایسه کمی و کیفی اسانس مرزه خوزستانی (*Satureja khuzistanica* Jamzad) در رویشگاه‌های مختلف غرب و جنوب غرب ایران. مجله پژوهش‌های گیاهی ۲۹: ۳۷۷-۳۸۴.
- 3- Abdollahi M, Salehnia A, Mortazavi SH. (2003): Antioxidant, antidiabetic, antihyperlipidemic, reproduction stimulatory properties and safety of essential oil of *Satureja khuzestanica* in rat in vivo: An toxicopharmacological study. Med. Sci. Monit., 9: 331-335.
- 4- Aurelia, S., Aleksandra, P. (2007): The effect of physical medium state on anther cultur Response in polish cultivated Oat, Acta Biological., 49: 27-31.
- 5- Basiri S, Esmaily H, Vosough-Ghanbari S, Mohammadirad A, Yasa N, Abdollahi M. (2007): Improvement by *Satureja khuzestanica* essential oil of malathion-induced red blood cells acetylcholinesterase inhibition and altered hepatic mitochondrial glycogen phosphorylase and phosphoenolpyruvate carboxykinase activities. Pesticide Biochem. Physiol., 89: 124-129.
- 6- Chu C., Wang, C., Sun, S., Hsu, C., Yin, K., Pi, F.Y. (1975): Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiment on the nitrogen sources. Sci. Sin., 18: 659-668.
- 7- Edvard, C., Yeung, G., (2011): Anther, pollen and tapetum development in safflower, *Carthamus tinctorius*. Sex. Plant Reprod., 24: 307-317.
- 8- Farsam H., Amanlou M., Radpour M.R., (2004): Composition of the essential oils of wild and cultivated *Satureja khuzestanica* Jamzad from Iran. Flav. Frag. J., 19: 308-310.
- 9- Ferrie, A., (2007): Doubled haploid production in nutreutical species, Euphytica 158: 347-357.
- 10- Ferrie, A.M.R., Caswell, K.L., (2011): Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production. Plant Cell, Tiss.Org. Cul., 104: 301-309.
- 11- Ferrie, A.M.R., (2009). Current status of doubled haploids in medicinal plants. Advances in Haploid Production in Higher Plants, pp. 209-217.
- 12- Fletcher, R., Coventry, J., Kott, L.S., (1998): Double haploid technology for spring and winter *Brassica napus*. Technical Bulletin, OAC Publication, pp.1-42.
- 13- Forster, B.P., Thomas, W.T.B., (2005): Doubled haploids in genetics and plant breeding. Plant Breed. Rev. 25: 57-88.
- 14- Hadian, J., Akramian, M., Heydari, H., Mumivand, H., Asghari, B., 2012. Composition and in vitro antibacterial activity of essential oils from four *Satureja* species growing in Iran. Nat. Prod. Res., 26, 98-108.
- 15- Hadian, J., Esmaeili, H., Nadjafi, F., Khadivi-Khub, A., (2014): Essential oil characterization of *Satureja rechingeri* in Iran. Ind. Crops Prod., 61: 403-409.
- 16- Hadian, J., Mirjalili, M.H., M. R. Kanani, A. Salehnia, Ganjipoor, P., (2011): Morphological and phytochemical characterization of natural populations of *Satureja khuzistanica*. Chem. Biod., 8: 902-915.
- 17- Iva, S., Jiri, H., Michaela, K., (2011): Induction condition for somatic and microspore derived structure and detection of haploid status by isozyme analyses in anther culture of caraway. In Vitro Cell. Dev. Bio. Plant, 548: 30-39.
- 18- Jamzad, Z., (1994): A new species of the genus *Satureja* from Iran. Iranian J. Bot., 6: 215-218.
- 19- Jamzad, Z., (1996). *Satureja rechingeri* (Labiatae) – a new species from Iran. Ann. Natu. Mus. Wien., 98: 75-77.
- 20- Kamila, K., Renata, G., Mohammad. T.W., Sawicka, E., (2011): Anther culture of *Lupines angustifolius*: callus formation and the development of multicellular and embryo-like structure. Plant Growth Reg., 66:145-153.
- 21- Kästner, U., Kittler, J., Marthe, F., (2016): Comparison of in vitro haploid induction in balm (*Melissa officinalis*). Plant Cell Tissue Org. Cult., 126: 561-566.
- 22- Kiviharju, E., Moisander, S., Laurila, J., (2005): Improved green plants regeneration rates from oat anther culture and the agronomic performance of some DH lines. Plant Cell Tissue Org. Cult., 81: 1-9.

- 23- Kyo, M., Harada, H., (1986): Control of the developmental pathway of tobacco pollen in vitro. *Planta* 168: 427-432.
- 24- Lantus, C., Gemes, A., Somogyi, G. O., tvos, K., Vagi, P., Mihaly, R., Kristof, Z., Somogyi, N., Pauk, J., (2009): Improvement of isolated microspore culture of pepper (*Capsicum annuum* L.) via co-culture with ovary tissues of pepper or wheat. *Plant Cell Tissue Org. Cult.*, 97: 285-293.
- 25- Lichter, R., (1982): Efficient yield of embryoids by culture of isolated microspore of different Brassicacea species. *Plant Breed.* 103: 119-123.
- 26- Maheshwari, S.C., (1996): The discovery of anther culture techniques for the production of haploids. In: Jain SM, Sopory SK Veilleux RE (eds.), *In Vitro Haploid Production in Higher Plants*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers pp. 1-10.
- 27- Maria, A.G., (2011): Anther culture for haploid and doubled haploid production. *Plant Cell Tissue Org. Cult.*, 104: 283-300.
- 28- Matsubara, S., Dohya, N., Murakami, K., (2005): Callus formation and regeneration of adventitious embryos from carrot, fennel and mitsuba microspores by anther and isolated microspore cultures. *Act. Horticult.* 392: 129-137.
- 29- Matthys, R.E., (2005): Multicellular structures developing during maize microspore culture express endosperm and embryo-specific genes and show different embryogenic potentialities. *Eur. J. Cell Biol.* 84: 663-675.
- 30- Murashige, T., Skoog, F., (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiology Plant.*, 15: 473-497.
- 31- Nooshkam, A., Majnoun, H.N., Hadian, J., Jahansooz, M., Khavazi, K., Salehnia, A. and Hedayatpour, S., (2016): The effect of irrigation intervals on quantitative and qualitative yields of two savory species (*Satureja khuzestanica* and *S. rechingeri*). *Plant Prod.*, 39: 11-20.
- 32- Nooshkam, A., Mumivand, H., Hadian, J., Alemardan, A. and Morshedloo, M.R., (2017): Drug yield and essential oil and carvacrol contents of two species of *Satureja* (*S. khuzistanica* Jamzad and *S. rechingeri* Jamzad) cultivated in two different locations. *J. Appl. Res. Med. Arom. Plants* 6: 126-130.
- 33- Pauls, K.P., Chan, J., Woronuk, G., Schulze, D., Brazolot, J., (2006): When microspores decide to become embryos – cellular and molecular changes. *Can. J. Bot. Rev. Can. Bot.*, 84: 668-678.
- 34- Rezvanfar, M.A., Farshid, A.A., Sadrkhanlou, R.A., Ahmadi, A., Rezvanfar, M.A., Salehnia, A. and Abdollahi, M., (2010): Benefit of *Satureja khuzestanica* in subchronically rat model of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 62: 323-330.
- 35- Rezvanfar, M.A., Sadrkhanlou, A. Ahmadi, H. Shojaei-Sadee M.A., (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. *Hum. Exp. Toxicol.*, 27: 901-910.
- 36- Shariat, A., Karimzadeh, G. and Assareh, M.H., (2013): Karyology of Iranian Endemic *Satureja* (Lamiaceae) Species. *Cytologia*, 78: 305-312.
- 37- Shariatpanahi M, E., Bal U, Heberle-Bors E, Touraev A., (2006): Stresses applied for the re-programming of plant microspores towards in vitro embryogenesis. *Physiol. Plant.*, 127: 519-534.
- 38- Shariatpanahi M, E., Emami Meybodi, D., (2009): Microspore: a haploid cell with various applications in genetics and plant breeding. *Modern Genet. J.*, 14: 5-16.
- 39- Smýkal, P., (2000): Pollen embryogenesis - the stress mediated switch from gametophytic to sporophytic development - current status and future prospects. *Biologia Planta.*, 43: 481-489.
- 40- Smýkalová, I., Šmirous, P., Kubořiová, M., Gasmanová, N. and Griga, M., 2009. Doubled haploid production via anther culture in annual, winter type of caraway (*Carum carvi* L.). *Acta Physiol. Planta.*, 31: 21.
- 41- Supena, E.D., 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 Rep.*, 25:1-10.
- 42- Teodora, I., Stanislava, G. (2011): Anther culter in pepper (*Capsicum annum*) in vitro. *Acta Physiol. Plant* 33: 1559-1570.
- 43- Touraev, A., Ilham, A., Vicente, O., Heberle, E., (1996): Stress induced microspore embryogenesis from tobacco microspores: an optimaized system for molecular studies. *Plant Cell Rep.*, 15: 561-565.

- 44- Ugur, A., Shariatpanahi, M. E., Antonio, J., Delphine, E., Christophe, C., Dehestani, M., Mozaffari, K., Touraev, A., (2012): Pseudo-embryogenic Structures in Anther and Isolated Microspore Cultures *in vitro*: a Cautionary Guide, Genet. Plant Breed., 48: 51–60.
- 45- Zhao, F.C., Nilanthi, D., Yang, Y.S., Wu, H., (2006). Anther culture and haploid plant regeneration in purple coneflower (*Echinacea purpurea* L.). Plant Cell Tissue Org. Cult., 86: 55.

Study of androgenesis of two medicinal plants

Satureja khuzistanica Jamzad and *S. rechingeri* Jamzad

Afzalifar M.¹, Hadian J.¹, Mirjalili M.H.¹ and Enayati Shariatpanahi M.²

¹ Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, G.C. Tehran, I.R. of Iran.

² Dept. of Tissue and Cell Culture, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj, I.R. of Iran

Abstract

Androgenesis is an effective method of doubled haploid plant regeneration in breeding programs. For this purpose, anther and microspore cultures of two medicinal plants, *Satureja khuzistanica* Jamzad and *S. rechingeri* Jamzad, were studied. As the first step, uninuclear developmental stages of microspores were determined in relation to flower size, using acetocarmen staining. In anther culture, the effects of different temperatures, hormonal treatments and carbohydrate sources (maltose, sucrose) on androgenesis were studied in N6 induction medium. The ploidy level of calluses was determined using flow cytometry. Isolated microspores were also subjected to three induction media (NLN-13, FHG, A2-60), different temperatures and hormonal pretreatments. The highest percentage of callus induction was obtained in hormonal treatment of 0.5 mg/l of BA, 2,4-D, and Kin with temperature treatment of 30 °C for 3 days. Based on flow cytometry results, ploidy level of almost all calli was similar to that of donor plants and only some calli of *S. rechingeri* in the media containing 0.5 mg/l of BA, 2,4-D, and Kin were haploid. In the regeneration medium (MS), only roots but no shoots were observed. In microspore culture of both species, the highest numbers of multi-cellular structures were observed in NLN-13 and FHG induction medium with temperature treatment of 30 °C for 8 days. Heart-shaped embryo like structures were only observed in NLN-13 induction medium. The finding of this research will be a good base for haploid plant regeneration of *S. khuzistanica* and *S. rechingeri*.

Key words: *Satureja khuzistanica*, *S. rechingeri*, androgenesis, anther culture, microspore culture, breeding