بررسی نرزایی دو گونه گیاه دارویی مرزه خوزستانی (*Satureja khuzistanica* Jamzad) و مرزه رشینگری (*S. rechingeri* 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 دریافت: ۹۳/۱۰/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۱/۱۶

چکیده

در این تحقیق کشت بساک و میکروسپور دو گونه گیاه دارویی مرزه خوزستانی و مرزه رشینگری با هدف باززایی گیاهان هاپلویید 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 پلوییدی 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 کینتین و پیش تیمار دمایی۳۰ درجه‌سانتی‌گراد به مدت ۳ روز حاصل شد. نتایج آنالیز فلوسایتومتری این کالوسها نشان داد که اکثر آنها از نظر تراز پلوییدی مشابه گیاهان مادری بودند و هاپلویدی فقط در گونه مرزه رشینگری در کالوس حاصل از ترکیب هورمونی ۰/۵ میلی گرم در لیتراز بنزیل آدنین، توفوردی و کینتین 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 نرزایی در این دو گونه فراهم آورد.

واژه های کلیدی: مرزه خوزستانی، مرزه رشینگری، کشت بساک، کشت میکروسپور، اصلاح

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

مقدمه

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). هردو گونه در طب سنتی به عنوان مسکن و ضد عفونی کننده همچنین به عنوان دمنوش و ادویه مورد استفاده قرار می گیرند. در سالهای اخیر مطالعات گسترده‌ای روی جنبه های فیتوشیمیایی همچنین اثرات بیولوژیکی و دارویی این گیاهان از جمله خواص آنتی اکسیدانی، 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

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، ۱۳،۱۶، 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 دگرگشن 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 می باشد (۱۵ و ۱۶).

تولید لاینهای خویش‌آمیز به عنوان اولین مرحله در تولید بذور هیبرید و سنتتیک از طریق روشهای سنتی نیاز به چندین نسل خویش آمیزی دارد که فرآیندی وقت گیر و هزینه بر است و در نهایت هموزیگوسیتی کامل نیز به دست نمی آید (۲۷). در مقابل، با دستیابی به فنون تولید گیاهان هاپلویید مضاعف شده خالص از طریق کشت بساک یا کشت میکروسپور، این فرآیند در زمان کوتاه و باصرف هزینه کم قابل انجام بوده و گیاهان به دست آمده ۱۰۰ درصد خالص خواهند بود (۹، ۱۷ و ۲۷). عوامل چندی ازجمله ژنوتیپ، شرایط رشدی گیاهان مادری، مرحله نموی دانه گرده، پیش تیمارهای تنشی و ترکیب محیط کشت در موفقیت نرزایی مؤثر هستند (۱۰، ۲۲ و ۳۹). یکی از عوامل تعیین کننده در موفقیت نرزایی زمان برداشت بساکها می‌باشد که مناسب‌ترین بساکها آنهایی 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 می توان از طریق اعمال تنش مناسب به فاز رویشی تغییر داده و از میکروسپورهای جدا شده تولید جنین نمود (۹و۳۶).

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 نرزایی 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 نرزایی از گونه‌های مختلف نعناییان چون زوفا، ریحان، اسطوخودوس، رزماری، مرزه تابستانه و آویشن موفقیتی گزارش نشده است (۹ و ۱۱). با این حال، نرزایی در مورد گیاهانی چون بادرنجبویه از خانواده نعناییان (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 نرزایی 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 نرزایی از کشت بساک و میکروسپور هردو گونه مورد بررسی قرار گرفت. این اولین گزارش در مورد نرزایی در این گونه‌ها است که می‌تواند اطلاعات مفید و مؤثری برای ادامه تحقیقات در این زمینه باشد تا نهایتاً با ایجاد لاینهای هاپلویید مضاعف و تولید ارقام مناسب، کشت تجاری این گونه ها 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 خرم آباد کشت شده اند. در اواخر پاییز، قلمه های 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 ریشه زایی کامل در اواخر اردیبهشت ماه به گلدانهای بزرگتر با بستر ماسه، خاک باغچه و کود دامی پوسیده به نسبت ۲ : ۲: 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 گلها 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 نموی میکروسپور: به منظور تعیین مرحله نموی میکروسپور و ارتباط آن با اندازه گل، غنچه‌ها در اندازه های مختلف (از هر مرحله رشدی ۲۰ غنچه) از هرگونه برداشت و پس از بررسی ریخت شناسی، 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 نموی مناسب (انتهای تک هسته‌ای) جهت کشت بساک جمع‌آوری شدند. جهت سترون سازی، غوطه‌وری در اتانول ۷۰ درصد به مدت۳۰ ثانیه، شستشو با آب مقطر سترون، همزدن در هیپوکلریت 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 نرزایی (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 و۴ دی کلرو فنوکسی استیک اسید و ۰/۵ میلی گرم در لیتر کینتین، **B**: ۱ میلی گرم در لیتر بنزیل آدنین، ۰/۵ میلی گرم در لیتر ۲ و۴ دی کلرو فنوکسی استیک اسید و ۰/۳۶ میلی گرم در لیتر کینتین، **C**: ۱ میلی گرم در لیتر بنزیل آدنین، ۱ میلی گرم در لیتر ۲ و۴ دی کلرو فنوکسی استیک اسید و صفر میلی گرم در لیتر کینتین، **D**: شاهد) و پیش تیمارهای دمایی(دماهای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۷ روز، ۳۰ درجه‌سانتی‌گراد به مدت ۳ روز و ۲۴ درجه سانتی گراد 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 درجه‌سانتی‌گراد 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، ۰/۵، 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 درجه‌سانتی‌گراد، ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند. در طول این دوره نیز تغییرات (تغییر رنگ کالوس، شاخه زایی، ریشه زایی) 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 پلوییدی کالوسها: برای تعیین تراز پلوییدی

کالوسهای حاصل از کشت بساک، از دستگاه فلوسایتومتری (pA 1 Partec, Germany) مجهز به لامپ UV-arc پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی کرج استفاده شد(۴۰). بدین منظور تعداد ۲۰ نمونه کالوس به طور تصادفی از هر تیمار انتخاب و برای تعیین تراز پلوییدی 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 الی۳ دقیقه نمونه‌ها درون دستگاه قرارداده شدند. با توجه به تراز پلوییدی دو گونه مرزه خوزستانی (2C DNA= 1.446 pg) و مرزه رشینگری (2CDNA= 1.456 pg) (۳۷)، برای سنجش تراز پلوییدی کالوسها از گیاه جعفری (*Petroselinum sativum*) (2n=22 , 2c=4.48 pg) به عنوان گیاه استاندارد استفاده شد.

کشت میکروسپور: پس از جمع آوری گلها در مرحله نموی مناسب (انتهای تک هسته‌ای) و ضدعفونی آنها، جدا سازی میکروسپور (له کردن غنچه ها 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 فالکون) 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 کربنB (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 $Ca(NO_3)_2$,$4H_2O$) (۳۳) به مدت ۱، ۳ و ۵ روز، تیمارهای دمایی (شامل دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴، ۷، ۱۰ روز و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳، ۵، ۸ روز) و تیمار هورمونی2, 4-D (با غلظتهای ۲۵، ۳۵، ۴۵ میلی‌گرم بر لیتر به مدت ۳۰ دقیقه) استفاده شد. نمونه های شاهد بدون تیمار و در دمای محیط باقی ماندند. تیمارها به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار مورد بررسی قرار گرفت.

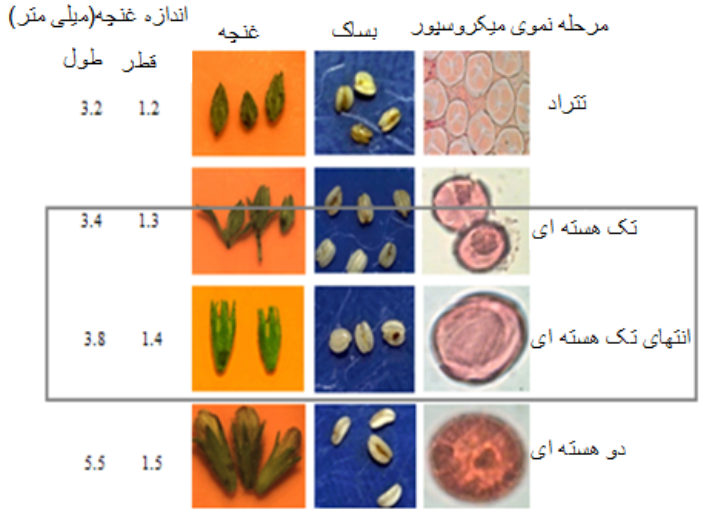
در شرایط استریل زیر هود، ۱۵ غنچه ضدعفونی شده در ۴ تا ۵ میلی‌لیتر محیط جداسازی با استفاده از پیستون سرنگ استریل له شده و از الک آزمایشگاهی ۴۵ میکرومتری عبور داده شدند. سوسپانسیون حاصل به فالکون‌های ۱۵ میلی لیتری منتقل و دو بار به مدت ۳ دقیقه با ۹۰۰ دور در دقیقه در دمای ۵ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شدند. در ادامه ۲ سی سی محیط کشت جنین‌زایی به رسوب ته فالکون اضافه و همزده شد تا سوسپانسیون یکنواختی تشکیل شود. سپس ۳۰۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون به پتری دیشهای حاوی محیط جنین‌زایی اضافه و با پارافیلم درزگیری شد. تراکم نهایی حدود ۲۰۰۰۰ میکروسپور در میلی لیتر 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 Exele انجام شد.

نتایج

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

بررسی بساک مربوط به غنچه‌های با اندازه‌های مختلف، چهار مرحله نموی متفاوت میکروسپور را مشخص نمود. در شکل ۱ ارتباط بین اندازه گل و مرحله نموی 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 نموی مشابه بودند. جوانترین گلهای مورد بررسی دارای میانگین طول ۳/۲ میلی متر و قطر ۱/۲ میلی متر 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 نموی تتراد قرار داشتند (شکل ۱– الف). گلهای با میانگین طول ۳/۴ تا ۳/۸ میلی متر و میانگین قطر ۱/۳ تا ۱/۴ میلی متر بساکهای بزرگتر با رنگ روشن‌تر داشتند و حاوی میکروسپورهای با مرحله نموی تتراد تا تک‌هسته‌ای بودند که غالب آنها (بیش از ۶۰ درصد) در مرحله نموی تک-هسته‌ای قرار داشتند (شکل ۱– ب و ج). در این مرحله نموی، 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 میلی متر نشان داد که اکثر میکروسپورهای موجود در آنها در مرحله نموی پیشرفته‌تر (دو هسته‌ای) می‌باشند (شکل ۱– د). طبق این نتایج، جهت نرزایی در هر دو گونه از گلهای با میانگین طول ۳/۴ تا ۳/۸ میلی متر که دارای میکروسپور با مرحله نموی تک هسته‌ای می‌باشند، استفاده شد.

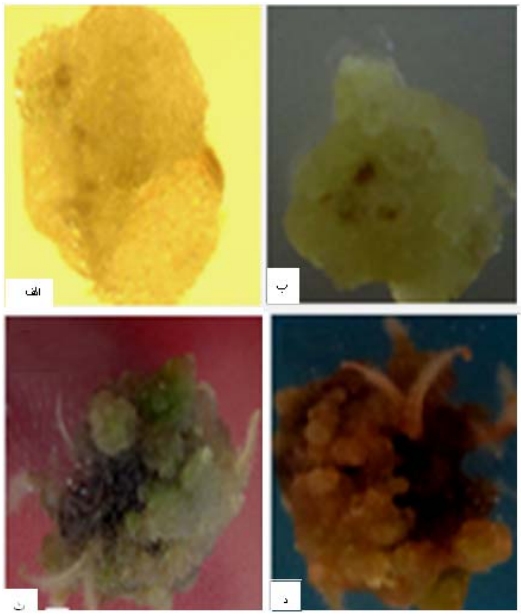


شکل ۱– ارتباط بین اندازه گل و مرحله نموی میکروسپور

کشت بساک: تأثیر فاکتورهای مختلف گونه، پیش-تیمارهای مختلف دمایی و هورمونی و نوع کربوهیدرات جهت القای کالوس هاپلویید 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 باززایی منتقل شدند. پس از انتقال به محیط باززایی، 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 کالوس زایی اختلاف معنی‌داری بین گونه‌ها، نوع کربوهیدارت، پیش تیمار دمایی و ترکیبهای هورمونی وجود داشت (جدول ۱). همچنین بین اثرات متقابل گونه و

ترکیبات هورمونی، کربوهیدرات و ترکیبات هورمونی، پیش تیمار 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 پیش تیمارهای دمایی، دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و بین ترکیبات هورمونی، ترکیب A (۰/۵ میلی گرم در لیتر BA، ۰/۵ میلی گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی گرم در لیتر کینتین) بیشترین درصد کالوس زایی 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 کالوس زایی بالاتری از مرزه خوزستانی دارد (شکل ۳- الف). در بررسی اثر متقابل کربوهیدرات و ترکیبات هورمونی، بیشترین درصد کالوس-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 پیش تیمار دمایی ۳۰ درجه-سانتی‌گراد به مدت ۳ روز حاصل شد (شکل ۳- ث).

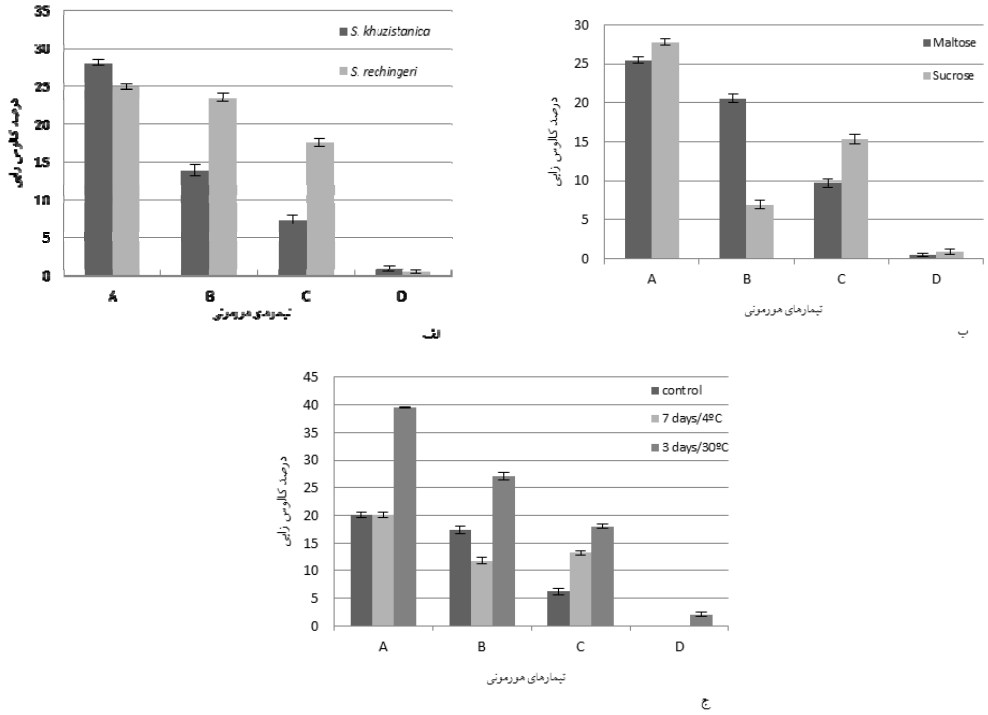
جدول ۱- اثر ساده گونه، نوع کربوهیدرات، تیمارهای هورمونی و پیش‌تیمارهای مختلف بر درصد کالوس‌زایی ۲۵ روز بعد از کشت

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

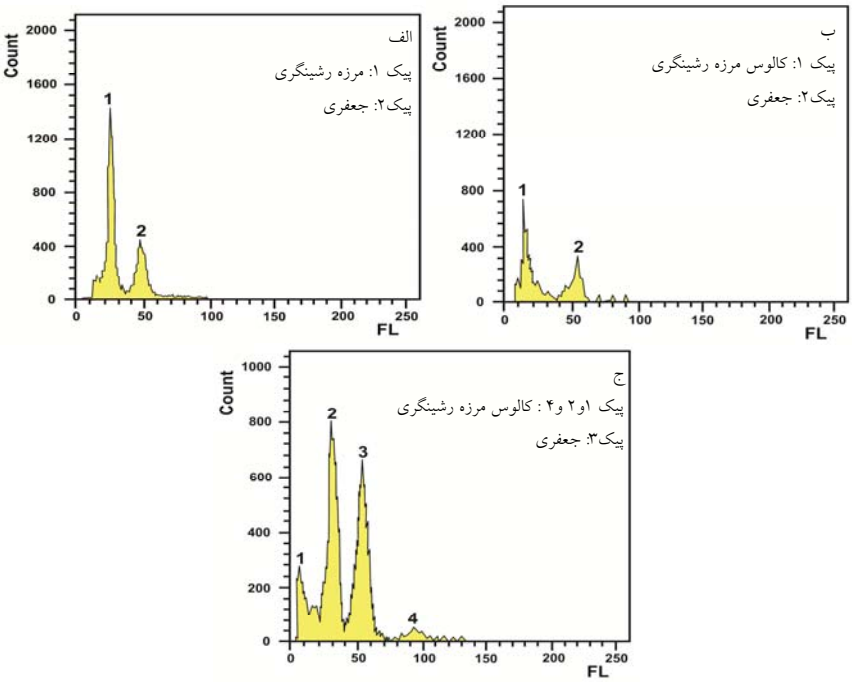
* حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار می باشند.

بررسی تراز پلوییدی کالوسها: نتایج به دست آمده از آنالیز فلوسایتومتری کالوسها نشان داد که اکثر کالوسها در تیمارهای مختلف از نظر سطح پلوییدی مشابه گیاهان مادری (شکل ۴-الف) بودند. فقط در دو نمونه از گونه مرزه رشینگری (در ترکیب هورمونی A و پیش تیمار دمایی ۳۰ درجه‌سانتی‌گراد به مدت ۳ روز) کالوسهای هاپلویید (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 پیش تیمارهای مختلف بر میکروسپور در دو گونه بررسی شد.

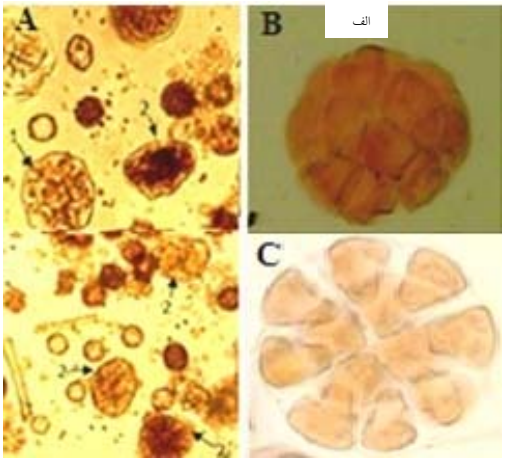


شکل ۳- اثر متقابل ترکیبات هورمونی با الف) گونه، ب) کربوهیدرات، ج) پیش تیمار دمایی بر درصد کالوس زایی ۲۵ روز بعد از کاشت (ترکیبات هورمونی **A** (0.5 BA + 0.5 2,4-D + 0.5 Kin)، **B** (1 BA + 0.5 2,4-D + 0.36 Kin)، **C** (1 BA + 1 2,4-D + 0 Kin) و **D** (شاهد))



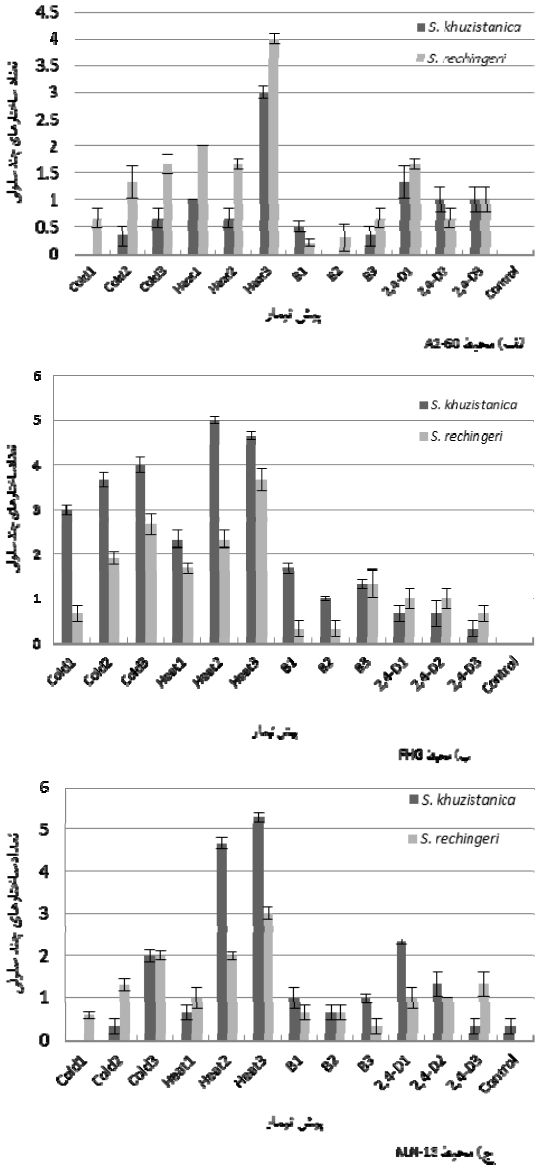
شکل۴- نمونه ای از هیستوگرامهای حاصل از آنالیز فلوسایتومتری الف- گیاه مادری مرزه رشینگری ب) کالوس دیپلویید مرزه رشینگری ج) کالوس هاپلویید و دیپلویید مرزه رشینگری در مقایسه با گیاه استاندارد جعفری

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).



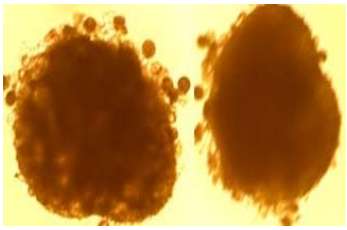
شکل ۵- ساختارهای شبه جنینی کاذب و چند سلولی حاصل از میکروسپور الف: تصویر تهیه شده با میکروسکوپ اینورت (۱: ساختارهای شبه جنینی کاذب، ۲: ساختارهای چند سلولی) ب و ج: به ترتیب ساختارهای چند سلولی حقیقی و ساختارهای شبه جنینی کاذب رنگ آمیزی شده با استوکارمن

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، پیش تیمار 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 پیش تیمار مشخص نمود که بیشترین تعداد ساختارهای چند-سلولی در مرزه رشینگری (۴ مورد) و مرزه خوزستانی (۳ مورد) در محیط A2-60 و پیش تیمار دمایی ۳۰ درجه به مدت ۸ روز به دست آمد (شکل ۶). در محیطهای FHG و NLN-13 با پیش تیمار 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 نمویافت (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 پیش تیمار دمایی بر تعداد ساختارهای چند سلولی در محیط الف) A2-60 ب) FHG ج) NLN-13 (cold1-3 به ترتیب ۴، ۷، ۱۰ روز دمای ۴ درجه سانتی-

گراد، heat 1-3 به ترتیب ۳، ۵، ۸ روز دمای ۳۰ درجه سانتی گراد، B1-3 به ترتیب گرسنگی کربن ۱، ۳، ۵ روز، 2,4-D 1-3 به ترتیب غلظتهای ۲۵، ۳۵، ۴۵ میلی گرم 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 نرزایی انتخاب گلهای دارای میکروسپور با مرحله نموی مناسب است. در گونه‌های گیاهی مختلف مرحله نموی انتهای تک هسته‌ای (مرحله قبل از اولین تقسیم میتوز دانه گرده) به عنوان مرحله مناسب ذکر شده است چرا که در این مرحله سلول از لحاظ تمایز آزادانه عمل می کند و بیشترین پاسخ را به نرزایی 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 میلی متر و میانگین طول ۳/۴ تا ۳/۸ میلی متر حاوی میکروسپورهایی مناسب (تک هسته‌ای میانی تا انتهایی) برای نرزایی بودند.

نرزایی از طریق کشت بساک و میکروسپور زمانی موفقیت-آمیز 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 اسپوروفیتی تغییر جهت دهند (۱۰ و ۳۶). در این مطالعه، مشابه نتایج مهشواری (۲۶)، نتایج کشت بساک نشان داد که استفاده از قند مالتوز نسبت به 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 جنین زا مؤثرتر عمل کرده است (۴۰).

ترکیبات هورمونی نیز تأثیر زیادی بر القای کالوس داشتند چنان که با کاهش میزان اکسین نسبت به سیتوکنین (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 می باشد. همچنین ترکیب هورمونی بنزیل‌آدنین و نفتالین استیک 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 نفتالین استیک اسید و بنزیل آدنین (به ترتیب ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی گرم بر لیتر) به دست آمد(۴۵).

در نرزایی، برای خاموش شدن مرحله گامتوفیتی و شروع مرحله اسپروفیتی میکروسپور به تنش فیزیکی یا شیمیایی احتیاج است (۲۵، ۳۱، ۳۵ و ۴۲). اعمال پیش تیمار دمایی مناسب می‌تواند عامل کلیدی در موفقیت نرزایی باشد. در کشت بساک، پیش تیمار دمای بالا نسبت به پیش تیمار دمای پایین اثر بهتری داشت و کالوسهای باززایی شده بیشتر از درون بساک (میکروسپور ها) بود (شکل ۲- الف). در کشت بساک زیره سیاه اروپایی، القای کالوس در همه دماهای آزمون شده ۶، ۲۷ و ۳۱ درجه سانتی‌گراد امکان پذیر 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).

شش هفته پس از انتقال کالوسها به محیط باززایی، رشد و نمو آنها متوقف و کالوسها از بین رفتند. این امر نشان می دهد 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، شاخه زایی 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 پلوییدی متفاوت به وجود می-آیند که به وجود آمدن بافتهای با تراز مختلف پلوییدی 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 پلوییدی متفاوت گردد که می‌تواند ناشی از بافتهای بدنی بساک، امتزاج هسته‌ها، اندومیتوز داخل میکروسپور، شکل گیری 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 هاپلویید وجود داشته و در مورد گونه های 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 بهینه سازی شرایط باززایی از نظر نوع محیط کشت و ترکیب هورمونی، امکان ایجاد گیاهان هاپلویید وجود خواهد داشت.

در کشت میکروسپور ساختارهای مدور چهار هفته بعد از اعمال پیش تیمارها در محیط کشت ظاهر شدند (شکل ۵ ج). که منشاء آنها به احتمال زیاد سلولهای اپیدرمی است 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 می تواند منشاء تشکیل این ساختارهای چند سلولی کاذب در کشت میکروسپور باشد.

در هردو 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 پیش تیمار دمایی ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۸ روز به دست آمد. می توان نتیجه گرفت که همانند آنچه در مورد برخی گونه های دیگر (۶، ۲۰ و ۴۲) نیز گزارش شده است، در دو گونه مورد مطالعه دمای بالا نسبت به دمای پایین اثر بهتری در تحریک جنین زایی از میکروسپور دارد. مشابه با نتایج گزارش شده در مطالعه نرزایی 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.

علی رغم پیچیدگی تکنیکی کشت میکروسپور در مقایسه با کشت بساک، باززایی گیاهان صرفاً هاپلویید از مزایای این روش می باشد. با توجه به نتایج به دست آمده، امکان دسترسی به تعداد زیادی میکروسپور نرزا از طریق دستکاری و بهینه سازی شرایط کشت وجود خواهد داشت. با توجه به موفقیت پیش تیمارهای دمایی در تشکیل ساختارهای جنینی به ویژه در محیط NLN-13، پیشنهاد می شود تیمارهای دمایی طولانی‌تر اعمال شود. همچنین عواملی چون تراکمهای مختلف کشت میکروسپور و پیش تیمارهای تغذیه ای گیاهان مادری نیز مورد بررسی قرار گیرد.

منابع

۱- امیری ح، قاسمی رمضان آباد ز. (۱۳۹۶) بررسی اثر تنش شوری بر ترکیبهای شیمیایی اسانس گیاه مرزه رشینگری *Satureja rechingeri* Jamzad. مجله پژوهش های گیاهی (در حال انتشار).

۲- دوستی ب. (۱۳۹۵) مقایسه کمی و کیفی اسانس مرزه خوزستانی (*Satureja khuzistanica* Jamzad) در رویشگاههای مختلف غرب و جنوب غرب ایران. مجله پژوهش های 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- Murashge, 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. Path., 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., l4: 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., Kubošiová, 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 ºC 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 ºC 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