

## ریزازدیادی مرزه بختیاری (*Satureja bachtiarica* Bunge) از طریق بافت‌های سوماتیک: تکثیر انبوه و سازگاری

مرضیه احمدی روشن<sup>۱</sup>، قاسم کریم‌زاده<sup>۲\*</sup> و سجاد رشیدی منفرد<sup>۳</sup>

۱- دانشجوی دکتری، گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، پردیس کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- نویسنده مسئول، استاد، گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، پردیس کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

پست الکترونیک: karimzadeh\_g@modares.ac.ir

۳- استادیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، پردیس کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: شهریور ۱۴۰۱

تاریخ اصلاح نهایی: مرداد ۱۴۰۱

تاریخ دریافت: خرداد ۱۴۰۱

### چکیده

مرزه بختیاری (*Satureja bachtiarica* Bunge) یکی از گونه‌های انحصاری جنس مرزه در ایران است که به‌واسطه دارا بودن ترکیب‌هایی نظیر کارواکرول و تیمول در اسانس و اسید رزمارینیک و سایر اسیدهای فنولیک در عصاره، دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی قوی و همچنین ارزش اقتصادی و دارویی است. در این مطالعه به‌منظور تولید کلون این گونه با استفاده از روش ریزازدیادی از ۱۰ تیمار نوساقه‌زایی و ۸ تیمار ریشه‌زایی در محیط کشت پایه MS استفاده گردید. تیمارهای نوساقه‌زایی ترکیبی از هورمون‌های سیتوکینین (2ip, Kin, TDZ) و اکسین (IBA و BA) با غلظت‌های مختلف بودند. تیمارهای ریشه‌زایی نیز ترکیبی از غلظت‌های مختلف هورمون‌های اکسین (IBA و NAA) بودند. با بررسی صفاتی از جمله تعداد و طول شاخه اصلی و فرعی، تعداد برگ، تعداد جوانه فعال جانبی و رنگ برگ، بهترین تیمار نوساقه‌زایی [IBA (۰/۰۱ mg l<sup>-1</sup>), TDZ (۰/۰۵ mg l<sup>-1</sup>) و (۰/۳ mg l<sup>-1</sup>)] و بهترین تیمار ریشه‌زایی [IBA (۰/۵ mg l<sup>-1</sup>) و (۰/۵ mg l<sup>-1</sup>)] مشخص گردید. تعداد ریشه اصلی و فرعی نیز معیار انتخاب بهترین تیمار ریشه‌زایی [IBA (۰/۵ mg l<sup>-1</sup>) و (۰/۵ mg l<sup>-1</sup>)] بودند. از آنجا که مرزه بختیاری گیاهی دگرگشن است و دارای تنوع بالایی برای صفات مختلف از جمله متابولیت‌ها می‌باشد، هدف کاربردی از تحقیق حاضر، تولید انبوه افراد همسان به‌منظور استفاده در برنامه‌های اصلاحی بود. این هدف با ارائه پروتکل ریزازدیادی این گیاه با ارزش انجام گردید.

واژه‌های کلیدی: اکسین، دگرگشن، ریزازدیادی، سیتوکینین، گیاه بومی، مرزه بختیاری (*Satureja bachtiarica* Bunge).

### مقدمه

زمین‌شناسی می‌باشد که از این دوران در رویشگاه‌های خشک گسترش یافته است. به عقیده پلینی نام *Satureja* از کلمه لاتین Saturare به معنی Saturate (اشباع شدن) گرفته شده و این به‌دلیل استفاده از این گیاهان در غذا

جنس مرزه (*Satureja*) یکی از جنس‌های خانواده نعنا (Lamiaceae) متعلق به زیرخانواده Nepetoideae و قبیله Menthae است. مبدأ پیدایش *Satureja* دوران سوم

جایگزینی مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌های سنتزی که مقاومت باکتری‌ها به آنها روزبه‌روز در حال افزایش است بکار رود (Sefidkon et al., 2007).

از نظر سطح پلوییدی مرزه بختیاری دیپلوئید و دارای  $2n = 2x = 30$  کروموزوم (Shariat et al., 2013) و اندازه ژنوم  $2C\text{-value} = 1/3$  پیکوگرم است (Shariat et al., 2018c). شاخص خود ناسازگاری نیز در مرزه بختیاری ۹۶٪ می‌باشد، به این مفهوم که این گیاه تقریباً ۹۶٪ دگرگرده‌افشان است (Shariat & Sefidkon, 2020)، بنابراین تنوع بالایی در میان بوته‌ها از نظر صفات مختلف وجود دارد که این موضوع در بعضی از کارهای اصلاحی که وجود جمعیت یکنواخت از اصول اولیه آن محسوب می‌شود، امتیاز منفی به حساب می‌آید و لازم است کلون تهیه گردد. البته تاکنون تحقیقات مختلفی در زمینه کشت بافت گونه‌های مختلف مرزه انجام شده است که در آنها محیط‌های کشت پایه و غلظت هورمون‌های استفاده شده با یکدیگر متفاوت بوده‌اند (Arrebola et al., 1997؛ Ramak et al., 2011). در تحقیقی که روی گیاه مرزه *S. rechingeri* انجام شد بهترین هورمون برای نوساقه‌زایی ترکیبی از سه هورمون  $(0.1 \text{ mg l}^{-1})$  IBA،  $(0.3 \text{ mg l}^{-1})$  BAP و  $(0.5 \text{ mg l}^{-1})$  2ip و بهترین هورمون برای ریشه‌زایی یکی از سطوح غلظتی  $(1 \text{ mg l}^{-1})$  IBA،  $(0.5 \text{ mg l}^{-1})$  و  $(0.1 \text{ mg l}^{-1})$  BAP به‌عبارتی برای ریشه‌زایی در این گونه سطوح مختلف هورمون IBA مناسب می‌باشد و این گونه از مرزه به مقدار اکسین حساسیت بالایی ندارد (Shariat et al., 2016). در گونه *S. khuzistanica* نیز بهترین هورمون برای نوساقه‌زایی ترکیبی از سه هورمون  $(0.1 \text{ mg l}^{-1})$  IBA،  $(0.3 \text{ mg l}^{-1})$  BAP و  $(0.2 \text{ mg l}^{-1})$  Kin و بهترین هورمون برای ریشه‌زایی تلفیقی از دو هورمون  $(0.5 \text{ mg l}^{-1})$  IBA و  $(0.1 \text{ mg l}^{-1})$  NAA بود (Shariat & Sefidkon, 2021). از مجموع تحقیقاتی که در گونه‌های مختلف جنس مرزه انجام شده است می‌توان این گونه نتیجه‌گیری کرد که لازم است شیوه‌نامه ریزازدیادی در هر یک از گونه‌ها بهینه شود. هدف از اجرای این تحقیق، ارائه شیوه‌نامه ریزازدیادی مرزه بختیاری و نیز سازگاری آن برای استفاده در کارهای اصلاحی بود.

می‌باشد. جنس مرزه، دارای حدود ۲۳۵ گونه است ولی براساس تعریف محدود، حدود ۳۰ گونه است که با نام معمول Savory شناخته می‌شود (Jamzad, 2009). این جنس در ایران دارای ۱۵ گونه می‌باشد که از میان آنها ۹ گونه به نام‌های *S. edmondi*، *S. sahendica*، *S. rechingeri*، *S. kallarica*، *S. bachtiarica* و *S. isophylla*، *S. khuzistanica*، *S. intermedia*، *S. atropatana* انحصاری کشور ایران هستند و سایر گونه‌ها علاوه بر ایران در ترکمنستان، ترکیه، قفقاز و عراق نیز می‌رویند. گونه‌های این جنس چندساله و دگرگشن بوده و بیشتر در دامنه‌های کوهستانی مناطق شمال، شمال‌غربی، شمال‌شرقی، مرکزی و جنوب‌غربی ایران پراکندگی داشته و روی صخره‌های آهکی، یا دامنه‌های سنگلاخی رشد می‌کنند (Sefidkon et al., 2005). اسانس موجود در اندام‌های گونه‌های مختلف مرزه عمدتاً تیمول، کارواکرول، گاما-تریپین و پارا-سیمن هستند (Shariat et al., 2017). محل رویش طبیعی مرزه بختیاری (*S. bachtiarica*) در دامنه‌های صخره‌ای ارتفاعات ۱۷۰۰ تا ۳۷۰۰ متری در مناطق کردستان، اصفهان، یزد، کهگیلویه و بویراحمد، چهارمحال و بختیاری، شهرکرد و کرمان است. این گونه در مقایسه با سایر گونه‌ها در ایران دارای پراکندگی جغرافیایی نسبتاً وسیعی است و در استان‌های مرکزی و غربی ایران می‌روید و دارای چند کموتایپ است (Sefidkon et al., 2005). دو کموتایپ غالب، کموتایپ غنی از نظر کارواکرول و پارا-سیمن (متعلق به استان‌های فارس و یزد) و کموتایپ غنی از تیمول و گاما-تریپین (متعلق به استان چهارمحال و بختیاری) (Jamzad, 2009) است. در بررسی اثرهای ضد میکروبی اسانس دو گونه *S. bachtiarica* و *S. khuzistanica* در دو مرحله برداشت، نشان داده شد که اسانس‌های *S. khuzistanica* در هر دو مرحله برداشت (قبل و زمان گلدهی) و اسانس *S. bachtiarica* در مرحله قبل از گلدهی دارای اثرهای ضد میکروبی قابل ملاحظه‌ای بودند. این خواص به دلیل وجود ترکیب‌های فنلی کارواکرول و تیمول در اسانس این گیاهان است و می‌تواند به‌عنوان

## مواد و روش‌ها

### مواد گیاهی مورد نیاز

برای ریزازدیادی مرزه بختیاری، از نهال‌های از پیش کشت شده در گلخانه که بذر آن از مهریز یزد جمع‌آوری شده بود (N ۵۶' ۳۰' ۳۱° و E ۴۵' ۲۱' ۵۴°) ریزنمونه تهیه و به آزمایشگاه کشت بافت، دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس انتقال داده شد. ریزنمونه‌ها قبل از فصل گلدهی از قسمت‌های مختلف یک تک بوته که بیشتر جوان و عاری از آلودگی و بیماری بودند، تهیه گردید.

### ضدعفونی سطحی ریزنمونه‌ها

در شروع کار، نمونه‌های جمع‌آوری شده به قطعات کوچک دارای جوانه تقسیم شد و برگ‌ها و شاخه‌های اضافی آنها حذف گردید، سپس نمونه‌ها با آب زیاد و ۱۰۰ µl مایع ظرف‌شویی شستشو داده شد. پس از شستشو، نمونه‌ها به مدت ۲ ساعت در زیر آب جاری و بعد به مدت ۱۵ min در محلول کربوکسیل تیرام (Carboxyl thiram) ۲٪ (v/v) قرار داده شدند. قارچ‌کش تیرام برای حذف آلودگی‌های قارچی سطح نمونه‌ها استفاده گردید. برای ضدعفونی سطحی ریزنمونه‌ها، از الکل ۷۰٪ (v/v) و هیپوکلریت سدیم ۱/۵٪ (v/v) به مدت ۳ دقیقه در دمای آزمایشگاه (۲۵°C) استفاده شد.

### انتقال ریزنمونه‌ها به محیط کشت

برای کشت ریزنمونه‌ها، از ریزنمونه‌هایی به طول ۰/۵ تا ۱ سانتی‌متر استفاده شد. در این مرحله ریزنمونه‌ها در زیر هود با شرایط استریل به ویال‌های حاوی ۱۵ ml محیط کشت استقرار حاوی محیط پایه MS (Murashige & Skoog, 1962) با هورمون‌های  $0.3 \text{ mg l}^{-1}$  BAP (6-Benzylaminopurine)،  $0.3 \text{ mg l}^{-1}$  2ip (2-isopentenyl-adenine) و  $0.1 \text{ mg l}^{-1}$  IBA (indole-) (Shariat et al., 2018b) منتقل شدند. این تیمار با انجام مجموعه آزمایش‌های

مقدماتی (با تغییر میزان سیتوکینین‌ها) برای بدست آوردن بهترین تیمار استقرار بدست آمد. معمولاً در فاصله ۲۰ تا ۳۰ روز پس از کشت اولیه علائم آلودگی (باکتریایی یا قارچی) در صورت وجود در زیر یا اطراف نمونه‌ها ظاهر می‌گردد. در هر واگشت، شاخه‌ها تفکیک و قسمت‌های نکروزه شده آنها قطع شد. پس از یک ماه ریزنمونه‌های مستقر شده و سالم، از نمونه‌های آلوده یا صدمه‌دیده مجزا و به درون محیط‌های جدید واگشت گردید. در این مرحله استقرار ریزنمونه‌ها در محیط کشت با موفقیت انجام شد.

### روش نگهداری بافت‌های کشت شده

بافت‌های کشت شده در شرایطی مشابه با وضعیت طبیعی و مناسب برای رشد و نمو گیاه قرار گرفتند که عبارت بود از: برنامه دمایی  $15/25 \text{ }^{\circ}\text{C}$  (روز/شب)، دوره نوری  $8/16 \text{ h}$  (روشنایی / تاریکی)، تهویه مناسب اتاق کشت و شدت نور  $8000-10000 \text{ lx}$ . لامپ‌ها با نور آفتابی و مهتابی به صورت یک‌درمیان در اتاقک نصب شده بودند، به طوری که در بین قفسه‌ها نور کافی و مناسب پخش شده و دما یکنواخت بود.

شاخه‌زایی گیاهچه‌های حاصل از جوانه جانبی پایه مادری در این مرحله گیاهچه‌های تولیدشده از جوانه‌های جانبی پایه مادری به محیط‌های شاخه‌زایی با تیمارهای مختلف منتقل شدند. محیط مورد استفاده MS بود. هورمون‌های مورد استفاده در جدول ۱ نشان داده شده است. تیمارها بر روی گیاهچه‌های حاصل از جوانه جانبی پایه مادری در پنج تکرار و در هر تکرار ۵ ریزنمونه در قالب طرح کاملاً تصادفی اعمال و بعد به اتاق رشد با شرایط ذکرشده منتقل شدند. پس از ۲۰ روز آماربرداری بعمل آمد و شاخص‌های نوساقه‌زایی شامل: تعداد شاخه، تعداد جوانه، رشد طولی شاخه و میزان سبزینگی برگ‌ها ثبت شد (میزان سبزینگی بین ۰-۵ کدگذاری شد که صفر نشانگر زردی و پلاسیدگی برگ‌ها و ۵ نمایانگر رنگ سبز تیره برگ‌ها بود).

جدول ۱- تیمارهای مختلف نوساقه‌زایی گیاهچه‌های حاصل از جوانه‌های جانبی پایه مادری مرزه بختیاری

**Table 1. Different shooting treatments for maternal base lateral buds-derived plantlets in *Satureja bachtiarica***

Treatments	Auxin (mg l <sup>-1</sup> )					Cytokinin (mg l <sup>-1</sup> )				
	IBA		BAP			TDZ	Kin	2ip		
	0.01	0.1	0.1	0.3	0.5	0.05	0.2	0.3	0.5	
T1	-	+	-	+	-	-	-	+	-	
T2	+	-	-	-	+	-	-	-	+	
T3	+	-	-	-	+	-	+	-	-	
T4	+	-	-	+	-	-	+	-	-	
T5	+	-	+	-	-	-	+	-	-	
T6	+	-	-	-	-	+	-	+	-	
T7	+	-	-	+	-	+	-	-	-	
T8	+	-	-	+	-	-	-	-	+	
T9	+	-	-	-	+	-	-	+	-	
T10	+	-	-	+	-	-	-	+	-	

+ and -: presence and absence of hormones, respectively.

+ and -: show the presence and absence of hormones, respectively.

هفته پلاستیک‌ها سوراخ شدند. این کار به این دلیل انجام شد که رطوبت اطراف گیاه کمتر شود و گیاه آرام با محیط گلخانه سازگار گردد و بعد از گذشت یک ماه، نهال‌ها به گلدان‌های بزرگ‌تر منتقل گردید.

#### روش تجزیه و تحلیل آماری

برای تجزیه داده‌های حاصل از اثر تیمارهای مختلف شاخه‌زایی و ریشه‌زایی بر صفاتی مانند تعداد شاخه‌ها و ریشه‌های اصلی و فرعی، طول شاخه و ریشه اصلی و فرعی و سبزی‌نگی، ابتدا داده‌ها از لحاظ نرمال بودن با استفاده از نرم‌افزار Minitab 17 مورد آزمون قرار گرفتند. نتایج این آزمون نشان داد که به‌غیر از طول شاخه اصلی بقیه صفات نرمال نبودند، از این رو با استفاده از روش‌های تبدیل داده آزمون شده و از آنجایی که نرمال نشدند، از روش ناپارامتری کروسکال والیس برای تجزیه و تحلیل داده‌ها و رتبه‌بندی آنها استفاده شد (Bairu et al., 2009).

ریشه‌زایی گیاهچه‌های حاصل از مرحله تکثیر شاخه شاخه‌های تولیدشده در مرحله پرآوری به طول ۱/۵ تا ۲ سانتی‌متر برای ارزیابی ریشه‌زایی به محیط القاء ریشه منتقل شدند. تیمارهای استفاده شده در جدول ۲ ارائه شده است (Shariat et al., 2016; Shariat et al., 2018b). هشت تیمار ریشه‌زایی با پنج تکرار که هر تکرار دارای پنج ریزنمونه بود بر روی گیاهچه‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی اعمال شد. بعد از یک ماه نتایج بدست آمده، ثبت و شاخص‌های ریشه‌زایی از جمله درصد ریشه‌زایی، تعداد و طول ریشه اصلی، تعداد ریشه‌های فرعی و وجود و فقدان تارکشنده آمارگیری شد.

#### انتقال و سازگاری در گلخانه و تولید انبوه

گیاهان ریشه‌دار شده از محیط کشت بافت خارج و ریشه‌های آنها شسته و به گلدان‌های کوچک حاوی کوکوپیت استریل شده در گلخانه منتقل شد. برای سازگاری، گیاهان منتقل شده روی گلدان‌ها با پلاستیک پوشانده شد. بعد از یک

جدول ۲- تیمارهای مختلف ریشه‌زایی گیاهچه‌های حاصل از جوانه‌های جانبی پایه مادری مرزه بختیاری

**Table 2. Different rooting treatments for maternal base lateral buds-derived plantlets in *Satureja bachtiarica***

Treatments	Auxin (mg l <sup>-1</sup> )				
	IBA			NAA	
	0.1	0.5	1	0.1	0.5
R1	-	-	+	-	-
R2	-	+	-	+	-
R3	-	+	-	-	+
R4	+	-	-	-	+
R5	-	-	-	-	+
R6	-	-	-	+	-
R7	-	+	-	-	-
R8	+	-	-	-	-

+ and -: presence and absence of hormones, respectively.

## نتایج

اثر تیمارهای مختلف نوساقه‌زایی و ریشه‌زایی بر مرزه بختیاری

اثر تیمارهای نوساقه‌زایی: برای تعیین بهترین تیمار نوساقه‌زایی، تأثیر ۱۰ تیمار مختلف هورمونی بر شاخص‌های رشد و نوساقه‌زایی (تعداد شاخه اصلی و جوانه فعال جانبی، طول شاخه اصلی و فرعی، تعداد برگ و سبزی‌نگی) (جدول ۳) بررسی شد. از میان تنظیم‌کننده‌های رشدی استفاده شده، همان‌طور که در شکل ۱- الف مشاهده می‌شود تیمار T6 که تلفیق IBA (۰/۰۱ mg l<sup>-1</sup>)، TDZ (۰/۰۵ mg l<sup>-1</sup>) و 2iP (mg ۰/۳ l<sup>-1</sup>) بود، به‌طور مؤثری تمام شاخص‌های مورفولوژی بررسی شده را افزایش داد. به‌علاوه از نظر کیفی شاخه‌های تشکیل شده در این محیط نسبت به سایر محیط‌ها قوی‌تر و شاداب‌تر بودند. زمانی که سیتوکینین‌ها در غلظت‌های مختلف BAP و 2iP مورد استفاده قرار گرفتند، نوساقه‌زایی به‌خوبی انجام نشد. در ضمن صفاتی مانند سبزی‌نگی در پایین‌ترین سطح خود قرار داشت. بیشترین شاخص سبزی‌نگی در تیمار T6 بدست آمد. همچنین بالاترین میزان تشکیل جوانه‌های نوپدید نیز مربوط به همین تیمار بود. از نظر تعداد شاخه‌های اصلی، تیمارهای T6 و T7 بالاترین رتبه را به خود اختصاص دادند (جدول ۴).

اثر تیمارهای ریشه‌زایی: اثر هشت تیمار مختلف هورمونی اکسین بر شاخص‌های رشد و ریشه‌زایی (درصد ریشه‌زایی، طول ریشه، تعداد ریشه اصلی و فرعی، تعداد شاخه اصلی و جوانه فعال جانبی، طول شاخه اصلی و فرعی و سبزی‌نگی) مرزه بختیاری در جدول ۳ نشان داده شده است. در این‌گونه از بین تنظیم‌کننده‌های اکسینی استفاده شده، همان‌طور که در شکل ۱- ب مشاهده می‌شود تیمار R3 شامل IBA (۰/۵ mg l<sup>-1</sup>)، NAA (۰/۵ mg l<sup>-1</sup>) به‌طور مؤثری تمام شاخص‌های مورد بررسی را افزایش داد. به‌علاوه از نظر کیفی ریشه‌های تشکیل شده در این محیط نسبت به سایر محیط‌ها قوی‌تر بودند. نکته دیگر آن است که در تیمار مذکور نوساقه‌زایی نیز بسیار مناسب بوده است. در جدول ۳ نتایج تجزیه واریانس اثر تیمارهای هورمونی ریشه‌زایی بر تعدادی از صفات مرزه بختیاری بیانگر آن است که تیمارهای مختلف بر صفات تعداد جوانه فعال جانبی و نیز طول شاخه اصلی اثر معنی‌داری نداشتند ولی بر صفات مختلف ریشه‌زایی از جمله درصد ریشه‌زایی، طول ریشه و تعداد ریشه اصلی و فرعی اثر معنی‌داری داشتند. در جدول ۴ نیز مقایسه میانگین تیمارها از نظر صفات ریشه‌زایی به روش کروسکال والیس نشان داده شده است. بیشترین شاخص سبزی‌نگی با ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشدی تیمار R1، R2 و R4 بدست آمد. پایین‌ترین مقدار شاخص سبزی‌نگی نیز مربوط به تیمار R5 بود. شایان ذکر است که برای تعیین شاخص سبزی‌نگی،

اصلی و فرعی نیز بهترین تیمار، R3 بود. بعد از تعیین بهترین تیمارهای نوساقه‌زایی و ریشه‌زایی، گیاهچه‌ها به تعداد زیاد تکثیر و به گلخانه منتقل شدند (شکل ۲).

برگ‌های کل گیاهچه‌های تولید شده، بررسی شد. از نظر درصد ریشه‌زایی، طول ریشه، تیمار R3 بالاترین مقدار و تیمار R1 کمترین مقدار را به خود اختصاص داد. از نظر تعداد ریشه



شکل ۱- اثر تیمارهای مختلف نوساقه‌زایی (a) و ریشه‌زایی در تیمارهای (b) در مرزه بختیاری  
**Figure 1. Different shooting (a) and rooting (b) treatments effects in *Satureja bachtiarica***  
 T1-T10 t and R1-R8 treatments described in Table 1 and 2, respectively.



شکل ۲- سازگاری کلون مرزه بختیاری در گلخانه  
**Figure 2. *Satureja bachtiarica* clone adaptation under greenhouse conditions**

جدول ۳- تجزیه واریانس اثر تیمارهای هورمونی نوساقه‌زایی (a) و ریشه‌زایی (b) بر مرزه بختیاری با استفاده از آزمون کروسکال والیس

**Table 3. ANOVA of shooting (a) and rooting (b) hormone treatments effects in *Satureja bachtiarica* using Kruskal Wallis test**

Regeneration	Statistical analysis	Rooting percentage	Length of roots (mm)	Number of main roots	Number of lateral roots	Number of main shoots	Number of lateral buds	Length of main Shoots (mm)	Length of ateral shoot: (mm)	Leaf colour	Number of leaves
a	$X^2$	---	---	---	---	36.9**	45.5**	45.7**	---	45.9**	36.9**
	d.f.	---	---	---	---	9	9	9	---	9	9
b	$X^2$	30.1**	3.0**	28.3**	29.6**	26.5**	11.0 <sup>n.s.</sup>	11.2 <sup>ns</sup>	36.0**	28.7**	---
	d.f.	7	7	7	7	7	7	7	7	7	---

n.s. and \*\*: non-significant and significant at 1% probability level, respectively.

جدول ۴- رتبه تیمارها از نظر صفات نوساقه‌زایی (a) و ریشه‌زایی (b) با استفاده از آزمون کروسکال والیس، گروه بندی با استفاده از آزمون ویل کاکسون (حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار آماری می‌باشد).

**Table 4. Treatments ranking in terms of shooting (a) and rooting (b) traits using Kruskal Wallis test, different letters indicate statistically significant differences according to Wilcoxon test.**

Regeneration	Treatments	Rooting percentage	Length of roots (mm)	Number of main roots	Number of lateral roots	Number of main shoots	Number of lateral buds	Length of main shoots (mm)	Length of lateral shoots (mm)	Leaf colour	Number of leaves
<b>a</b>	<b>T1</b>	---	---	---	---	21.7 <sup>c</sup>	15.0 <sup>d</sup>	6.4 <sup>d</sup>	---	19.2 <sup>c</sup>	3.0 <sup>d</sup>
	<b>T2</b>	---	---	---	---	30.4 <sup>b</sup>	16.5 <sup>d</sup>	29.9 <sup>b</sup>	---	25.9 <sup>b</sup>	13.4 <sup>c</sup>
	<b>T3</b>	---	---	---	---	12.7 <sup>d</sup>	9.0 <sup>e</sup>	13.1 <sup>c</sup>	---	6.9 <sup>d</sup>	26.9 <sup>b</sup>
	<b>T4</b>	---	---	---	---	12.7 <sup>d</sup>	3.0 <sup>e</sup>	7.1 <sup>d</sup>	---	10.0 <sup>d</sup>	18.5 <sup>c</sup>
	<b>T5</b>	---	---	---	---	15.8 <sup>d</sup>	34.7 <sup>b</sup>	36.4 <sup>a</sup>	---	32.5 <sup>b</sup>	33.0 <sup>b</sup>
	<b>T6</b>	---	---	---	---	45.9 <sup>a</sup>	47.6 <sup>a</sup>	48.0 <sup>a</sup>	---	48.0 <sup>a</sup>	48.0 <sup>a</sup>
	<b>T7</b>	---	---	---	---	45.1 <sup>a</sup>	28.4 <sup>b</sup>	41.9 <sup>a</sup>	---	41.0 <sup>a</sup>	43.0 <sup>a</sup>
	<b>T8</b>	---	---	---	---	27.6 <sup>b</sup>	33.4 <sup>b</sup>	22.3 <sup>b</sup>	---	38.0 <sup>a</sup>	13.1 <sup>c</sup>
	<b>T9</b>	---	---	---	---	30.4 <sup>b</sup>	25.2 <sup>c</sup>	16.2 <sup>c</sup>	---	26.4 <sup>b</sup>	18.1 <sup>c</sup>
	<b>T10</b>	---	---	---	---	12.7 <sup>d</sup>	42.2 <sup>a</sup>	33.7 <sup>a</sup>	---	7.1 <sup>d</sup>	38.0 <sup>a</sup>
<b>b</b>	<b>R1</b>	76.0	3.5 <sup>d</sup>	3.5 <sup>d</sup>	4.5 <sup>c</sup>	37.6 <sup>a</sup>	10.0 <sup>c</sup>	26.5 <sup>a</sup>	38.0 <sup>a</sup>	29.0 <sup>a</sup>	---
	<b>R2</b>	84.0	31.2 <sup>a</sup>	27.4 <sup>a</sup>	23.9 <sup>b</sup>	20.1 <sup>b</sup>	20.1 <sup>b</sup>	27.8 <sup>a</sup>	18.2 <sup>c</sup>	29.0 <sup>a</sup>	---
	<b>R3</b>	92.0	36.2 <sup>a</sup>	37.0 <sup>a</sup>	38.0 <sup>a</sup>	30.7 <sup>a</sup>	29.8 <sup>a</sup>	27.8 <sup>a</sup>	28.0 <sup>b</sup>	29.0 <sup>a</sup>	---
	<b>R4</b>	88.0	31.6 <sup>a</sup>	21.7 <sup>b</sup>	23.8 <sup>b</sup>	24.1 <sup>b</sup>	23.9 <sup>a</sup>	19.3 <sup>b</sup>	26.3 <sup>b</sup>	18.2 <sup>b</sup>	---
	<b>R5</b>	84.0	21.5 <sup>b</sup>	15.3 <sup>c</sup>	23.6 <sup>b</sup>	17.6 <sup>b</sup>	21.2 <sup>b</sup>	17.0 <sup>b</sup>	9.2 <sup>c</sup>	29.0 <sup>a</sup>	---
	<b>R6</b>	88.0	17.0 <sup>b</sup>	27.7 <sup>a</sup>	21.0 <sup>b</sup>	8.7 <sup>c</sup>	21.4 <sup>b</sup>	21.6 <sup>b</sup>	29.5 <sup>b</sup>	6.8 <sup>c</sup>	---
	<b>R7</b>	84.0	15.3 <sup>c</sup>	19.1 <sup>b</sup>	22.5 <sup>b</sup>	8.4 <sup>c</sup>	24.5 <sup>a</sup>	12.2 <sup>c</sup>	10.2 <sup>c</sup>	14.2 <sup>b</sup>	---
	<b>R8</b>	80.0	7.7 <sup>d</sup>	12.3 <sup>c</sup>	6.7 <sup>c</sup>	16.8 <sup>b</sup>	13.1 <sup>c</sup>	11.8 <sup>c</sup>	4.6 <sup>d</sup>	8.8 <sup>c</sup>	---

## بحث

Sarihan et al., ) *Origanum vulgare* var. *hirtum* 2003). همچنین در گیاه *Lavandula stoechas* غلظت ( $1 \text{ mg l}^{-1}$ ) NAA منجر به ۱۰۰٪ ریشه‌زایی در محیط کشت پایه شد (Nobre, 1996). بهترین محیط ریشه‌زایی برای *Salvia guaranitica* Benth نیز غلظت ( $2/85 \mu\text{M}$ ) IAA در محیط کشت MS بود (Echeverrigaray et al., 2010). در گونه *Satureja obovata* مرزه، بهترین ریشه‌زایی زمانی حاصل شد که نوشاخه‌ها به مدت سه روز در معرض محیط MS حاوی ( $4/92 \mu\text{M}$ ) IBA قرار گرفتند و بعد به محیط کشت بدون هورمون انتقال داده شدند. در این روش ۹۵٪ نوشاخه‌ها ریشه‌دار شدند (Arrebola et al., 1997).

مقایسه نتایج نوساقه‌زایی و ریشه‌زایی در این تحقیق بیانگر آن است که مرزه بختیاری گونه‌ای حساس محسوب می‌گردد، زیرا فقط در یک ترکیب هورمونی خاص توانسته بازدهی مناسب داشته باشد. موفقیت گونه‌ها در ریزازدیادی به عوامل مختلفی مانند گونه، ژنوتیپ، نوع ریزنمونه، زمان جمع‌آوری نمونه، ترکیب محیط کشت و میزان تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بستگی دارد (Ramak et al., 2011). از آنجایی که ریزنمونه‌های کشت بافتی، از گلدان‌هایی با شرایط سنی مشابه در گلخانه تهیه شده بودند، در نتیجه می‌توان این گونه فرض کرد که بیشتر شرایط در میان گونه‌ها، کاملاً یکسان بوده ولی تفاوت در پاسخ به تیمارهای مختلف هورمونی مربوط به نوع گونه می‌باشد. از آنجایی که اندازه ژنوم گونه S5 تقریباً دو برابر سایر گونه‌ها بوده و در ضمن تعداد کروموزوم‌های آن نیز دو برابر می‌باشد، به نظر می‌رسد که عامل موفقیت این گونه، سطح پلوئیدی بالاتر آن است. بنابراین، می‌توان این گونه فرض کرد که در این تحقیق افزایش سطح پلوئیدی باعث سازگاری بیشتر با شرایط درون شیشه‌ای و هورمون‌های مختلف شده است. مقدار اسانس مرزه گونه *Satureja obovata* که از طریق ریزازدیادی تکثیر شده بود، مشابه با گیاهان رشد کرده در مزرعه گزارش شد (Arrebola et al., 1997)، البته زمانی

نتایج حاصل از مقایسه ۱۰ تیمار نوساقه‌زایی بیانگر آن بود که ترکیب هورمونی ( $0/01 \text{ mg l}^{-1}$ ) IBA، ( $0/05 \text{ mg l}^{-1}$ ) TDZ و ( $0/3 \text{ mg l}^{-1}$ ) 2iP بهترین نتیجه را دربر داشته است. تاکنون استفاده از ترکیب اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها در جنس مرزه برای افزایش نوساقه‌زایی و رشد در شرایط درون شیشه‌ای در چندین گزارش ارائه شده است (Ramak et al., 2011; Shariat et al., 2016; Shariat et al., 2018 a,b). در تعدادی از گزارش‌ها از غلظت‌های بالای سیتوکینین‌ها برای افزایش نوساقه‌زایی در تیره Laminaceae استفاده شده است. در تحقیقی که در گونه *Satureja khuzestanica* انجام شد، بهترین تیمار نوساقه‌زایی ترکیب هورمونی ( $5 \mu\text{M}$ ) BAP و ( $2 \mu\text{M}$ ) IBA معرفی شد (Ramak et al., 2011)، در حالی که در تحقیق دیگری ترکیب هورمونی ( $0/1$ ) IBA، ( $0/3$ ) BAP و ( $0/2$ ) Kin در همین گونه معرفی گردید (Shariat & Sefidkon, 2021). همان‌طور که ذکر شد در این تحقیق بالاترین نوساقه‌زایی در تیمار هورمونی ( $0/1 \text{ mg l}^{-1}$ ) IBA، ( $0/3 \text{ mg l}^{-1}$ ) BAP و ( $0/2 \text{ mg l}^{-1}$ ) Kin حاصل گردید. در صورتی که واحد  $\mu\text{M}$  را به  $\text{mg l}^{-1}$  تبدیل نمایم، مقدار هورمون استفاده شده در تحقیق Ramak و همکاران (۲۰۱۱) برابر ( $1/26 \text{ mg l}^{-1}$ ) BAP و ( $0/4 \text{ mg l}^{-1}$ ) IBA می‌باشد که این مقدار بسیار بالاتر از مقدار هورمون توصیه‌شده در این تحقیق است. در تحقیق دیگری که بر روی مرزه *Satureja obovata* انجام شد، بهترین تیمار نوساقه‌زایی ( $2/22 \mu\text{M}$ ) BAP نشان داده شد (Arrebola et al., 1997).

مقایسه هشت تیمار ریشه‌زایی نیز حکایت از آن دارد که تیمار هورمونی ( $0/5 \text{ mg l}^{-1}$ ) IBA و ( $0/5 \text{ mg l}^{-1}$ ) NAA بهترین تیمار ریشه‌زایی بوده است. تعداد زیادی گزارش مبنی بر اثر مثبت IBA بر ریشه‌زایی گیاهان دارویی وجود دارد از جمله: *Origanum vulgare* L.، *Mentha piperita* L. و *Melissa officinalis* L. (Kuris et al., 1980) و



- Rooting and initial establishment of stem cuttings of oregano, peppermint and balm. *Scientia Horticulturae*, 13(1): 53-59.
- Nobre, J., 1996. In vitro cloning and micropropagation of *Lavandula Stoechas* from field-grown plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 46(2): 151-155.
  - Ramak, P., Sharifi, M., Kazempour Osaloo, S., Ebrahimzadeh, H. and Behmanesh, M., 2011. Studies on seed germination and in vitro shoot multiplication of *Satureja khuzistanica* Jamzad, an important medicinal plant. *African Journal of Biotechnology*, 10(83): 19407-19414.
  - Sarihan, E.O., Ipek, A. and Arslan, N., 2003. The effect of indole butyric acid (IBA) on rooting of cuttings from oregano (*Origanum vulgare* var. *hirtum*). *Field Crops Congress of Turkey*, Diyarbakır: 367-372.
  - Sefidkon, F., Jamzad, Z. and Barazandeh, M.M., 2005. Essential oil of *Satureja bachtiarica* Bunge, a potential source of carvacrol. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 20(4): 425-439.
  - Sefidkon, F., Sadeghzadeh, L., Teimouri, M., Asgari, F. and Ahmadi, S.H., 2007. Antimicrobial effects of the essential oils of two *Satureja* species (*S. khuzistanica* Jamzad and *S. bachtiarica* Bunge) in two harvesting time. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 23(2): 174-181.
  - Shariat, A. and Sefidkon, F., 2020. Investigation of pollination system and self-incompatibility in two species of *Satureja sahendica* and *S. bachtiarica*. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 27(2): 204-215.
  - Shariat, A. and Sefidkon, F., 2021. Tetraploid induction in savory (*Satureja khuzistanica*): cytological, morphological, phytochemical and physiological changes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 146: 137-148.
  - Shariat, A., Karimzadeh, G. and Assareh, M.H., 2013. Karyology of Iranian endemic *Satureja* (Lamiaceae) species. *Cytologia*, 78(3): 305-312.
  - Shariat, A., Karimzadeh, G., Assareh, M.H. and Esfahan, E.Z., 2016. Drought stress in Iranian endemic savory (*Satureja rechingeri*): in vivo and in vitro studies. *Plant Physiology and Breeding*, 6(1): 1-13.
  - Shariat, A., Karimzadeh, G., Assareh, M.H. and Hadian, J., 2017. Variations of physiological indices and metabolite profiling in *Satureja khuzistanica* in response of drought stress. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 25(2): 174-192.
  - Shariat, A., Karimzadeh, G., Assareh, M.H. and Hadian, J., 2018a. A promising application of drought stress for increasing product quality of Iranian endemic *Satureja sahendica* Bornm,
- که از جیبرلیک اسید (GA3) در محیط کشت استفاده گردید، تنوع قابل ملاحظه‌ای در مقدار اسانس گیاهان تکثیرشده در مقایسه با پایه مادری مشاهده شد. یادآوری می‌شود که تیمار جیبرلیک اسید در بعضی از گونه‌ها برای القای فرایند جوانی استفاده می‌گردد (Zimmerman *et al.*, 1985).
- به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی می‌توان گفت که در این تحقیق اهمیت گیاه بومی مرزه بختیاری از نظر دارویی، صنعتی و اقتصادی و لزوم اهلی‌سازی و قرار دادن این گیاه در برنامه‌های اصلاحی، باعث شد تا تکثیر آن از طریق کشت بافت برای تولید کلون امری ضروری به‌نظر آید. با توجه به نتایج این پژوهش، ریزازدیادی مرزه بختیاری با استفاده از تیمار هورمونی 2ip با غلظت  $0.3 \text{ mg l}^{-1}$  به‌همراه TDZ ( $0.05 \text{ mg l}^{-1}$ ) و IBA ( $0.1 \text{ mg l}^{-1}$ ) به‌عنوان بهترین تیمار در پرآوری ریزنمونه‌ها معرفی گردید و برای القای ریشه (تعداد و طول ریشه) در ریزنمونه‌ها تیمار IBA با غلظت  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  به همراه NAA با غلظت  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  به عنوان مناسب‌ترین ترکیب هورمونی در نظر گرفته شد. همچنین نتایج سازگاری نمونه‌ها نیز نشان داد که ۸۰٪ گیاهچه‌های کشت بافتی در مدت ۴ هفته در این مرحله سازگار شدند. از شیوه‌نامه ارائه شده برای تولید انبوه این گیاه استفاده شد.
- ### References
- Arrebola, M.L., Socorro, O., Barcelo-Munoz, A., Simon-Perez, E. and Plielgo-Alfaro, F., 1997. Micropropagation of *Satureja obovata* Lag. *HortScience*, 32(7): 1278-1280.
  - Bairu, M.W., Kulkarni, M.G., Street, R., Mulaudzi, B. and Van Staden, J., 2009. Studies on seed germination, seedling growth, and *in vitro* shoot induction of *Aloe ferox* Mill., a commercially important species. *HortScience*, 44(3): 751-756.
  - Echeverrigaray, S., Carrer, R.P. and Andrade, L.B., 2010. Micropropagation of *Salvia guaranitica* Benth. through axillary shoot proliferation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53: 883-888.
  - Jamzad, Z., 2009. *Thymus* and *Satureja* species of Iran. Research Institute of Forest and Rangelands publication, 171p.
  - Kuris, A., Atlaman, A. and Putievsky, E., 1980.

- Loureiro, J., 2018c. Relationships between genome size, ecological and morphological traits in five *satureja* (Lamiaceae) species. Iranian Journal of Botany, 24(2): 163-173.
- Zimmerman, R.H., Hackett, W.P. and Pharis, R.P., 1985. Hormonal aspects of phase change and precocious flowering. Encyclopedia of Plant Physiology, 11: 79-115.
- medicinal plant. Iranian Journal of Field Crop Science, 49(1): 167-177.
- Shariat, A., Karimzadeh, G., Assareh, M.H. and Hadian, J., 2018b. Metabolite profiling and molecular responses in a drought-tolerant savory, *Satureja rechingeri* exposed to water deficit. 3 Biotech, 8(11): 477.
- Shariat, A., Karimzadeh, G., Assareh, M.H. and

## ***Satureja bachtiarica* micropropagation through somatic tissues: mass propagation and adaptation**

**M. Ahmadi Roshan<sup>1</sup>, G. Karimzadeh<sup>2\*</sup> and S. Rashidi Monfared<sup>3</sup>**

1- Ph.D. student, Department Plant Genetics and Breeding, College of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2\*- Corresponding author, Department of Plant Genetics and Breeding, College of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran, E-mail: karimzadeh\_g@modares.ac.ir

3- Department of Agricultural Biotechnology, College of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Received: June 2022

Revised: August 2022

Accepted: August 2022

### **Abstract**

*Satureja bachtiarica* Bunge is one of the endemic *Satureja* species in Iran, which has strong antioxidant and antimicrobial properties as well as economic and medicinal value due to the presence of compounds like carvacrol and thymol in the essential oil and rosmarinic acid and other phenolic acids in the extract. In this study, 10 shooting and 8 rooting treatments were used in MS medium to produce clones of this species using micropropagation method. The shooting treatments were a combination of cytokinins (Kin, 2ip, and TDZ) and auxins (IBA and BA) with different concentrations. The rooting treatments were also a combination of different concentrations of auxins (IBA and NAA). The best shooting treatment [IBA (0.01 mg l<sup>-1</sup>), TDZ (0.05 mg l<sup>-1</sup>), and 2ip (0.3 mg l<sup>-1</sup>)] was recognized by examining traits such as number and length of main and secondary shoots, number of leaves, number of lateral active buds, and leaf colour. Number of main and lateral roots were also criteria for the best rooting treatment [IBA (0.5 mg l<sup>-1</sup>) and NAA (0.5 mg l<sup>-1</sup>)] selection. Since *S. bachtiarica* is an allogamous plant and has a high diversity for different traits like metabolites, practical purpose of the present study was mass production of identical individuals for use in breeding programs. This purpose was done by presenting the micropropagation protocol of this valuable plant.

**Keywords:** Auxin, cross pollination, micropropagation, cytokinin, native plant, *Satureja bachtiarica* Bunge.