دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijrfpbgr.2018.109250.1235
جلد ۲۶، شماره ۱، صفحه ۶۲-۵۳ (۱۳۹۷)

عوامل مؤثر بر ریزازدیادی گیاه دارویی مرزه خوزستانی (*Satureja khuzistanica* Jamzad)

لیلا میرجانی[۱]، اعظم سلیمی[۲*]، محمد متینی‌زاده[۳]، خدیجه رضوی[۴] و مریم شهبازی[۵]

۱- دانشجوی دکتری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران

۲- نویسنده مسئول مکاتبات، دانشیار، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران. پست الکترونیک: salimi@khu.ac.ir

۳- دانشیار، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران

۴- استادیار، پژوهشکده زیست فناوری کشاورزی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران

۵- استادیار، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۰۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۱/۲۸

چکیده

مرزه خوزستانی (*Satureja khuzistanica* Jamzad) انحصاری ایران است و با وجود ارزش دارویی فراوان در حال انقراض می‌باشد. به‌منظور تکثیر انبوه آن از طریق ریزازدیادی، جوانه‌های جانبی از منطقه پل‌دختر استان لرستان جمع‌آوری شد. برای سترون‌سازی جداکشت‌ها بهترین تیمار محلول کلرید جیوه یک درصد به‌مدت ۶ دقیقه تعیین شد. بهترین محیط نوشاخه‌زایی پس از بررسی ۱۲ تیمار مختلف، محیط کشت پایه MS حاوی هورمون‌های BA، 2ip و IBA به‌ترتیب ۰/۵، ۰/۳ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر تعیین شد، که از لحاظ ضریب ازدیاد، رشد طولی و سبزینگی نسبت به بقیه تیمارها برتری داشت. محیط کشت پایه MS با هورمون‌های IBA و NAA به‌ترتیب ۱ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر به‌عنوان بهترین محیط نوریشه‌زایی پس از انجام سه تیمار با ترکیب‌های هورمونی متفاوت به‌دست آمد، این محیط کشت محرک تولید بیشترین تعداد ریشه اصلی و فرعی بود. تأثیر ۱۰ ترکیب مختلف خاک بر درصد زنده‌مانی در زمان سازگاری مورد بررسی قرار گرفت و تیمار ماسه: خاک مزرعه: پیت: پرلیت به‌نسبت ۱:۱:۱:۱ بیشترین درصد زنده‌مانی و رشد را داشت. بنابراین در طی این تحقیق مناسب‌ترین روش تکثیر برای گونه مرزه خوزستانی به‌دست آمد و می‌توان گیاهان تکثیر شده را به رویشگاه اصلی منتقل نمود.

واژه‌های کلیدی: تکثیر درون شیشه‌ای، تنظیم‌کننده‌های رشد، ریزازدیادی، مرزه خوزستانی

مقدمه

مرزه خوزستانی (*Satureja khuzistanica* Jamzad) متعلق به جنس مرزه (*Satureja*) و خانواده نعنا (Lamiaceae) می‌باشد. مرزه خوزستانی گونه انحصاری ایران است که محل رویشگاه طبیعی آن در استان لرستان، اندیمشک به پل‌دختر، روستای پالان و در استان خوزستان، ۷۲ کیلومتر از اندیمشک به خرم‌آباد، ۵ کیلومتر بعد از پل تنگ و در کوهپایه‌ها و روی شکاف صخره‌های آهکی پراکنش دارد (Jamzad, 2011).

در نمونه‌های کاشته شده گونه مرزه خوزستانی حدود ۸۰ درصد و در نمونه‌های وحشی تا ۹۳ درصد کارواکرول مشاهده شده است. حضور میزان بالای کارواکرول باعث خواص دارویی با ارزش، مانند تأثیر اسانس آن بر روی درمان بیماری RAS (بیماریهای مخاطی دهان)

(Amanlou *et al*., 2007)، ضدباکتریایی (Motaharinia *et al*., 2012) ، ضد قارچی(Sadeghi-Nejad *et al*., 2010)، ضد انگلی (Zibaei *et al*., 2012)، آنتی اکسیدانی (Ahmadvand *et al*., 2012)، ضد دیابت (Kaeidi *et al*., 2013)، ضد التهاب ,(Shahab *et al*., 2011) و ضد انعقادی (Nazari *et al*., 2005) در این گونه شده است.

با توجه به خطر رو به انقراض بودن، تکثیر غیرجنسی پایه‌های سالم این گونه از طریق کشت بافت می‌تواند منجر به حفاظت از این منابع ژنتیکی با ارزش شود. به‌طورکلی بررسی‌های مربوط به کشت بافت این گونه محدود می‌باشد. در پژوهشی Teshome و Soromessa (۲۰۱۵) گزارش کردند، بهترین محیط کشت برای نوشاخه‌زایی گونه *Satureja abyssinica* محیط کشت پایه MS حاوی ۱/۵ mg/l BAP می‌باشد. بیشترین تعداد شاخه ۲۰/۵۳ (محیط پایه MS حاوی ۱/۲۵ mg/l KIN)، بیشترین طول شاخه ۳/۴۱ (محیط پایه MS حاوی mg/l ۰/۵BAP) و بیشترین تعداد ریشه ۲۵ (در محیط پایه MS ۱/۲ حاوی ۲ mg/l IBA) گزارش شده است. در پژوهش دیگری Arrebola و همکاران (۱۹۹۷) موفق به ریزازدیادی گونه *Satureja obovata* بر روی محیط نوشاخه‌زایی MS حاوی ۲/۲۲ ماکرومول BAP و نوریشه‌زایی در محیط MS حاوی ۴/۹۲ میکرومول IBA شدند. بهترین محیط برای نوشاخه‌زایی گیاه *Satureja avromanica* محیط کشت پایه MS حاوی ۲ mg/l BA و ۲ mg/l TDZ و برای نوریشه‌زایی محیط کشت پایه WPMحاوی ۰/۱ mg/l IBA به‌دست آمده است (Mozafari *et al*., 2015).

استفاده فراوان مردم بومی از مرزه خوزستانی به‌دلیل ارزش دارویی بسیار زیاد آن و آفت‌های ازبین برنده بذر آن، این گیاه را با خطر انقراض جدی روبرو کرده است (Jalili and Jamzad, 1999). بنابراین لزوم توجه به کشت انبوه ژنوتیپ‌های برتر این گونه از طریق ریزازدیادی اهمیت ویژه پیدا می‌کند.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: گیاه مرزه خوزستانی از منطقه پل‌دختر لرستان در اوایل فصل پاییز جمع‌آوری شد.

سترون‌سازی: پس از انتقال شاخه‌های حاوی جوانه‌های انتهایی و جانبی به آزمایشگاه به‌ترتیب زیر سترون‌سازی شد:

الف- شستشو و برس‌کشی با مایع ظرفشویی، ب- قرار دادن در زیر آب جاری به‌مدت دو ساعت، ج- استفاده از محلول کلرید جیوه ۰/۱ درصد برای سترون‌سازی جوانه‌ها (جداکشت مورد نظر). در زمان‌های مختلف ۴ و ۶ دقیقه، برای حذف این محلول در هر مرحله، جوانه‌ها ۳ بار با آب مقطر سترون شده، شستشو شدند.

نوشاخه‌زایی: ریزنمونه‌ها معمولاً حاوی یک یا دو جوانه و به ابعاد ۱ تا ۱/۵ سانتی‌متر بودند. نمونه‌های استریل شده در محیط‌های کشت DKW (Driver and Kuniyuki, 1984) و MS (Murashige and Skoog, 1962) و WPM (Lloyd and McCown, 1981) با ترکیب‌های مختلف هورمونی (جدول ۱) کشت شد.

پس از استقرار و رشد جوانه‌ها در هر ماه بازکشت انجام شد. پس از کامل شدن نوشاخه‌زایی صفات ضریب ازدیاد (تعداد شاخه در هر تکرار)، رشد طولی شاخه‌ها و سبزینگی اندازه‌گیری شد (Naraghi *et al*., 2013). قابل ذکر است که در مورد شاخص سبزینگی که صفتی کیفی است تبدیل آن به کمی به این ترتیب انجام شد که از عدد ۵ تا ۱ (رنگ سبز تیره تا زرد) استفاده شد.

جدول ۱- تیمارهای محیط پایه و ترکیب‌های هورمونی به‌کار گرفته شده در مرحله نوشاخه‌زایی

ردیف	محیط کشت پایه	تیمار ترکیب‌های هورمونی برای نوشاخه‌زایی
۱	MS	۰/۶ mg/l BAP
۲	MS	۰/۶ mg/l 2iP
۳	MS	۰/۳ mg/l BAP + ۰/۳ mg/l 2iP
۴	MS	۰/۵mg/l BAP + ۰/۳ mg/l 2iP + ۰/۱ mg/l IBA
۵	DKW	۰/۶ mg/l BAP
۶	DKW	۰/۶ mg/l 2iP
۷	DKW	۰/۳ mg/l BAP + ۰/۳ mg/l 2iP
۸	DKW	۰/۵mg/l BAP + ۰/۳ mg/l 2iP + ۰/۱ mg/l IBA
۹	WPM	۰/۶ mg/l BAP
۱۰	WPM	۰/۶ mg/l 2iP
۱۱	WPM	۰/۳ mg/l BAP + ۰/۳ mg/l 2iP
۱۲	WPM	۰/۵mg/l BAP + ۰/۳ mg/l 2iP + ۰/۱ mg/l IBA

نوریشه‌زایی: پس از اینکه بهترین محیط کشت برای نوشاخه‌زایی به‌دست آمد، نمونه برای نوریشه‌زایی در محیط پایه MS حاوی ترکیب‌های مختلف هورمونی کشت شد (جدول ۲). پس از نوریشه‌زایی تعداد ریشه اصلی، طول ریشه اصلی و تعداد ریشه فرعی اندازه‌گیری شد. تعداد تکرارها در هر تیمار ۲۵ عدد (۵ شیشه و در هر کدام ۵ نمونه) بود.

جدول ۲- تیمارهای ترکیب‌های هورمونی به‌کار گرفته شده در مرحله نوریشه‌زایی

ردیف	ترکیب‌های هورمونی برای نوریشه‌زایی
۱	۰/۵ mg/l NAA + ۱ mg/l IBA
۲	۰/۱ mg/l NAA + ۱ mg/l IBA
۳	۱ mg/l IBA

پس از ریزازدیادی گونه مورد نظر در زمان انتقال به گلخانه، به‌منظور پیدا کردن بهترین ترکیب خاک از لحاظ تأثیر آن بر روی زنده‌مانی و سازگاری گیاهچه کشت بافتی، از ده نوع ترکیب مختلف خاک شامل: ۱- (پیت: خاک مزرعه: ماسه ۲:۱:۱)، ۲- (خاک مزرعه: ورمیکولیت ۲:۱)، ۳- (خاک مزرعه: ماسه ۳:۱)، ۴- (خاک مزرعه: ماسه ۱:۱)، ۵- (خاک مزرعه: ماسه ۵:۱)، ۶- (پیت: پرلیت ۷:۱)، ۷- (پیت: پرلیت ۱:۱)، ۸- (پیت: پرلیت ۱:۲)، ۹- (ورمیکولیت: ماسه: پیت ۱:۱:۱) و ۱۰- (ماسه: خاک مزرعه: پیت: پرلیت ۱:۱:۱:۲) استفاده شد. برای هر تیمار خاکی ۵ تکرار گذاشته شد.

تجزیه‌وتحلیل آماری

تعداد تکرارها در شرایط درون شیشه‌ای هر تیمار ۲۵ عدد (۵ شیشه و در هریک ۵ نمونه) بود. داده‌ها پس از نرمال‌سازی، در قالب مدل آماری فاکتوریل بر پایه طرح کاملا تصادفی توسط نرم‌افزار SAS مورد بررسی و آنالیز قرار گرفت.

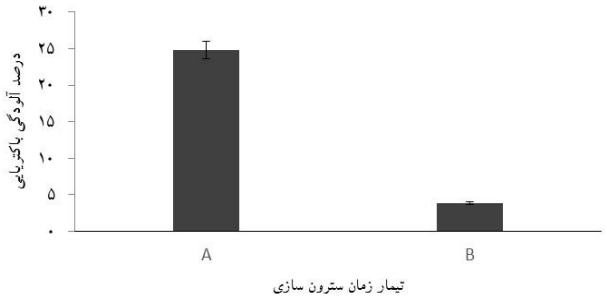
نتایج

پس از تجزیه واریانس یک‌طرفه داده‌ها، بهترین روش برای سترون‌سازی جوانه‌های مرزه خوزستانی پس از شستشو با مایع ظرفشویی، دو ساعت قرار گرفتن در زیر آب جاری و استفاده از محلول کلرید جیوه ۰/۱ درصد به‌مدت ۶ دقیقه تعیین شد. چون در این تیمار آلودگی قارچی دیده نشد و ۱۵ درصد آلودگی باکتریایی در این تیمار کمتر بود (جدول ۳ و شکل ۱).

جدول ۳- بررسی تأثیر زمان‌های مختلف استریل بر میزان استقرار جوانه‌های مرزه خوزستانی

منابع تغییر	D.F.	زمان استفاده از محلول کلرید جیوه
تیمار	۱	۶۶۱/۲۹**
خطا	۴	۲۶/۸۳
CV		۳۶/۱۹

**: معنی‌دار در سطح ۰/۰۱



شکل ۱- تأثیر زمان استفاده از کلرید جیوه ۰/۱ درصد بر میزان درصد آلودگی باکتریایی (**A**: ۴ دقیقه، **B**: ۶ دقیقه)

نتایج تجزیه واریانس داده‌های مربوط به نوشاخه‌زایی نشان داد که تفاوت معنی‌داری (P< ۰/۰۱) از لحاظ ضریب ازدیاد شاخه و سبزینگی بین محیط‌های پایه مختلف وجود دارد. گرچه محیط پایه‌های مختلف تأثیری بر میزان طول شاخه نداشت. اما تغییر در ترکیب‌های هورمونی مختلف نیز تفاوت معنی‌داری (P< ۰/۰۵) نشان نداد. همچنین اختلاف معنی‌داری (P< ۰/۰۵) در اثر متقابل بین آنها دیده نشد.

جدول ۴- نتایج تجزیه واریانس اثر محیط‌های پایه و ترکیب‌های هورمونی مختلف بر روی نوشاخه‌زایی

منابع تغییر	ضریب ازدیاد	رشد طولی	سبزینگی
محیط پایه (**A**)	۱۰/۷۵**	۰/۵۱ ns	۱۳/۴۸**
ترکیب هورمونی (**B**)	۰/۴۳ ns	۰/۳۶ ns	۰/۹۶ns
A*B	۰/۵۲ ns	۱/۶ns	۰/۷۸ ns
خطا	۰/۵۲	۰/۹۴	۰/۵۲
cv	۵۵/۸۲	۴۱/۳۵	۱۷/۴۳

**: معنی‌دار در سطح ۰/۰۱، *: معنی‌دار در سطح ۰/۰۵، ns: غیر معنی‌دار

جدول ۵- مقایسه میانگین اثر محیط پایه‌های مختلف بر نوشاخه‌زایی

تیمار	سبزینگی	رشد طولی	ضریب ازدیاد
محیط پایهWPM	۴/۴۳ a	۲/۱۸ a	۱/۴۳ b
محیط پایه DKW	۳/۲۳ b	۲/۳۵ a	۰/۵ c
محیط پایه MS	۴/۷۹ a	۲/۵۰ a	۱/۹۵ a

جدول ۶- مقایسه میانگین اثر ترکیب‌های هورمونی مختلف بر نوشاخه‌زایی

تیمار	سبزینگی	رشد طولی	ضریب ازدیاد
۰/۶ mg/l BAP	۴/۰۴ a	۲/۳۷a	۱/۳۵ a
۰/۳mg/l BAP+ ۰/۳ mg/l 2iP	۴/۳۶ a	۲/۲۹ a	۱/۲۹ a
۰/۶ mg/l 2iP	۴/۳۶ a	۲/۵۴ a	۱/۰۹ a
۰/۵mg/l BAP+ ۰/۳ mg/l 2iP +۰/۱ mg/l IBA	۳/۸۴ a	۲/۱۷a	۱/۴۹ a

از لحاظ تعداد و طول ریشه اصلی اختلاف معنی‌داری (P< ۰/۰۵) بین ترکیب‌های هورمونی مختلف مورد استفاده مشاهده شد (جدول ۷). مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بهترین محیط با توجه به تعداد ریشه اصلی و فرعی ترکیب هورمونی ۱ mg/l IBA+۰/۱ mg/l NAA می‌باشد (جدول ۸ و شکل ۳).

نتایج حاصل از داده‌های مربوط به تأثیر ترکیب خاک بر زنده‌مانی و رشد گیاهچه‌ها تفاوت معنی‌داری بین تیمارها (P< ۰/۰۱) نشان داد (جدول ۹). همچنین مقایسه میانگین‌ها به‌روش دانکن نشان داد که تیمار ماسه: خاک مزرعه: پیت: پرلیت به‌نسبت ۱:۱:۱:۱ بیشترین درصد زنده‌مانی و رشد را داشت (شکل ۲).

جدول ۷- نتایج تجزیه واریانس اثر محیط‌های پایه و ترکیبات هورمونی مختلف بر روی نو ریشه‌زایی

منابع تغییر	Df	طول ریشه اصلی	تعداد ریشه اصلی	تعداد ریشه فرعی
تیمار ترکیب هورمونی	۲	۴۷/۹۴*	۱۸/۸۶ns	۳/۱*
خطا	۱۲	۷/۹۸	۸/۳	۰/۶۷
cv		۴۷/۲	۳۲/۵۵	۳۴/۲

*: معنی‌دار در سطح ۰/۰۵، ns: غیر معنی‌دار

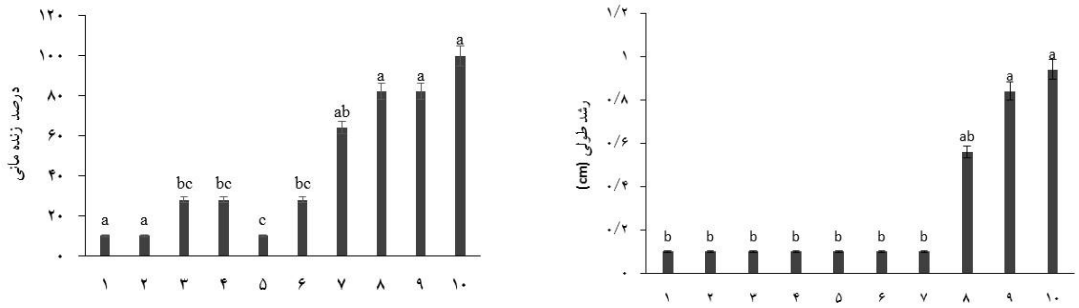
جدول ۸- مقایسه میانگین‌های عوامل رشد نو ریشه‌زایی تحت تأثیر محیط پایه کشت

تیمار	تعداد ریشه اصلی	طول ریشه اصلی	تعداد ریشه فرعی
۰/۵ mg/l NAA + ۱ mg/l IBA	۲/۲ ab	۳/۴۹ b	۷/۲ a
۰/۱ mg/l NAA + ۱ mg/l IBA	۳/۲۶ a	۴/۹۸ b	۱۱ a
۱ mg/l IBA	۱/۷۲b	۹/۴۴a	۸/۴ a

جدول ۹- تجزیه واریانس صفات مطالعه شده در زمان استقرار گیاهچه کشت بافتی تحت تأثیر ترکیبات مختلف خاکی

منابع تغییرات	DF	درصد زنده‌مانی	رشد طولی
تیمار	۹	۰/۵۹**	۰/۵۸**
تکرار	۴	۰/۰۱۶ns	۰/۴۵ns
خطا	۳۶	۰/۱۱	۰/۱۴

**: معنی‌دار در سطح ۰/۰۱، ns: غیر معنی‌دار



شکل ۲- مقایسه میانگین درصد زنده‌مانی و رشد طولی گیاهچه‌های کشت بافتی در زمان سازگاری تحت تأثیر ترکیبات مختف خاک.
۱- (پیت: خاک مزرعه: ماسه ۲:۱:۱)، ۲- (خاک مزرعه: ورمیکولیت ۲:۱)، ۳- (خاک مزرعه: ماسه ۳:۱)، ۴- (خاک مزرعه: ماسه ۱:۱)، ۵- (خاک مزرعه: ماسه ۵:۱)، ۶- (پیت: پرلیت ۷:۱)، ۷- (پیت: پرلیت ۱:۱)، ۸- (پیت: پرلیت ۱:۲)، ۹- (ورمیکولیت: ماسه: پیت ۱:۱:۱) و ۱۰- (ماسه: خاک مزرعه: پیت: پرلیت ۱:۱:۲)

شکل ۳- مراحل مختلف ریزازدیادی ***Satureja khuzistanica***. الف- جمع‌آوری از رویشگاه پل‌دختر لرستان، ب- رشد جوانه در مرحله استقرار، ج- نوشاخه‌زایی در محیط بهینه (**MS+ ۰/۳ mg/l 2iP +۰/۵mg/l BAP+۰/۱mg/l IBA**)، د- نوریشه‌زایی در محیط بهینه (**MS+۱ mg/l IBA+۰/۱ mg/l NAA**)، ه- گیاهان سازگار شده در گلخانه

بحث

در این تحقیق از ریزنمونه جوانه‌های جانبی و انتهایی به‌منظور ریزازدیادی استفاده شد. بهترین روش سترون‌سازی استفاده از کلرید جیوه ۰/۱ درصد به‌مدت ۶ دقیقه بود. در حالی‌که برای استریل گونه *Satureja obovata* از هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد، ۵ دقیقه (Arrebola *et al.* 1997)، گونه *Satureja avromanica* از محلول نانو ذرات نقره ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر، ۳۰ ثانیه (Mozafari *et al.*, 2015) و گونه *Satureja abyssinica* از محلول هیپوکلریت سدیم، ۲۰ دقیقه (Teshome & Soromessa, 2015) استفاده شده بود، با توجه به متفاوت بودن نوع محلول‌های سترون‌سازی به‌کار گرفته شده، قابل مقایسه با یکدیگر نمی‌باشند. مؤثر بودن روش استریل به‌درجه نفوذ عامل گندزدا به درون بافت‌های آلوده، نوع ماده استریل‌کننده، غلظت محلول تهیه شده از آن و مدت زمان کاربرد آن برای استریل نمونه‌های گیاه بستگی دارد. محلول کلرید جیوه به‌عنوان ضدعفونی‌کننده اصلی در مقادیر ضعیف و زمان‌های کوتاه‌مدت، تأثیر قوی و ماندگاری بر حذف آلودگی‌های میکروبی داشته و باعث مرگ و قهوه‌ای شدن نمونه‌ها نیز نمی‌شود (Emam *et al.*, 2012).

محیط کشت پایه MS تأثیر بیشتری بر روی تکثیر شاخه‌ها، فعالیت جوانه‌های جانبی روی شاخه و سبزینگی و شادابی اندام هوایی مرزه خوزستانی داشت. در مورد گونه‌های دیگر مرزه نیز برای نوشاخه‌زایی محیط کشت پایه MS به‌عنوان بهترین محیط پایه گزارش شده است (Arrebola *et al.* 1997, Mozafari *et al.*, 2015, Teshome & Soromessa, 2015). یکی از عوامل تعیین‌کننده کارآیی محیط کشت، نوع املاح و مجموع قدرت یونی آن (McCown and Sellmer, 1987) می‌باشد. با توجه به اینکه قدرت یونی محیط کشت MS مابین قدرت یونی دیگر محیط‌های کشت پایه به‌کار گرفته شده است، در نتیجه مرزه خوزستانی نیاز به محیط کشتی با قدرت یونی متوسط دارد.

در بین تنظیم‌کننده‌های رشد مورد استفاده برای نوشاخه‌زایی تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. استفاده از ترکیب هورمونی سیتوکنینی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر 2iP تأثیر بیشتری نشان داد. در این زمینه Teshome و Soromessa (۲۰۱۵) گزارش کردند که بهترین تنظیم‌کننده رشد برای نوشاخه‌زایی گونه *S. abyssinica* محیط کشت حاوی ۱/۵ mg/l BAP می‌باشد. ضمن اینکه Arrebola و همکاران (۱۹۹۷) نیز محیط حاوی ۲/۲۲ ماکرومول BAP را برای نوشاخه‌زایی گونه *S. obovata* و بهترین ترکیب هورمونی برای نوشاخه‌زایی گیاه *S. avromanica* را محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BA و ۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ (Mozafari *et al.*, 2015) و *S. edmondi* مقدار ۱ میلی‌گرم در لیتر BA (Omrani *et al.*, 2016) گزارش کردند؛ به‌طوری‌که در همه گونه‌ها، بنزیل‌آمینوپورین به‌عنوان بهترین تنظیم‌کننده رشد برای نوشاخه‌زایی مشاهده شد. به‌طور کلی بنزیل‌آمینوپورین از محرک‌های قوی برای نوشاخه‌زایی است و ترکیب آن با 2iP باعث افزایش تکثیر شاخه در مرزه خوزستانی شد.

در بین تیمارهای به‌کارگرفته شده در این تحقیق برای نوریشه‌زایی، محیط پایه MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA اثر افزایشی بیشتری هم از لحاظ تعداد ریشه اصلی و هم تعداد ریشه فرعی از بقیه تیمارها داشت. در حالی‌که بهترین محیط کشت پایه و تنظیم‌کننده رشد برای گونه *S. abyssinica*، محیط کشت پایه MS ۱/۲ حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA (Teshome & Soromessa, 2015)، گونه *S. obovata* محیط کشت پایه MS حاوی ۴/۹۲ میکرومول IBA (Arrebola *et al.* 1997)، گونه *S. avromanica* محیط کشت پایه WPMحاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA گزارش شده است، که در بیشتر موارد بهترین محیط پایه برای نوریشه‌زایی مانند مرزه خوزستانی محیط پایه MS و در همه تنظیم‌کننده رشد IBA می‌باشد. در حالی‌که Omrani و همکاران (2016) برای نوریشه‌زایی گونه *S. edmondi* محیط کشت پایه DKW حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیترNAA را گزارش کردند.

ریزازدیادی اجازه تولید سریع گیاهانی با کیفیت بالا، یکنواخت، بدون بیماری و بدون در نظر گرفتن فصل و آب و هوا را می‌دهد. با این حال محدودیت عمده در استفاده از این تکنولوژی در مقیاس بزرگ مرگ و میر بالای گیاهان ریزازدیادی شده در انتقال به زمین است. به‌همین علت در این تحقیق نوع ترکیب خاک نیز برای افزایش زنده‌مانی مورد بررسی قرار گرفت. پایین بودن درصد زنده‌مانی در ۶ تیمار نوع ترکیب خاک، بیان‌کننده اهمیت آن در استقرار گیاهچه‌های کشت بافتی می‌باشد. اثر بستر مختلف خاک بر صفات رویشی نهال‌های حاصل از کشت بافت خرما به‌وسیله Vezvaei و همکاران (2003) بررسی شد و نشان دادند که اثر نوع بستر خاک بر قطر، تعداد کل برگها و ارتفاع جوانه انتهایی و تعداد برگهای مرکب و طول برگ معنی‌دار بود.

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به خطر رو به انقراض بودن این گونه، تکثیر غیرجنسی آن از طریق کشت بافت می‌تواند ضمن حفاظت از آن، به‌عنوان روش تولید منبع ترکیبات ثانویه با ارزش به‌ویژه کارواکرول، در اختیار صنایع داروسازی و غذایی قرار گیرد.

منابع مورد استفاده

– Ahmadvand, H., Tavafi, M. and Khalatbary, A.R., 2012. Hepatoprotective and hypolipidemic effects of *Satureja khuzestanica* essential oil in alloxan-induced type 1 diabetic rats. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 11: 1219–1226.
– Amanlou, M., Dadkhah, F., Salehnia, A. and Farsam, H., 2005. An anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of hydroalcoholic extract of *Satureja khuzestanica* Jamzad extract. The Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 8: 102–106.
– Arrebola, A.M., Socorro, O., Barcelo-Monoz, A., Simon perez, E. and Fernando Perpliago A., 1997. Micropropagation of *Satureja obavata* Lag. Hort Sciences, 32 (7): 1278-1280
– Driver, J.A. and Kuniyuki, A.H., 1984. *In vitro* propagation of *Paradox walnut* rootstocks (*Juglans hindsii* × *J. regia*). Horticultural Science, 19: 507-509.
– Emam, M., Ghamarizare, A., Espahbodi, K., Naraghi, T.S., Shahrzad, Sh., Zare, H. and Mirjani, L., 2013. Effect of medium, plant growth regulators and genotype on *In vitro* regeneration of *Sorbus aucuparia* L. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 29: 85-95.
– Jalili, A. and Jamzad, Z. 1999. Red data book of Iran. Research Institute of Forests and Rangelands. Tehran, Iran. 748 p.
– Jamzad, Z., 2011. Thyme and Savory Iran. Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, 171 p.
– Kaeidi, A., Esmaeili-Mahani, S., Abbasnejad, M., Sheibani, V., Rasoulian, B., Hajializadeh, Z. and Pasban-Aliabadi, H., 2013. *Satureja khuzestanica* attenuates apoptosis in hyperglycemic PC12 cells and spinal cord of diabetic rats. Journal of Natural Medicines, 67: 61–69.
– Lloyd, G. and McCown, B.H., 1981. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by shoot tip culture. Combined Proceedings, International Plant Propagators' Society, 30:421–427
– McCown, B.H. and Sellmer, J.C., 1987. Media and physical environment: 4-17. In: Bonga, J.M. and Durzan, D.J., (Eds.). Cell and Tissue Culture in Forestry (Vol 1), General principles and Biotechnology. Martinus Nijhoff Publishers, Pordrecht, 422p
– Murashige, T. and Skooge, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum, 15: 473-597.
– Motaharinia, Y., Hazhir, M.S., Rezaee, M.A., Vahedi, S., Rashidi, A., Hosseini, W., Hakhamaneshi, M.S. and Rahmani, M.R., 2012. Comparison of *in vitro* antimicrobial effect of ethanol extracts of *Satureja khuzestanica*, *Rhus coriaria* and *Ocimum basilicum* L. on Helicobacter pylori. Journal of Medicinal Plants Research, 6 (21): 3749–3753.
– Mozafari, A.K., Vafaee, Y. and Karami, E., 2015. *In vitro* propagation and conservation of *Satureja avromanica* Maroofi an indigenous threatened medicinal plant of Iran. Physiology and Molecular Biology of Plants, 21(3):433–439.
– Naraghi, T.S., Emam, M., Ghamrizare, A., Damizadeh, Gh. and Shariat, A., 2013. *In vitro* propagation of *Capparis decidua* through shoot tip culture of seedlings and mature trees.

clinical, microbiological and immunological comparison between subgingival irrigation with DentolTM and chlorhexidine in advanced periodontitis. Archives of Medical Science, 7 (1): 154–160.
– Teshome, S., Soromessa, T., 2015. *In Vitro* Propagation of *Satureja Abyssinica* (Benth) Briq. A Valuable Medicinal Plant. Advances in Life Science and Technology, 34: 100-109
– Vezvaei, A., Alamdari, M., Sanei Shariat Panahi, M. and Kashani, M., 2003. Effect of different growing media and plant growth substances on vegetative characters and off shoot production of "Barhi" date palm liners derived from micropropagation. Iranian Journal Agriculture Science. 34 (4): 969-976.
– Zibaei, M., Sarlak, A., Delfan, B., Ezatpour, B. and Azargoon, A., 2012. Scolicidal effects of *Olea europaea* and *Satureja khuzestanica* extracts on protoscolices of hydatid cysts. The Korean Journal of Parasitology. 50: 53–55.
Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 20 (1). 134-144.
– Nazari, A., Delfan, B., Shirkhani, Y., Kiyanei, A.A. and Mandegary, A., 2005. Effect of decoction of *Satureja khuzestanica* Jamzad on blood coagulation time, triglyceride and glucose levels in rats. Pakistan Journal of Biological Sciences, 8 (6): 790–792.
– Omrani Sabbaghi, S., Tabaei Aghdaie, S.R., Emam, M. and Bakhshi Khaniki, G.R., 2016. Micropropagation of rare endemic *Satureja edmondi.* Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 24(1): 134-141.
– Sadeghi-Nejad, B., Saki, J., Khademvatan, S. and Nanaei, S., 2011. *In vitro* antileishmanial activity of the medicinal plant – *Satureja khuzestanica* Jamzad. Journal of Medicinal Plants Research, 5 (24): 5912–5915.
– Shahab, A., Haghighati, F., Baeeri, M., Jamalifar, H. and Abdollahi, M., 2011. A

Effective factors on micropropagation of medicinal plant of *Satureja khuzistanica*

L. Mirjani[1], A. Salimi[2]*, M. Matinizadeh[3], K. Razavi[4] and M. Shahbazi[5]

1- Ph.D. student, College of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, I.R. Iran.
2*- Corresponding author, Assoc. Prof., College of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, I.R. Iran,
Email: salimi@khu.ac.ir.
3- Assoc. Prof., Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, I.R. Iran.
4- Accis. Prof., National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, I.R.Iran.
5-Accis. Prof., Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, I.R. Iran.

Received: 21.01.2017 Accepted: 17.04.2017

Abstract

Satureja khuzistanica Jamzad is an endemic species of Iran. The species is an endangered and valuable medicinal plant. In order to propagate through micropropagation, lateral buds were collected from Lorestan province, region of Pol of Dokhtar. The best treatment of sterilization of the explants was 0.1% HgCl2 for 6 minutes. The best medium for shoot regeneration was MS with BA, 2iP and IBA 0.3, 0.3 and 1 mg/l, respectively. Applying 12 different treatments, the mentioned medium was better than other treatments in term of the coefficient of elongation, leaf elongation and leaf greenness. The best medium for root regeneration was MS with 1 mg/l IBA and 0.1 mg/l NAA. It initiated the highest number of primary and secondary roots. Various combinations of different soils were evaluated for survival during the acclimatization, and sand: soil: peat: perlite at a ratio of 1: 1: 1: 1 showed the highest percentage of survival and growth. The best propagation method of the species was developed and the propagated plants could be transplanted into the habitat of the species.

Key Words: *In vitro* regeneration, Micropropagation, Plant growth regulator and *Satureja khuzistanica*