

بررسی سیستم گرده‌افشانی و میزان خودناسازگاری در دو گونه مرزه سهندی *Satureja sahendica* و مرزه بختیاری *S. bachtiarica*

آناهیتا شریعت^۱ و فاطمه سفیدکن^۲

*۱-دکتری اصلاح نباتات، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، نویسنده و مسئول مکاتبات، پست الکترونیک:

shariat@rifr-ac.ir

۲-استاد پژوهش، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۸/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۰۹

چکیده

آگاهی از سیستم گرده‌افشانی و میزان خودناسازگاری گونه‌های گیاهی، اولین گام در اتخاذ روش اصلاحی مناسب است. این مطالعه به منظور بررسی میزان خودناسازگاری و درصد خودگشنی و دگرگشنی دو گونه مرزه بومی ایران شامل مرزه سهندی *Satureja sahendica* و مرزه بختیاری *S. bachtiarica* انجام گردید. به این منظور تعدادی از گل‌آذین‌های هر ژنوتیپ را برای انجام خودگشنی اجباری با پاکت پوشانیده و به تعداد دیگری از گل‌آذین‌ها، اجازه گرده‌افشانی آزاد داده شد. همچنین میزان زنده‌مانی دانه گرده و میزان پذیرش کلاله تعیین گردید. ریخت‌شناسی گل نیز با مطالعه صفات مختلفی از جمله طول گل، طول کاسبرگ، طول بساک، طول خامه، طول میله پرچم، شکل خامه، شکل کلاله، طول تخمدان، موقعیت قرارگیری پرچم‌ها نسبت به یکدیگر و موقعیت قرارگیری پرچم‌ها نسبت به مادگی انجام شد. شاخص خودناسازگاری در مرزه بختیاری و سهندی به ترتیب ۹۶ و ۷۹ درصد تعیین گردید. نتایج حاصل از این تحقیق، بیانگر نیمه خودگشن بودن دو گونه مرزه مورد مطالعه می‌باشد که می‌تواند نویدی برای تولید بذر هیبرید از طریق تلاقی‌های بین و درون گونه‌ای باشد. از نتایج کاربردی این تحقیق که می‌توان در برنامه اهلی کردن و اصلاح دو گونه مذکور استفاده نمود، زمان مناسب دورگ‌گیری در مرزه بختیاری و سهندی است که به ترتیب در روزهای پنجم و ششم بعد از باز شدن گل‌ها تعیین شد. در این مرحله کلاله‌ها در اوج پذیرش هستند و می‌توانند با استفاده از گرده گل‌هایی که دو روز به باز شدن آنها باقی مانده و دارای حداکثر درصد زنده‌مانی هستند، گرده‌افشانی شوند.

واژه‌های کلیدی: زنده‌مانی دانه گرده، میزان پذیرش کلاله، خودگشنی و ریخت‌شناسی گل

مقدمه

میزان و توزیع تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های گیاهی، عمدتاً تحت تأثیر ویژگی‌های تولید مثلی مانند فنولوژی گل، خودسازگاری و سیستم تولید مثلی قرار دارد (Rodríguez-Pérez and Traveset, 2016). سیستم تولید مثلی و سازوکار گرده‌افشانی گیاهان را می‌توان به روش‌های

گوناگونی بررسی کرد. کرودن (Cruden, 1977) بیان کرد که محاسبه نسبت دانه گرده به تخمک در یک گل، می‌تواند به عنوان روشی برای تخمین نوع سیستم تولید مثلی گیاه محسوب شود. با وجود اینکه نظریه کرودن در مورد رابطه بین نسبت دانه گرده به تخمک با نوع سیستم تولید مثلی پذیرفته شده است، برخی از دانشمندان معتقدند که باید

فاکتورهای دیگری مانند شکل زندگی، اندازه گل، اندازه دانه گرده، شهد گل برای گرده افشان ها و غیره را نیز مورد توجه قرار داد و از این فاکتورها برای بحث و تفسیر نتایج استفاده کرد (Sanchez et al., 2012; Ollerton et al., 2011). گیاهان سازوکارهای متعددی دارند که به دگرباروری کمک می کند و از خودباروری جلوگیری به عمل می آورد. خودناسازگاری یکی از موارد مهم و سازوکار ژنتیکی است که دگرباروری را به طور فیزیولوژیک موجب می شود (Therios, 2009). خودناسازگاری وضعیتی است که در آن با وجود فعال بودن دانه گرده و مادگی، امکان تولید بذر از طریق خودباروری وجود ندارد (Ehdaei, 1993). مطالعات ژنتیک کلاسیک در اوایل قرن بیستم، دو سیستم خودناسازگاری گامتوفیتیکی و اسپوروفیتیکی را مشخص کرد (Nettancourt, 1977). در صورتی که عامل ناسازگاری بر روی کلاله گیاه باشد و عدم نفوذ لوله گرده در کلاله را به همراه داشته باشد این عامل ناسازگاری را گامتوفیتی می گویند. در صورتی که عامل ناسازگاری در خامه گیاه باشد و رشد لوله گرده در خامه به قدری کند باشد که به تخمک نرسد، این ناسازگاری را اسپوروفیتی می گویند (Koseva et al., 2017). کسب اطلاعات لازم در زمینه میزان خودناسازگاری، تأثیر عوامل محیطی بر آن و شناسایی ژنوتیپ هایی که درصد خودناسازگاری کمتری دارند و می توانند برای تولید لاین های خود آمیخته نسل اول یا S1 استفاده گردند، از مقدمات برنامه های اصلاحی در گیاهان است.

فاکتورهای دیگری مانند شکل زندگی، اندازه گل، اندازه دانه گرده، شهد گل برای گرده افشان ها و غیره را نیز مورد توجه قرار داد و از این فاکتورها برای بحث و تفسیر نتایج استفاده کرد (Sanchez et al., 2012; Ollerton et al., 2011). گیاهان سازوکارهای متعددی دارند که به دگرباروری کمک می کند و از خودباروری جلوگیری به عمل می آورد. خودناسازگاری یکی از موارد مهم و سازوکار ژنتیکی است که دگرباروری را به طور فیزیولوژیک موجب می شود (Therios, 2009). خودناسازگاری وضعیتی است که در آن با وجود فعال بودن دانه گرده و مادگی، امکان تولید بذر از طریق خودباروری وجود ندارد (Ehdaei, 1993). مطالعات ژنتیک کلاسیک در اوایل قرن بیستم، دو سیستم خودناسازگاری گامتوفیتیکی و اسپوروفیتیکی را مشخص کرد (Nettancourt, 1977). در صورتی که عامل ناسازگاری بر روی کلاله گیاه باشد و عدم نفوذ لوله گرده در کلاله را به همراه داشته باشد این عامل ناسازگاری را گامتوفیتی می گویند. در صورتی که عامل ناسازگاری در خامه گیاه باشد و رشد لوله گرده در خامه به قدری کند باشد که به تخمک نرسد، این ناسازگاری را اسپوروفیتی می گویند (Koseva et al., 2017). کسب اطلاعات لازم در زمینه میزان خودناسازگاری، تأثیر عوامل محیطی بر آن و شناسایی ژنوتیپ هایی که درصد خودناسازگاری کمتری دارند و می توانند برای تولید لاین های خود آمیخته نسل اول یا S1 استفاده گردند، از مقدمات برنامه های اصلاحی در گیاهان است.

مرزه بختیاری (*S. bachtiarica*) دارای پراکندگی نسبتاً وسیعی در ایران بوده و در استان های غرب، مرکزی و جنوب غربی ایران رویش دارد (Jamzad, 2009). رویشگاه مرزه سهندی (*S. sahandica*) دامنه های صخره ای و سنگی در ارتفاع ۱۳۰۰ تا ۲۵۰۰ m است. این گونه در آذربایجان، زنجان، کردستان، کرمانشاه و ایلام پراکنش دارد (Jamzad, 2009; Shariat et al., 2018a). ترکیب های عمده اسانس در گونه های مختلف مرزه عمدتاً تیمول، کارواکرول، گاماترینین و پاراسیمین می باشد (Shariat et al., 2017).

تاکنون منابع اندکی در مورد پراکنش فنوتیپی و اهمیت سازگاری گل های دوسویه (bilabiate) در خانواده Lamiaceae گزارش شده است. در مریم گلی ساختار اهرم مانند پرچم ها (lever like stamen) به عنوان یک ابزار مکانیکی زیستی منجر به پراکنش گرده ها می گردد (Reith et al., 2007). در تحقیقی نشان داده شد که گوناگونی مورفولوژیکی گل های مریم گلی به دلیل فرار از زنبورها و جلب پرندگان گرده افشان بوده است (Westerkamp and Claßen-Bockhoff, 2007). اگرچه ایران خاستگاه اصلی برخی از مهمترین گونه های جنس مرزه در دنیا می باشد ولی تعداد منابع منتشر شده در مورد تنوع مورفولوژیکی گل ها و سیستم های گرده افشانی در گونه های بومی مرزه بسیار کم است. با توجه به اینکه در حال حاضر این اطلاعات در پایگاه های معتبر بین المللی وجود ندارد لزوم غنی سازی این اطلاعات در قالب مطالعات جامع داخلی از ضروریات برنامه های اصلاحی در این جنس می باشد. بر این اساس هدف از این تحقیق بررسی میزان خودناسازگاری در دو گونه مرزه بومی انحصاری ایران می باشد و اینکه آیا احتمال خویش آمیزی ژنوتیپ ها به منظور تولید لاین های خالص برای تولید ارقام هیبرید وجود دارد؟

مواد و روش ها

به منظور مطالعه بیولوژی گل و سیستم های گرده افشانی دو گونه *S. sahandica* (منشا آذربایجان شرقی) و *S. bachtiarica* (منشا یزد) از گیاهان مستقر در مزرعه مجتمع تحقیقاتی البرز (کلکسیون مرزه) استفاده شد. در تیرماه به موازات تعیین مراحل نموی گل، آزمون زنده مانگی دانه گرده و آزمون پذیرش کلاله انجام گردید.

دم‌گل تا ساقه (برحسب میلی متر) اندازه‌گیری شد. طول دم‌گل ۱: فاصله بین کاسه گل و برگه (میلی متر) تحت عنوان دم‌گل ۱ ثبت شد. طول دم‌گل ۲: فاصله بین برگه تا ساقه (میلی متر) تحت عنوان دم‌گل ۲ ثبت شد. وضعیت کرک کاسه: (۱) کم، (۲) متوسط کم، (۳) متوسط، (۴) متوسط تا زیاد

رنگ کاسه گل: (۱) سبز، (۲) سبز روشن، (۳) سبز جزئی تیره

رنگ جام گل (گلبرگ): (۱) گل سفید، (۲) سفید نقش‌دار، (۳) جزئی بنفش، (۴) بنفش کمرنگ
رنگ بساک: (۱) سفید، (۲) شیری، (۳) زرد، (۴) بنفش، (۵) بنفش روشن

تعیین بذره‌ای حاصل از خود‌گرده‌افشانی و گرده‌افشانی آزاد

برای تعیین میزان تشکیل بذر در گرده‌افشانی باز و کیسه‌گذاری ۳۰ بوته از هر گونه انتخاب و تعدادی از گل‌آذین‌ها با کیسه‌های پارچه‌ای که قابلیت عبور دادن گرده‌های خارجی را نداشتند، پوشانیده شدند. همچنین همین تعداد گل‌آذین نیز به صورت گرده‌افشانی آزاد در نظر گرفته شد. در پایان فصل گلدهی گل‌آذین‌ها برداشت شده و درصد تشکیل بذر و تعداد کل گل‌ها در یک بوته برای هر ژنوتیپ محاسبه گردید. در بحث تولید بذر و میوه بر اساس اصل Bateman عدم موفقیت گیاهان ماده در تولید بذر و میوه به علت عدم دریافت دانه‌های گرده کافی می‌باشد. بنابراین تأمین گرده مکمل منجر به افزایش تشکیل میوه می‌شود. تعیین شاخص خودسازگاری با استفاده از فرمول زیر بر اساس نسبت بذره‌ای حاصل از خود‌گرده‌افشانی به بذره‌ای حاصل از گرده‌افشانی آزاد (برحسب درصد) محاسبه گردید (Bateman, 1956; Silva et al., 2016).

$$\text{بذر حاصل از خودگرده‌افشانی} = \frac{\text{شاخص خود سازگاری} (\%) \times 100}{\text{بذر حاصل از گرده‌افشانی آزاد}}$$

آزمون قابلیت پذیرش کلاله و زنده‌مانی دانه گرده برای انجام آزمون قابلیت پذیرش کلاله از روش آنزیمی MTT^۱ و روش H₂O₂^۲ استفاده شد (Khatum and Flowers 1995). برای انجام آزمون زنده‌مانی دانه گرده از روش آنزیمی X-Gal (Trognitz 1991; Singh et al. 1985) و روش‌های MTT^۳ و TTC^۳ استفاده گردید (Khatum and Flowers 1995; Norton 1966).

بررسی مراحل نمو گل

برای تعیین مراحل نمو گل‌ها (از غنچه تا مرحله‌ای که گلبرگ‌ها به‌طور کامل باز می‌شوند) و اندازه‌گیری اجزای زایشی گل‌ها، آنها را برداشت و به شیشه‌های حاوی الکل ۷۰ درصد انتقال و در آزمایشگاه نگهداری شدند. آنگاه گل‌ها مورد بررسی مورفولوژیکی قرار گرفته و از هر یک از اندام‌های زیای گل در هر مرحله عکس گرفته شد.

ریخت‌شناسی گل

برای تعیین ریخت‌شناسی گل، صفات مختلفی مثل طول گل، طول کاسبرگ، طول بساک، طول خامه، طول میله پرچم، شکل خامه، شکل کلاله، طول تخمدان، موقعیت قرارگیری پرچم‌ها نسبت به یکدیگر، موقعیت قرارگیری پرچم‌ها نسبت به مادگی، تعداد دانه گرده و تخمک اندازه‌گیری شد. برای تعیین اندازه دانه گرده، از هر گونه حداقل ۱۰ گل از بوته‌های مختلف انتخاب و بعد به روش آنالیز ارتمن (Erdtman, 1969) دانه‌های گرده بر روی لام حاوی یک قطره گلیسرین ژلاتین قرار داده شدند و توسط میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند. در اندازه‌گیری صفات مورفولوژیک موارد زیر در نظر گرفته شدند.

طول برگه کنار گل: طول برگ کوچک در فاصله بین

¹ 3-[4,5-dimethyl-ithiazolyl-2]-2,5-diphenyl monotetrazolium bromide

² Hydrogen peroxide

³ 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride

هفت تا نه روز (شکل ۱) و در گونه *S. sahendica* حدود هفت روز به طول انجامید (شکل ۳). به این ترتیب طول عمر یک گل از زمان پیدایش غنچه تا زمان پیر شدن آن دو هفته به طول انجامید. لازم به ذکر است که طول دوره گلدهی رابطه معکوس با دمای محیط دارد، به این ترتیب که هر چه دما کمتر باشد، طول دوره گلدهی افزایش می‌یابد و شروع فرایند پیری گل‌ها به تعویق می‌افتند.

شکل ۵ بیانگر آن است که اندام‌های زایای گل، با افزایش سن گل بزرگتر می‌شوند. تنها دو پارامتر اندازه قطر بساک و قطر مادگی در طول دوره نمو گل ثابت باقی ماندند (شکل ۲ و ۴). دلیل ثابت ماندن اندازه بساک و مادگی را می‌توان به این نسبت داد که تقسیمات سلولی و نمو آنها در دوره جنینی در گل‌ها اتفاق می‌افتد و فرایند بلوغ دانه‌های گرده نیز در مراحل نمو گل حادث می‌شود. اندازه خامه گل نیز در مراحل نمو متفاوت بوده و در دو گونه مورد بررسی نیز با یکدیگر متفاوت بود (شکل ۲ و ۴). اندازه خامه حتی بعد از باز شدن گل‌ها نیز به رشد خود ادامه داد و به حداکثر خود رسید (شکل ۵). البته اندازه دم‌گل‌ها نیز از روند ثابتی برخوردار نبود.

شاخص خود سازگاری - ۱۰۰ = شاخص خود ناسازگاری (%)

تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزارهای Minitab17 و SPSS18 انجام شد.

نتایج

تعیین دوره گلدهی و مراحل نمو گل

برای ارزیابی دوره گلدهی در دو گونه مرزه، گل‌ها در پنج مرحله نمو مورد بررسی قرار گرفتند (شکل ۱ و ۳). در مرحله اول گل به صورت غنچه قابل مشاهده بود (شکل الف)، در مرحله دوم نمو گل قابل رؤیت بود (شکل ا ب)، در مرحله سوم نمو گل به یک چهارم اندازه خود رسید (شکل ا ج). در مرحله چهارم نمو گل به یک دوم اندازه (شکل ا د) و در مرحله پنجم زمان باز شدن کامل گل بود (شکل ا ه). مدت زمان تبدیل مراحل به همدیگر به این ترتیب بود که قرار گرفتن گل در مرحله اول سه تا چهار روز به طول انجامید. مدت زمان تبدیل مرحله دوم به مرحله سوم دو تا سه روز، مرحله سوم به مرحله چهارم یک تا دو روز و مرحله نهایی دو روز و از زمان باز شدن گل تا زمان پیری که اولین نشانه قهوه‌ای شدن نوک کلاله است حدود یک هفته طول کشد. البته در گونه *S. bachtiarica* حدود



شکل ۱- اندازه گل‌ها در مراحل نمو مختلف در *S. bachtiarica*

مرحله غنچه (الف)، مرحله‌ای که قسمتی از سر جام گل دیده می‌شود (ب)، مرحله‌ای که گل به یک دوم اندازه خود رسیده است (ج)، مرحله‌ای که گل به سه چهارم اندازه خود رسیده است (د)، مرحله باز شدن کامل گل (ه).



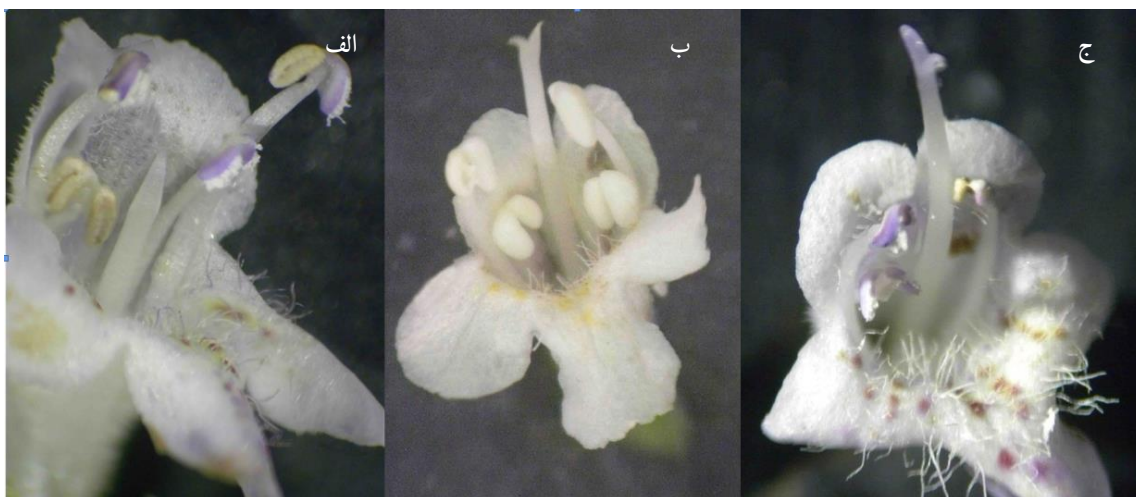
شکل ۲- مقایسه گل‌ها در *S. bachtiarica* در مراحل مختلف نمو بعد از باز شدن گل‌ها

بساک‌ها و کلالة كاملا رسیده‌اند (الف و ج)، گل تک‌جنسی که فقط مادگی دارد (ب)، نحوه قرارگیری بساک‌ها و مادگی در یک گل (د و ه)، نحوه آزاد شدن گرده‌ها از بساک (و و ز)

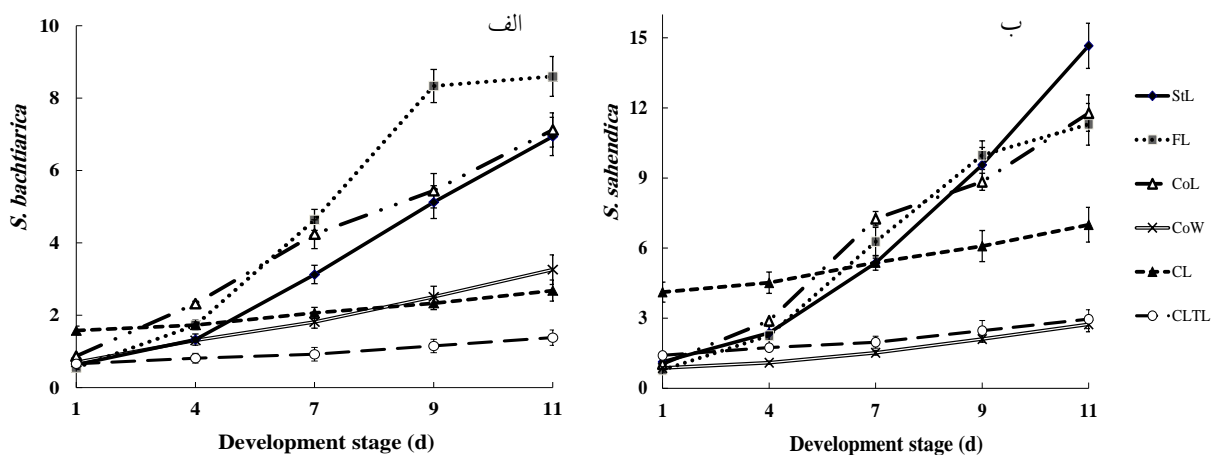


شکل ۳- اندازه گل‌ها در مراحل نموی مختلف در *S. sahendica*

مرحله غنچه و مرحله‌ای که قسمتی از سر جام گل دیده می‌شود (الف)، مرحله‌ای که گل به یک دوم و به سه چهارم اندازه خود رسیده است (ب)، مرحله باز شدن کامل گل (ج)



شکل ۴- مقایسه گل *S. sahendica* در بوته‌های مختلف جمعیت بررسی شده
 بساک‌ها رسیده و گرده‌ها آزاد شده ولی کلاله رشد نکرده و زبانه‌های بالایی باز نشده‌اند (الف)، کلاله کاملاً رشد کرده و قابلیت پذیرش
 گرده را دارد ولی بساک‌ها کامل نرسیده‌اند (ب)، بساک‌ها و کلاله هر دو رسیده‌اند (ج)



شکل ۵- روند تغییرات مراحل رشد اندام‌های زایشی و رویشی گل در دو گونه مرزه

CoW = قطر جام گل (میلی‌متر)

FL = طول پرچم (میلی‌متر)

StL = طول خامه گل (میلی‌متر)

CL = طول کاسه گل (میلی‌متر)

CLTL = طول دندانه زیرین (میلی‌متر)

CoL = طول جام گل (میلی‌متر)

۱۶/۲±۰/۸۶ بود (جدول ۱). طول جام گل در مرزه سهندی

۷/۱۲±۰/۴۷ در مرزه بختیاری و در مرزه سهندی

به‌طور متوسط طول گل‌آذین در مرزه بختیاری

۲۳/۲±۱/۲۸ (جدول ۱) سانتی‌متر و در مرزه سهندی

سایر صفات گل نیز دارای ابعاد بزرگتری نسبت به گونه بختیاری می‌باشد (شکل ۵).

قابلیت پذیرش کلاله

آزمون قابلیت پذیرش کلاله که با دو روش MTT و H₂O₂ انجام گردید بیانگر آن بود که از زمان باز شدن کامل دو زبانه کلاله، پذیرش کلاله شروع می‌شود (معمولا دو تا سه روز بعد از باز شدن گل اتفاق می‌افتد) و تا زمان قهوه‌ای شدن نوک کلاله که شروع پیری و پایان عمر گل می‌باشد، ادامه دارد. در تحقیقی که بر روی گیاه *Elaeis guineensis* انجام شد، نشان داده شد که شروع پذیرش کلاله از هنگام باز شدن دو زبانه کلاله تا ۲۴ ساعت بعد از آن می‌باشد (Tandon et al., 2001).

همان‌طور که در شکل ۶ دیده می‌شود، با گذشت زمان پذیرش کلاله افزایش می‌یابد، پذیرش کلاله زمانی اتفاق می‌افتد که کلاله‌ها کاملا باز باشند. در مرزه بختیاری پذیرش کلاله از روز چهارم باز شدن گل شروع و تا روز هفتم ادامه می‌یابد (شکل ۶ الف). اوج پذیرش کلاله در روزهای پنجم و ششم با میزان ۹۵٪ می‌باشد. در مرزه سهندی باز شدن کلاله‌ها از روز سوم آغاز شده و اوج پذیرش کلاله در روز پنجم با میزان تقریبی ۱۰۰٪ می‌باشد (شکل ۶ ب). کلاله‌ها با پراکسید هیدروژن نیز واکنش بسیار فعالی داشتند و بیشترین میزان تشکیل حباب در مرزه بختیاری در روزهای پنجم و ششم و در مرزه سهندی نیز در روز پنجم بود (شکل ۶ ب). در آزمون MTT تمامی کلاله‌های مورد آزمایش در روز پنجم به رنگ بنفش تیره در آمدند. با کاهش قابلیت پذیرش کلاله از میزان رنگ بنفش کاسته شد، به طوری که در روز هفتم کلاله‌ها از ناحیه نوک به پایین رنگ بنفش کم‌رنگ به خود گرفته که به دلیل کاهش فعالیت آنزیمی و پیر شدن کلاله بود. این نتیجه تأییدکننده نتیجه حاصل از آزمون پراکسید هیدروژن بود که میزان تشکیل حباب در روز هفتم در مرزه بختیاری کاسته شد (شکل ۶ الف).

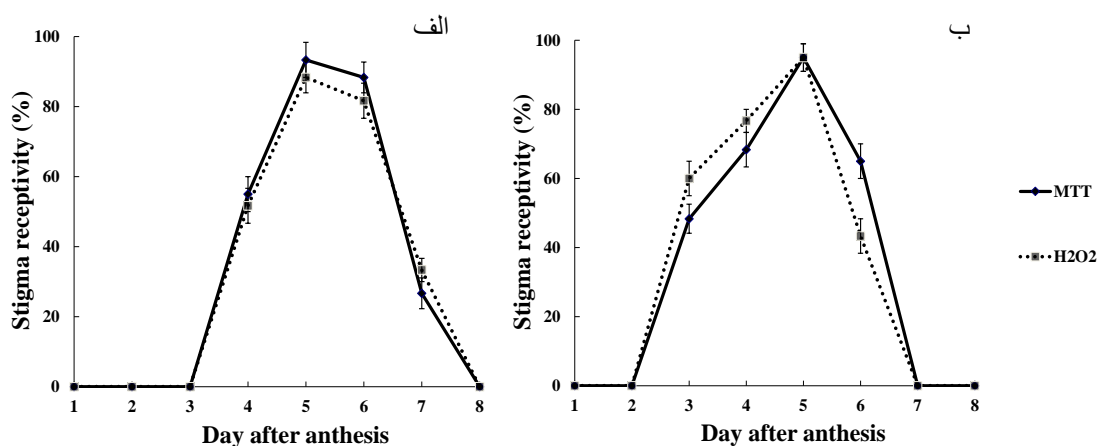
میلی‌متر بود (جدول ۱). متوسط طول خامه نیز در مرزه سهندی $14/66 \pm 0/96$ میلی‌متر و در مرزه بختیاری $6/94 \pm 0/52$ میلی‌متر بود. متوسط طول پرچم در مرزه سهندی $11/3 \pm 0/88$ میلی‌متر و در مرزه بختیاری $8/60 \pm 0/51$ میلی‌متر بود. مقایسه بین صفات مختلف دو

جدول ۱- پارامترهای اندام زایای گل در دو گونه مرزه

(ارزش‌ها بر اساس میانگین \pm خطای استاندارد)

صفات مورفولوژیک	<i>S. sahendica</i>	<i>S. bachtiarica</i>
طول گل‌آذین (سانتی‌متر)	۱۶/۲±۰/۸۶	۲۳/۲±۱/۲۸
طول برگ زایشی (میلی‌متر)	۶±۰/۴۵	۹/۴±۰/۹۳
عرض برگ زایشی (میلی‌متر)	۱۲/۱±۰/۱۱	۶/۳۲±۰/۱۴
طول برگه کنار گل (میلی‌متر)	۱/۸±۰/۰۹	۳/۱±۰/۲۵
طول کاسه گل (میلی‌متر)	۷±۰/۷۴	۲/۶۸±۰/۲۹
طول دندانه زیرین (میلی‌متر)	۲/۹۶±۰/۴۰	۱/۳۸±۰/۲۱
طول دندانه بالایی (میلی‌متر)	۱/۱۵±۰/۰۲	۰/۶۶±۰/۰۳
طول جام گل (میلی‌متر)	۱۱/۷۸±۰/۷۷	۷/۱۲±۰/۴۷
طول دم گل ۱ (میلی‌متر)	۰/۹۸±۰/۰۵	۳/۱±۰/۱۰
طول دم گل ۲ (میلی‌متر)	۲/۱۶±۰/۰۹	۶/۶۲±۰/۱۷
قطر جام گل (میلی‌متر)	۲/۷۴±۰/۳۱	۳/۲۶±۰/۴۰
طول پرچم (میلی‌متر)	۱۱/۳±۰/۸۸	۸/۶±۰/۵۱
طول خامه گل (میلی‌متر)	۱۴/۶۶±۰/۹۶	۶/۹۴±۰/۵۲
صفات کیفی		
رنگ کاسه گل	۱ = سبز	۲ = سبز روشن
رنگ جام گل (گلبرگ)	۱ = گل سفید	۳ = جزئی بنفش
رنگ بساک	۳ = زرد	۵ = بنفش روشن
تعداد کرک کاسه	۴ = (متوسط تا زیاد)	۲ = (متوسط تا کم)

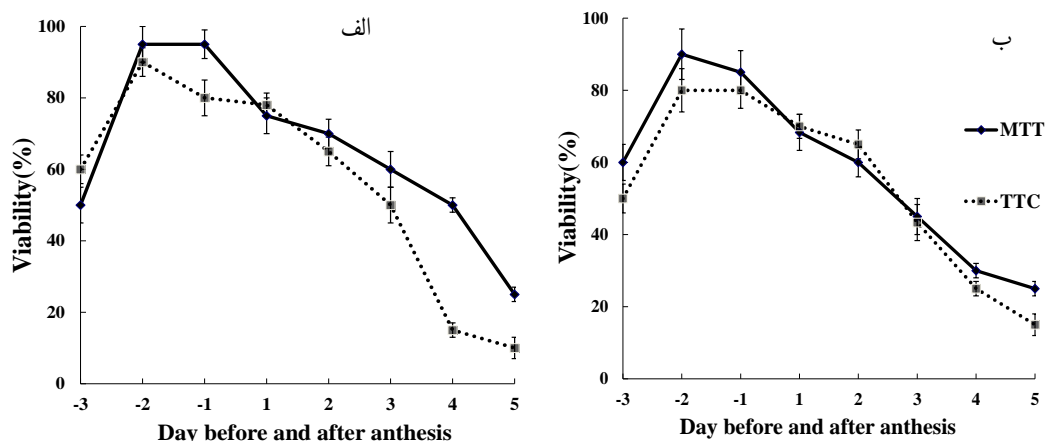
گونه بیانگر آن است که مرزه سهندی با وجود کوتاه‌تر بودن طول گل‌آذین، دارای گل‌های درشت‌تری بوده که به تبع آن



شکل ۶- آزمون قابلیت پذیرش کلاله با استفاده از دو روش MTT و H₂O₂ در مرزه بختیاری (الف) و مرزه سهندی (ب)

گرده یک تا دو روز قبل از باز شدن گل اتفاق افتاد که به ترتیب در مرزه سهندی ۹۰ درصد و در مرزه بختیاری ۸۵ درصد می‌باشد. با باز شدن گل‌ها و افزایش عمر گل به سرعت از زنده‌مانی دانه گرده کاسته شد، به طوری که ۴ تا ۵ روز بعد از باز شدن گل‌ها، زنده‌مانی دانه گرده به حدود ۲۰ درصد کاهش یافت (شکل ۷). نتایج حاصل از آزمون TTC نیز مؤید آزمون MTT می‌باشد و نتایج حاصل بیانگر آن است که بیشترین زنده‌مانی گرده‌ها قبل از شکوفایی گل‌هاست (شکل ۷).

آزمون قدرت زنده بودن دانه گرده
 آزمون TTC و MTT به منظور بررسی حضور فعالیت آنزیم دهیدروژناز در دانه‌های گرده به کار برده شدند. در آزمون TTC دانه‌های گرده زنده در حضور آنزیم دهیدروژناز رنگ صورتی تیره به خود گرفتند. گرده‌های غیرزنده در این آزمون بی‌رنگ ماندند (Dafni, 2000). در آزمون MTT دانه‌های گرده زنده در حضور آنزیم دهیدروژناز رنگ بنفش به خود گرفتند و گرده‌های غیرزنده، بی‌رنگ ماندند (Subasi and Guvensen., 2011). با توجه به شکل ۷ در آزمون MTT بیشترین میزان زنده‌مانی دانه



شکل ۷- آزمون قدرت زنده بودن دانه گرده با استفاده از دو روش MTT و TTC در مرزه بختیاری (الف) و مرزه سهندی (ب)

به خودگشنی اجباری بیشتر بود که حکایت از طبیعت دگرگشن این گیاه دارد، در مقابل در مرزه بختیاری مقدار بذر تشکیل شده در خودگشنی اجباری بیشتر از گرده‌افشانی آزاد بود. همچنین اندازه دانه‌ها در خودگشنی اجباری کوچکتر و تعداد آنها نیز کمتر بود. در مطالعه‌ای که بر روی بروموس *Bromus hordeaceum* انجام گردید بیانگر آن بود که تشکیل دانه در حالت خودگشنی نسبت به دگرگشنی ضعیف‌تر است (Weimark, 1963). تنوع قابل ملاحظه‌ای که در صفات ظاهری در میان بوته‌های مختلف درون جمعیت مورد بررسی دیده می‌شود عمدتاً مربوط به طبیعت دگرگرده‌افشان مرزه می‌باشد. لازم به ذکر است که علاوه بر اینکه در طول پرچم و طول خامه تنوع زیادی مشاهده شد، در حدود ۵ و ۳ درصد از گلها به ترتیب در مرزه بختیاری و مرزه سهندی فاقد پرچم بوده و تنها دارای کلالة بودند. همچنین حدود ۲ درصد از گل‌ها در مرزه سهندی نیز فاقد کلالة بودند و فقط پرچم داشتند. در تحقیقی که بر روی گیاه آویشن انجام شد، فرضیه ارتباط میان چندشکل جنسی و منطقه رشد به‌ویژه خاک بررسی شد. نتایج بیانگر آن بود که جمعیت رشد کرده در خاک آهکی (که به‌عنوان محیط بومی برای آویشن شناخته می‌شود) عمدتاً گیاهان هرمافرودیت بودند. در خاک‌های مرطوب، عمیق و قهوه‌ای جایی که چندین گونه سازگار حضور داشتند، درصد بالایی از گیاهان ماده مشاهده شد (Atlan et al., 1992). البته عکس این پدیده در گیاه مرزنجوش (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) مشاهده شد. بر اساس مشاهدات Letswaart, 1980 در جمعیت‌های کشت شده دو نوع افراد گیاهی حضور داشتند، یک نوع که فقط دارای گل‌های هرمافرودیت و گیاهانی که دارای گل‌های هرمافرودیت و نر به نسبت ۵۵ : ۴۵ بودند. پرچم‌ها از گل‌ها به بیرون آویزان بوده و جهت آنها از اختصاصات تاکسون‌های درون گونه‌ای جنس *Origanum* می‌باشد (Letswaart, 1980). در گیاه *Withania somnifera* دو نوع گل در دو فصل متفاوت سال به وجود می‌آید. یک

تعیین میزان تشکیل بذر

گونه‌های مورد بررسی در این مطالعه آزاد گرده‌افشان بودند. بنابراین هریک از بوته‌ها نقش یک ژنوتیپ را داشته و تنوع قابل ملاحظه‌ای در بوته‌ها از نظر صفات مورد بررسی وجود داشت. به‌طورکلی اندازه خامه رابطه مستقیم با میزان تشکیل بذر داشت و در ژنوتیپ‌هایی (تک بوته) که اندازه خامه کوتاه‌تر و یا مساوی طول پرچم‌ها بود، میزان تشکیل بذر حاصل از خودگشنی بیشتر بود. همچنین در بوته‌هایی که دارای خامه بلندتری نسبت به پرچم بودند، میزان بذر حاصل از خودگشنی به شدت کاهش یافت.

تعیین بذره‌ای حاصل از خودگرده‌افشانی و گرده‌افشانی آزاد

در پایان فصل (آبان) که بذرها کاملاً رسیده بودند پاکت‌های حاوی گل‌آذین و گل‌آذین‌های آزاد گرده‌افشان همان بوته که با بستن نخ علامت‌گذاری شده بودند، برداشت شده و برای شمارش به آزمایشگاه منتقل شدند. نتایج شمارش بذرها بیانگر آن بود که مقدار شاخص خودناسازگاری در دو گونه *S. bachtiarica* و *S. sahendica* به ترتیب ۰/۷۹ و ۰/۹۶ بود. هنگامی که این شاخص ۱ باشد بیانگر خودناسازگاری کامل می‌باشد و گیاه کاملاً دگرگرده‌افشان تلقی می‌شود (در این شرایط گرده یک گل‌های خود را نمی‌تواند بارور کند و فقط گل‌های بوته‌های دیگر همان گونه را می‌تواند بارور نماید). به این مفهوم که امکان تولید زیگوت در اثر خودگرده‌افشانی وجود ندارد. با توجه به مقدار شاخص خودناسازگاری می‌توان نتیجه‌گیری کرد که گونه‌های مورد بررسی هم از طریق خودگرده‌افشانی و هم از طریق دگرگرده‌افشانی تولید بذر می‌نمایند.

بحث

نتایج حاصل از گرده‌افشانی نشان داد که تعداد بذر در گل‌آذین در حالت دگرگشنی در مرزه سهندی اندکی نسبت

مرزه بختیاری نسبت به مرزه سهندی آسانتر انجام می‌گردد. مقایسه شکل گل‌ها بیانگر آن است که در گل‌های مرزه بختیاری، موقعیت قرارگیری کلاله نسبت به پرچم‌ها پایین‌تر یا هم‌سطح می‌باشد. در حالی‌که در مرزه سهندی در بیشتر موارد طول خامه بلندتر از میله پرچم بوده و از آنجایی‌که حرکت رو به بالای گرده‌ها در مرزه سهندی با فراوانی کمتر به وقوع می‌پیوندد، بنابراین میزان تشکیل بذر حاصل از خودگرده‌افشانی در مرزه سهندی کمتر بوده است.

از کاربردهای قابل پیش‌بینی برای نتایج این تحقیق، تولید لاین‌های برتر از طریق برنامه‌های خودگشنی مصنوعی و هیبریداسیون بین و یا درون گونه‌ایست. چنین هیبریدهایی قابلیت بالاتری در تولید متابولیت‌های ثانویه مفید مانند ترپنوئیدها خواهند داشت و علاوه بر آن در برابر تنش‌های محیط‌زیستی و غیرزیستی از سطح مقاومت بیشتری برخوردار خواهند بود. در نتیجه امکان اهلی‌سازی و توسعه سطح زیر کشت این گیاه به مناطق دارای شرایط اقلیمی متنوع‌تر در کشور فراهم خواهد شد.

منابع مورد استفاده:

- Atlan, A., Gouyon, P. H., Fournial, T., Pomente, D. and Couvet, D. (1992), Sex allocation in a hermaphroditic plant: the case of gynodioecy in *Thymus vulgaris* L. *Journal of Evolutionary Biology*, 5: 189-203. Doi:10.1046/j.1420-9101.1992.5020189.x
- Bateman, A. J. 1956. Cryptic self-incompatibility in the wallflower: *Chieranthus chieri* L. *Heredity* 10: 257-261.
- Cruden, R.W. (1977). Pollen/ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. *Evolution* 31: 32-46.
- Dafni, A. (1992). *Pollination Ecology: A Practical Approach*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Ehdaei, B. (1993). *Plant Breeding*, third edition. Shahid Chamran University Press, Ahvaz, 662pp (In Persian).
- Erdtman, G. 1969. *Handbook of Palynology: Morphology, Taxonomy, Ecology*. Munksgaard; Copenhagen, Denmark. 486 pp.
- Jamzad, Z. 2009. *Thymus and Satureja species of Iran*, Research Institute of Forest and Rangelands

نوع گل‌هایی که دارای پرچم‌های کوتاه هستند و در فصل زمستان ظاهر می‌شوند. در فصل تابستان نیز گل‌هایی که دارای پرچم بلند هستند ظاهر می‌شوند. در حقیقت گیاه با چنین راهبردی حداکثر بذر را تولید می‌کند (Nasimi Doost Azgomi et al., 2018). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که گیاهان در جهت سازگاری به محیط رشدشان سیستم‌های تولیدمثلی خود را تغییر می‌دهند. در این مطالعه با وجود تنوع قابل ملاحظه‌ای که در اندام‌های زایشی گل‌ها و نوع قرار گرفتن پرچم‌ها و کلاله نسبت به یکدیگر دیده شد ولی بیشتر گل‌ها دارای ساختار مشابه بوده، به این ترتیب که اندازه کلاله در آنها بلندتر از پرچم بود.

مشاهدات ما نشان داد که دو گونه مرزه مورد مطالعه سه مرحله را در جریان گرده‌افشانی پشت سر گذاشتند. در مرحله اول، بساک‌ها رسیده و گرده‌ها آزاد و در دسترس حشرات گرده‌افشان و یا باد بودند، در حالی‌که کلاله هنوز نرسیده بود. در این مرحله، حرکت گرده توسط گرده‌افشان‌ها در درون یک گل منجر به خودگرده‌افشانی نمی‌شود ولی از آنجایی‌که در مرزه گل‌آذین به‌طور مرتب در حال رشد و گلدهی دوباره می‌باشد، در صورتی‌که حشرات از گل‌های بالایی به گل‌های پایینی همان بوته حرکت نمایند منجر به خودگرده‌افشانی در یک بوته می‌گردد.

در مرحله دوم، زبانه‌های کلاله باز شده و پذیرای دانه‌های گرده هستند ولی دسترسی به دانه‌های گرده بستگی به نحوه گرده‌افشانی دارد. در این مرحله امکان انتقال گرده از هر گلی وجود دارد. سومین مرحله مرحله‌ای است که به‌طور اتفاقی در جریان است و در آن زبانه‌های کلاله بسته هستند ولی ممکن است در معرض تماس با گرده‌ای باشد که هنوز در پرچم قرار دارد یا بر روی گلبرگ‌ها افتاده است. این مثالی از تأخیر در خودگرده‌افشانی اختیاری است که علت آن کاهش عوامل گرده‌افشان می‌باشد.

بنابراین به نظر می‌رسد خودگرده‌افشانی اختیاری در

- 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 (In Persian).
- 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, medicinal plant. Iranian Journal of Field Crop Science, 49(1): 167-177 (In Persian). Doi: 10.22059/ijfcs.2017.228905.654289
- Shariat, A., Karimzadeh, G., Assareh, M. H., & Hadian, J. (2018b). Metabolite profiling and molecular responses in a drought-tolerant savory, *Satureja rechingeri* exposed to water deficit. 3 *Biotech*, 8(11), 477. Doi: 10.1007/s13205-018-1491-9
- Shariat, A., Karimzadeh, G., Assareh, M. H., Loureiro, J. (2018c). Relationships between genome size, ecological and morphological traits in five *satureja* (lamiaceae) species. Iranian Journal of Botany, 24 (2): 163-173. Doi: 10.22092/ijb.2018.122705.1211
- Silva, J. L., Brennan, A. C., & Mejías, J. A. (2016). Population genetics of self-incompatibility in a clade of relict cliff-dwelling plant species. *AoB Plants*, (May), plw029. Doi:10.1093/aobpla/plw029
- Singh M. B., O'Neill, P. M.; Knox, R. B. (1985). Initiation of postmeiotic beta-galactosidase synthesis during microsporogenesis in oilseed rape. *Plant Physiology*, 77: 225-228.
- Subaşı, Ü., & Güvensen, A. (2011). Breeding systems and reproductive success on *Salvia smyrnaea*. *Turkish Journal of Botany*, 35: 681–687. Doi:10.3906/bot-1012-105
- Tandon, R., Manohara, T. N., Nijalingappa, B. H. M., & Shirvanna, K. R. (2001). Pollination and pollen-pistil interaction in oil palm, *Elaeis guineensis*. *Annals of Botany*, 87: 831–838.
- Therios, L. (2009). *Olives*. Oxford UK. CABI Press. 256p.
- Trognitz B. R. (1991). Comparison of different pollen viability assays to evaluate pollen fertility of potato dihaploids. *Euphytica*, 56: 143-148.
- Weimark, R. (1963). *Sklnes flora*. Lund. Institute of Genetic, University of Lund, Sweden.
- Westerkamp C, Claßen-Bockhoff R. (2007). Bilabiate flowers: the ultimate response to bees? *Annals of Botany*, 100: 361–374.
- publication, 171 pp (In Persian).
- Khatun S. T., Flowers J. (1995). The estimation of pollen viability in rice. *Journal of Experimental Botany* 46: 151-154.
- Koseva, B. , Crawford, D. J., Brown, K. E., Mort, M. E. and Kelly, J. K. (2017), The genetic breakdown of sporophytic self-incompatibility in *Tolpis coronopifolia* (Asteraceae). *New Phytol*, 216: 1256-1267. doi:10.1111/nph.14759
- Letswaart, J.H. (1980). A taxonomic revision of genus *Origanum* (Labiatae). PhD Thesis, Leiden Botanical Series 4. Leiden University Press, The Hague.
- Nasimi Doost Azgomi, R., Zomorodi, A., Nazemyieh, H., Fazljou, S. M. B., Sadeghi Bazargani, H., Nejatbakhsh, F., Ahmadi AsrBadr, Y. (2018). Effects of *Withania somnifera* on Reproductive System: A Systematic Review of the Available Evidence. *BioMed Research International*, Article ID 4076430, 17p. Doi:10.1155/2018/4076430
- Nettancourt, D. (1977). Incompatibility in angiosperms. New York, Springer Verlag, 122p.
- Norton J. D. (1966). Testing of plum pollen viability with tetrazolium salts. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 89: 132-134.
- Ollerton J, Winfree R, Tarrant S. (2011). How many flowering plants are pollinated by animals? *Oikos* 120:321–326.
- Reith M, Baumann G, Claßen-Bockhoff R, Speck T. (2007). New insights into the functional morphology of the lever mechanism of *Salvia pratensis*. *Annals of Botany* 100: 393–400.
- Rodríguez-Pérez, J. and Traveset, A. (2016). Effects of flowering phenology and synchrony on the reproductive success of a long-flowering shrub, *AoB PLANTS*, 8, 1- plw007, Doi:10.1093/aobpla/plw007
- Sanchez, A.M., Albert, M.J., Rodri'guez, M., Escudero, A. (2012). Extended flowering in a Mediterranean shrub: seasonal variability in seed quality and quantity. *Flora*, 207:821–827.
- Sefidkon, F., Jamzad, Z., Barazandeh, M.M. (2005). Essential oil of *Satureja bachtiarica* Bunge, a potential source of carvacrol. *Iran. J. Med. Aromatic Plants*, 4: 425–439.
- Shariat, A., Karimzadeh, G., & Assareh, M. H. (2013). Karyology of Iranian Endemic *Satureja* (Lamiaceae) Species. *Cytologia*, 78(3): 305–312. doi:10.1508/cytologia.78.305.
- Shariat, A., Karimzadeh, G., & Assareh, M. H. and

Investigation of pollination system and self-incompatibility in two species of *Satureja sahendica* and *S. bachtiarica*

A. Shariat¹ and F. Sefidkon²

1* - Corresponding author, Ph.D., Research Institute of Forests and Rangelands of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, I.R. Iran. Email: shariat@rifr-ac.ir

2- Prof., Research Institute of Forests and Rangelands of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, I.R. Iran.

Received: 11.11.2018

Accepted: 28.02.2019

Abstract

Awareness of the pollination system and the amount of self-incompatibility of plant species is the first step in choosing appropriate breeding method. This study was carried out to determine the rate of self-incompatibility and the amount of self and cross pollination of *Satureja sahendica* and *S. bachtiarica*. For this purpose, paper bags were used for self-pollination treatments, while in control treatment, flowers were allowed to receive pollens from other genotypes. The pollens viability and stigma receptivity were also determined. Flower morphology such as flower length, calyx length, corolla length, anther length, style length, peduncle length, reproductive leaf height, position of anthers relative to each other, position of style relative to stigma, the number of pollen and ovule were determined. Self-incompatibility indices in *S. bachtiarica* and *S. sahendica* were 96 and 79%, respectively. The results of this study indicated that the amount of self and cross pollination could be a promising way to produce hybrid seeds through inter and intera species breeding. Practical results of this study that can be used in domestication and breeding improve varieties of these two mentioned species. In both species anthesis started in the fifth and sixth days after flower opening. At this point, the stigmas are at the peak of acceptance that can be pollinated by pollens for two days having the highest survival rate.

Key words: Pollen viability, Style receptivity, Selfing, Flower morphology