فصلنامه (علمی – پژوهشی)

زیست شناسی تکوینی

سال چهاردهم، شماره ۲، بهار ۱۴۰۱ ص. ۴۲-۳۵

مقاله پژوهشی

بررسی پایداری فیتوشیمیایی *Satureja bachtiarica* بعد از حفاظت فراسرد با استفاده از پروتکل کاهش رطوبت

لیلا غفارزاده نمازی

استادیار گروه علوم گیاهی وگیاهان دارویی، دانشگاه محقق اردبیلی، ایران

* (نویسنده مسئول مکاتبات): namazi83@yahoo.com

تاریخ دریافت: آبان ۱۴۰۰ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۴۰۱

چکیده

در سال‌های اخیر در کشور ما نیز توجه زیادی به گیاهان دارویی شده است. از آنجا که گونه‌های مختلف گیاه مرزه بر اثر برداشت بی‌رویه از عرصه‌های طبیعی توسط انسان، تنش‌های زنده و غیرزنده تهدید شده و کشت کار پی‌درپی یک گونه باعث کاهش تنوع ژنتیکی آنها می‌گردد، حفظ ذخایر ژنتیک این گونه‌ها از اهمیت بالایی برخوردار است. تکنیک‌های ذخیره سازی بذر در دمای بسیار پایین (۱۹۶- درجه سانتی‌گراد) با استفاده از نیتروژن مایع که یکی از راه‌های حفظ ژرم پلاسم با هزینه بسیار پایین و بدون از دست دادن قابلیت زنده مانی می‌باشد، زمانی مفید خواهد بود که منجر به تغییرات در محتوی اسانس گیاه مورد نظر نگردد. به منظور بررسی پایداری فیتوشیمیایی و مقایسه نوع و مقدار ترکیبات شناسایی شده گیاه*Satureja bachtiarica*، بذرها به مدت ۱ هفته در نیتروژن مایع در دمای ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. ساقه چه بذور کشت شده در شرایط درون شیشه‌ای جمع آوری و در آزمایشگاه خشک شدند. اسانس توسط روش تقطیر با آب جدا شده و ترکیبات با استفاده از GC و GC-MS تجزیه و تحلیل شدند. نتایج نشان داد که ۱۲ عنصر در اسانس گیاهان نگهداری شده در شرایط فراسرد شناسایی شدند و تفاوتی بین اسانس‌های استخراج شده از گیاهان حاصل از بذور شاهد و حفاظت فراسرد از لحاظ تعداد، نوع و درصد ترکیبات موجود وجود ندارد. بنابراین این گونه در معرض خطر با تکنیک نگهداری در شرایط فراسرد می‌تواند برای یک دوره طولانی مدت حفظ شوند.

کلیدواژه‌ها: مرزه، اسانس، نگهداری در شرایط فراسرد.

مقدمه

جنس مرزه (*Satureja*) یکی از جنس‌های خانواده نعنا (*Lamiaceae*) متعلق به زیر خانواده *Nepetoideae* و قبیله *Mentheae* می‌باشد. این جنس از نظر فیلوژنیتکی به جنس‌های *Gonstscharovia*، *Calamintha*، *Acinos*، *Clinopodium* و *Micromeria* نزدیك می‌باشد. به عقیده پلینی نام *Satureja* از کلمه لاتین Saturare به معنی Saturate (اشباع شدن) گرفته شده و این بدلیل استفاده از این گیاهان در غذا می‌باشد [۱].

گونه‌های این جنس بیشتر در دامنه‌های کوهستانی مناطق شمال، شمال غربی، شمال شرقی، مرکزی و جنوب غربی ایران

پراکندگی داشته و روی صخره‌های آهکی و یا دامنه‌های سنگلاخی می‌رویند. گونه‌های مرزه بومی مناطق معتدله گرم و مناطق مدیترانه‌ای هستند[۲.]

امروزه تعداد زیادی از داروهای ضد قارچی و ضد باکتریایی موثر برای درمان عوامل عفونی به کار گرفته می شوند، اما با توجه به تنوع ژنتیکی ایجاد شده در عوامل بیماریزای میکروبی و پیدایش سویه‌های مقاوم و همچنین عوارض جانبی ناشی از مصرف این داروها، جایگزین کردن آنها توسط داروهای ضد میکروبی با منشاء گیاهی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار بوده و سبب تحقیقات در زمینه یافتن داروهای گیاهی بدون عوارض جانبی شده است. بنابراین با توجه به تنوع آب و هوایی و تنوع فلور گیاهی در ایران، شناسایی مواد موثر گیاهان بومی کشور و استخراج آنها به منظور تولید انبوه و در سطح صنعتی آنها اهمیت زیادی پیدا کرده است [۳].

عصاره متانولیک *S. bachtiarica* می‌تواند در درمان بیماری آلزایمر موثر باشد [۴].

در بررسی اثرات ضد میکروبی اسانس گونه *S. bachtiarica* در مرحله برداشت نشان داد که اسانس *S. bachtiarica* در مرحله قبل از گلدهی دارای اثرات ضد میکروبی قابل ملاحظه‌ای هستند. این خواص به دلیل وجود ترکیبات فنلی کارواکرول و تیمول در اسانس این گیاهان است و می‌توانند به عنوان جایگزینی مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌های سنتزی که مقاومت باکتری‌ها به آنها روز به روز در حال افزایش است به کار روند [۵].

نگهداری از منابع ژنتیکی گیاهی برای حفظ امنیت غذایی و تنوع زیستی ضروری می‌باشد. تنوع ژنتیکی امکان انتخاب و اصلاح گیاهان زراعی جدید و پرمحصول، مقاوم به تنش‌های زیستی و محیطی را فراهم می‌نماید. نگهداری به صورت Ex situ روشی عمومی است که در مورد نگهداری جمعیت‌های حفاظت شده و در معرض خطر انقراض مورد استفاده قرار می‌گیرد. نگهداری بذرها در بانک بذر، بانک‌های گیاهی مزرعه‌ای، باغ‌های گیاهشناسی، نگهداری DNA و گرده گیاهان، از جمله روش‌های مورد استفاده در نگهداری گیاهان به صورت Ex situ می‌باشند [۶].

نگهداری از ذخایر ژنتیکی را می‌توان هم در زیستگاه‌های طبیعی گیاهان (In situ) و هم خارج ار زیستگاه‌های طبیعی آن‌ها (Ex situ) انجام داد [۷]. حفاظت گیاه در رویشگاه می‌تواند بسیار پر هزینه باشد [۸].

در کنار روش‌های مرسوم و کلاسیك حفاظت ازگونه‌های منابع طبیعی مانند ایجاد باغ‌های گیاه شناسی ملی و منطقه‌ای، بانك ژن بذرهای گونه‌های جنگلی و مرتعی و عرصه‌های حفاظت شده جنگلی، استفاده از توانمندی‌های بیوتکنولوژی راهکاری منحصر به فرد برای حفاظت از گونه‌های گیاهی است که به سرعت در حال توسعه می‌باشد. یکی از این توانمندی‌ها، نگهداری بذرها و اندام‌های رویشی در شرایط فراسرد یا Cryopreservation است [۹].

فنآوری فراسرد روش ذخیره‌سازی بذرها و اندام‌های گیاهی برای مدت زمان بسیار طولانی است [۱۰]. با این فنآوری می توان بسیاری از بذرها، اندام‌های رویشی، سلول و دانه گرده گیاهی را در دمای $196^{o}C$ -یا محیط ازت مایع که در آن فعالیت‌های متابولیکی و فیزیولوژیك بذر و اندام متوقف شده است را برای مدت زمان بسیار طولانی حفظ نمود [۱۱].

نگهداری در شرایط فراسرد برای تعدادی گیاهان دارویی نظیر *Ginkgo biloba* ، [۱۲] *Anemarrhena asphodeloides*، [۱۳] *Dioscorea bulbifera* [ ]، [۱۴] با موفقیت به کار برده شده است.

از مزایای این تکنیک می‌توان به حفظ ثبات ژنتیکی پایه مادری، کاهش هزینه‌های حفاظت در شرایط مزرعه، نسخه پشتیبان برای گیاهانی که به صورت کلون تکثیر می‌شوند و نیز به عنوان یک سیستم حفاظتی برای کشت‌های مهم اشاره کرد [۱۵].

تلاش جهت حفاظت از ذخایر گیاهی با روش نگه‌داری در شرایط فراسرد به شرط حفظ پایداری فیتوشیمیایی ریزنمونه بذر گونه دارویی مورد مطالعه که در معرض خطر انقراض قرار دارند، از اهداف این تحقیق می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

بذر گونه *S. bachtiarica* از استان یزد در ۱۲km جنوب غربی شهرستان مهریز با طول جغرافیایی "۵۶ ′۱۸ ۵۴، عرض جغرافیایی "۱ ′۳۱ ۳۱ و ارتفاع ۲۳۵۷ متر از سطح دریا جمع‌آوری شد. در شرایط درون شیشه‌ای قسمت‌های هوایی گیاه رشد کرده از بذور شاهد و بذور نگهداری شده در شرایط فراسرد *S. bachtiarica* در مرحله گلدهی برداشت گردید.

جدول ۱- ویژگی‌های بذر گونه *S. bachtiarica*

گونه گیاهی	محل جمع‌آوری	موقعیت جغرافیایی	درصد محتوای رطوبت (پس از آبگیری)	درصد محتوای رطوبتی (قبل از آبگیری)	وزن هزار دانه (گرم)
S. Bachtiarica	استان یزد در ۱۲ کیلومتری جنوب غربی شهرستان مهریز	طول جغرافیایی "۵۶ '۱۸ ۵۴، عرض جغرافیایی "۱ '۳۱ ۳۱	۳/۸۸	۵/۶۶	۰/۲

حفاظت فراسرد با پروتکل کاهش رطوبت

قبل از انتقال نمونه های بذر در نیتروژن مایع (۱۹۶- درجه سانتیگراد)، پروتکل کاهش رطوبت [۱۶]، برای حفاظت فراسرد انجام شد.

برای تعیین محتویات آب، بذور وزن شدند و در آون به مدت ۱۷ ساعت در دمای ۱۰۳ درجه سانتی گراد گذاشته شدند. مقدار آب بر اساس وزن تازه (FW) محاسبه شد. به منظور کاهش رطوبت، بذور در یک دسیکاتور حاوی سیلیکاژل قرار داده شده و در آون به مدت ۱۹ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد قرار گرفتند (جدول ۱). برای جلوگیری از جذب رطوبت محیط توسط بذرهای آبگیری‌شده، درب ظروف محکم بسته شد. در ادامه، بذرها بلافاصله درون کرایوویال قرار داده شدند و مستقیماً وارد ازت مایع گردیدند. بذور به عنوان شاهد به کرایوویال‌ها منتقل شده و در یخچال (دمای ۴°C) به مدت یک هفته نگهداری شدند.

ذوب شدن

. به منظورگرم کردن سریع، نمونه‌ها بلافاصله از تانك ازت خارج و در بن ماری ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰۰ ثانیه قرار داده شدند [۱۷].

پس تیمار و کشت بذرها

بذور به محیط کشت مایع MS ساکارز ۱/۲ مولار منتقل شده و بمدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۵°C نگهداری شدند. عمل ضدعفونی بذرها پس از خروج از شرایط تیمار انجام گرفت تا از مرطوب شدن بذرها قبل از اعمال تیمار و متعاقبا آسیب دیدن در هنگام نگهداری دمای فراسرد، جلوگیری شود.

بذور با استفاده از هیپوکلریت ۱/۵ درصد (V/V) بمدت پنج دقیقه ضدعفونی سطحی شده و پس از سه بار شستشو با آب مقطر و سترون، در درون ویال‌های حاوی محیط کشت MS با نصف نیترات کشت شدند. سپس نمونه‌ها در اتاق رشد در دمای ۲۵C با فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگه‌داری شدند.

تهیه گیاهچه‌ها وجداسازی اسانس

شاخه‌های گیاهان رشد کرده در شرایط درون شیشه ای برداشت شد و در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد در زیر سایه خشک شدند.

اسانس نمونه‌های مذکور پودر شد و توسط دستگاه کلونجر و به روش تقطیر با آب به مدت ۳ ساعت استخراج شد. اسانس‌های حاصل پس از رطوبت‌زدایی با سولفات سدیم تا زمان تزریق به دستگاه گازکروماتوگرافی در ظرف دربسته و در یخچال نگهداری شدند [۱۸].

روش تجزیه و تحلیل و شناسایی اسانس

به منظور جداسازی و شناسایی ترکیبات اسانس، کروماتوگرافی گاز و کروماتوگرافی گاز متصل به طیف سنج جرمی (GC / MS) مورد استفاده قرار گرفت. دستگاه GC مجهز به ستون Ph-5 با طول ۱۰ متر و قطر داخلی ۰/۱ میلی‌متر و ضخامت لایه فاز ساکن ۰/۴ میکرومتر است. برنامه‌ریزی حرارت ستون از ۶۰ درجه سانتی گراد تا دمای اولیه ۲۸۵ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۸۰ درجه سانتیگراد افزایش یافته است. دمای محفظه تزریق در دمای ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. دتکتور از نوع FID بوده و از گاز هلیوم به عنوان گاز حامل استفاده شد که با سرعت ۰/۵ میلی‌متر دردقیقه در طول ستون حرکت می کرد.

خصوصیات دستگاه GC / MS

از گاز کروماتوگراف شیمادزو (Shimadzu) مدل 9A متصل شده با طیف جرمی مدل واریان ۳۴۰۰ از نوع تله یونی مجهز به ستون DB-5 با طول ۳۰ متر و ضخامت لایه فاز ساکن ۰/۲۵ میلی‌متر استفاده شد. برنامه ریزی حرارتی مشابه با دستگاه GC

بود. دمای محفظه تزریق در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد بیشتر از دمای نهایی ستون تنظیم شد و هلیوم به عنوان گاز حامل با سرعت ۳۱/۵ سانتی‌متر بر ثانیه اعمال شد. زمان اسکن کردن ۱ ثانیه، انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت و ناحیه جرمی ۳۴۰-۴۰ بود.

شناسایی ترکیبات اسانس

پس از تزریق اسانس‌ها به دستگاه GC و پیدا کردن مناسب‌ترین برنامه حرارتی ستون، اسانس‌های به دست آمده با دی کلرومتان رقیق شده و به دستگاه GC/MS تزریق و طیف‌های جرمی و کرواتوگرام‌های مربوطه به دست آمد. سپس با استفاده از زمان بازداری و شاخص بازداری کواتس، بررسی طیف‌های جرمی و مقایسه این طیف‌ها با ترکیبات استاندارد و استفاده از اطلاعات موجود در نرم افزار SATURN، ترکیب‌های تشکیل دهنده اسانس‌ها، به صورت کیفی و کمی شناسایی شدند.

نتایج

نتایج شناسایی ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس *S. bachtiarica*

ترکیبات اسانس گونه *S. bachtiarica* در تیمارهای حفاظت فراسرد و شاهد با استفاده از طیف‌های جرمی به دست آمده از دستگاه GC/MS و مقایسه این طیف‌ها با طیف های موجود در کتابخانه کامپیوتری و با کمک گرفتن از شاخص بازداری مشخص شد. نتایج بررسی پایداری فیتوشیمیائی و مقایسه نوع و مقادیر ترکیبات اسانس گونه *S. bachtiarica* پس از حفاظت فراسرد در مقایسه با شاهد ۱۲ ترکیب شناسایی شده نشان داد (جدول ۲).

ترکیبات اصلی اسانس در تیمار حفاظت فراسرد شامل کارواکرول (۷۰/۵٪)، γ - ترپینن (۱۰/۹٪)، پارا- سیمین (۶/۹٪)، لینالول (۴/۳%)و E -کاریوفیلن (۲/۵٪) بود.

بیشترین ترکیبات اسانس گونه *S. bachtiarica* در شاهد شامل کارواکرول (۶۸/۳٪)، γ -ترپینن (۱۲/۳٪)، پارا- سیمین (۶/۳٪)، لینالول (۴/۴%)و E - کاریوفیلن (۲/۷٪) بود. شکل‌های ۱ و ۲ کروماتوگرام‌های ترکیبات جدا شده از نمونه‌های شاهد و تیمار را نشان می‌دهند.

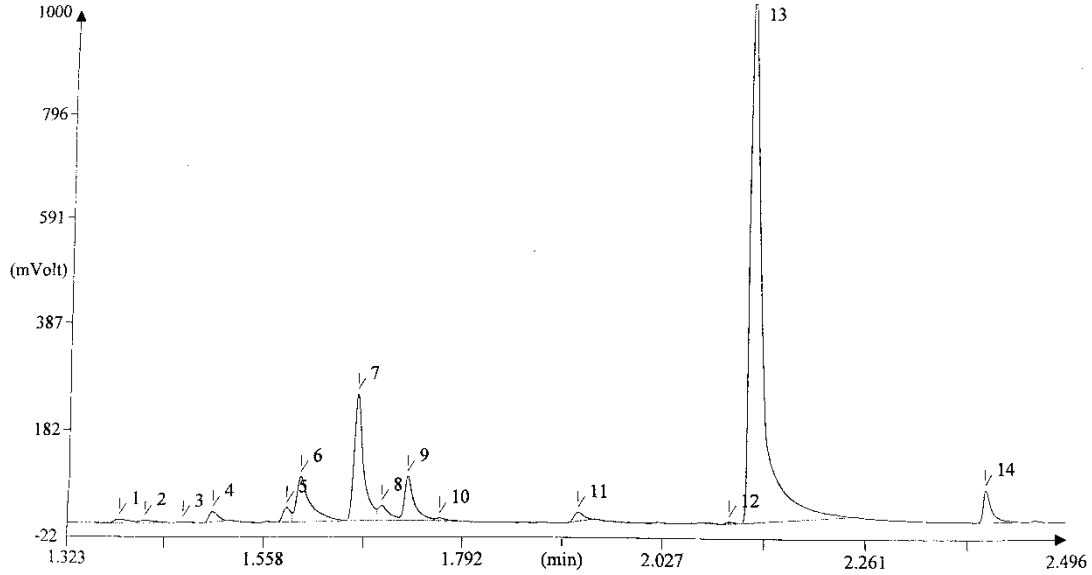
مقایسه ترکیبات به دست آمده از اسانس تیمار حفاظت فراسرد و شاهد نشان داد که قرار دادن بذور در ازت مایع تاثیری بر نوع ترکیب اسانس ندارد و اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید.

بیشترین درصد ترکیب اسانس در شاهد در کارواکرول به عنوان اولین ترکیب با مقدار ۶۸/۳% در نظر گرفته شد و تفاوت معنی‌داری با مقدار کارواکرول حاصل از اسانس در تیمار حفاظت فراسرد نداشت.

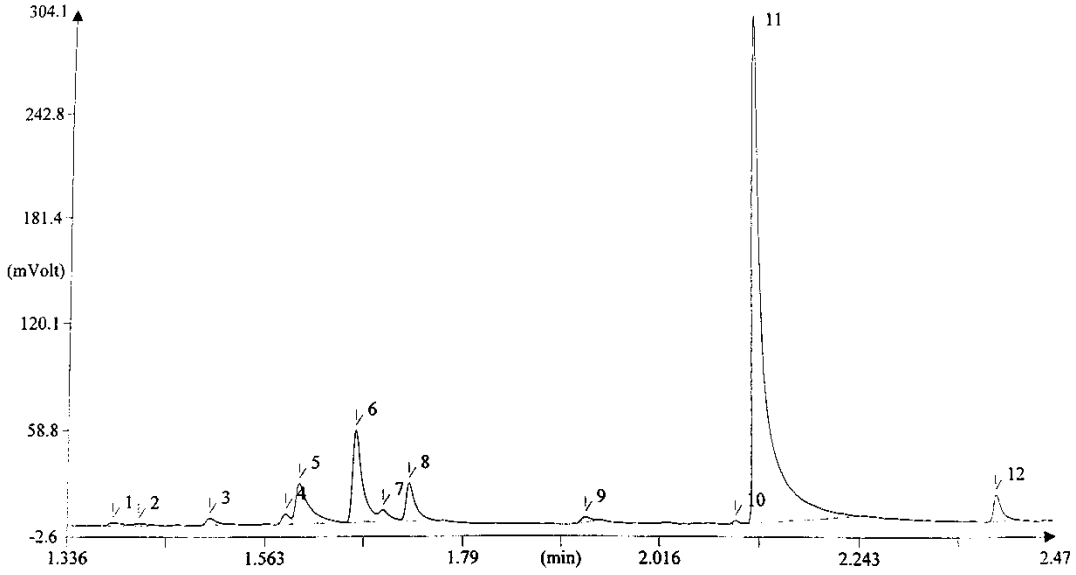
γ - ترپینن به عنوان دومین ترکیب در تیمار شاهد با مقدار ۱۲/۳٪ و در تیمار حفاظت فراسرد ۱۰/۹٪ محاسبه گردید. علاوه بر این، پارا- سیمین در شاهد با مقدار ۶/۳٪ و در تیمار حفاظت فراسرد ۶/۹٪، لینالول در شاهد با مقدار ۴/۴% و در تیمار حفاظت فراسرد ۴/۳% و E -کاریوفیلن در شاهد با مقدار ۲/۷٪ و در تیمار حفاظت فراسرد ۲/۵٪ محاسبه شد.

جدول ۲- ترکیبات شناسایی شده اسانس گونه *S. bachtiarica* در تیمار حفاظت فراسرد و شاهد

نام ترکیب	شاخص بازداری	درصد ترکیب کرایو	درصد ترکیب شاهد
α-Thujene	۹۴۴/۳	۰/۵	۰/۵
α-Pinene	۹۵۷	۰/۳	۰/۴
Eamphene	۹۷۳	-	۰/۱
β-Pinene	۹۸۹	۰/۸	۰/۹
α-Terpinene	۱۰۳۹	۰/۹	۱/۱
P-Cymene	۱۰۴۹	۶/۹	۶/۳
γ-Terpinene	۱۰۸۱	۱۰/۹	۱۲/۳
Terpinolene	۱۰۹۵	۱/۵	۱/۷
Linalool	۱۱۰۸	۴/۳	۴/۴
Terpinen-4-ol	۱۲۱۶	۰/۵	۰/۸
Thymol	۱۳۱۰	۰/۲	۰/۲
Carvacrol	۱۳۲۴	۷۰/۵	۶۸/۳
E-Caryophyllene	۱۴۸۲	۲/۵	۲/۷



شکل ۱ - کروماتوگرام اسانس گونه *S. bachtiarica* (شاهد)



شکل ۲ - کروماتوگرام اسانس گونه *S. bachtiarica* (تیمار حفاظت فراسرد)

مطالعه حفاظت فراسرد گونه*S. bachtiarica* نشان داد که بذور پس از خارج شدن از ازت مایع مانند نمونه‌های شاهد قادر به جوانه زدن و رشد سالم هستند. بررسی فیتوشیمیایی گونه *S. bachtiarica* پس از نگهداری در شرایط فراسرد نشان داد که فقدان تغییرات فیتوشیمیایی واضح بوده و نگهداری در شرایط فراسرد تاثیری روی خصوصیات فیتوشیمیایی گیاه مورد نظر نداشته است.

بحث

برخي از مطالعات انجام شده گزارش کردند که در دماهاي بسیار پایین، متابولیسم گیاهان و فعالیت‌های تقسیم سلولي به تاخیر می‌افتد و مواد گیاهی برای مدت طولانی بدون هیچ تغییری باقی می ماند. به این ترتیب، حفاظت فراسرد منجر به حفظ ثبات ژنتیکی ژرم پلاسم شد [۱۹]. باززایی و پایداری ژنتیکی گیاهان برای یک دوره طولانی حفظ می شود [۲۰].

شواهدی از تغییرات مورفولوژیکی، سیتولوژیک و بیوشیمیایی یا مولکولی ممکن است در گیاهان پس از حفاظت فراسرد وجود نداشته باشد [۲۱].

بسیاری از گزارش‌ها در مورد پایداری ژنتیکی گیاهان پس از حفاظت فراسرد وجود دارد [۲۴-۲۲].

اولین گزارش برای ارزیابی ژنتیکی حفاظت فراسرد با استفاده از روش کپسوله- آبگیری و روش کپسوله-شیشه‌ای شدن به گونه *Ziziphora tenuior* L که در اردن به صورت وحشی رشد می کند، مربوط می‌شود. اثبات پایداری ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای مولکولی AFLP مورد مطالعه قرار گرفت. بررسی پایداری ژنتیکی بافت نگهداری شده در شرایط فراسرد و شاهد گونه *Ziziphora tenuior* L. به وسیله AFLP نشان داد که تفاوت معنی داری بین تیمار حفاظت فراسرد و شاهد وجود ندارد [۲۵]. بررسی پایداری ژنتیکی و مورفولوژیکی بین شاهد و تیمار حفاظت فراسرد دو مرحله ای جوانه دورمانت سیب نشان داد که هیچ اختلافی در ویژگی‌های مورفولوژیکی از جمله طول ساقه، شکل برگ، نسبت طول و عرض برگ و طول ریشه ما بین شاهد و تیمار حفاظت فراسرد وجود نداشت. همچنین در بررسی پایداری ژنتیکی با مارکر ISSR بین شاهد و تیمار حفاظت فراسرد دو مرحله ای، مارکرهای ISSR ۲۵۳ باند با مصرف ۴ پرایمر تولید کردند. این مارکرها هیچ پلی‌مورفیسم بین شاهد و تیمار حفاظت فراسرد دو مرحله ای جوانه دورمانت سیب آشکار نکردند. با استفاده از چندین نشانگر مورفولوژیکی و مولکولی هیچ تغییرات ژنتیکی در شاخه‌ها مشاهده نکردند. پس حفاظت فراسرد دو مرحله‌ای تاثیری بر پایداری ژنتیکی و مورفولوژیکی جوانه دورمانت سیب نداشت. در نتیجه استفاده از حفاظت فراسرد دو مرحله‌ای در مورد جوانه های به خواب رفته یک روش عملی برای ذخیره‌سازی طولانی مدت ژرم‌پلاسم سیب است [۲۶]. همچنین هیچ گونه تفاوت مورفولوژیکی ما بین گیاهان نگهداری شده در شرایط فراسرد و شاهد گونه *Rubus grabowskii* وجود ندارد [۲۷].

بررسی پایداری ژنتیکی (با استفاده از مارکر MSAP) جوانه نعناع بعد از هر مرحله پروتکل حفاظت فراسرد با روش کپسوله-دهیدراتاسیون نشان داد که اضافه کردن آنتی‌اکسیدانت (اسید اسکوربیک) در محیط کشت همراه با غلظت بالای شکر هیچ تاثیری بر پایداری ژنتیکی نداشت [۲۸]. اگرچه برخی از تغییرات ژنوتیپ بین گیاهان نگهداری شده در شرایط فراسرد و شاهد دیده شده است، به این معنی نیست که این تغییرات به فرایند حفاظت فراسرد مربوط می شود بلکه می‌تواند به کشت بافت گیاهی و مراحل باززایی مربوط باشد [۲۱]. مشکلات ناشی از بی‌ثباتی ژنتیکی و خطر از بین رفتن مواد بیولوژیکی می‌تواند به آلودگی یا خطای انسانی در طول واکشت مربوط شود [۲۹].

با توجه به برخی از تغییرات ژنوتیپ بین گیاهان نگهداری شده در شرایط فراسرد و شاهد نیاز به تایید یکنواختی ژنتیکی مواد گیاهی پس از نگهداری در شرایط فراسرد داشت [۳۰]. برای شناسایی هرگونه تنوع ژنتیکی در مواد گیاهی، از چندین تکنیک مولکولی استفاده شده است [۲۱]. RAPD و پلی‌مورفیسم طولی قطعه تکثیر شده (AFLP) متداول‌ترین مارکرهای مورد استفاده در این دامنه بودند [۳۰].

بررسی پایداری فیتوشیمیایی گیاه آویشن *Thymus moroderi* پس از نگهداری در شرایط فراسرد نشان داد که فقدان تغییرات فیتوشیمیایی واضح بوده و نگهداری در شرایط فراسرد تاثیری روی خصوصیات فیتوشیمیایی گیاه مورد نظر نداشته است که با نتایج حاصل از این پژوهش مطابقت دارد [۳۱]. شهبازی و همکاران، (۲۰۱۷) به منظور مقایسه نوع و میزان ترکیبات فیتوشیمیایی شاخه‌های گلدار گیاه مرزه *Satureja rechingeri* که در شرایط فراسرد قرار گرفته بودند، تعداد 41 و 46 ترکیب به ترتیب از اسانس سر شاخه‌های گلدار در شرایط فراسرد و شاهد شناسایی کردند، ترکیبات عمده شامل کارواکرول، پاراسیمن و تیمول بوده و از لحاظ نوع و درصد ترکیبات موجود در اسانس سر شاخه‌های گلدار تفاوت قابل توجهی بین تیمار و شاهد دیده نشد که یافته‌های آن با نتایج حاصل از این پژوهش مطابقت دارد [۱۸].

بررسی پایداری فیتوشیمیایی گونه‌های ذکر شده نشان می دهد که فقدان تغییرات فیتوشیمیایی واضح بوده و نگهداری در شرایط فراسرد تاثیری روی خصوصیات فیتوشیمیایی گیاه مورد نظر نداشته است.

نتیجه‌گیری کلی

بررسی فیتوشیمیایی *S. bachtiarica* پس از نگهداری در شرایط فراسرد نشان داد که پایداری فیتوشیمیایی پس از ذخیره سازی و

حفاظت فراسرد مورد تایید بوده است. بنابراین از حفاظت فراسرد می توان برای حفظ و ذخیره این گونه ارزشمند و در معرض خطر انقراض استفاده نمود.

سپاسگزاري

از مسئولان محترم گروه مستقل تحقیقات زیست فناوری منابع طبیعی که امکانات مالي و اجرايي را براي انجام اين تحقيق فراهم آورده‌اند، صميمانه تشكر و قدرداني مي‌شود.

References

[1] Jamzad Z. Savory *Thymus* and *Satureja* species of Iran. publication of Research Institute of Forests and Rangelands 2009 171pp

[2] Sefidkon F., Askari F., Sadeghzadeh L. and Oulia P. Antimicrobial Effects Of The Essential Oils Of *Satureja Mutica*, *S. Edmondi* and *S. Bachtiarica* against *Salmonella Paratifi.* Iranian Journal Of Biology Summer 2009 22(2):249-258

[3] Feyzi M.T. Introduction of the *Satureja Bakhtiarica* and its Ecological Characteristic in Esfahan Province. Proceeding of National Iranian Congress of Medical Plants 2002 Iran

[4] Soodi M., Moradi S., Sharifzadeh M. and Saeidnia S. *Satureja bachtiarica* methanolic extract ameliorate beta amyloid induced memory impairment. Research in Pharmaceutical Sciences 2012 7(5):S802.

[5] Sefidkon F, Sadeghzadeh L, Teimouri M, Asgari F and Ahmadi SH. Antimicrobial effects of the essential oils of two *Satureja* species (*S. Khuzistanica* Jamzad and *S. bachtiarica* Bunge) in two harvesting time. Iran J Med Arom Plants 2007 23:174-81(persian)

[6] Rao N.K. Plant Genetic Resources: Advancing conservation and use through biotechnology. African Journal of Biotechnology 2004 3:136-145

[7] Hawksworth D.L. and Bull A.T. Plant Conservation and Biodiversity. Springer 2007 Volume 6, 420 p

[8] Li D.Z. and Pritchard H.W. The science and economics of ex situ plant conservation. Trends in Plant Science 2009 14:614-621

[9] Lambardi M., Benelli C. and Decarlo A. Cryopreservation as a tool for the long-term conservation of woody plant germplasm: development of the technology at the CNR/INVALSA Institute of Florence. The Role of Biotechnology 2005 181-182

[10] Popov A.S., Popova E.V., Nikishina T.V. and Vysotskaya O. N. Cryobank of plant genetic resources in Russian Academy of Sciences. International Journal of Refrigeration 2006 29:403-410

[11] Ozkavukcu S. and Erdemli E. Cryopreservation: basic knowledge and biophysical effects. Journal of Ankara Medical School 2002 24:187-196

[12] Popova E.V., Lee E.J., Wu C.H., Hahn E.J and Paek K.Y. A simple method for cryopreservation of *Ginkgo biloba* callus. Plant Cell Tissue and Organ Culture 2009 97:337–343

[13] Hong S.R and Yin M.H. A simple and efficient protocol for cryopreservation of embryogenic calli of the medicinal plant *Anemarrhena asphodeloides* Bunge by vitrification. Plant Cell Tissue and Organ Culture 2012 109: 287–296.

[14] Hong S.R., Yin M.H., Shao X.H., Wang A.P and Xu W.H. Cryopreservation of embryogenic callus of *Dioscorea bulbifera* by vitrification. CryoLetters 2009 30:64–75

[15] Reed B.M. Plant Cryopreservation: A Practical Guide. Springer 2008 Chap 19. 515pp

[16] Ghaffarzadeh-Namazi L., Babaeian N., Ghamari-zare A and Nematzadeh G.H. Cryopreservation the seeds of the medicinal plant *Satureja bachtiarica* Bunge. International Journal of Biosciences 2015 6(2):24-29

[17] Engelmann F. Use of cryopreservation for plant germplasm long-term conservation, Case history: Oil Palm somatic embryos. International Journal of Refrigeration 1990 13:26-30

[18] Shahbazi Sh., Sefidkon F and Ghamari Zare A. Phytochemical persistence of *Satureja rechengeri* under cryopreservation conditions. Agroecology 2017 13(3):51-58

[19] 19. Panis B and Lambardi M. Status of cryopreservation technology in plant (Crops and forest trees). The role of biotechnology 2005 43-50

[20] Al-Ababneh S., Karam N and Shibli R. Cryopreservation of sour orange (*Citrus aurantium* L.) shoot tips. *In Vitro* Cell and Dev Biol—Plant 2002 38:602-607

[21] Harding K. Genetic integrity of cryopreserved plant cells. Cryoletters 2004 25:3-22

[22] Choudhary R., Chaudhury R., Malik S.K., Susheel K and Digvender P. Genetic stability of mulberry germplasm after cryopreservation by two- step freezing technique. African journal of biotechnology 2013 12(4):5983-5993

[23] Scocchi A., Falici M., Medina R., Olmos S and Mroginski L. Plant recovery of cryopreserved apical meristems- tips of *Melia*

azadarach L. using encapsulation/dehydration and assessment of their genetic stability. Euphytica 2004 135:29- 38

[24] Wang Z., Lie J.Sh., Zhang Ch.W and He Y. X. Analysis genetic stability in *Prunus humilis* Bung plants after cryopreservation twice. Advances in forestry letters 2013 2(4):67-75

[25] Al-Baba H., Shibli R.A., Akash M., Al-Qudah T.S., Tahtamouni R.W and Al-Ruwaiei H. Cryopreservation and Genetic Stability Assessment of Threatened Medicinal Plant (*Ziziphora tenuior* L.) Grown Wild in Jordan. Jordan Journal of Biological Sciences 2015 8(4):247-256

[26] Yi J.Y., Lee G.A., Chung J.W., Lee Y.Y., Kwak J.G and Lee S.Y. Morphological and Genetic Stability of Dormant Apple Winter Buds After Cryopreservation. Korean J. Plant Res 2015 28(6):697-703

[27] Castillo F.V., Bassil V., Wad S and Reed M. Genetic stability of cryopreserved shoot tips of *Rubus* germplasm. *InVitro* Cell and Dev Biol--Plant 2010 46:246-256

[28] Ibaneza M.A., Alvarez-Maria A., Rodriguez-Sanzb H., Kremerb C., Gonzalez-Benitob M. E., Martinb C. Genetic and epigenetic stability of recovered mint apices after several steps of a cryopreservation protocol by encapsulation-dehydration. A new approach for epigenetic analysis Plant Physiology and Biochemistry 2019 143:299–307

[29] Kaviani B. Conservation of plant genetic resources by cryopreservation. AJCS 2011 5:778-800

[30] Micuła A., Tomiczak K and Rybczynski J.J. cryopreservation enhances embryogenic capacity of *Gentianacruciata* (L.) suspension culture and maintains (epi) geneticuniformity of regenerants. Plant Cell Rep 2011 30:565-574

[31] Marco-medina A and Casas JL. RAPD and phytochemical analysis of *Thymus moroderi* plantlets after cryopreservation. Cryoletters 2013 34(2):119- 127