فصلنامه (علمی – پژوهشی)

زیست شناسی تکوینی

سال یازدهم، شماره ۴، پاییز ۱۳۹۸ ص. ۱۶-۹

مقاله پژوهشی

بررسی اثر نگهداری در شرایط فراسرد بر پایداری فیتوشیمیایی گیاه مرزه *Satureja sahendica*

شبنم شهبازی[۱]، عباس قمری زارع[۲*]، فاطمه سفیدکن[۲]، علی اشرف جعفری[۲]، وحید عبدوسی[۱]

[۱] دانشکده کشاورزی، علوم باغبانی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

[۲] موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور. سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

[*] Email: ghamarizare@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۲/۲۹ تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۶/۱۵

چکیده

فن‌آوری انجماد برای نگهداری طولانی‌مدت ژرم‌پلاسم گیاهی از اهمیت زیادی برخوردار است. به‌کارگیری این فن‌آوری برای حفاظت مواد گیاهی زمانی سودمند است که باعث تغییرات در ترکیبات شیمیایی اسانس آن در گیاه نگردد. گیاه مرزه *Satureja sahendica* ازگونه‌های در معرض خطر انقراض در ایران است. حفاظت از موادژنتیکی این گیاهان ارزشمند، لازم و ضروری است. به منظور بررسی اثر نگهداری در شرایط فراسرد بر پایداری فیتوشیمیایی و نوع و میزان ترکیبات شناسایی شده گیاهان حاصل از بذور تیمار شده به مدت یک هفته در نیتروژن مایع (۱۹۶°C-) با گیاهان شاهد اندازه‌گیری شد. نخست سرشاخه‌های گلدار گیاهان حاصل از هر دو نوع بذر جمع‌آوری گردید و پس از خشک‌شدن در محیط آزمایشگاه به روش تقطیر با اب، مورد اسانس‌گیری قرارگرفت، سپس ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس‌ها با استفاده از کروماتوگرافی گازی تجزیه‌ای وگازکروماتوگراف متصل به طیف‌سنج جرمی و محاسبه شاخص بازداری، مورد شناسایی قرارگرفت. تعداد ۱۵ترکیب در اسانس سرشاخه *S. sahendica* قرارگرفته در شرایط فراسرد،شناسایی‌شد. ترکیب‌های عمده در این نمونه، پاراسیمن (۴۳/۳٪)، گاماترپینن (۲۱/۰۵٪)، تیمول (۱۸/۳٪) و کارواکرول (۵/۱٪) بودند. تعداد۱۳ ترکیب در اسانس سرشاخه مرزه *S. sahendica* شاهد، شناسایی شد، که از میان آنها، پاراسیمن (۲۹/۴٪)، تیمول (۲۸/۳٪)، گاماترپینن (۱۹٪) و کارواکرول (۱۴/۵٪) اجزای اصلی اسانس بودند. نتایج نشان داد که از لحاظ نوع و درصد ترکیبات موجود در اسانس تفاوت قابل ملاحظه‌ای بین گیاهان شاهد و گیاهان فراسرد وجود نداشت و با استفاده از فناوری فراسرد می‌توان بذر این گونه ارزشمند ودر حال خطر را برای مدت زمان بسیار طولانی حفظ و از خطر انقراض این گونه منحصربه‌فرد جلوگیری‌نمود.

کلیدواژه‌ها: حفاظت فراسرد، *Satureja sahendica* ، اسانس، پایداری فیتوشیمیایی،ژرم پلاسم.

مقدمه

نگهداری در شرایط فراسرد یک روش بسیار کارآمد برای نگهداری ریزنمونه‌های گیاهان در معرض انقراض در بانک‌های ژن گیاهی می‌باشد و از این رو، پایداری ژنتیکی، مورفولوژیکی یا فیتوشیمیایی گیاهان باززایی شده پس از خروج از شرایط فراسرد بسیار مهم است.[۱٤]

مرزه[1] از گیاهان دارویی باارزش اسانس‌دار بومی ایران، در معرض انقراض است و از این رو، ارزیابی پایداری فیتوشیمیایی بذور آن در شرایط نگهداری فراسرد بسیار ضروری است.[۱۱]

پژوهش‌های زیادی در زمینه نگهداری بذور گیاهان مختلف در دمای فراسرد و بررسی ثبات ژنتیکی و فیتوشیمیایی و مورفولوژیکی آنها صورت گرفته است و عدم تغییرات ژنتیکی یا سیتولوژیکی و مورفولوژیکی در حفاظت فراسرد مورد تأکید قرار گرفته است.[۱۷] عدم تنوع ژنتیکی در گیاهان باززایی شده از سیب‌زمینی[۱۰] و تمشک[۱۹] نگهداری شده در نیتروژن مایع به اثبات رسیده است. همچنین، عدم تغییر محتوای دیوسگنین[2] در نگهداری در شرایط فراسرد سیب‌زمینی شیرین نیز گزارش شده است.[۱،۳] ثبات ژنتیکی تعدادی از هسته‌داران با استفاده از نشانگرهای مولکولی در شرایط فراسرد نیز اثبات شده است.[۲۲] علاوه بر ثبات ژنتیکی، پایداری فیتوشیمیایی گیاهان نیز در شرایط پس از نگهداری اهمیت دارد. از این رو، بر مناسب‌بودن روش نگهداری در شرایط فراسرد تأکید زیاد شده است.[۱٤]

ثبات ژنتیکی گیاه ترب‌ژاپنی[3] نگهداری شده به مدت طولانی در شرایط فراسرد با استفاده از نشانگرهای مولکولی، مورفولوژیکی و بیوشیمیایی مشخص شد.[۱۵] به طور مشابه، تأثیری از انجماد بر رونویسی و بیان ژن‌های خاص در خشخاش[٤] و گندم[۵] گزارش نشده است. اثر نگهداری در شرایط فراسرد بر بیان ژن و انتقال ژن گیاه آرابیدوپسیس[4] مطالعه شده است. بعد از نگهداری در شرایط فراسرد هیچ افزایش قابل‌توجهی در کارایی انتقال ژن وجود ندارد، اما انجماد می‌تواند بیان ژن اگزوژن[5] را بهبود بخشد.[۱۲] نتایج مطالعه روی توت[6] نشان می‌دهد که نگهداری در شرایط فراسرد ثبات ژنتیکی ژرم‌پلاسم این گیاه را حفظ می‌نماید.[۲] بررسی با نشانگرهای مولکولی برای ثبات ژنتیکی رازک[7] نشان می‌دهد که بین گیاهان شاهد و گیاهانی که در شرایط فراسرد قرار گرفته بودند هیچ تفاوتی در تنوع ژنتیکی وجود ندارد.[۱۸]

با وجود مطالعاتی که روی ثبات ژنتیکی گیاهان حاصل از فراسرد در برخی از نقاط جهان صورت گرفته است، مطالعه‌ای روی این گونه از مرزه و اثر فراسرد بر ترکیبات اسانس و ثبات فیتوشیمیایی صورت نگرفته است. هدف این پژوهش تعیین کارآمدی روش نگهداری به روش انجماد در نیتروژن مایع به‌منظور حفظ ژرم‌پلاسم گیاهی گیاه مرزه با حفظ پایداری فیتوشیمیایی بود.

مواد و روش‌ها

[1] *Satureja sahendica*
[2] diosgenin
[3] Wsabi
[4] *Arabidopsis thaliana*
[5] exogen
[6] mulberry
[7] *Humulu slupulus* L

۱- **جمع‌آوری گیاه** بذور گیاه مرزه *S. sahendica* از طبیعت استان کردستان جمع‌آوری گردید.۲

۲- - **مواد گیاهی مورد استفاده** در این بخش از سرشاخه‌های گلدار گیاه مرزه *S. sahendica* که بذور آنها به‌مدت یک هفته تحت شرایط فراسرد در نیتروژن مایع قرار گرفته بود استفاده گردید.

۳- **نگهداری بذور گیاهی در فراسرد** بذورگونه مرزه، در محلول بارگیری[1] به‌مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفتند و پس از آن محلول PVS_2[2] در کرایوویال‌ها[3] به آن‌ها افزوده‌گردید و درب کرایوویال‌ها با استفاده از پارافیلم مسدود گشت و نمونه‌ها به مدت یک هفته وارد نیتروژن مایع گردیدند. پس از خروج از تانک نیتروژن مایع، بذور به‌مدت ۲دقیقه در حمام آب گرم (۴۲ درجه سیلسیوس) ذوب شدند و به‌منظور شستشوی مواد محافظ سرمایی، بذرها سه مرتبه و هر مرتبه ۲دقیقه در محلول ساکارز ۱/۲ مولار قرار گرفتند. از مخلوط پیت‌ماس – پرلایت (۱:۳) برای کشت گیاهان گلخانه استفاده‌شد، بسته خاک ابتدا توسط دستگاه آون سترون گشته و سپس مورد استفاده قرارگرفت.

٤- **روش خشک‌کردن** سرشاخه‌های گلدار در مرحله گلدهی برداشت و در دمای اتاق با(دمای ۲۵°C) که امکان نفوذ نور مستقیم خورشید وجود نداشت خشک شدند.

۵- **روش اسانس‌گیری** از سرشاخه‌های گلدار خشک‌شده گیاه مرزه *S. sahendica* با روش تقطیر با اب توسط دستگاه کلونجر (اسانس‌گیری) شدند.

٦- **جداسازی و شناسایی ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس** به‌منظور جداسازی و شناسایی ترکیبات اسانس از دستگاه کروماتوگرافی‌گازی و کروماتوگرافی‌گازی متصل به طیف‌سنج‌جرمی استفاده شد. برای آماده‌سازی نمونه‌ها، ابتدا نمونه‌های هر تیمار با سولفات سدیم رطوبت‌گیری شدند.۷

۷- **دستگاه کروماتوگرافی گازی**[4] گاز کروماتوگراف Thermo و مدل UFM مجهز به ستون موئینه Ph-5 به طول ۱۰متر و قطر داخلی ۰/۱ میلی‌متر که ضخامت لایه فاز ساکن در آن ۰/٤ میکرومتر بود، مورد استفاده قرار گرفته شد. برنامه‌ریزی حرارتی ستون از ٦۰°Cشروع تا دمای نهایی اولیه°C ۲۸۵و بتدریج با سرعت ۸۰ درجه سلسیوس در دقیقه افزایش یافته است. دمای محفظه تزریق و دکتور°C ۲۸۰ تنظیم شده بودند. آشکارساز مورد استفاده در دستگاه GC از نوع FID بوده و از گاز هلیم به‌عنوان گاز حامل با سرعت ۰/۵میلی‌متر در دقیقه استفاده گردید.

۸- **کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی**[5] واریان مدل ۳٤۰۰ از نوع تله‌یونی مجهز به ستون DB-5 به طول ۳۰متر و قطر ۰/۲۵میلی‌متر ضخامت لایه فاز ساکن در آن ۰/۲۵میکرومتر بوده است. برنامه‌ریزی حرارتی ستون مشابه با برنامه‌ریزی ستون در دستگاه GC

[1] Liquid solution
[2] Plant vitrification solution 2
[3] cryovial

[4] Gas Chromatography (Agilent ساخت کشور آلمان، مارک)
[5] Gas Chromatography Mass Spectrometry (Varian ساخت کشور امریکا، مارک)

می‌باشد. دمای محفظه تزریق ۱۰درجه بیش از دمای نهایی ستون تنظیم می‌گردد و گاز هلیم با سرعت ۳۱/۵سانتی‌متر بر ثانیه در طول ستون حرکت می‌کند. زمان اسکن برابر یک ثانیه، انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت و ناحیه جرمی از ٤٠ تا ٣٤٠ بوده است.

۹- شناسایی ترکیبات موجود در اسانس‌ها پس از تزریق اسانس‌ها به دستگاه گاز کروماتوگراف GC و یافتن مناسب‌ترین برنامه‌ریزی حرارتی ستون، جهت دستیابی به بهترین جداسازی، اسانس‌های حاصله با دی‌کلرومتان رقیق گردید و به دستگاه گاز کروماتوگراف متصل شده با طیف‌سنج جرمی GC/MS تزریق و طیف‌های جرمی و کروماتوگرام‌های مربوط بدست آمد. سپس با استفاده از زمان بازداری، شاخص کواتس، مطالعه طیف‌های جرمی و مقایسه با ترکیبات استاندارد و ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس‌ها، مورد شناسایی کمی و کیفی قرار گرفت.

نتایج و بحث

حفاظت از ذخائر توارثی گونه *S. sahendica* به عنوان گیاه دارویی در معرض خطر و بومی کشور ایران با روش های نوین و بنیادی نگهداری در شرایط فراسرد از اهمیت خاصی برخوردار است، از آنجائیکه گیاهان مورد مطالعه، گیاهان دارویی حاوی اسانس می‌باشند، بسیار ضرورت دارد که پایداری فیتوشیمیایی آن‌ها پس از قرارگیری در شرایط فراسرد مورد ارزیابی قرار گیرد.

بانک فراسرد گونه‌های گیاهی طرح راهبردی و بلندمدت است که نوید حفاظت بسیار طولانی مدت، کم هزینه و ایمن ذخائر توارثی گیاهی را می‌دهد. دانش ذخیره سازی فراسرد تحولی بزرگ در حفظ و حراست از گونه‌های گیاهی زمانی مطمئن و امیدوارکننده است که شاهد پایداری ژنتیکی، فیتوشیمیائی و مورفولوژیکی نمونه‌ها پس از خروج از شرایط فراسرد باشیم.[٦] گزارشات زیادی حکایت از ثبات ژنتیکی گیاهان پس از قرارگیری در شرایط فراسرد دارند. [۲،۹،۲۰،۲۲،۲۳] درطی قرارگیری در شرایط فراسرد کلیه فعالیت‌های بیوشیمیائی به طور مشخص کاهش پیدا می‌کند و پایداری ژنتیکی به مفهوم واقعی وجود دارد.[١٦]

دانشمندان به این نتیجه رسیدند که در دماهای بسیار پائین، تقسیم سلولی و سوخت وساز گیاه به حالت تعلیق در می آید و ترکیبات شیمیائی برای مدت طولانی بدون تغییر باقی می‌مانند، بنابراین انجماد در شرایط فراسرد باعث تضمین ثبات ژنتیکی ژرم پلاسم های گیاهی خواهد بود. با بررسی‌ها بر روی تغییر در توالی‌های DNA پس از نگهداری در شرایط فراسرد با روش AFLP تغییرات ژنتیکی در گیاه *Prunus humilis* مشاهده نگردید.[۸]

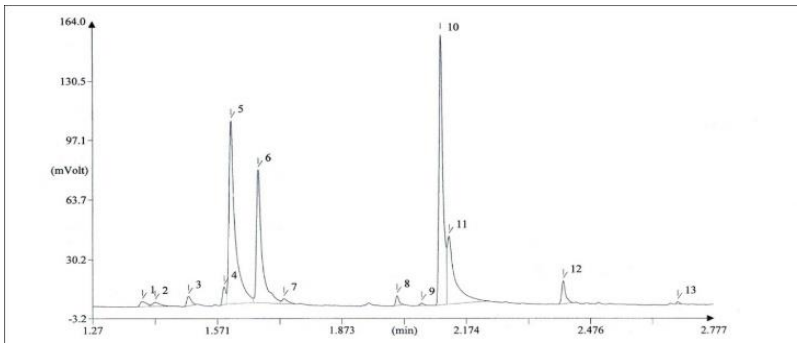
پژوهش ها نشان داد انجماد در شرایط فراسرد باعث تضمین ثبات ژنتیکی ژرم‌پلاسم گیاه توت گردید، به طوری که هیچ تغییری در ثبات ژنتیکی در طی نگهداری در شرایط فراسرد مشاهده نشد[۲]. نگهداری در شرایط فراسرد برای حفظ ذخایر ژنتیک گیاهی اهمیت بالایی دارد، هنگامی که سلول‌ها با موفقیت نگهداری شوند و با حذف آب اثرات تشکیل کریستال‌های یخ به حداقل برسد و رشد بلور کمتر شود، منجر به سازگاری به سرما می‌گردد، با اینکه تعداد گزارشاتی که بر روی جزئیات جنبه‌های تنوع ژنتیکی گیاهان حفاظت شده در شرایط فراسرد تحقیق کرده باشند هنوز محدود می‌باشد، این واقعیت

که تاکنون هیچ شواهدی مبنی بر بروز دگرگونی‌های مورفولوژیکی، سیتولوژیکی یا ژنتیکی در شرایط فراسرد بدست نیامده است امیدوارکننده می‌باشد. [۱۷] در مطالعه اثر فراسرد بر روی اسانس شاخه‌های گلدار گیاه مرزه *Satureja sahendica* تعداد۱۳ ترکیب در تیمار شاهد یا نگهداری در شرایط معمولی شناسایی گردید (شکل ۱) و عمده‌ترین ترکیبات شناسایی شده به ترتیب، پاراسیمن[1] (۲۹/٤٪)، تیمول[2] (۲۸/۳٪) گاماترپینن[3] (۱۹٪) و کارواکرول[4] (۱٤/۵٪) بودند (جدول ۱). از گیاهان حاصل از بذور مرزه نگهداری شده در شرایط فراسرد ۱۵ ترکیب شناسایی‌شد (شکل ۲) و عمده‌ترین ترکیبات شناسایی شده به ترتیب پاراسیمن (٤۳/۳٪)، گاماترپینن (۲۱/۰۵٪)، تیمول (۱۸/۳٪)و کارواکرول (۵/۱٪) بودند (جدول ۱). عمده‌ترین ترکیبات در اسانس‌های مرزه *S. sahendica* کارواکرول، پاراسیمن، گاماترپینن و تیمول می‌باشد. [۷]

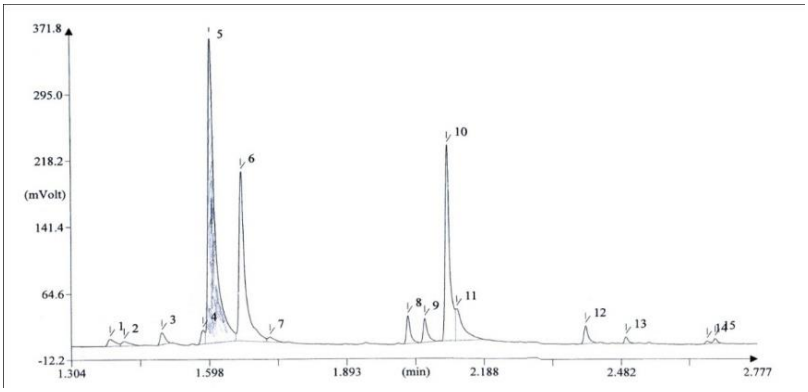
تیمول به‌عنوان عمده‌ترین ترکیب، در تیمار اسانس شاهد (۲۸/۳٪)بود، که در اسانس حاصل از بذور قرار گرفته در نیتروژن مایع (۱۸/۳٪) بود.

مقدار پاراسیمن به‌عنوان دیگر ترکیب عمده، در تیمار اسانس شاهد *S. sahendica* (٤۳/۳٪) بود و در اسانس گیاه حاصل از بذور قرار گرفته درنیتروژن مایع (۲۹/٤٪) بود، همچنین گاماترپینن در تیمار اسانس شاهد (۱۹٪) ودر تیمار اسانس حاصل از بذور قرار گرفته در نیتروژن مایع (۲۱/۰۵٪) است. مقدار کارواکرول در تیمار اسانس حاصل از بذور قرار گرفته در ازت مایع (۵/۱٪) و در اسانس تیمار شاهد (۱٤/۵٪) بود، مقایسه ترکیبات به‌دست آمده از اسانس حاصل از سرشاخه‌های گلدار بذور شاهد و شرایط فراسرد مرزه نشان می‌دهد که قرار دادن بذور گونه مورد مطالعه در نیتروژن مایع تأثیری بر نوع ترکیبات عمده تشکیل‌دهنده اسانس نداشته و اختلاف قابل توجهی در مقدار هر یک از این ترکیبات مشاهده نگردید، افزون بر این مشاهدات نشان داد که بذور مرزه پس از خروج از نیتروژن مایع همانند نمونه‌های شاهد قادر به جوانه‌زنی و تولید گیاهچه بودند و از نظر سلامتی هیچ‌گونه علائم سوئی در آن‌ها مشاهده نگردید. درپژوهشی، به منظورمقایسه نوع ومیزان ترکیبات فیتوشیمیایی شاخه‌های گلدار گیاه مرزه *Satureja rechingeri* که در شرایط فراسرد قرار گرفته بودند، تعداد۱۵و ۱٦ ترکیب به ترتیب از اسانس سر شاخه‌های گلدار در شرایط فراسرد و شاهد شناسایی شد، ترکیبات عمده شامل کارواکرول، پاراسیمن و تیمول بودند. از لحاظ نوع و درصد ترکیبات موجود در اسانس سر شاخه‌های گلدار تفاوت قابل توجهی بین تیمارها دیده نشد، که یافته‌های آن با نتایج حاصل از این پژوهش مطابقت دارد. [۲۱] بررسی فیتوشیمیایی گیاه آویشن *Thymus moroderi* در حفاظت فراسرد، ثبات ترکیبات فیتوشیمیایی را نشان داد و داده‌ها بر مناسب بودن روش نگهداری در شرایط فراسرد اذعان داشتند، که بانتایج حاصل از پژوهش ما هم خوانی دارد. [۱٤] بنابراین می‌توان گفت که حفاظت بذور مرزه در شرایط فراسرد تغییرات قابل ملاحظه ایی در ترکیبات شیمیایی گیاه را به‌دنبال نداشته است و در همین رابطه بررسی‌های صورت گرفته در پژوهش*های مرتبط* دیگر حاکی از آن است که در دماهای بسیار پایین، فعالیت‌های تقسیم سلولی و سوخت و ساز

[1] ρ −cymene
[2] thymol
[3] δ − terpinene
[4] carvacrol



شکل ۱) کروماتوگرام اسانس شاخه گلدار مرزه حاصل از بذور نگهداری شده در شرایط معمولی



شکل ۲) کروماتوگرام اسانس شاخه گلدار مرزه حاصل از بذور نگهداری شده در شرایط فراسرد

جدول ۱) ترکیبات شناسایی شده در اسانس گیاه مرزه *S. sahendica* تیمار شاهد و تیمار فراسرد

نام ترکیب	RI	درصد *S. sahendica* شاهد	درصد *S. sahendica* فراسرد
α – thujene	931	0.9	1.1
α – pinene	940	0.8	0.8
β – pinene	980	1.1	1.2
α – terpinene	1018	1.6	1.1
ρ – cymene	1026	29.4	43.3
δ – terpinene	1061	19	21.05
terpinolene	1090	0.8	0.7
Thymol, methyl ether	1236	0.9	2.3
Carvacrol, methyl ether	1246	0.2	2.1
Thymol,	1290	28.3	18.3
Carvacrol	1300	14.5	5.1
E-caryophyllene	1420	2.3	1.6
Germacrene D	1485	-	0.5
Spathulenol	1580	-	0.2
Caryophyllene oxide	1585	0.2	0.4

گیاه به حالت تعلیق در می‌آید و مواد برای مدت طولانی بدون تغییر باقی می‌مانند،[۱۷] که این یافته‌ها با نتایج این پژوهش همخوانی دارد. افزون بر این در این پژوهش تغییرات بیوشیمیایی در مرزه مورد مطالعه که در شرایط فراسرد قرار گرفته بودند،

مشاهده نگردید. یافته‌های پژوهشی‌های مرتبط نیز همین نتیجه را نشان می‌دهد.[۲،۱۲،۲۰،۲۲]

در مجموع دستاورد تحقیق حاضر یک گام به جلو محسوب می‌شود چراکه روش فراسرد در نگهداری مرزه با حفظ خصوصیات فیتوشیمیایی یک نسخه پشتیبان و یک روش جایگزین و مقرون به صرفه در حفاظت از این گونه گیاهی می‌باشد.

References

[1] Ahuja S., Mandal BB., Dixit S., Srivastava PS. 2002, Molecular, phenotypic and biosynthetic stability of plants recovered from cryopreserved shoot-tips of *Dioscorea floribunda.* Plant Science, 163: 971-977.

[2] Chaudhary R., Choudhury R., Malik SK., Susheel K., Digvender P. 2013, Genetic stability of mulberry germplasm after cryopreservation by two- step freezing technique. African Journal of bio technique. 12(4): 5983-5993.

[3] Dixit S., Mandal BB., Ahuja S., Srivastava PS 2003. Genetic stability assessment of plants regenerated from cryopreserved embryogenic tissues of *Dioscorea bulbifera* L. using RAPD, biochemical and morphological analysis. National Bureau plant genetic resources, Cryoletters , 24(2): 77-84.

[4] Elleuch H., Gazeau C., David H., David A. 1998, Cryopreservation does not affect the expression of foreign sam gen in transgenic *Papaver somniferon* cells. Plant cell Rep, 18: 94-98.

[5] Fretz A., Lorz H. 1995, Cryopreservation of *in vitro* culture of barley (*Hordeum murinum* L.) and transgenic cells of barley (*Triticum aestivum* L.). Journal of plant physiology, 4: 489- 496.

[6] Ghamari Zare A., Naderi Shahab M.A., Jebelli M. 2016, Cryopreservation of natural resources plant species and establishing Cryo- Bank is a national strategic necessity. Iran nature, 2(2).

[7] Ghamari H., Saidi M., Ghaasemnejaad A., Ghabari A.R. 2016, Evaluation of phytochemical composition of Sahandian Savory (*Satureja sahendica* Bornm) Essential Oils at different phonological stages. Journal of Agroecology, 8(1) :1-16.

[8] Hao Y.S., You C.X., Deng X.X. 2001, Effect of cryopreservation on genetic resources at morphological chromosomal and molecular levels. Cryobiology, 43: 46- 53.

[9] Harding K. 2004, Genetic integrity of cryopreserved plant cells. A review. Cryoletters, 25: 3-22.

[10] Harding K., Benson E.E. 2000, Analysis of nuclear and chloroplast DNA in plants regenerated from cryopreservation shoot-tips of potato. Cryoletters, 21: 279- 289.

[11] Jalili A., Jamzad Z. 1999, Red data Book of Iran. Apreliminary survey of endemic rare and endangered plant speices in Iran. Research institute of forests and rangland, 323- 331.

[12] Li Z A., Du YQ., Wang Z C. 2013, Effect of cryopreservation on the efficiency of exogenous gene, genetic transformation and expression level of *Arabidopsis thaliana*. Electronic journal of biotechnology, 16(6).

[13] Mandal B.B., Chaudhury R., Engelmann F., Bhag Mal K., Tao L., Dhillon B S, 2003, Conservation biotechnology of plant germplasm NBPGR, New Dehli,I ndia/ IPGRI, Rom, Italy/ Fao. Rom, Italy.

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

[15] Matsumoto T., Akihiro T., Maki S., Mochida K., Kitagawa M., Tanaka D., Yamamoto S., Niino T. 2013, Genetic stability assessment of Wsabi plants regenerated from long- term cryopreserved shoot tips using morphological, biochemical and molecular analysis. Cryoletters, 34(2): 128-36.

[16] Niino T., Valle Arizago M. 2015, Cryopreservation for preservation of potato genetic resources. Breeding Science, 65(1): 41-52.

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

[18] Peredo E L., Arroyo- Garcia R., Reed B M., Revilla M A. 2008, Genetic and epigenetic stability of cryopreserved and cold- stored hops *(Humulus lupulus* L). Cryobiology, 224- 234.

[19] Rosa N., Castillo F., Bassil N V., Wada S., Reed B M. 2010, Genetic stability of cryopreserved shoot tips of Rubus germplasm. In vitro cell, 46: 246- 256.

[20] Scocchi A., Falici M., Medina S., Olmos S., Mroginski L. 2004, Plant recovery of cryopreserved apical meristems- tips of *Melia azadarach* L. using encapsulation/ dehydration and assessment of their genetic stability. Euphytica , 135: 29- 38.

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

[22] Wang Z., Lie JSh., Zhang ChW., He YX. 2013, Analysis genetic stability in *Prunus humilis* Bung plants after cryopreservation twice. Advances in forestry letters, 2(4): 67- 75.

[23] Zhai Z., Wu Y., Engelmann F., Chen R., Zhao Y. 2003, Genetic stability assessments of plantlets regenerated from cryopreserved in vitro cultures grape and kiwi shoot tips using RAPD. Cryoletters, 24(5): 315- 322.

Journal of Developmental Biology
Vol. 11, No. 4, Autumn 2019

Effects of Cryopreservation on the phytochemical stability of *Satureja sahendica* essential oil

Shahbazi Sh.[1], Ghamari Zare A.[2*], Sefidkon F.[2], Ashraf Jafari A.[2], Abdossi V.[1]

[1] Department of Horticulture, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2] Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research, Education and Extension organization, Tehran, Iran

[*] Email: ghamarizare@gmail.com

Received: 19 May 2019 Accepted: 6 September 2019

Abstract

Cryopreservation is regarded as a technology with high importance to conserve the plant germplasm for a long period. The use of this technology to preserve the plant materials is useful when it does not change the chemical composition of the essential oil. *Satureja sahendica* is one of the endangered medicinal species in Iran; thus, conservation of its genetic materials is considerably important. In order to investigate the phytochemical stability and to compare the type and content of the compositions identified, the plant samples were studied under cryopreservation condition and then, the treated seeds were transferred to the liquid nitrogen at –196°C for one week. In the present study, the flowering shoots resulted from various treated seeds were collected and dried in the laboratory; then, their essential oils were obtained by hydro-distillation method. Afterwards, the essential oil compositions were identified using analytical gas chromatography and gas chromatography coupled with mass spectrometer (GC/MS) as well as retention index calculation. Finally, 15 compositions were identified in the essential oil of the study plant under cryopreservation condition. The main components in the essential oil included, p-cymene (43.3%), $\delta -$ terpinene (21.5%), thymol (18.3%) and carvacrol (5.1%). Results indicated that regarding the number, type and percentage of compounds existing in the essential oils, there was no difference between the control and cryopreservation treatments; therefore, the seeds of this valuable endangered species can be preserved for a long period and its extinction may be avoided by using the cryopreservation technique.

Keywords: Cryopreservation, Essential oil composition, germplasm, phytochemical stability, *Satureja sahendica*.