پایداری فیتوشیمیایی مرزه در شرایط نگهداری فراسرد

فصلنامه بوم‌شناسی گیاهان زراعی
جلد ۱۳، شماره ۳، صفحات ۵۷ – ۵۱
(پاییز ۱۳۹۶)

شبنم شهبازی[۱]، فاطمه سفیدکن[۲*]، عباس قمری زارع[۲]

۱ گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، واحد رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی، رودهن، ایران

۲ مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

* sefidkon@rifr-ac.ir ✉ (مسؤول مکاتبات)

چکیده به منظور مقایسه نوع و میزان ترکیبات فیتوشیمیایی مرزه به عنوان یک گونه ارزشمند، بومی و در خطر انقراض ایران، در شرایط فراسرد، بذور مرزه به مدت ۱ هفته در نیتروژن مایع با دمای ۱۹۶- درجه سلسیوس نگهداری شدند. اسانس‌گیری از سرشاخه‌های گلدار حاصل از این بذور به روش تقطیر با آب انجام گرفت و ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس با روش کروماتوگرافی گازی و کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی شناسایی شد. تعداد ۱۵ و ۱۶ ترکیب به ترتیب از اسانس سرشاخه‌های مرزه حاصل از بذور نگهداری شده در شرایط فراسرد و معمولی شناسایی شد و ترکیبات عمده شامل کارواکرول، پاراسیمن و تیمول بودند. از لحاظ نوع و درصد ترکیبات موجود در اسانس تفاوت قابل توجهی بین گیاهان شاهد و فراسرد مشاهده نشد. بنابراین، با استفاده از فناوری فراسرد می‌توان بذر این گونه ارزشمند را برای مدت زمان بسیار طولانی حفظ و از خطر انقراض این گونه منحصر به فرد جلوگیری نمود.

شناسه مقاله

نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ پژوهش: ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: ۹۶/۰۷/۱۲

تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۹/۲۷

واژه‌های کلیدی

- اسانس
- حفاظت فراسرد
- ژرم‌پلاسم گیاهی
- نگهداری طولانی‌مدت

این مقاله با دسترسی آزاد تحت شرایط و قوانین The Creative Commons of BY - NC - ND انتشار یافته است.

DOI: 10.22034/AEJ.2017.537586

مقدمه نگهداری در شرایط فراسرد[1] 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.[۱۱]

مرزه[2] 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 بااهمیت است.[۸]

پژوهش‌های زیادی در زمینه نگهداری بذور گیاهان مختلف در دمای فراسرد و 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.[۱۳] عدم تنوع ژنتیکی در گیاهان باززایی شده از سیب‌زمینی[۷] و تمشک[۱۵] نگهداری شده در نیتروژن مایع به اثبات رسیده است. همچنین، عدم تغییر محتوای دیوسگنین[3] در نگهداری در شرایط فراسرد سیب‌زمینی شیرین نیز گزارش شده است.[۱۰۳] ثبات ژنتیکی تعدادی از هسته‌داران با استفاده از نشانگرهای مولکولی در شرایط فراسرد نیز اثبات شده است.[۱۷] علاوه بر ثبات ژنتیکی، پایداری فیتوشیمیایی گیاهان نیز در شرایط پس از نگهداری نیز اهمیت دارد. از این رو، بر مناسب‌بودن نگهداری در شرایط فراسرد تأکید زیاد شده است.[۱۱]

ثبات ژنتیکی گیاه ترب‌ژاپنی[4] نگهداری شده به مدت طولانی در شرایط فراسرد با استفاده از نشانگرهای مولکولی، مورفولوژیکی و بیوشیمیایی مشخص شد.[۱۲] به طور مشابه، تأثیری از انجماد بر رونویسی و بیان ژن‌های خاص در خشخاش[٤] و گندم[٥] گزارش نشده است. اثر نگهداری در شرایط فراسرد بر بیان ژن و انتقال ژن گیاه آرابیدوپسیس[5] مطالعه شده است. بعد از نگهداری در شرایط فراسرد هیچ افزایش قابل‌توجهی در کارایی انتقال ژن وجود ندارد، اما انجماد می‌تواند بیان ژن اگزوژن[6] را بهبود بخشد.[۹] نتایج مطالعه روی توت[7] نشان می‌دهد که نگهداری در شرایط فراسرد ثبات ژنتیکی ژرم‌پلاسم این گیاه را حفظ می‌نماید.[۲] بررسی با نشانگرهای مولکولی برای ثبات ژنتیکی رازک[8] نشان می‌دهد که بین گیاهان شاهد و گیاهانی که در شرایط فراسرد قرار گرفته بودند هیچ تفاوتی در تنوع ژنتیکی وجود ندارد.[۱٤]

با وجود مطالعاتی که روی ثبات ژنتیکی گیاهان حاصل از فراسرد در برخی از نقاط جهان صورت گرفته است، مطالعه‌ای روی گیاه 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 بذور مرزه از طبیعت استان ایلام جمع‌آوری گردید. بذور در محلول بارگیری[9] به‌مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفته و پس از آن محلول شماره ۲[10] در کرایوویال‌ها[11] به آن‌ها افزوده شده و درب آنها با پارافیلم مسدود و نمونه‌ها به مدت یک هفته تحت شرایط فراسرد در نیتروژن مایع قرار گرفتند. بذور پس از خروج از تانک نیتروژن مایع به‌مدت ۲ دقیقه در حمام آب گرم ٤۲ درجه سلسیوس قرار گرفته و سه مرتبه و هر مرتبه ۲ دقیقه در محلول ساکارز ۱/۲ مولار قرار گرفتند. بذور نگهداری شده در شرایط معمولی به عنوان

[1] cryopreservation
[2] *Satureja rechingeri*
[3] diosgenin
[4] wsabi
[5] *Arabidopsis thaliana*
[6] exogen
[7] mulberry
[8] *Humulu slupulus* L
[9] liquid solution
[10] plant vitrification solution 2
[11] cryovial

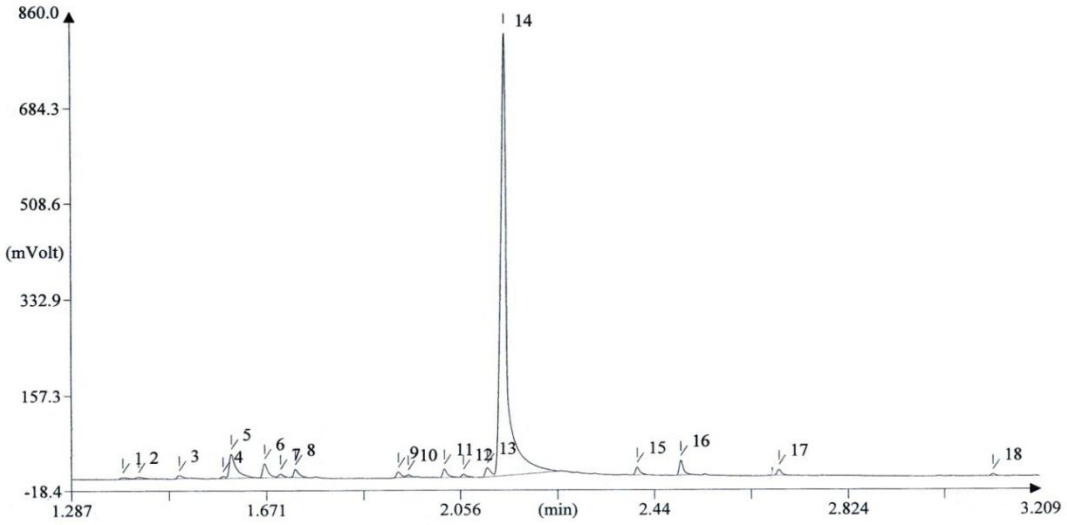
شاهد در نظر گرفته شدند. بذرها در بستری از مخلوط پیت‌ماس: پرلایت به نسبت ۱:۳ در گلخانه کشت شده و در هر گلدان یک بذر قرار گرفت. آبیاری از لوله‌کشی شهری از قسمت پایین گلدان انجام شد. سرشاخه‌های گلدار در مرحله گلدهی برداشت و در دمای معمولی آزمایشگاه و دور از نور مستقیم خورشید خشک شده و با روش تقطیر با آب و به کمک دستگاه کلونجر اسانس‌گیری شد. برای آماده سازی نمونه‌ها، ابتدا نمونه‌های گیاهی با سولفات سدیم بی‌آب رطوبت‌گیری شدند. به‌منظور جداسازی و شناسایی ترکیبات اسانس از دستگاه کروماتوگرافی گازی[1] و کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی[2] بهره گرفته شد. ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس گونه مرزه در تیمارهای شاهد و فراسرد، پس از به‌دست آوردن کروماتوگرام‌ها و طیف‌های جرمی با محاسبه شاخص‌های بازداری، درصد کمی ترکیب‌ها ارزیابی شدند.

نتایج و بحث تعداد ۱۶ ترکیب در تیمار شاهد یا نگهداری در شرایط معمولی شناسایی گردید (شکل ۱) و عمده‌ترین ترکیبات شناسایی شده به ترتیب کارواکرول[3] (۸۲/۱٪)، پاراسیمن[4] (۴/۹٪)، گاماترپینن[5] (۲/۱٪) و تیمول[6] (۱/۴٪) بود (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 کارواکرول (۸۱/۹٪)، پاراسیمن (۵/۸٪)، گاماترپینن (۳/۲٪) و تیمول (۰/۶٪) بودند (جدول ۱). 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 درخور توجهی در مقدار هر یک از این ترکیبات مشاهده نگردید. کارواکرول به‌عنوان عمده‌ترین ترکیب، در اسانس شاهد بیشترین مقدار می‌باشد که با اسانس حاصل از سرشاخه‌های گلدار فراسرد تفاوت قابل توجهی ندارد. بررسی مقدار پاراسیمن به‌عنوان دومین ترکیب عمده نشان می‌دهد که میزان این ترکیب در اسانس شاهد و تیمار فراسرد اختلاف چندانی ندارند. همچنین مقدار گاماترپینن هم تفاوت عمده‌ای در شاهد و تیمار فراسرد نشان نمی‌دهد.

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 علایم سوئی در آن‌ها مشاهده نگردید. بنابراین می‌توان گفت که حفاظت بذور مرزه در شرایط فراسرد تغییرات قابل توجهی 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، فعالیت-های تقسیم سلولی و سوخت و ساز گیاه به حالت تعلیق در می‌آید و مواد برای مدت طولانی بدون تغییر باقی می‌مانند،[۱۳] 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،۶،۱۶،۱۷،۱۸]

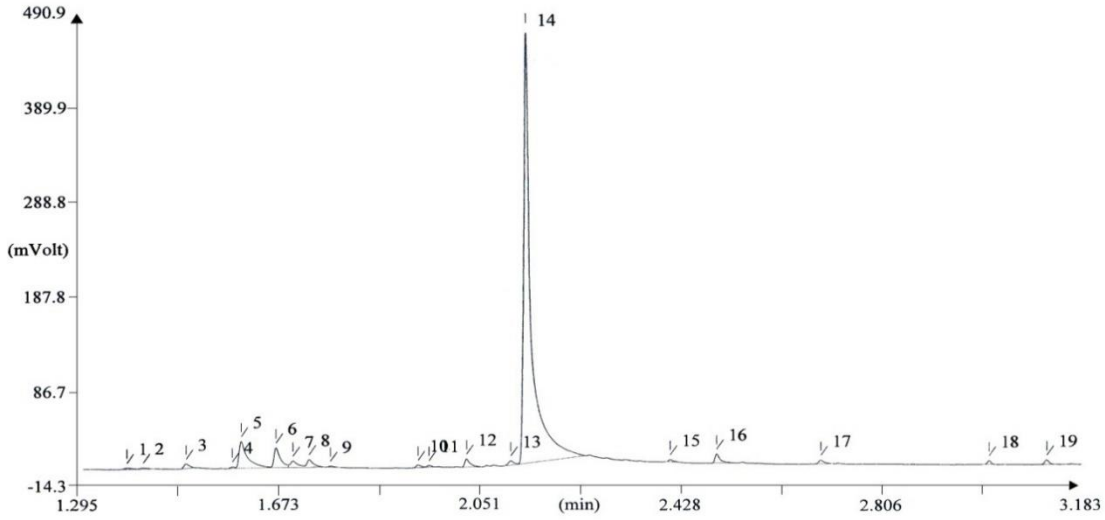
نتیجه‌گیری کلی بررسی‌ها پایداری فیتوشیمیایی مرزه در شرایط فراسرد نشان داد که نگهداری بذور مرزه در این شرایط بر خصوصیات فیتوشیمیایی مرزه مورد مطالعه پس از خروج از نیتروژن مایع تأثیری ندارد.

[1] Gas Chromatography (Agilent, Germany)
[2] Gas Chromatography Mass Spectrometry (Varian, USA)
[3] carvacrol
[4] ρ –cymene
[5] δ – terpinene
[6] thymol



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

Figure 1) Chromatograms of Essential oils of flowering braches of *Satureja rechingeri* derived from seeds incubated in usual condition



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

Figure 2) Chromatograms of Essential oils of flowering braches of *Satureja rechingeri* derived from seeds incubated in cryopreservation condition

جدول ۱) ترکیبات شناسایی شده در اسانس شاخه گلدهنده مرزه حاصل از بذور نگهداری شده تحت شرایط معمولی و فراسرد

Table 1) Identified essential oils compositions of *Satureja rechingeri* flowering stem derived from seeds incubated in usual and cryopreservation conditions

compositions	Retention Index	control (%)	cryopreservation (%)
α – thujene	931	0.3	0.3
α – pinene	940	0.4	0.2
β – pinene	980	0.4	0.6
α – terpinene	1018	0.2	0.1
ρ – cymene	1026	4.9	5.8
δ – terpinene	1061	2.1	3.2
terpinolene	1090	1.2	1.3
Terpinen-4-ol	1177	0.7	0.3
α – terpined	1189	0.3	0.2
Thymol, methyl ether	1236	1.1	1.1
Carvacrol, methyl ether	1246	0.5	
Thymol	1290	1.4	0.6
Carvacrol	1300	82.1	81.9
E-caryophyllene	1420	1	0.2
Germacrene D	1485	1.7	1.2
Caryophyllene oxide	1585	0.8	0.5

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 Biotechnology 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. Cryoletters 24(2): 77-84.
4. Elleuch H, Gazeau C, David H, David A (1998) Cryopreservation does not affect the expression of a foreign *Sam* gen in transgenic *Papaver somniferon* cells. Plant cell Reports 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. Harding K (2004) Genetic integrity of cryopreserved plant cells. A review. Cryoletters 25: 3-22.
7. Harding K, Benson EE (2000) Analysis of nuclear and chloroplast DNA in plants regenerated from cryopreservation shoot- tips of potato. Cryoletters 21: 279- 289.
8. Jalili A, Jamzad Z (1999) Red data Book of Iran. A preliminary survey of endemic rare and endangered plant species in Iran. Research Institute of Forests and Rangland 323- 331. [in Persian]
9. 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 available online as <http://www.ejbiotechnology.info/index.php/ejbiotechnology/article/view/v16n6-12/1788 > on 12 November 2017.
10. Mandal BB, Chaudhury R, Engelmann F, Bhag Mal K, Tao L, Dhillon BS (2003) Conservation biotechnology of plant germplasm NBPGR, Biodiversity International, Library and Information Services. New Dehli India.
11. Marco-Medina A, Casas JL (2013) RAPD and phytochemical analysis of *Thymus moroderi* plantlets after cryopreservation. Cryoletters 34(2): 119- 127.

12. 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): 128-136.
13. Panis B, Lambardi M (2005) Status of cryopreservation technology in plant (crops and forest trees). The Role of Biotechnology 43- 50.
14. Peredo EL, Arroyo-Garcia R, Reed BM, Revilla MA (2008) Genetic and epigenetic stability of cryopreserved and cold- stored hops *(Humulus lupulus* L). Cryobiology 224- 234.
15. 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.
16. 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
17. 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.
18. 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.

Phytochemical persistence of *Satureja rechingeri* under cryopreservation conditions

Agroecology Journal

Vol. 13 No. 3 (51-57)
(autumn 2017)

Shabnam Shahbazi[1], Fatemeh Sefidkon[2*], Abbas Ghamari Zare[2]

1 Department of Horticulture, Roudehen Branch, Islamic Azad University, Roudehen, Iran

2 Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research, Education and Extension organization, Tehran, Iran

* sefidkon@rifr-ac.ir **(corresponding author)**

Received: 04 October 2017 **Accepted:** 18 December 2017

Abstract This research was aimed to compare the type and content of phytochemical compounds of *Satureja rechingeri* as a valuable, indigenous and endangered species of Iran under cryopreservation. The seeds were kept in liquid nitrogen at -196 °C for 1 week. The flowering shoots resulted from the treated seeds were collected and dried in the laboratory condition and their essential oils were obtained by hydro-distillation method. The essential oil compositions were determined using analytical gas chromatography and gas chromatography coupled with mass spectrometer (GC/MS). Finally, 15 and 16 components were identified in the essential oils in the cryopreservation and control groups, respectively. The main components in the essential oil were carvacrol, p-cymeneand and thymol. Regarding the type and percentage of compounds existing in the essential oil, there was no significant difference among the control and cryopreservation treatments. Therefore by cryopreservation technique, the seeds of this valuable endangered species could be preserved for a long period and its extinction may be avoided.

Keywords

- essential oils
- long term storage
- plant germplasm
- ultra cold

This open-access article is distributed under the terms of the Creative Commons-BY-NC-ND which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

DOI: 10.22034/AEJ.2017.537586