

## نگهداری بذر *Satureja spicigera* در شرایط فراسرد

لیلا غفارزاده نمازی<sup>۱\*</sup>، نادعلی باباییان<sup>۲</sup>، عباس قمری زارع<sup>۳</sup>، قربانعلی نعمت زاده<sup>۲</sup>

۱- دانشجوی دکتری رشته اصلاح نباتات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

۲- استاد دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

۳- استادیار موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، تهران، ایران

namazi83@yahoo.com

### 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 و 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. با استفاده از تکنیک نگهداری بذر در دمای فراسرد که یکی از روش‌های نگهداری ژرم‌پلاسما در شرایط خارج از رویشگاه است، می‌توان بذر را به طور طولانی مدت، با هزینه بسیار کمتر و بدون از دست دادن قوه‌نامیه ذخیره‌سازی کرد. برای نگهداری بذر *Satureja spicigera* در شرایط فراسرد، از پیش تیمارهای گلیسرول، محلول ویتریفیکاسیون گیاهی (PVS2) Plant Vitrification Solution 2 و کاهش رطوبت بذر قبل از ورود به ازت مایع استفاده شد. بذرهای تیمار شده به مدت یک هفته، یک ماه و سه ماه در دمای °C 196- نگهداری شدند. در این تحقیق شاخص‌های جوانه‌زنی و رشد (درصد جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی) بذر ارتودکس گونه مرزه *S. spicigera* در شرایط فراسرد به مدت یک هفته، یک ماه و سه ماه مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بین پیش تیمارهای مختلف، از لحاظ شاخص جوانه‌زنی و سرعت جوانه‌زنی اختلاف معنی‌داری وجود دارد و می‌توان با استفاده از فناوری فراسرد و بکارگیری پیش تیمار مناسب، بذر این گونه ارزشمند و در حال خطر را، برای مدت زمان بسیار طولانی حفظ و از انقراض این گونه منحصر به فرد جلوگیری نمود.

**کلمات کلیدی:** مرزه، فراسرد، ژرم‌پلاسما، گلیسرول، ویتریفیکاسیون

مقدمه  
فیلوژنتیکی به جنس‌های *Gonstscharovia*

*Clinopodium*، *Acinos*، *Calamintha* و  
*Micromeria* نزدیک می‌باشد. مبدا پیدایش *Satureja*  
دوران سوم زمین‌شناسی است که از این دوران در

جنس مرزه (*Satureja*) یکی از جنس‌های خانواده  
نعنا (*Lamiaceae*) متعلق به زیر خانواده  
*Nepetoideae* و قبیله *Mentheae* می‌باشد. از نظر

بختیاری که منحصر بومی ایران بوده و کمتر مورد بررسی قرار گرفته است، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد (۶).

صعودی و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که عصاره متانولیک *S. bachtiarica* می‌تواند در درمان بیماری آلزایمر موثر باشد.

در بررسی اثرات ضد میکروبی اسانس دو گونه *S. bachtiarica* و *S. khuzistanica* در دو مرحله برداشت نشان داد که اسانس‌های *S. khuzistanica* در هر دو مرحله برداشت (قبل و زمان گلدهی) و 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 می‌تواند به عنوان جایگزینی مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌های سنتزی که مقاومت باکتری‌ها به آن‌ها روزبه‌روز در حال افزایش است به کار روند (۳).

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 (۱۳).

از آن‌جا که گونه‌های مختلف گیاه مرزه بر اثر برداشت بی‌رویه از عرصه‌های طبیعی توسط انسان و تنش‌های زنده و غیرزنده تهدید شده و کشت کار پی‌درپی یک گونه باعث کاهش تنوع ژنتیکی آن‌ها می‌شود، حفظ ذخایر ژنتیکی این گونه‌ها از اهمیت بالایی برخوردار است.

از جمله روش‌هایی که برای حفظ ژرم‌پلاسما گیاهان وجود دارد، می‌توان به حفاظت در رویشگاه و یا

رویشگاه‌های خشک گسترش یافته است. جنس مرزه بر اساس تعریف محدود برای آن، دارای حدود ۳۰ گونه است که با نام معمول Savory شناخته می‌شوند. 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).

این جنس در ایران دارای ۱۵ گونه می‌باشد که از میان آن‌ها ۹ گونه به نام‌های *S. sahendica*, *S. edmondi*, *S. bachtiarica*, *S. rechingeri*, *S. kallarica*, *S. isophylla*, *S. intermedia*, *S. khuzistanica* و *atropatana* منحصر کشور ایران هستند و سایر گونه‌ها علاوه بر ایران در ترکمنستان، ترکیه، قفقاز، ماورای قفقاز و عراق نیز می‌رویند. 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 (۲).

امروزه تعداد زیادی از داروهای ضد قارچی و ضد باکتریایی موثر برای درمان عوامل عفونی به کار گرفته می‌شوند، 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 منشا 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. این کار در مورد گیاهانی از جمله مرزه

## "نمازی و همکاران، نگهداری بذر *Satureja spicigera* در شرایط فراسرد"

### مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: بذر گونه *S. spicigera* از استان گیلان ۵ کیلومتر مانده به رودبار با طول جغرافیایی ۲۸°۰۲' و ۴۹°۰۴' عرض جغرافیایی ۵۸°۵۰' و ارتفاع ۱۳۲۰ متر از سطح دریا جمع‌آوری و مورد استفاده قرار گرفت.

نگهداری در دمای فراسرد: قبل از قرارگیری نمونه بذر در ازت مایع (دمای °C ۱۹۶-) پیش تیمارهای زیر اعمال شد:

- پیش‌تیمار گلیسرول (Glycerol): بذر ها به کرایوویال‌های حاوی گلیسرول منتقل شده و بمدت یک ساعت در دمای °C ۴ قرار داده شدند. سپس کرایوویال‌ها وارد ازت مایع گردیدند.

- پیش‌تیمار ویتریفیکاسیون (Vitrification): از دو محلول PVS2 (Plant Vitrification Solution 2) و محلول Loading به عنوان پیش‌تیمار استفاده شد. محلول PVS2 حاوی ۱۵ درصد (W/V) اتیلن گلیکول، ۱۵ درصد (W/V) دی‌میتل سولفوکساید، ۳۰ درصد (W/V) گلیسرول در محیط کشت مایع MS سوکروز ۰/۴ مولار همراه با تنظیم‌کننده‌های رشد (pH=۵/۸) است (۱۶). محلول Loading شامل گلیسرول ۲ مولار و سوکروز ۰/۴ مولار در محیط کشت مایع MS می‌باشد (۱۷). ابتدا بذور بمدت ۲۰ دقیقه در محلول Loading قرار گرفتند. سپس محلول Loading تخلیه و محلول PVS2 (دمای °C ۲۵) جایگزین شد. پس از سپری شدن پنج دقیقه، بذور به کرایوویال‌های حاوی محلول PVS2 سرد (دمای °C ۴) منتقل شده و بمدت یک ساعت در دمای °C ۴ قرار داده شدند. سپس کرایوویال‌ها وارد ازت مایع شدند. - پیش‌تیمار کاهش رطوبت بذر: در این تیمار، وزن

حفاظت در خارج از رویشگاه اشاره کرد (۷). حفاظت گیاه در رویشگاه می‌تواند بسیار پرهزینه باشد (۱۰). در کنار روش‌های مرسوم و کلاسیک حفاظت از گونه‌های منابع طبیعی مانند ایجاد باغ‌های گیاه‌شناسی ملی و منطقه‌ای، بانک ژن بذرهای گونه‌های جنگلی و مرتعی و عرصه‌های حفاظت شده جنگلی، استفاده از توانمندی‌های بیوتکنولوژی راهکاری منحصر به فرد برای حفاظت از گونه‌های گیاهی هست که به سرعت در حال توسعه می‌باشد. یکی از این توانمندی‌ها، نگهداری بذر ها و اندام‌های رویشی در شرایط فراسرد (Cryopreservation) است (۹).

فن‌آوری فراسرد، روش ذخیره‌سازی بذر ها و اندام‌های گیاهی برای مدت زمان بسیار طولانی است (۱۲). با این فن‌آوری می‌توان بسیاری از بذر ها، اندام‌های رویشی، سلول و دانه گرده گیاهی را در دمای °C ۱۹۶- یا محیط ازت مایع که در آن فعالیت‌های متابولیکی و فیزیولوژیک بذر و اندام متوقف شده است، برای مدت زمان بسیار طولانی حفظ نمود (۱۱).

از مزایای این تکنیک می‌توان به حفظ ثبات ژنتیکی پایه مادری، کاهش هزینه‌های حفاظت در شرایط مزرعه، نسخه پشتیبان برای گیاهانی که به صورت کلن تکثیر می‌شوند و نیز به عنوان یک سیستم حفاظتی برای کشت‌های مهم اشاره کرد (۱۴).

در این تحقیق سعی بر این هست که شاخص‌های جوانه‌زنی و رشد بذر گونه مرزه *S. spicigera* را در پاسخ به دمای فراسرد، جهت بررسی کارآمدی فن‌آوری فراسرد به عنوان یک روش جایگزین و مقرون به صرفه‌ی ذخیره کردن بلندمدت بذر های ارتودکس در مراکز ژرم‌پلاسمی ارزیابی شود.

مدت ۱۹ ساعت در دستگاه آون و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند (جدول ۱). برای جلوگیری از جذب رطوبت محیط توسط بذره‌های آبیگری‌شده، درب ظروف محکم بسته شد. در ادامه، بذرها بلافاصله درون کرایوویال قرار داده شدند و مستقیماً وارد ازت مایع شدند.

اولیه بذر با ترازوی حساس (0/0001 گرمی) تعیین شد. ابتدا محتوای رطوبتی بذرها بر اساس اختلاف وزن تر و وزن خشک نمونه‌ها (خشک کردن نمونه‌ها با استفاده از دستگاه آون در دمای ۱۰۳°C و بمدت ۱۷ ساعت (۸) محاسبه شد. به منظور کاهش محتوای رطوبتی به حداقل ممکن، بذرها روی کاغذ صافی به

جدول ۱- ویژگی‌های بذر گونه مورد مطالعه

| نوع گیاه            | محل جمع‌آوری                          | درصد محتوای رطوبت (پس از آبیگری کردن) | درصد محتوای رطوبتی (قبل از آبیگری کردن) | وزن هزار دانه (گرم) | زمان جمع‌آوری |
|---------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------------|---------------------|---------------|
| <i>S. spicigera</i> | استان گیلان ۵ کیلومتر مانده به رودبار | ۲/۲۸                                  | ۴                                       | ۰,۶                 | ۱۳۸۸/۸/۲۳     |

انتقال داده شدند. تعداد بذر در هر ظرف پتری ۳۰ عدد و از هر ظرف ۳ تکرار در نظر گرفته شد. این آزمایش ۳ بار تکرار شد. به هر ظرف پتری ۳ میلی‌لیتر آب مقطر افزوده شد. شمارش بذرها به صورت روزانه و در ساعت معین انجام شد. پس از طی زمان جوانه‌زنی محاسبه شاخص‌های درصد سرعت به روش زیر انجام شد (۱۵):

۱- درصد جوانه‌زنی (درصد بذره‌های جوانه‌زده)  
 $\text{Germination Percent} = \text{Ni/N}$  که در آن Ni تعداد بذره‌های جوانه زده در روز iam و N تعداد کل بذره‌های آزمون شده است.

۲- سرعت جوانه‌زنی  $\text{Germination rate} = \Sigma \text{Ni/Ti}$  که در آن Ni تعداد بذره‌های جوانه زده در هر روز و Ti شمار روز پس از کاشت است.

با استفاده از مدل طرح آماری فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی، تیمارها مقایسه شد. تیمارهای قبل از فراسرد شامل گلیسرول، ویتریفیکاسیون (PVS2)، کاهش رطوبت (Desiccation) و شاهد به عنوان سطوح یک فاکتور و زمان‌های ذخیره‌سازی شامل یک

بدون پیش‌تیمار (شاهد): بذور به عنوان شاهد به کرایوویال‌ها منتقل شده و در یخچال (دمای ۴°C) نگهداری شدند.

کلیه تیمارها بجز تیمار شاهد به مدت یک هفته، یک ماه و سه ماه در ازت مایع با دمای ۱۹۶ °C- نگهداری شدند. به منظور گرم کردن سریع، نمونه‌ها بلافاصله از تانک ازت خارج و در بن ماری ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰۰ ثانیه قرار داده شدند (۵). سپس بذور به محیط کشت مایع MS سوکروز 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 متعاقباً 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، به درون پتری‌دیش سترون شده با قطر ۱۰ سانتی‌متر حاوی یک عدد کاغذ صافی و اتمن منتقل شدند و در نهایت به اتاقک کشت با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد

## "نمازی و همکاران، نگهداری بذر *Satureja spicigera* در شرایط فراسرد"

هفته، یک ماه و سه ماه به عنوان سطوح فاکتور دوم در نظر گرفته شدند. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزار MSTAT-C استفاده شد.

### نتیجه‌گیری

در بررسی اثر زمان‌های یک هفته، یک ماه و سه ماه نگهداری بذر در دمای  $196^{\circ}\text{C}$  در صفاتی مانند درصد جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. همچنین اثر متقابل تیمار  $\times$  زمان معنی‌دار نبود. در خصوص درصد و سرعت جوانه‌زنی، بین تیمار شاهد و تیمارهای مختلف گلیسرول، ویتریفیکاسیون (PVS2)، کاهش رطوبت (Desiccation) تفاوت در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین تیمارها با آزمون دانکن نشان داد که درصد جوانه‌زنی و سرعت جوانه‌زنی در تیمار گلیسرول به ترتیب به میزان  $41/80$  و  $0/901$  از کمترین مقدار برخوردار بود (جدول ۲). همچنین درصد جوانه‌زنی در تیمار کاهش رطوبت و ویتریفیکاسیون تفاوت معنی‌داری با شاهد نداشت و سرعت جوانه‌زنی در تیمار کاهش رطوبت، تفاوت معنی‌داری با شاهد نداشت.

**جدول ۲-** میانگین مربعات جدول‌های تجزیه وایانس صفات اندازه‌گیری شده در نگهداری بذر گونه *S. spicigera* در شرایط آزمایشگاه پس از خروج از دمای  $196^{\circ}\text{C}$ ، فاکتور A زمان، فاکتور B پیش تیمارهای بکاربرده شده می‌باشد.

| منابع تغییرات     | درجه آزادی | درصد جوانه زنی | سرعت جوانه زنی |
|-------------------|------------|----------------|----------------|
| فاکتور A          | ۲          | $87/586^{ns}$  | $0/074^{ns}$   |
| فاکتور B          | ۳          | $897/315^{**}$ | $2/072^{**}$   |
| AB                | ۶          | $49/610^{ns}$  | $0/118^{ns}$   |
| خطا               | ۱۲         | $81/399$       | $0/102$        |
| ضریب تغییرات CV % |            | $15/71$        | $19/11$        |

ns و \*، \*\* به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۱، ۵ درصد و غیر معنی‌دار

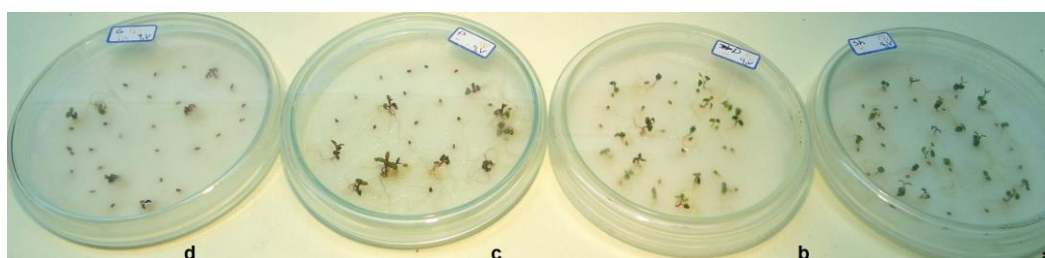
**جدول ۳-** مقایسه میانگین اثر تیمارها در نگهداری بذرهای گونه *S. spicigera* در شرایط آزمایشگاه پس از خروج از دمای  $196^{\circ}\text{C}$  به روش آزمون دانکن

| تیمار         | درصد جوانه زنی | سرعت جوانه زنی |
|---------------|----------------|----------------|
| ویتریفیکاسیون | $53/59ab$      | $1/673b$       |
| گلیسرول       | $41/80b$       | $0/901c$       |
| کاهش رطوبت    | $66/30a$       | $1/791ab$      |
| شاهد          | $67/96a$       | $2/326a$       |

## بحث

در مقایسه بین تیمارها با تیمار شاهد، در صد و سرعت جوانه‌زنی در تیمار کاهش رطوبت از بیشترین مقدار برخوردار بود (شکل ۱). استفاده از تیمار کاهش رطوبت با هدف تقلیل رطوبت بذر قبل از ورود به دمای  $-196^{\circ}\text{C}$  تاثیر مثبتی در درصد جوانه‌زنی و سرعت جوانه‌زنی داشت. در این بررسی مشاهده شد که این تیمار باعث حفاظت از بذر در شرایط فراسرد می‌شود و کاربرد این روش با موفقیت همراه می‌باشد. لذا از این روش می‌توان در مقیاس کاربردی استفاده نمود. در همین رابطه بردمور و وایتل (۲۰۰۵) نیز بکارگیری روش کاهش رطوبت را برای حفاظت از بذر موفقیت‌آمیز گزارش کردند.

بین زمان‌های نگهداری بذر در ازت مایع تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. بر اساس تئوری، در صورتی که بذر در محیط ازت مایع زنده بماند، نباید تفاوت محسوسی بین طول مدت نگهداری در کوتاه مدت و میان مدت وجود داشته باشد. زیرا با کاهش شدید فعالیت‌های متابولیکی و حیاتی، مساله زمان نگهداری تقریباً منتفی می‌شود. پاپوو و همکاران (۲۰۰۶) نیز نشان دادند که سلول‌های هویج پس از ۲۵ سال ذخیره در ازت مایع قابلیت تجدید حیات خود را حفظ می‌کند.



شکل ۱- مقایسه جوانه‌زنی بذر گیاه مرزه (*S. spicigera*) پس از خروج از دمای  $-196^{\circ}\text{C}$  (a) شاهد (b) کاهش رطوبت (c) ویتریفیکاسیون (d) گلیسرول

## سپاسگزاری

را برای انجام این تحقیق فراهم آورده‌اند، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

از مسئولان محترم گروه مستقل تحقیقات زیست‌فناوری منابع طبیعی که امکانات مالی و اجرایی

## "نمازی و همکاران، نگهداری بذر *Satureja spicigera* در شرایط فراسرد"

### فهرست منابع

### References

- ۱- جم زاد، ز. (۱۳۸۸). آویشن‌ها و مرزه‌های ایران، چاپ اول، انتشارات موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور ۱۷۱ صفحه.
- ۲- سفیدکن، ف.، ف. عسگری، ل. صادق زاده و پ. اولیاء. (۱۳۸۸). بررسی تاثیر اسانس سه گونه مرزه (*Satureja S. bachtiarica S. edmondi mutica*) بر سالمونلا پاراتیفی، مجله زیست شناسی ایران، جلد ۲۲، شماره ۲.
- ۳- سفیدکن، ف.، ل. صادق زاده، م. تیموری، ف. عسگری و ش. احمدی. (۱۳۸۶). بررسی اثرات ضد میکروبی اسانس دو گونه مرزه بختیاری و خوزستانی، فصلنامه علمی-پژوهشی گیاهان دارویی و معطر ایران تحقیقات، جلد ۲۳، شماره ۲، صفحه ۱۸۲-۱۷۴.
- 4- Beardmore, T. and Whittle, C.A., (2005). Induction of tolerance to desiccation and cryopreservation in silver maple (*Acer saccharinum*) embryonic axes. *Tree physiology*, 25(8), pp.965-972.
- 5- Engelmann, F., (1990). Use of cryopreservation for plant germplasm long-term conservation. Case history: Oil Palm somatic embryos. *International Journal of Refrigeration*, 13: 26-30.
- 6- Feyzi, M.T., (2002). Introduction of the *Satureja Bakhtiarica* and its Ecological Characteristic in Esfahan Province. *Proceeding of National Iranian Congress of Medical Plants*, Iran.
- 7- Hawksworth, D.L. and Bull, A.T., (2007). *Plant Conservation and Biodiversity*. Springer, Volume 6, 420 p.
- 8- ISTA [International Seed Testing Association]. (1996). *International Rules for Seed Testing*, 1996. *Seed Science and Technology*, 21(Suppl.): 1B288.
- 9- Lambardi, M., Benelli, C. and Decarlo, A., (2005). Cryopreservation as a tool for the long-term conservation of woody plant germplasm: development of the technology at the CNR/IVALSA Institute of Florence. *The Role of Biotechnology*: 181-182.
- 10- Li, D.Z. and Pritchard, H.W., (2009). The science and economics of ex situ plant conservation. *Trends in Plant Science*, 14: 614-621.
- 11- Ozkavukcu, S. and Erdemli, E., (2002). Cryopreservation: basic knowledge and biophysical effects. *Journal of Ankara Medical School*, 24 :187-196.
- 12- Popov, A.S., Popova, E.V., Nikishina, T.V. and Vysotskaya, O. N., (2006). Cryobank of plant genetic resources in Russian Academy of Sciences. *International Journal of Refrigeration*, 29: 403-410.
- 13- Rao, N.K., (2004). *Plant Genetic Resources: Advancing conservation and use through biotechnology*. *African Journal of Biotechnology*, 3: 136-145.
- 14- Reed, B.M. (2008). *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*. Springer, Chap 19. 515pp.
- 15- Ruan, S., Xue, Q. and Tylkowska, K., (2002). The influence of priming on germination of rice seeds and seedling emergence and performance in flooded soil. *Seed Science and Technology*, 30: 61-67.
- 16- Halmagyi, A., Deliu, C., & Isac, V. (2010). Cryopreservation of *Malus* cultivars: comparison of two droplet protocols. *Scientia horticulturae*, 124(3), 387-392.
- 17- Sant, R., Panis, B., Taylor, M., & Tyagi, A. (2008). Cryopreservation of shoot-tips by droplet vitrification applicable to all taro (*Colocasia esculenta* var. *esculenta*) accessions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 92(1), 107-111.

## Cryopreservation of *Satureja spicigera* seeds

Leila Ghaffarzadeh-Namazi<sup>1\*</sup>, Nadali Babaeian<sup>2</sup>, Abbas Ghamari-zare<sup>3</sup> and Ghorbanali Nematzadeh<sup>2</sup>

1- PhD student in Plant Breeding of Agricultural Sciences and Natural Recourses Sari University, Sari, Iran.

2- Professor of Agricultural Sciences and Natural Recourses Sari University, Sari, Iran.

3- Assistant Professor of Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, Iran.

namazi83@yahoo.com

### Abstract

In recent years, our country has drawn an increasing amount of attention to medicinal plants. Because different plant species Savory inappropriate harvesting of natural areas by humans, and the growing threat of biotic and abiotic stresses following the work resulted in reduced genetic diversity of a species is, a species of genetically keep reserves Curb upper's. Seed storage techniques using ultracold temperatures is one way of maintaining germplasm habitat conditions are outside, you can seed a long time, with much less cost and without loss of viability on storage. Using seed cryopreservation, as one of the Ex situ plant germplasm conservation method we can store seed for long-term, with much lower expenses and without losing seed viability. In order to preserve *Satureja spicigera* seed under -196°C condition, three precryopreservation treatments, PVS2 solution, Desiccation and Glycerol were applied. The treated seeds were transferred into Liquid Nitrogen (LN) and stored for 7, 30 and 90 days respectively. In this study the effect of cryopreservation on germination and growth indices (germination percent, germination rate, seed vigour index, plantlet length on orthodox seeds of plant species (*Satureja spicigera*) in storage conditions of cryopreservation (-196°C) were evaluated for 7, 30 and 90 days. Comparing treatments, significant differences were observed on germination indices and germination rate. The results showed that, the long-term preservation of the species, seed in -196 °C using suitable precryopreservation treatment is possible.

**Keywords:** *Satureja*, Cryopreservation, Germplasm, Glycerol, Vitrification