مقاله پژوهشی

Research Article

نشریه علمی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۹، شماره ۲، صفحه ۱۷۴-۱۶۳ (۱۴۰۲)

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijmapr.2022.359328.3206
شناسه دیجیتال (DOR): 20.1001.1.17350905.1402.39.2.1.8

ارزیابی تمایزی مرزه رشینگری (*Satureja rechingeri* Jamzad) و مرزه خوزستانی (*Satureja khuzistanica* Jamzad) با استفاده از صفات ریخت‌شناختی، فیتوشیمیایی و مولکولی

مهدیه صالحی وژده نظری[۱]، زهرا شیرازی[۲] و سمانه سماوات[۳*]

۱- دانش‌آموخته دکتری، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

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

۳*- نویسنده مسئول، استادیار، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

پست الکترونیک: samaneh.samavat@gmail.com

تاریخ دریافت: تیر ۱۴۰۱ تاریخ اصلاح نهایی: آذر ۱۴۰۱ تاریخ پذیرش: آذر ۱۴۰۱

چکیده

با توجه به قرابت ظاهری و تشابه خواص برخی گیاهان دارویی، شناسایی دقیق‌تر آنها به کمک روش‌های مختلف ضرورت دارد. بر این اساس در پژوهش حاضر به مطالعه و مقایسه مرزه رشینگری (*Satureja rechingeri* Jamzad) و مرزه خوزستانی (*S. khuzistanica* Jamzad) به لحاظ خصوصیات ریخت‌شناختی، فیتوشیمیایی و مولکولی پرداخته شد. بذرهای مرزه رشینگری و خوزستانی به‌ترتیب از استان‌های ایلام و لرستان جمع‌آوری شدند و پس از شناسایی علمی، در گلخانه پژوهشی مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور کاشته شدند. سپس نشاءها به مزرعه تحقیقاتی مؤسسه مذکور براساس آزمون t (n=3) منتقل شدند. چندین صفت مهم ریخت‌شناختی ازجمله طول گل‌آذین، طول میانگره ساقه گل‌آذین، طول و قطر کاسه گل، طول سه دندانه بزرگ و دو دندانه کوچک، طول و قطر جام گل، طول پرچم، طول کلاله، طول و عرض برگ اندام رویشی، طول و عرض برگک، قطر ساقه، ارتفاع بوته، تعداد شاخه اصلی و فرعی، بزرگ‌ترین و کوچک‌ترین قطر تاج پوشش و طول و عرض برگ اندام زایشی در مرحله گلدهی کامل در سال سوم کاشت اندازه‌گیری شد. از سرشاخه‌های گلدار گیاهان در سال سوم کاشت به روش تقطیر با آب اسانس‌گیری شد. بازده اسانس‌ها محاسبه و با استفاده از کروماتوگراف گازی فوق سریع (GC-FID) و کروماتوگراف گازی متصل به طیف‌سنج جرمی (GC/MS) ترکیب‌های تشکیل‌دهنده آنها شناسایی شد. از روش بارکدگذاری DNA و نشانگر ITS به‌منظور مطالعات مولکولی روی این دو گونه مرزه استفاده شد. نتایج نشان داد، این دو گونه از نظر تمامی صفات ریخت‌شناختی مورد بررسی اختلاف معنی‌دار ($P<0.01$) با یکدیگر نداشتند. ۱۳ ترکیب مشترک در اسانس این دو گونه مرزه شناسایی شد. اسانس مرزه رشینگری و خوزستانی به‌ترتیب شامل ۸۸/۶٪ و ۸۹/۵٪ کارواکرول بود. بازده اسانس مرزه رشینگری ۳/۱۳٪ و مرزه خوزستانی ۳/۰۴٪ بدست آمد. این دو گونه ۱۰۰٪ تشابه نوکلئوتیدی با یکدیگر داشتند و از قرابت بالایی با گونه *S. bachtiarica* (۹۸٪) برخوردار بودند. بر این اساس به احتمال زیاد مرزه رشینگری و خوزستانی نه تنها گونه‌های مستقل از یکدیگر نیستند بلکه ممکن است اکسشن‌های مختلف یک گونه باشند.

واژه‌های کلیدی: اسانس، بارکدگذاری DNA، کارواکرول، گونه، گیاه دارویی.

Copyright: © 2023 by the authors. This is an open access, peer-reviewed article published by Research Institute of Forests and Rangelands (http://ijmapr.areeo.ac.ir/) and distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

مقدمه

جنس مرزه (*Satureja* L.) متعلق به خانواده نعنا (Lamiaceae) و دارای تعداد زیادی گونه و زیرگونه است. در ایران برای این جنس ۱۵ گونه معرفی شده است که از میان آنها گونه‌های *S. intermedia*، *S. edmondi*، *S. isophylla*، *S. rechingeri*، *S. bachtiarica*، *S. kallarica*، *S. atropatanatana*، *S. sahendica*، *S. khuzistanica* و *S. kermanshahensis* انحصاری کشور هستند (Shahnazi *et al*., 2008; Jamzad, 2010). گونه‌های انحصاری مذکور در بسیاری از مناطق کشور شامل استان‌های مازندران، کردستان، کرمانشاه، آذربایجان، اصفهان، چهارمحال و بختیاری، گیلان، کهگیلویه و بویراحمد، فارس، خراسان و لرستان می‌رویند. سایر گونه‌ها علاوه بر ایران در ترکمنستان، ترکیه، قفقاز، ماورای قفقاز و عراق نیز رویش دارند. از آنجایی که اسانس این گیاهان شامل مقادیر قابل توجهی از مواد مؤثره ارزشمندی مانند تیمول و کارواکرول است، در میان انواعی از گیاهان دارویی مورد مطالعه، از جایگاه ویژه‌ای برخوردار هستند (Sefidkon *et al*., 2016a).

از میان گونه‌های مختلف مرزه بومی فلور ایران، دو گونه مرزه خوزستانی (*S. khuzistanica* Jamzad) و مرزه رشینگری (*S. rechingeri* Jamzad)، قرابت و شباهت زیادی با یکدیگر دارند تا جایی که در بسیاری از مواقع به راحتی قابل تمایز از یکدیگر نیستند. این دو گونه از گیاهان دارویی چند ساله و معطّر هستند که در مناطق خشک، آفتابی و خاک‌های سنگلاخی و آهکی جنوب‌غرب ایران رویش دارند (Afzalifar *et al*., 2019). اسانس حاصل از این دو گونه مرزه، غنی از ترکیبات فنلی کارواکرول و عصاره‌های آنها شامل اسیدهای فنلی آزاد به‌ویژه رزمارینیک اسید است که باعث شده تا از فعالیت بیولوژیکی قابل ملاحظه‌ای برخوردار شوند. ذکر این نکته اهمیت دارد که اگرچه ممکن است کارواکرول در اسانس سایر گیاهان دارویی نیز یافت شود ولی از ویژگی‌های بارز اسانس این دو گونه، وجود ۹۰-۸۰٪ از این ترکیب فنولی با ارزش است. این در حالی است که در اسانس سایر گیاهان دارویی ازجمله آویشن، مرزنگوش و پونه کوهی حداکثر ۴۰٪ کارواکرول یافت می‌شود. هردو گونه در طب سنتی به‌عنوان آنتی‌اکسیدان، تسهیل‌کننده عمل هضم، ضد التهاب، مدر، مسکن و ضدعفونی کننده و نیز به‌عنوان دمنوش و ادویه استفاده می‌شوند (Nooshkam *et al*., 2015؛ Amiri & Ghasemi Ramadanabad, 2018).

گونه مرزه خوزستانی براساس گزارش Jamzad (۱۹۹۴)، گیاهی بوته‌ای چند ساله به ارتفاع حدود ۳۰ سانتی‌متر، با ساقه‌های منشعب و پوشیده از کرک‌های زگیل مانند خیلی کوتاه ساده و غده‌دار، با میانگره‌های کوتاه است. برگ‌ها متراکم، نسبتاً هم‌پوش، متقابل متناوب، مسطح، تخم‌مرغی- دایره‌ای، در قاعده باریک، پوشیده از کرک، در سطح زیرین با تراکم بیشتر، همراه با غده‌های ترشحی متراکم در سطح فوقانی و در حاشیه کم و بیش مژه‌دار هستند. گل‌آذین متشکل از چرخه‌هایی با ۲ تا ۸ گل است. برگک‌ها سرنیزه‌ای، کاسه گل لوله‌ای- استکانی و دو لبه‌ای می‌باشد. دندانه‌های لبه بالایی سه‌گوش و دندانه‌های لبه پائینی خطی است. جام گل بنفش مایل به آبی است. پرچم‌ها چهار عدد، به صورتی که دو تا از پایینی کم و بیش از لوله گل بیرون آمده است. میوه از نوع فندقه است.

گونه مرزه رشینگری نیز براساس توصیف Jamzad (۱۹۹۶)، گیاهی چند ساله و بسیار معطر، با قاعده چوبی و منشعب است. ساقه به ارتفاع حدود ۵۰ سانتی‌متر و پوشیده از کرک‌های بلند خاکستری است. برگ‌ها پوشیده از غده‌های ترشحی بدون پایک فراوان است. برگ‌های پایینی مسطح و برگ‌های بالایی به‌تدریج به طرف نوک به طرف داخل تاخورده‌اند. گل‌آذین سنبله مانند، متراکم با فاصله کم نسبت به یکدیگر هستند. برگک‌ها سرنیزه‌ای، کاسه گل لوله‌ای- استکانی، دو لبه‌ای، دندانه‌های لبه بالایی سه‌گوش، نوک تیز و دندانه‌های لبه پائینی سرنیزه‌ای هستند. جام گل زرد کم رنگ، با لبه ارغوانی است و پرچم‌ها کمی از گل خارج شده‌اند. میوه از نوع فندقه است.

طبق فلور ایران (Ghahraman, 1999)، این دو گونه براساس صفات مرتبط با برگ‌ها در یک کلاس قرار

گرفته‌اند و فقط از این لحاظ که مرزه خوزستانی گیاهی سبز مایل به خاکستری با گل‌های بنفش و مرزه رشینگری گیاهی نقره‌ای مایل به خاکستری با گل‌هایی زرد کم‌رنگ است، در دو گونه متمایز نام‌گذاری شده‌اند.

با توجه به شباهت بسیار زیاد گونه‌های رشینگری و خوزستانی به لحاظ خصوصیات گیاه‌شناختی، اکولوژیکی و خواص دارویی، برای شناسایی و تفکیک دقیق‌تر آنها از یکدیگر، لازم است از روش‌های مولکولی نیز بهره جست. ازجمله این روش‌ها، بارکدگذاری DNA (DNA barcoding) است. در این روش از یک توالی کوتاه از یک منطقه استاندارد ژنوم مانند توالی‌های ITS (Internal Transcribed Spacer) برای تشخیص، تمایز و تخصیص نمونه‌ها به گونه‌های شناخته شده یا جدید استفاده می‌شود. این روش دارای اهمیت معنی‌داری در طبقه‌بندی سریع، دقیق و مطمئن گونه‌های متنوع موجودات زنده است. بارکدگذاریDNA ، فرصت شناسایی، ایجاد فهرست و مطالعه گونه‌ها را برای درک تنوع گونه‌های درون یک اکوسیستم و ارزیابی تنوع ژنتیکی درون گونه‌ها فراهم می‌کند. بر این اساس محققان می‌توانند به شناسایی سریع‌تر و دقیق‌تر گونه‌ها حتی در مراحل اولیه رشد بپردازند (Ghahramanzadeh *et al*., 2012). نشانگر ITS، شامل توالی‌هایی است که ژن‌های ۱۸ s،۵/۸s و ۲۸s را از هم جدا می‌کند (Wheeler & Honeycutt,1988). از آنجایی که بر خلاف نواحی ژنومی DNA ریبوزومی تکامل نواحی بین ژنی خیلی سریع‌تر است، این نواحی به‌طور گسترده‌ای به‌عنوان یک نشانگر مناسب برای بررسی روابط فیلوژنتیکی در سطوح مختلف ازجمله در بررسی یک جنس منفرد، زیرجنس، در میان گونه‌های خویشاوند یا در میان جمعیت‌های درون یک گونه استفاده می‌شوند (Porter & Collins, 1991). Sonboli و همکاران (۲۰۱۳)، به منظور شناسایی و تأیید مولکولی گونه *Thymus persicus* از توالی‌های nrDNA ITS استفاده کردند. Noormand Moaied و همکاران (۲۰۲۱)، نیز در مطالعه روابط فیلوژنتیکی گونه‌های متعلق به جنس مرزه، از ژن هسته‌ای ITS و ژن کلروپلاستی *mat*K استفاده کردند.

به این ترتیب، این پژوهش با هدف انجام مطالعات مقایسه‌ای بیشتر بر روی ویژگی‌های ریخت‌شناختی، فیتوشیمیایی و مولکولی این دو گونه مرزه انجام شده است تا براساس نتایج حاصل به تأیید و یا رد نظریه متمایز بودن دو گونه از یکدیگر دست یابد.

مواد و روش‌ها

بذر مرزه رشینگری و خوزستانی به‌ترتیب از استان‌های ایلام و لرستان جمع‌آوری شدند و پس از شناسایی علمی براساس صفات ریخت‌شناختی (برگ‌های مرزه خوزستانی سبز مایل به خاکستری با گل‌های بنفش و مرزه رشینگری با برگ‌های نقره‌ای مایل به خاکستری و گل‌هایی زرد کم‌رنگ است)، در اسفندماه ۱۳۹۷ در سینی نشاء (حاوی ۸۰٪ پیت‌ماس و ۲۰٪ پرلیت) در گلخانه پژوهشی مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور کاشته شدند. نشاءها به‌صورت یک روز در میان آبیاری شدند. پس از رسیدن نشاءها به ارتفاع حدود ۱۰ سانتی‌متر، در فروردین ۱۳۹۸ به مزرعه تحقیقاتی مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور واقع در استان تهران منتقل شدند. مختصات جغرافیایی محل کشت شامل عرض جغرافیایی ۳۵ درجه و ۴۱ دقیقه شمالی و طول جغرافیایی ۵۱ درجه و ۱۹ دقیقه شرقی، در ارتفاع ۱۳۲۰ متری از سطح دریا، با شیب اصلی ۲/۶٪ (شمال به جنوب) و شیب فرعی ۱/۹٪ (غرب به شرق) است. در سیستم طبقه‌بندی آمبرژه از آب و هوای خشک و سرد با میانگین درجه حرارت سالانه ۱۷/۲°C برخوردار است. حداکثر دمای سالانه ۴۳ درجه سانتی‌گراد در تیرماه و حداقل آن ۱۵- درجه سانتی‌گراد در دی‌ماه با متوسط بارندگی سالانه ۲۳۰/۵ میلی‌متر است. بافت خاک لومی‌شنی و به لحاظ اسیدیته قلیایی است. آزمایش در قالب آزمون t با سه تکرار انجام شد. انتخاب تکرارها به‌طور تصادفی و از سه بلوک (حداقل ۱۰ بوته) انجام شد. کرت‌ها در ابعاد ۲×۲ متر و با فاصله ۲ متر از هم و فاصله بین بلوک‌ها ۳ متر بود. آبیاری به‌صورت قطره‌ای انجام شد که در ابتدای رشد

گیاهچه‌ها، دو نوبت در هفته و پس از استقرار گیاه، به یک نوبت در هفته در روزهای خنک و یک روز در میان در روزهای گرم رسید. کنترل علف‌های هرز هم به روش دستی انجام شد.

مطالعات ریخت‌شناختی

چندین صفت مهم ریخت‌شناختی ازجمله طول گل‌آذین، طول میانگره گل‌آذین، طول کاسه گل، قطر کاسه گل، طول ۳ دندانه بزرگ، طول ۲ دندانه کوچک، طول و قطر جام گل، طول پرچم، طول کلاله، طول و عرض برگ رویشی، طول و عرض برگک، قطر ساقه، ارتفاع بوته، تعداد شاخه اصلی، تعداد شاخه فرعی، بزرگترین قطر تاج پوشش، کوچکترین قطر تاج پوشش و طول و عرض برگ زایشی در مرحله گلدهی کامل در سال سوم کاشت اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری صفات با استفاده از خط‌کش و کولیس ورنیه انجام گردید.

بررسی‌های فیتوشیمیایی

برای این منظور، در سال سوم کاشت از سرشاخه گلدار گیاه در مرحله گلدهی کامل نمونه‌برداری شد. پس از خشک شدن نمونه‌ها در شرایط سایه و دمای ۲۵±۲°C، ۱۰۰ گرم از نمونه خشک شده توسط آسیاب برقی پودر گردید. اسانس‌گیری توسط دستگاه کلونجر به روش تقطیر با آب انجام شد. رطوبت احتمالی اسانس‌ها با پودر سولفات سدیم بی‌آب (Na_2SO_4) به‌عنوان ماده جاذب رطوبت، حذف شد. اسانس‌های بدست آمده تا زمان تزریق به دستگاه گاز کروماتوگرافی در یخچال (دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند. بازده اسانس براساس وزن خشک سرشاخه محاسبه شد.

کروماتوگراف گازی فوق سریع (GC-FID)

به منظور جداسازی و شناسایی ترکیب‌های تشکیل دهنده اسانس هر یک از دو گونه مرزه مورد مطالعه، نمونه‌های اسانس به دستگاه کروماتوگراف گازی فوق سریع (Thermo-UFM) مجهز به آشکارساز یونیزاسیون شعله (FID) و داده‌پرداز با نرم‌افزار Chrom-Card 2006 مورد استفاده قرار گرفت. دستگاه دارای ستون DB-5 نیمه قطبی (به طول ۱۰ متر، قطر داخلی ۰/۱ میلی‌متر و ضخامت لایه فاز ساکن برابر ۰/۴ میکرومتر) بود. گاز حامل، هلیوم و فشار آن در ابتدای ستون برابر $3\ Kg\ cm^{-2}$، دمای قسمت تزریق ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد و دمای آشکارساز ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شده بود.

کروماتوگراف گازی متصل به طیف‌سنج جرمی (GC/MS)

کروماتوگراف گازی Varian-3400 متصل شده با طیف‌سنجی جرمی (Saturn II)، ستون DB-5 نیمه‌قطبی به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۲۵ میکرومتر و ضخامت لایه فاز ساکن برابر ۰/۲۵ میکرومتر بود. برنامه‌ریزی حرارتی ستون از ۶۰ تا ۲۷۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت افزایش دمای ۳ درجه سانتی‌گراد در دقیقه و دمای محفظه تزریق ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد بود. دتکتور Ion trap، گاز حامل هلیوم و سرعت جریان گاز حامل ۳۵ میلی لیتر در دقیقه بود.

با استفاده از شاخص بازدارندگی (RI)، بررسی طیف‌های جرمی و مقایسه این پارامترها با ترکیب‌های استاندارد و یا با اطلاعات موجود در کتابخانه دستگاه GC/MS نسبت به شناسایی ترکیب‌های تشکیل‌دهنده اسانس اقدام شد. درصد کمّی این ترکیب‌ها نیز با محاسبه سطوح زیر منحنی در کروماتوگرام‌های GC محاسبه گردید.

مطالعات مولکولی

بررسی ناحیه ژنومی ITS

از برگ‌های مرزه گونه‌های خوزستانی و رشینگری مطابق روش Dellaporta و همکارن (۱۹۸۳)، با کمی تغییر، استخراج DNA ژنومی انجام شد. به کمک الکتروفورز ژل آگارز و اسپکتروفتومتری، کمّیت و کیفیت DNA استخراج شده بررسی شد. مطابق جدول ۱، از دو جفت آغازگر ساخته شده توسط شرکت پیشگام بیوتکنولوژی برای تکثیر

ناحیه ITS دو گونه مرزه مورد مطالعه استفاده شد و بعد مطابق شرایط ذکر شده در جدول ۲، واکنش PCR توسط دستگاه ترموسایکلر انجام گردید.

جدول ۱- توالی‌ها و دمای اتصال آغازگرهای ITS

Table 1. Sequences and annealing temperatures of ITS primers

Primer	Sequence	Annealing temperature (ºC)
ITSa Forward	GAGGAAGGAGAAGTGGTAAC	60
ITSa Reverse	GATATGCTTAAACTCAGC	
ITSb Forward	TATCTTTAGAGGAAGGA	50
ITSb Reverse	GATATGCTTAAACTCAGC	

جدول ۲- چرخه‌های دما و زمان PCR سه مرحله‌ای

Table 2. Three-step PCR temperature and time cycles

	Step	Temperature (ºC)	Time (min)	Number of cycles
Step 1	Initial denaturation	94	5	1
	Denaturation	94	1	
Step 2	Annealing	60/50	1	35
	Extension	72	1	
Step 3	Final extension	72	10	1

به‌منظور توالی‌یابی ناحیه ITS، محصولات حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، به شرکت کدون ارسال شدند. کیفیت، سرهم‌بندی، هم‌ترازی و تنوع توالی‌های بدست آمده از دو گونه مرزه توسط نرم‌افزار جنیوس (Geneious Prime Software, 2019) بررسی شد. BLAST توالی‌ها به کمک پایگاه داده NCBI انجام شد. همچنین پس از ویرایش، اطلاعات خوانش توالی بدست آمده، در پایگاه داده NCBI ثبت گردید.

تجزیه‌وتحلیل آماری

داده‌های حاصل از مطالعات ریخت‌شناختی براساس آزمون t و با سه تکرار مورد تجزیه‌وتحلیل آماری قرار گرفتند. تجزیه واریانس و مقایسه میانگین داده‌ها به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن و با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (IBM SPSS Statistics V 22) انجام شد.

نتایج

مطالعات ریخت‌شناختی

نتایج مربوط به آزمون t صفات ریخت‌شناختی مورد بررسی، نشان داد که دو گونه مرزه رشینگری و خوزستانی از نظر تمامی صفات مورد بررسی اختلاف آماری معنی‌داری ($P<0.01$) را با یکدیگر نداشتند (جدول ۳).

بررسی‌های فیتوشیمیایی

نتایج مربوط به آنالیز GC و GC/MS منجر به شناسایی ۱۳ ترکیب در اسانس مرزه رشینگری و خوزستانی در مرحله گلدهی کامل شد (جدول ۴). از میان ترکیب‌های اصلی اسانس، کارواکرول بخش عمده اسانس‌ها را تشکیل می‌داد، به‌نحوی که اسانس مرزه رشینگری و خوزستانی به‌ترتیب شامل ۸۸/۶٪ و ۸۹/۵٪ کارواکرول بود. بازده اسانس مرزه رشینگری ۳/۱۳٪ و مرزه خوزستانی ۳/۰۴٪ بود.

جدول ۳- نتایج **t-test** برای مقایسه میانگین‌های صفات ریخت‌شناختی در دو گونه مرزه رشینگری (***Satureja rechingeri***) و خوزستانی (***S. khuzistanica***) در مرحله گلدهی کامل در شرایط مزرعه (**n=3**) (***P*<0.01**)

Table 3. T-test results for means comparison of morphological traits in *Satureja rechingeri* and *S. khuzistanica* at full flowering stage under field conditions (n=3) (*P*<0.01)

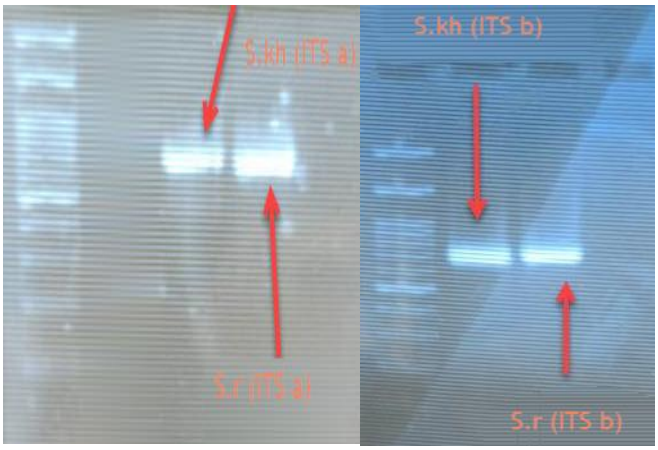
Source	Species	IL	ISIL	CL	CD	CL3	CS	COL	COW	SL	STL	LLVO	LWVO	LL	LW	SD	PH	NOM	NOS	LCC	SCC	LLRO	LWRO
Mean	K	14.33	0.92	10.67	3.20	3.07	2.03	13.87	6.03	9.10	0.47	16.43	10.10	5.40	2.43	1.57	35.00	1.00	21.67	36.67	22.33	11.50	7.53
	R	14.00	1.12	12.00	3.43	3.50	2.03	13.17	5.30	10.0	0.40	15.30	8.50	5.00	2.13	1.70	43.00	1.00	22.00	39.90	17.00	10.20	6.70
SE	K	0.33	0.17	0.33	0.12	0.03	0.03	0.45	0.03	0.06	0.03	0.03	0.06	0.06	0.03	0.03	2.90	0.00	1.70	1.70	1.50	0.15	0.09
	R	0.58	0.04	0.29	0.09	0.12	0.03	0.09	0.21	0.29	0.06	0.29	0.40	0.12	0.09	0.15	1.50	0.00	1.20	1.20	1.50	0.80	0.51
SD	K	0.58	0.29	0.57	0.20	0.06	0.06	0.78	0.06	0.10	0.06	0.06	0.10	0.10	0.06	0.06	5.00	0.00	2.89	2.89	2.52	0.25	0.15
	R	1.00	0.07	0.50	0.15	0.20	0.06	0.15	0.36	0.50	0.10	0.50	0.70	0.20	0.15	0.26	2.65	0.00	2.0	2.01	2.65	1.39	0.89
d.f.		3.00	2.00	3.00	3.00	2.00	4.00	2.00	2.00	2.00	3.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	3.00	-	3	3.00	3.00	2.00	2.00
T-value		0.50	1.44	-3.05	-1.61	-3.61	0.00	1.53	3.48	-3.06	1.00	3.76	3.92	3.10	3.18	-0.85	-2.45	-	-0.16	-1.59	2.53	1.55	1.60
P-value		0.65	0.29	0.06	0.21	0.07	1.00	0.27	0.07	0.09	0.39	0.06	0.06	0.09	0.09	0.48	0.09	-	0.88	0.21	0.08	0.26	0.25
C.V.(%)		5.31	22.20	7.71	6.15	8.27	2.54	4.67	8.18	6.17	18.84	4.29	10.58	5.01	8.50	11.40	14.50	0.00	10.21	7.42	18.93	10.44	10.26

K: *S. khuzistanica*; R: *S. rechingeri*; IL: Inflorescence length, ISIL: Inflorescence stem internode length, CL: Calyx length, CD: Calyx diameter, CL3: Calyx three- large teeth length, CS: Calyx two-short teeth length, COL: Corolla length, COW: Corolla width, SL: Stamen length, STL: Stigma length, LLVO: Leaf length of vegetative organ, LWVO: Leaf width of vegetative organ, LL: Leaflet length, LW: Leaflet width, SD: Stem diameter, PH: Plant height, NOM: Number of main branches, NOS: Number of sub-branches, LCC: Largest canopy cover, SCC: Smallest canopy cover, LLRO: Leaf length of reproductive organ, LWRO: Leaf width of reproductive organ.

جدول ۴- ترکیب‌های اصلی موجود در اسانس دو گونه مرزه رشینگری (***Satureja rechingeri***) و خوزستانی (***S. khuzistanica***)

Table 4. Essential oil main compounds in *Satureja rechingeri* and *S. khuzistanica*

Components	RI	*S. khuzistanica* (%)	*S. rechingeri* (%)
α-thujene	926	0.4	0.6
α-pinene	939	0.4	0.2
cis-sabinene hydrate	951	2.0	1.7
α-phellandrene	1003	0.6	0.3
α-terpinene	1013	2.1	0.7
p-cymene	1021	0.1	2.6
γ-terpinene	1058	1.9	2.0
terpinolene	1084	0.2	0.9
linalool	1100	0.6	0.99
borneol	1167	0.5	0.8
thymol	1292	0.5	0.3
carvacrol	1301	89.5	88.6
E-caryophyllene	1424	0.4	0.8



شکل ۱- الکتروفورز ژل آگارز محصولات تکثیر شده دو آغازگر ITS_a و ITS_b روی ژنوم دو نمونه مرزه رشینگری (***Satureja rechingeri***) و خوزستانی (***S. khuzistanica***) (نشانگر **3kb**)

Figure 1. Amplified products agarose gel electrophoresis of ITS_a and ITS_b primers on *Satureja rechingeri* and *S. khuzistanica* genomes (3kb marker)

مطالعات مولکولی

نتایج حاصل از تکثیر دو جفت آغازگر ناحیه ژنومی ITS برای دو گونه مرزه خوزستانی و رشینگری بر روی ژل آگارز ۰/۸٪ در شکل ۱ نشان داده شده است.

پس از توالی‌یابی و تعیین کیفیت و ویرایش داده‌ها، توالی‌های بدست آمده، با استفاده از Clustal W موجود در نرم‌افزار جنیوس هم‌ردیف شدند و ماتریکس تشابه و تفاوت آنها رسم شد (جدول ۵). هر چهار توالی ۱۰۰٪ تشابه داشتند که نشان‌دهنده این است که احتمالاً این دو گونه یکی هستند. توالی‌های مورد بررسی با شماره دستیابی

جدول ۵- درصد تشابه توالی ناحیه ITS مرزه رشینگری (*Satureja rechingeri*) و خوزستانی (*S. khuzistanica*) با دو جفت آغازگر ITS_a و ITS_b

Table 5. Sequence similarity percentage of ITS region in *Satureja rechingeri* and *S. khuzistanica* by two pairs of ITS_a and ITS_b primers

	S. rechingeri (ITS_a)	*S. khuzistanica* (ITS_b)	*S. khuzistanica* (ITS_a)	*S. rechingeri* (ITS_b)
S. rechingeri (ITS_a)		100%	100%	100%
S. khuzistanica (ITS_b)	100%		100%	100%
S. khuzistanica (ITS_a)	100%	100%		100%
S. rechingeri (ITS_b)	100%	100%	100%	

ON520804، ON479497، ON596905 و ON597080 ثبت شدند. BLAST توالی‌ها در پایگاه دادهNCBI ، با توالی *S. bachtiarica* L.، ۹۸٪ تشابه نشان داد.

بحث

ازجمله باارزش‌ترین منابع طبیعی در جهان، گیاهان دارویی هستند که شناسایی دقیق و علمی آنها بسیار حائز اهمیت است. این مسئله به‌ویژه در مورد گونه‌هایی از گیاهان دارویی که از نظر فنوتیپی شباهت زیادی با یکدیگر دارند، بیشتر مطرح است. دو گونه مرزه رشینگری و خوزستانی نیز به لحاظ خصوصیات ریخت‌شناختی شباهت زیادی به یکدیگر دارند، به‌طوری که به راحتی قابل تشخیص از یکدیگر نیستند. در حال حاضر نیز اندام‌های هوایی این دو گونه به‌صورت مخلوط با یکدیگر از رویشگاه‌های طبیعی جمع‌آوری می‌شود و در صنایع دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Esmaeili *et al*., 2016). بنابراین بایستی از ابزارهای دیگری مانند مطالعات فیتوشیمیایی و مولکولی بهره جست تا بتوان با اطمینان بیشتری آنها را از یکدیگر تشخیص داد. بر این اساس بیشتر محققان علاوه بر مطالعات ریخت‌شناختی، به بررسی سایر خصوصیات گونه‌های مرزه نیز اهتمام داشته‌اند. Hadian و همکاران (۲۰۱۱)، در مطالعات خود ۶۹ فرد از ۸ جمعیت مرزه خوزستانی را مورد ارزیابی ریخت‌شناختی و فیتوشیمیایی قرار دادند. Esmaeili و همکاران (۲۰۱۶) نیز به بررسی جمعیت‌های مختلف مرزه رشینگری به لحاظ خصوصیات ریخت‌شناختی، فیتوشیمیایی و اکولوژیکی پرداختند. در بررسی‌های مولکولی نیز Peiri و Fazeli (۲۰۲۲) با استفاده از بارکدگذاری DNA به شناسایی اکوتیپ‌ها و گونه‌های مختلف مرزه پرداختند.

در این پژوهش، ابتدا به بررسی و مقایسه صفات ریخت‌شناختی متعددی ازجمله طول گل‌آذین، طول میانگره گل‌آذین، طول کاسه گل، قطر کاسه گل، طول ۳ دندانه بزرگ، طول ۲ دندانه کوچک، طول و قطر جام گل، طول پرچم، طول کلاله، طول و عرض برگ رویشی، طول و عرض برگک، قطر ساقه، ارتفاع بوته، تعداد شاخه اصلی، تعداد شاخه فرعی، بزرگترین قطر تاج پوشش، کوچکترین قطر تاج پوشش و طول و عرض برگ زایشی در مرحله گلدهی کامل بین دو گونه مرزه رشینگری و خوزستانی پرداخته شد. طبق نتایج بدست آمده این دو گونه به لحاظ صفات ریخت‌شناختی مورد مطالعه، اختلاف آماری معنی‌داری با یکدیگر نشان ندادند ($P<0.01$). تاکنون مطالعات ریخت‌شناختی متعددی توسط محققان بسیاری در مورد این دو گونه گیاه دارویی انجام شده است. در این زمینه Jamzad (۱۹۹۶)، اگرچه مرزه رشینگری را براساس مطالعات ریخت‌شناختی انجام شده، به‌عنوان یک گونه مستقل گزارش کرده است، ولی به قرابت زیاد این گونه با گونه‌های *S. khuzistanica*، *S. edmondi* Briq. و *S. macrantha* C.A.Mey. نیز اشاره کرده است. Esmaeili و همکاران (۲۰۱۶) نیز به بررسی صفات ریخت‌شناختی متعددی مانند طول و عرض برگ، سطح برگ، طول میانگره، طول دمگل، طول جام گل، طول و قطر کاسه گل، نسبت

طول کاسه به قطر و نسبت طول جام به طول کاسه در جمعیت‌های مختلف مرزه رشینگری پرداختند. Nooshkam و همکاران (۲۰۱۵) به مقایسه عملکرد رویشی مرزه رشینگری و خوزستانی از نظر وزن تر و خشک، ارتفاع بوته و نسبت برگ به ساقه در دو منطقه لرستان و خوزستان پرداختند. براساس نتایج بدست آمده این دو گونه در منطقه خوزستان از نظر عملکرد وزن تر و خشک (تن در هکتار) با یکدیگر اختلاف آماری معنی‌داری نداشتند ($P<0.01$).

طبق نتایج مربوط به مطالعات فیتوشیمیایی، بیشترین ترکیب موجود در اسانس مرزه رشینگری و خوزستانی کارواکرول بود که به‌ترتیب ۸۸/۵۷٪ و ۸۹/۵٪ از اسانس‌ها را شامل می‌شد. این نتایج با یافته‌های سایر محققان مطابقت دارد. Zarezadeh و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند که بیشترین و کمترین درصد کارواکرول در مرزه خوزستانی به‌ترتیب مربوط به اکسشن EK (۹۲/۵۹٪) با منشأ استان لرستان و اکسشن HKP (۸۷٪) با منشأ استان ایلام بود. طبق یافته‌های Sefidkon و همکاران (۲۰۱۶b) نیز ترکیب عمده اسانس همه جمعیت‌های بررسی شده از مرزه رشینگری در سه سال متوالی پس از کاشت، کارواکرول بود که بین ۸۸-۸۰٪ اسانس را در گیاهان دو و سه ساله به خود اختصاص داده بود. در این بررسی، بازده اسانس برای مرزه رشینگری و خوزستانی به‌ترتیب ۳/۱۳٪ و ۳/۰۴٪ محاسبه شد. طبق گزارش Sefidkon و همکاران (۲۰۰۷) نیز در مرحله گلدهی کامل، بازده اسانس مرزه رشینگری جمع‌آوری شده از رویشگاه، بین ۲/۴۶٪ تا ۴/۲۴٪ متغیر بود. Majd و همکاران (۲۰۰۹) نیز بازده اسانس مرزه خوزستانی در مرحله گلدهی کامل را ۳/۷۵٪ گزارش کردند.

در این پژوهش از نشانگر ITS به منظور انجام مطالعات مولکولی بر روی مرزه رشینگری و خوزستانی استفاده شد. Noormand Moaied و همکاران (۲۰۲۱) نیز گزارش کردند که در بررسی روابط خویشاوندی جنس مرزه، ژن هسته‌ای ITS نسبت به ژن کلروپلاستی *mat*K مناسب‌تر است. طبق نتایج بدست آمده مشخص شد که مرزه رشینگری و مرزه خوزستانی ۱۰۰٪ تشابه نوکلئوتیدی با یکدیگر دارند و احتمالاً این دو گونه یکی هستند. همچنین این دو مرزه به لحاظ مولکولی از قرابت بالایی با گونه *S. bachtiarica* (۹۸٪) برخوردار بودند. بر این اساس به احتمال زیاد مرزه رشینگری و خوزستانی نه تنها گونه‌های مستقل از یکدیگر نیستند بلکه ممکن است اکسشن‌های مختلف یک گونه باشند. Noormand Moaied و همکاران (۲۰۲۱) نیز در مطالعه فیلوژنی جنس مرزه به بررسی ۲۱ اکسشن در قالب ۹ گونه از رویشگاه اصلی در هشت استان ایران پرداختند. طبق یافته‌های آنها، در گونه‌های بومی ایران حداکثر فاصله ژنتیکی بین گونه‌های *S. mutica* و *S. atropatana* و حداقل فاصله ژنتیکی بین گونه‌های *S. rechingeri* و *S. khuzistanica* بود. Peiri و Fazeli (۲۰۲۲) به شناسایی هفت اکوتیپ از گیاه دارویی مرزه (*S. mutica* ،*S. biossier* ، *S. bachtiarica*، *S. horentiss* و *S. bakhtiarica*) با استفاده از بارکدگذاری DNA پرداختند. یافته‌های آنان نشان داد که شباهت بسیار بالایی (بیش از ۹۶٪) بین توالی‌های بدست آمده و توالی‌های پایگاه NCBI وجود دارد. Saadati و همکاران (۲۰۲۱) نیز به‌منظور شناسایی چهار گونه گیاهی شامل مرزه جنگلی (*S. mutica*)، همیشه بهار (*Calendula persica*)، خارمریم (*Silybum marianum*) و پنیرک معمولی (*Malva neglecta*) از روش بارکدگذاری DNA استفاده کردند. همچنین، مقایسه بارکدهای گونه‌های جمع‌آوری شده توسط آنان از مراتع و عطاری‌ها نشان داد که برخی گونه‌های گیاهی شناسایی شده از طریق مولکولی با گیاهان شناسایی و عرضه شده براساس خصوصیات ظاهری، متفاوت هستند. بنابراین می‌توان گفت امکان اشتباه در ارائه گیاهان دارویی در عطاری‌ها غیر قابل انکار است.

براساس یافته‌های این پژوهش، به نظر می‌رسد که مرزه رشینگری و خوزستانی را نمی‌توان به‌عنوان گونه‌های مستقل از یکدیگر برشمرد، بلکه در واقع این دو ممکن است زیرگونه یا واریته‌هایی از یک گونه مرزه باشند. البته برای شناسایی صحیح و دقیق‌تر گیاهان دارویی، ضرورت دارد تا

گیاه از جنبه‌های مختلف ریخت‌شناختی، فیتوشیمیایی و مولکولی نیز مورد مطالعه و بررسی قرار گیرد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از سرکار خانم دکتر فاطمه سفیدکن، (استاد محترم مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور) که زحمت تفسیر نتایج مربوط به GC و GC/MS و شناسایی ترکیب‌های اسانس را تقبل کردند، کمال تشکر را داریم.

References

- Afzalifar, M., Hadian, J., Mirjalili, M.H. and Enayati Shariatpanahi, M., 2019. Study of androgenesis of two medicinal plants *Satureja khuzistanica* Jamzad and *S. rechingeri* Jamzad. Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology), 31(4): 458-470.
- Amiri, H. and Ghasemi Ramadanabad, Z., 2018. The effects of salinity on chemical composition of essential oil of *Satureja rechingeri*. Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology), 31(2): 248-257.
- Dellaporta, S.L., Wood, J. and Hicks, J.B., 1983. A plant DNA minipreparation: version II. Plant Molecular Biology Reporter, 1: 19-21.
- Esmaeili, H., Hadian, J., Mirjalili, M.H. and Rezadoost, H., 2016. Evaluation of some morphological, phytochemical and ecological characteristics of different populations of *Satureja rechingeri* Jamzad. Journal of Range and Watershed Management, 69(1): 1-12.
- Ghahraman, A., 1999. Flora of Iran. Volume 17. Publishing of Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, Iran.
- Ghahramanzadeh, R., Marashi, H., van de Weil, K., Malekzadeh, S., Shahriari, F. and Asmaldrz, R., 2012. The use of DNA barcoding to separation invasive species of aquatic weeds *Myriophyllum* spp. Non-invasive from relatives. Journal of Crop Protection, 37(5): 838-849.
- Hadian, j., Mirjalili, M.H., Kanani, M.R., Salehnia, A. and Ganjipoor, P., 2011. Phytochemical and morphological characterization of *Satureja khuzistanica* Jamzad populations from Iran. Chemistry & Biodiversity, 8: 902-915.
- Jamzad, Z., 1994. *Satureja khuzistanica*. Iranian Journal of Botany, 6(2): 216.
- Jamzad, Z., 1996. *Satureja rechingeri* (Labiatae)- a new species from Iran. Annual Naturhistorisches Museum Vienna, 98: 75-77.
- Jamzad, Z., 2010. A new species of *Satureja* (Lamiaceae) from Iran. The Iranian Journal of Botany, 16(2): 213-217.
- Majd, A., Nezhadsatari, T., Khavarinezhad, R.A. and Dousti, B., 2009. Chemical composition of *Satureja khuzistanica* Jamzad (Lamiaceae) essential oils produced during ontogenesis and in vitro antimicrobial activity of essential oil. Journal of Sciences (Islamic Azad University), 18(70/1): 51-60.
- Noormand Moaied, F., Bihamta, M.R., Tabaei Aghdaei, S.R. and Naghavi, M.R., 2021. Study of phylogenetic relationships of different species of *Satureja* spp. based on nuclear ITS region and chloroplast *mat*K gene. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 28(2): 173-190.
- Nooshkam, A., Majnoun Hoseini, N., Hadian, J., Jahansooz, M. and Khavazi, K., 2015. Comparison of the vegetative yeild and essential oil performance of *Satureja khuzistanica* Jamzad and *S. rechingeri* Jamzad in two regions of Khuzestan and Lorestan under field conditions. Journal of Plant Productions, 38(2): 77-88.
- Peiri, T. and Fazeli, A., 2022. Identification of ecotypes and different species of savory (*Satureja* spp) using DNA barcoding. Journal of Vegetables Sciences, 6, 11(1): 82-96.
- Porter, C.H. and Collins, F.H., 1991. Species-diagnostic differences in ribosomal DNA internal transcribed spacerfrom the sibling species *Anopheles freeborni* and *Anopheles hermsi* (*Diptera Culicidea*). The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 45(2): 271-279.
- Saadati, R., Sattarian, A., Daneshvar, A., Amini, E. and Nasrollahi, F., 2021. DNA barcoding of some medicinal plants in eastern Golestan province. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research, 37(5): 838-849.
- Sefidkon, F., Abbasi, Kh., Jamzad, Z. and Ahmadi, Sh., 2007. The effect of distillation methods and stage of plant growth on the essential oil content and composition of *Satureja rechingeri* Jamzad. Food Chemistry, 100(3): 1054-1058.
- Sefidkon, F., Tabaei Aghdaei, S.R., Lebaschi, M.H., Zaeazadeh, A., Noormand, F., Moayed, F., Hooshidari , Ahmadi, Sh., Najafi, A., Mirjani, L., Akbarinia, A., Abbaszadeh, B., Davazdahemami, S., Alizadeh, M.A., Jamzad, Z., behrad, Z., Naderi, M. and Asadi Sanam, S., 2016a. Introduction of valuable *Satureja* species for cultivation in different ecologic regions of Iran for vast production (Step 1: adaptation). 9th Congress of Iranian Horticultural Science, 2016 January 25-28, 1-8.

- Sefidkon, F., Taebnia, R. and Mirza, M., 2016b. Study of essential oil content and composition of six populations of *Satureja rechingeri* Jamzad in farm condition. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research, 32(1): 1-13.
- Shahnazi, S., Khalighi-Sigaroodi, F., Ajani, Y., Yazdani, D., Taghizad-Farid, R., Ahvazi, M. and Abdoli, M., 2008. The chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Satureja intermedia* C. A. Mey. Journal of Medicinal Plants, 7(25): 85-92.
- Sonboli, A., Mirjalili, M.H., Bakhtiar, Z. and Jamzad, Z., 2013. Molecular authentication of *Thymus persicus* based on nrDNA ITS sequences data. Iranian Journal of Botany, 19(1): 179-185.
- Wheeler, W.C. and Honeycutt, R., 1988. Paired sequence difference in ribosomal RNAs: evolutionary and phylogenetic implications. Molecular Biology and Evolution, 5: 90-96.
- Zarezadeh, A., Sefidkon, F., Tabaei Aghdaei, S., Mirhosseini, A., Arabzadeh, M. and Mirjalili, M., 2017. Investigation on quality and quantity of essential oil cultivated different *Satureja* species in Yazd province. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research, 33(3): 509-534.

Differentiative assessment between *Satureja rechingeri* Jamzad and *Satureja khuzistanica* Jamzad using morphological, phytochemical, and molecular traits

M. Salehi Vozhdehnazari[1], Z. Shirazi[1] and S. Samavat[2*]

1- Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran
2*- Corresponding author, Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran, E-mail: samaneh.samavat@gmail.com

Received: July 2022 Revised: December 2022 Accepted: December 2022

Abstract

Due to the similarity in appearance and properties of some medicinal plants, it is necessary to identify them more precisely by various methods. Accordingly, in the present study, *Satureja rechingeri* Jamzad and *S. khuzistanica* Jamzad were investigated and compared based on morphological, phytochemical, and molecular characteristics. *S. rechingeri* and *S. khuzistanica* seeds were collected from Ilam and Lorestan provinces, respectively, and after scientific identification, they were planted in the research greenhouse of the Research Institute of Forests and Rangelands. The seedlings were then transferred to the experimental farm of the mentioned institute based on a t-test (n=3). Several important morphological traits including inflorescence length, inflorescence stem internode length, length and calyx diameter, calyx three-large and two-short teeth length, length and corolla diameter, stamen length, stigma length, length and vegetative organ leaf width, length and leaflet width, stem diameter, plant height, number of main and sub-branches, largest and smallest canopy diameter, and length and reproductive organ leaf width were measured at full flowering stage in the third year of planting. The essential oils (EOs) were extracted from the plants floral branches in the third year of planting through water distillation. The EOs yield was calculated and their compounds were identified using ultra-fast gas chromatography (GC-FID). DNA barcoding and ITS marker were used for molecular studies on these two savory species. The results showed that these two species did not differ significantly (P<0.01) for all the morphological traits examined. 13 common compounds were identified in these two species EO. *S. rechingeri* and *S. khuzistanica* EOs contained 88.6% and 89.5% carvacrol, respectively. The EO yeild was obtained 3.3% for *S. rechingeri* and 3.04% for *S. khuzistanica*. These two species showed 100% nucleotide similarity with each other and were closely related to *S. bachtiarica* (98%). On this basis, it is probable that these two species are not only independent species, but can also be different accessions of the same species.

Keywords: Essential oil, DNA barcoding, carvacrol, species, medicinal plant.