بررسی آنالیز اسانس و خواص آنتی اکسیدانی بذر گیاه دارویی رازیانه *(Foeniculum) vulgare* قبل و پس از ذخیره‌سازی بذر در شرایط فراسرد (ازت مایع)

شهین مهرپور[1*]، نیره احمدی[2]، فاطمه جمالو[3]، محمدرضا زند منفرد[4]

۱. عضو هیات علمی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، ایران

۲. کارشناسی‌ارشد، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران

۳. عضو هیات علمی، گروه علوم جانوری، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران

٤. عضو هیات علمی، گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، قم، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۹/۱۵؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۲۵)

چکیده

مقدمه: اصطلاح ذخیره سازی در فراسرد (Cryopreservation) به ذخیره سازی یاخته ها، اندام ها و بافت ها دردمای نیتروژن مایع (°C ۱۹۶-) اشاره دارد .در این دما، یاخته ها به حالت سکون وارد شده و واکنش های فیزیکی و بیوشیمیایی عملا متوقف می شوند. در این شرایط خاص، زمان حفاظت نامحدود می شود. ذخیره سازی بذرها کارآمدترین روش برای حفاظت از خزانه ژنی گیاهان است .هزینه های ذخیره سازی پایین و بازسازی کل گیاه از ژنوم کامل، مزایای مشخصی برای ذخیره سازی بذر در مقایسه با انواع دیگر بافت های گیاهی را ارائه می دهد (۱).

مواد و روش ها: بذرهای گیاه دارویی رازیانه(*Foeniculum vulgare* (*Apiaceae* با استفاده از پیش تیمار کاهش رطوبت بذر (Dessication) تیمار شده و به مدت یک هفته در ازت مایع نگهداری شدند. سپس بذرها در معرض شوک حرارتی قرار گرفتند. بذرهای تیمار و شاهد پس از کشت به ژرمیناتور با دمای ۲۴°C و رژیم نوری ۱۶/۸ منتقل شدند. اسانس با روش تقطیر با آب با دستگاه کلونجر استخراج و ترکیبات موجود دراسانس توسطGC/MS آنالیز و مورد بررسی قرار گرفت .اثرات آنتی اکسیدانی عصاره هیدرو الکلی بذرتوسط معرف DPPH بررسی شد.

نتایج: درصد زنده مانی در بذرهای شاهد (۸۳٪) ودرتیمار کاهش رطوبت بذر(۵۳٪) مشاهده گردید. اصلی ترین ترکیب موجود در اسانس مربوط به آنتول (۷۸/۶ ٪) شناسایی شد که در مقایسه با نمونه های تیمار شده آنتول (۸۰/۰۴ ٪) تفاوت معنی داری مشاهده نشد. نتایج نشان داد که نگه داری بذر در شرایط فراسرد تاثیر منفی بر خواص آنتی اکسیدانی وترکیبات اسانس آنها ندارد.

کلیدواژگان

اسانس، آنتی اکسیدان، رازیانه، فراسرد.

* نویسنده مسئول، رایانامه: Sh.mehrpur12@gmail.com

مقدمه

ایران با داشتن ۸۰۰۰ گونه گیاهی یکی از کشورهای غنی از نظر تعداد و تنوع گونه های گیاهی است (۲).حفظ ذخایر توارثی و جلوگیری از فرسایش و انقراض این گونه ها، از اهمیت ویژه ای برخوردار است (۳).

ذخیره‌سازی درشرایط فراسرد(Cryopreservation) در دمای ^{o}C 196- روشی منحصر به فرد وابزاری قدرتمند برای حفاظت (exstitu) ژرم پلاسم گونه های گیاهی به شمار می‌رود (۴). با توجه به کاهش شدید فعالیت های متابولیک وفیزیولوژیک موجود زنده در این دما، طول مدت نگهداری به طور چشمگیری افزایش پیدا می کند (۵). با به کارگیری این تکنولوژی می توان نمونه های گیاهی نظیر بذر رابرای بلند مدت و با هزینه بسیار کم نگهداری نمود و نیاز به احیا مرتب این بذور نخواهد بود(۶).

کاهش رطوبت (Dessication)یکی از روش های آماده سازی بذر جهت ذخیره سازی در ازت مایع می باشد. این پیش تیمار ضمن آنکه از تشکیل یخ درون یاخته جلوگیری می کند، با افزایش فشار اسمزی محلول داخلی یاخته، نقطه انجماد آن را کاهش داده و موجب شروع پدیده شیشه ای شدن می گردد. این مکانیسم باعث جلوگیری از تشکیل کریستال های یخ درون یاخته می شوند (۷).

رازیانه (Foeniculum vulgare Mill., Apiaceae) گیاهی علفی، معطر، دوساله یا چند ساله از خانواده چتریان می‌باشد. رازیانه تا ارتفاع ۲ متر رشد می‌کند و ریشه دوکی شکل دوشاخه دارد. برگ ها دارای غلاف گوشتی ضخیم و ساقه آغوش بوده و خوراکی می‌باشند. گل‌ها دارای گل آذین چتر مرکب هستند. میوه شیزوکارپ تخم مرغی ودارای رگه‌های برجسته طولی می‌باشد. قسمت مورداستفاده رازیانه، ریشه، برگ ومیوه آن است (۸).

اسانس رازیانه به دلیل کاربرد در صنایع غذایی و دارویی از قدیم اهمیت ویژه ای داشته، در اسانس رازیانه ۲۲ ترکیب شناسایی شده است که درصد آنها طی مراحل مختلف رشد تغییراتی نموده اند. ولی ترکیبات عمده اسانس در تمام مراحل رشد ترانس آنتول، لیمونن، فنچون، استراگول و آلفاپینن می باشد. ترکیبات دیگر اسانس شامل میرسن، اوسیمن، فلاونوئیدها، قندها، لعاب، ویتامین A می باشد (۸).

آنتی اکسیدان ها، به ترکیبات شیمیایی خاصی گفته می شود که قادرند میزان و شدت اکسیداسیون یاخته ها ومولکول های زنده را کاهش دهند. این ترکیبات نقش مهمی در کاهش سرطان و بیماری های قلبی وعروقی دارند. همچنین در صنایع غذایی با مهار خود اکسایش اسید های چرب از فاسد شدن چربی ها واثرات نا مطلوب اکسیژن فعال در محصولات غذایی جلو گیری می کنند. آنها حتی در صنایع نفتی برای به تعویق انداختن شکل چسبناکی و در صنعت برای افزایش ماندگاری محصولات نیز استفاده می شوند. اسید اوریک، اسید اسکوربیک، گلو تاتیون و ملاتونین از آنتی اکسیدان های مهم می باشند(۹).

یکی از روش های مرسوم برای سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی نمونه های گیاهی DPPH می باشد. این روش مبتنی بر به دام اندازی میزان رادیکال های آزاد ماده ۲-۲-فنیل ۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH) با استفاده از عوامل آنتی اکسیدانی می باشد، که سبب کاهش میزان جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر می شود. وقتی محلول DPPH با ماده ای که می تواند دهنده هیدروژن باشد، مخلوط می شود فرم احیای رادیکال تشکیل می شود که همراه با کاهش رنگ است. این واکنش باعث از بین رفتن رنگ بنفش می شود که شاخص آن تشکیل باند جذبی در ۵۱۷ نانومتر است (۱۰).

مواد و روش‌ها

این پژوهش در بهار ۱۳۹۵ در دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم انجام شد. بذرها از همدان جمع آوری شد و به منظور تعیین قوه نامیه بذرهابه وسیله اتانول ۵٪ به مدت ۳۰ ثانیه وهیپو کلرید سدیم ۱٪ به مدت ۱۰ دقیقه ضد عفونی شد وبعد از سه مرتبه شستشو با آب مقطر اماده کشت گردید و سپس در پتری دیش های حاوی کاغذ صافی در ۱۰ تکرار ۱۰ تایی کشت شدند.

وزن هزار دانه بذرها توزین و اندازه گیری شد. درصد رطوبت بذر با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (۱۸).

درصد رطوبت بذر= [وزن اولیه –وزن انتهایی]/وزن اولیه

استخراج عصاره و اسانس: استخراج عصاره با دستگاه سوکسله انجام شد. ۹۰ گرم از بذر پودر شده را درون کیسه پارچه ای پیچیده، ودرون دستگاه سوکسله قرار دادیم. دوسوم بالن را اتانول ریخته، پس از ۶-۸ ساعت حرارت، حلال نمونه را با دستگاه روتاری تبخیر نموده و عصاره بدست امده را درون یخچال نگهداری کردیم.

استخراج اسانس با روش تقطیر با آب (Water distillation) و دستگاه کلونجر انجام شد. ابتدا ۱۵۰ گرم از بذر رازیانه را در بالن مخصوص دستگاه کلونجر ریخته و دوسوم بالن آب مقطر به آن اضافه کرده ودستگاه را به مدت ۳ ساعت روشن کرده و سپس روغن اسانسی را استخراج کرده واسانس درون شیشه تیره در دمای ۴°C- درجه در یخچال نگهداری شد.

جدا سازی و شناسایی ترکیبات توسط GC و GC/MS صورت گرفت. برای این منظور یک میکرو لیتر از اسانس رقیق شده به دستگاه GC تزریق و برنامه ریزی دمایی دستگاه به صورت زیر تنظیم شد. دمای اولیه اون ۶۰ درجه سانتی گراد که برای مدت ۳ دقیقه در این دما ثابت بود و با گردیان ۵ درجه ساتیگراد بر دقیقه تا دمای ۲۲۰ درجه سانتی گرادافزایش پیدا کرده و برای مدت ۵ دقیقه در این دما ثابت بود(۱۱).

- بررسی خاصیت انتی اکسیدانی به روش (DPPH):

برای این منظور، غلظت‌های مختلف عصاره (mg/mlit ۵×۱۰^{-۴}، ۵×۱۰^{-۳}، ۵×۱۰^{-۲}، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۰/۸) با ۲ میلی‌لیتر محلول متانولی ۰/۰۰۴٪ DPPH مخلوط گردید. محلول کنترل شامل ۲ میلی‌لیتر DPPH و ۲ میلی‌لیتر متانول بود. محلول‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و در دمای اتاق نگهداری شدند. جذب نمونه‌ها در ۵۱۷ نانومتر در مقابل شاهد متانول خوانده شد. برای هرکدام از محلول ها سه بار جذب خوانده شد وسپس از سه جذب خوانده شده میانگین گرفته شد.

درصد مهار رادیکال آزاد (%I) هر عصاره به کمک فرمول محاسبه شد:

$$A_{sample} / A_{control} \times 100 - \%I = (A_{control})$$

محاسبه غلظت مهار ۵۰ درصد (IC_{50}) روشی مناسب جهت مقایسه فعالیت مواد دارویی می باشد که در آن مقدار دوزی که ۵۰ درصد فعالیت نهایی دارو بروز می کند، ملاک اندازه گیری و مقایسه می باشد.

بر اساس اطلاعات حاصل، IC_{50} عصاره از منحنی درصد مهار در مقابل غلظت‌های مختلف عصاره بدست آمد. با محاسبه IC_{50} برای آسکوربیک اسید، به عنوان استاندارد و با استفاده از فرمول زیر، داده‌ها بر اساس فعالیت آنتی‌اکسیدانی معادل آسکوربیک اسید (AEAC) بیان شدند.

$$AEAC\ (mg\ AA/g\ dw) = IC_{50\ ascorbate} / IC_{50\ sample} \times 1000$$

بدیهی است که هرچه این عدد کوچکتر باشد قدرت انتی اکسیدانی با مهار رادیکال های ازاد بیشتر می باشد (۱۰).

آزمایشات فراسرد با پیش تیمار کاهش رطوبت بذر (Desiccation):

ابتدا درصد رطوبت بذر با محاسبه اختلاف وزن بذرها قبل وبعداز قرارگیری در آون با دمای ۷۲ درجه سانتی گراد تعیین گردید. بذرها با ترازوی حساس ۰/۰۰۰۱ گرم توزین وسپس به دسیکاتور حاوی ۱۰ برابر وزن بذرها سیلیکاژل خشک منتقل گردیدند. در ادامه هوای داخل دسیکاتور تخلیه ودسیکاتور به مدت یک هفته در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار داده شد. پس از یک هفته بذرها از دسیکاتور خارج ومجددا توزین شد مقدار رطوبت کاهش یافته در دسیکاتور نسبت به کل رطوبت بذر محاسبه ودرصدرطوبت آنها مطابق فرمول زیر محاسبه گردید. بذر ها پس از خروج از دسیکاتور به فالکون ها منتقل و بلافاصله وارد ازت شدند (۱۲).

درصد رطوبت بذر= [وزن اولیه –وزن انتهایی /وزن اولیه]

بذرها ی شاهد به فالکون ها منتقل ودر سرد خانه با دمای ۴ + درجه سانتی گراد نگهداری شدند. پس از یک هفته بذرها از ازت مایع خارج و ۲ دقیقه در آب ۴۲ درجه سانتی گراد (شوک حرارتی) قرار داده شدند پس از شوک حرارتی نمونه بذرها فراسرد وشاهد برای تعیین درصد جوانه زنی در ظروف حاوی کاغذ صافی کشت شدند وجوانه زنی آنها اندازه گیری شد(۱۲).

وزن هزار دانه بذرها نیز محاسبه گردید. بررسی های آماری با استفاده از نرم افزار Spssبه روش ANOVA وآزمون توکی صورت گرفت.

نتایج

وزن خشک بذر رازیانه g ۱ و وزن هزار دانه آن ۱۱/۳۲ محاسبه شد. درصد رطوبت بذر ۶/۸ درصد محاسبه شد. بذر ها پس از خروج از ازت همانند شاهد جوانه زدند. درصد جوانه زنی در بذرهای شاهد (۸۳٪) ودرتیمار کاهش رطوبت بذر(۵۳٪) مشاهده گردید.

بررسی های فیتوشیمیایی اسانس : میزان اسانس و عصاره بذر قبل و پس از ذخیره سازی در ازت مایع در جدول زیر مقایسه شده است.

جدول ۱- مقایسه میزان اسانس و عصاره بذر رازیانه قبل و پس ازذخیره سازی در ازت مایع

نوع ترکیب	وزن بذور	وزن قبل از ازت	وزن بعد از ازت
اسانس	۹۰ گرم	۱/۴۱ گرم	۱/۲۲ گرم
عصاره	۱۵۰ گرم	۳/۸ گرم	۲/۶ گرم

اصلی ترین ترکیبات موجود در اسانس (۹۸٪) مربوط به آنتول (۷۸/۶ ٪)، فنچون (۱۱/۳٪)، لیمونن (۴/۲٪) استراگول (۳/۲٪) وآلفا پینن (۰/۶۴٪) می‌باشد.

جدول ۲- ترکیبات تشکیل دهنده اسانس بذر رازیانه قبل ازذخیره سازی در ازت مایع

No	RT	Compound	Composition (%)
1	6.89	α–Pinene	0.64
2	7.31	Camphene	0.1
3	8.05	Sabinene	0.2
4	8.16	β–Pinene	0.05
5	8.55	Myrcene	0.29
6	9.05	Phellandrene	0.08
7	10.07	D-Limonene	4.17
8	10.24	*cis*-β-Ocimene	0.4
9	11.01	γ-Terpinene	0.07
10	12.63	Fenchone	11.29
11	13.65	7-isopropyliden norcarane	0.02
12	14.56	Camphor	0.22
13	15.93	Terpinen-4-ol	0.04
14	17.04	Estragole	3.23
15	18.21	α-Fenchyl acetat	0.11
16	18.96	L(-)-Carvone	0.23
17	19.28	S(+)-Carvone	0.27
18	22.02	Anethole	78.59

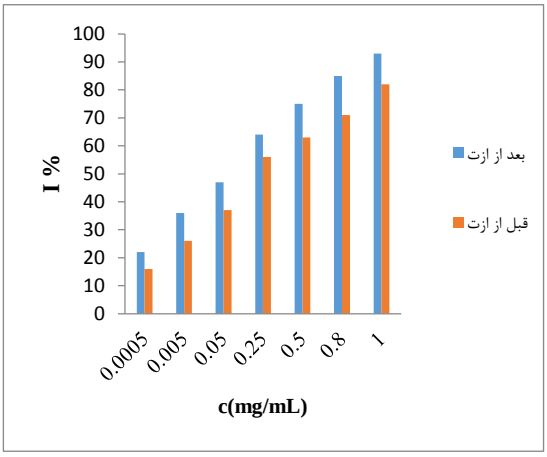
جدول ۳- ترکیبات تشکیل دهنده اسانس بذر رازیانه پس ازذخیره سازی در ازت مایع

No	RT	Compound	Composition (%)
1	6.89	α-Pinene	0.56
2	7.32	Camphene	0.08
3	8.05	Sabinene	0.19
4	8.17	β-Pinene	0.04
5	8.56	Myrcene	0.24
6	9.06	Phellandrene	0.06
7	10.02	D-Limonene	3.77
8	10.22	*cis*-β-Ocimene	0.33
9	11.02	γ-Terpinene	0.05
10	12.54	Fenchone	10.69
11	14.55	Camphor	0.21
12	16.98	Estragole	2.92
13	18.21	α-Fenchyl acetat	0.11
14	18.96	L(-)-Carvone	0.3
15	19.32	S(+)-Carvone	0.19
16	20.47	Z Anethole	0.18
17	21.78	E Anethole	80.04

نتایج آنالیز اسانس ها قبل و پس از نگهداری در ازت مایع نشان می دهد، ذخیره سازی بذر در ازت مایع تاثیر منفی بر ترکیبات اسانس این گیاه نداشته است وگیاه رازیانه از این جهت در شرایط فرا سرد بهتر عمل می کند.

بررسی خواص انتی اکسیدانی : فعالیت های انتی اکسیدانی عصاره های استخراج شده از بذر گیاه رازیانه به روش DPPH اندازه گیری شد. نتایج تست انتی اکسیدانی عصاره این گیاه در تست DPPH نشان دهنده فعالیت انتی اکسیدانی قابل توجه ان می باشد.

مقایسه درصد مهار رادیکال آزاد درغلظت های مختلف عصاره قبل و پس از ذخیره سازی در ازت مایع تفاوت چندانی را نشان نمی دهد، در نتیجه نگهداری بذر گیاه رازیانه در شرایط فراسرد تا ثیر منفی بر خواص آنتی اکسیدانی این گیاه ندارد.



شکل ۱- مقایسه درصد مهار رادیکال آزاد در غلظت های مختلف عصاره قبل و پس از ذخیره سازی در ازت مایع

بحث و نتیجه گیری

با توجه به اثرات نامطلوب انتی اکسیدان‌های سنتزی امروزه تمایل روز افزونی به استفاده از ترکیبات گیاهی به عنوان انتی اکسیدان های طبیعی در صنایع غذایی قابل مشاهده می شود. عصاره های تهیه شده از اندام های مختلف رازیانه به ویژه بذرهای ان اثرات انتی اکسیدانی بالایی را نشان داده اند. بوروس و همکاران ۲۰۰۹، با تحقیق بر روی عصاره رازیانه نشان دادند، اثرات انتی اکسیدانی عصاره عمدتا به دلیل وجود ترکیبات فنلیک می باشد ترکیبات فنلیک قادرند یک اتم هیدروژن به رادیکال های ازاد بدهند وبدین ترتیب باعث توقف پیشروی واکنش زنجیره ای در طی فرایند اکسیداسیون چربی می شوند (۱۴، ۱۳).

تهامی و همکاران نشان دادند عصاره بذر رازیانه دارای فعالیت انتی اکسیدانی مناسبی در روغن آفتاب گردان بوده ومی تواند در غلظت های مناسب به عنوان جایگزین طبیعی انتی اکسیدان های سنتزی بوتیل هیدروکسی آنیسولBHA و بوتیل هیدروکسی تلوئن BHT در روغن افتابگردان استفاده گردد (۱۴). هم چنین غلظت های ppm ۳۰۰و۲۵۰ عصاره رازیانه

دارای فعالیت انتی اکسیدانی بالاتری نسبت به انتی اکسیدان های سنتزی می باشند (۱۵).

مالو و همکاران ۲۰۱۲، از عصاره رازیانه جهت حفاظت اسپرم گراز در شرایط فراسرد استفاده نمودند. آنها رازیانه را به عنوان آنتی اکسیدان جدید برای استفاده در انجماد اسپرم معرفی نمودند (۱۶).

جورجیورا و همکاران ۲۰۱۴، تاثیرشرایط فراسرد برخواص آنتی اکسیدانی دو گونه گل راعی H. rumeliacum Boiss. and H. tetrapterum Fr. را بررسی نمودند. خواص آنتی اکسیدانی کل پس از شرایط فراسرد در گونه H. rumeliacum برابر شاهد و در گونه H. tetrapterum Fr. بیشتراز شاهد مشاهده شد (۱۷).

سنجش های آنتی اکسیدانی عصاره بذر رازیانه قبل و پس از قراردادن بذرها در ازت مایع نشان داد نگهداری بذرها در ازت مایع تاثیر منفی بر خواص انتی اکسیدانی انها ندارد. از آنجایی که در دمای بالا بسیاری از ترکیبات اکسید می شوند ولی در شرایط فراسرد اکسید شدن کاهش می یابد.

با توجه به نتایج آنالیز اسانس بذر رازیانه، اصلی ترین ترکیبات موجود در اسانس (۹۸٪) مربوط به آنتول (۷۸/۶ ٪)، فنچون (۱۱/۳٪)، لیمونن (۴/۲٪) استراگول (۳/۲٪) وآلفا پینن (۰/۷٪) شناسایی شد. هم چنین آنالیز ترکیبات اسانس بذرهای فراسردی نیز نتا یج نسبتا مشابهی را نشان داد. در پژوهشی که توسط جمشیدی و همکاران، ۱۳۸۳ انجام گرفت نیز ترکیبات تشکیل دهنده اسانس استخراج شده ازبذر رازیانه توسط GC/MS مورد تجزیه وشناسایی قرار گرفتند. مهم ترین ترکیبات اسانس رازیانه که مجموعا ۹۷٪ روغن فرار را تشکیل می دهند شامل: آنتول (۶۲/۷۳٪)، استراگول (۱۶/۵۲) و فنچون (۸/۸۶٪) گزارش شد (۱۸). جورجیورا و همکاران ۲۰۱۴، نیز تاثیرشرایط فراسرد بر گونه های گل راعی Hypericum را بررسی نمودند. نتایج نشان داد ذخیره سازی در فراسرد تاثیر منفی برترکیبات فنلی گیاه ندارد (۱۷).

با توجه به نتایج جوانه زنی مشاهده شد بذرها پس از خروج از ازت مایع زنده مانی خود را حفظ نمودند درصد جوانه زنی در بذرهای شاهد (۸۳٪) ودرتیمار کاهش رطوبت بذر(۵۳٪) مشاهده گردید.

جبلی وهمکاران در ۱۳۹۳ نشان دادند بذرهای اقاقیا پس از خروج از ازت مایع قادر به جوانه زنی و رشد عادی می باشند. با توجه به این نتایج امکان زنده مانی بذر های رازیانه در دمای $196^{o}C$- وجود دارد (۱۹). روبرت و همکاران ۱۹۸۹، نشان دادند، بذرهای گونه S.marianum پس از خروج از نیتروژن مایع همانند نمونه های شاهد قادر به جوانه زنی می باشند (۲۰). حاتمی و همکاران ۲۰۱۰نشان دادند در گیاه افرا A.monspessuamum در زمینه زمان نگهداری بذرها در ازت مایع بین زمان های مختلف نگهداری بذرها در ازت مایع تفاوت معنی داری دیده نمی شود (۲۱). براساس تئوری فراسرد، در صورتی که بذردر محیط ازت مایع زنده بماند نباید تفاوت محسوسی بین طول مدت نگهداری در کوتاه مدت ومیان مدت وجود داشته باشد، زیرا با کاهش فعالیت های متابولیکی وحیاتی مسئله زمان نگهداری منتفی است(۶).

هم چنین، کاهش محتوای رطوبتی بذر و نگه داری در دمای فراسرد، می تواند باعث افزایش ویسکوزیته یاخته ای وتغییر شکل سیتوپلاسم شود. آب در دمای 196 °C -از حالت مایع به فرم شیشه ای بی شکل (رسوب) و فاقد ساختار کریستالی تبدیل می شود، به همین دلیل نگه داری بافت ها بدلیل عدم تشکیل کریستال یخ امکان پذیر می باشد واز زوال تدریجی بذر جلوگیری می شود(۲۲).

وایتل و بیردام، ۲۰۰۵، نیز در همین رابطه

بکارگیری روش کاهش رطوبت برای حفاظت از بذر گیاهAcer saccharinum را موفقیت آمیز گزارش نمودند(۲۳). دربذر گیاه رازیانه نیز تیمار کاهش رطوبت بذر قبل از ورود به ازت مایع تاثیر مثبتی (۵۳٪ جوانه زنی) بر زنده مانی بذرها داشت. این روش به دلیل سادگی و عدم استفاده از مواد شیمیایی روش مناسبی در استفاده در مقیاس های کاربردی می باشد.

براساس مطالعات ترمودینامیکی انجام شده بر روی بذر کاهو، نیمه عمر جوانه زنی این گونه پس از ذخیره سازی در ازت مایع ۳۵۰۰ سال برآورد شده است (۲۴). براین اساس با توجه به مقاومت بذر رازیانه به شرایط فراسرد برآورد ماندگاری بذر این گیاه در ازت مایع را می توان بیش از هزار سال دانست.

منابع و مآخذ

1. Hugh W. Pritchard, Cryopreservation of Seeds., Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols pp 133-144.
2. Jalili, A. & Jamzad, Z. 1999: Biodiversity of Plant Species in Iran. -Tehran University.,1999. journals.areo.ir/article
3. Jamzad,Z., RJ Grayer, GC Kite, MSJ Simmonds, M Ingrouille, A Jalili. Leaf surface flavonoids in Iranian species of Nepeta (Lamiaceae) and some related genera. Prof. in Ecology in Research Institute of Forests and Rangelands - .ir.ac-rifr
4. Lambardi, M Panis, B., 2005. Status of cryopreservation technologies in plants (crops andforest trees). The role of biotechnology. VillaGualino, Turin, Italy, 5-7.
5. Ozkavukcu S, Erdemli E. Cryopreservation and oxidative stress in reproductive cells., REVIEW. Cryopreservation and oxidative stress in reproductive cells. Cynecological Endocrinology. , August 2010; 26(8): 563–567.
6. Popov,A.S., Popova, E.V., Cryobank of plant genetic resources in Russian Academy of Sciences. 2006.,International Journal of Refrigeration,29: 403-410.
7. Wolf and Bryant, Norman.., Cryopreservation of seeds of Amaranth., 1992. gjstd.org/index.php/GJSTD/article/viewFile/10/6.
8. Emad,M., Dr Fariborz Ghibi, Seyyed Mohsen Rasooli, Rasoul Khanjanzadeh, Medicinal Plants. -. Industrial Fennel. [in Persian]
9. Barry Hallwell and john M.C. Gutteridge Free Radicals. in Biology And Medicine (Oxford University Press2007)
10. Miliauskas, G., Venskutonis, P.R. and Vanbeek, T.A. (2004) Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. Food Chemistry 85: 231-237.
11. Barazandeh,M. The Effect of Essential Oil on the Quantity and Compounds of Fennel Essential Oil under the Species of Capellaeum (Foeniculum Vulgare Mill ssp. Capillaceum) belonging to six vegetative regions of Iran. Research and construction. 15 1 Spring of 1381 90 to 95.
12. Saleh,F., Mehrpoor,Sh., jamaloo,F., Cryopreservation of Silybum marianum L. seeds.2015. Applies Biology. period 4, n.2,p 41-54. [in Persian]
13. Barros, L., Heleno, S. A., Carvalho, A. M. & Ferreira, I. C. F. R. (2009). Systematic valuation of the antioxidant potential of different parts of Foeniculum vulgare Mill. Portugal Food and Chemical Toxicology, 47, 2458–2464.
14. Tahami,F., The effect of antioxidant effect of Foeniculum vulgare extract on sunflower oil stability. 2011. Iranian Scientific and Industrial Research Organization, Food and Transmission Industry, Tehran, Iran.[in persion]
15. Mirzaii,A., Evaluation of Total Phenol and Antioxidant Activity of Yarrow, Artemisia and Chamomile. 2010., Bringing Knowledge. P.15, number 3, 243 to 252.[in persion]
16. Malo C, Gil L, Cano R, González N, Luño V.,2012, Fennel (Foeniculum vulgare) provides antioxidant protection for boar semen cryopreservation. Andrologia. 2012 May;44 Suppl 1:710-5.
17. Georgivera,E.,et.al, Influence of cryopreservation on the antioxidative activity of *in vitro* cultivated *Hypericum* species.2014, Biotechnol Biotechnol Equip. Sep 3; 28(5): 863–870.
18. Jamshidi,A., Investigation of the effect of essential oil on volatile oil components of fennel. 2004. Medicinal Plants, Volume 3, Number 11; 68 - 72 .[in persion]

19. Jebelli M., Naderi Shahab MA, Feizi H., Jafari A., Cryopreservation of Pupulus euphratica oliv. Seeds and evaluation of the cryopreservation seeds under laboratory and greenhouse conditions. 2015., Iranian Journal of Horticultural Science. Volume 46, N 2; Page(s) 313 To 322. [in Persian]

20. Roberts, E.H. and Ellis, R.H., 1989. Water and seed survival. Annals of Botany, 63: 39

21. Hatami F., Jebeli M. , Shahab M.A., Cryopreservation OF Acer monspessulanum seeds. 2010., Iranian Journal of Rengeland and Forests. Plant Breeding and Genetic Research. , Volume 18 , N 1 (35); Page(s) 12 To 23. [in Persian]

22. Sun WQ, Irving TC, Leopold AC., Water Stress in Biological, Chemical, Pharmaceutical and Food Systems.1994. Ann Bot 79:291–297.

23. Beardmore, T., Whittle, CA., Induction of tolerance to desiccation and cryopreservation in silver maple (Acer saccharinum) embryonic axes.2005., Tree Physiol. Aug;25(8):965-72.

24. Walters C., Wheeler L., and Stanwood Ph., 2004. Longevity of cryogenically stored seeds. Cryobiology, 48: 229-244.