

## ردیابی ترکیبات موسیلاژی در مراحل مختلف تکوین برگ بنفشه معطر (*Viola odorata* L.)

زهرا شفقت و فاطمه زرین کمر\*

تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه علوم گیاهی

تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۱/۱۶

تاریخ دریافت: ۹۶/۲/۵

### چکیده

بنفشه معطر *Viola odorata* گیاهی متعلق به تیره بنفشگان می‌باشد که به دلیل وجود ترکیباتی از قبیل کربوهیدرات‌ها و موسیلاژ در برگ و گل آن خواص دارویی دارد. هیدروکلونیدهای پلی ساکاریدی از جمله ترکیبات موسیلاژ در بسیاری از گیاهان عالی یافت می‌شوند. این پلی ساکاریدها یک کلاس ساختاری متنوع از ماکرومولکول‌های بیولوژیکی با طیف گسترده‌ای از خواص فیزیکی تشکیل می‌دهند که به طور گسترده‌ای در پزشکی و تولید دارو کاربرد دارند. این تحقیق با هدف بررسی و ردیابی ترکیبات موسیلاژی و انواع آن در مراحل مختلف تکوین برگ گیاه بنفشه معطر به دلیل ارزش اقتصادی و سیستماتیکی این ترکیبات انحصاری انجام گردید. بذره‌های گیاه بنفشه معطر در شرایط مطلوب گلخانه در قالب طرح کاملاً تصادفی کاشته شدند. جهت بررسی و ردیابی ترکیبات موسیلاژی در مراحل مختلف رشد گیاه، برش عرضی از برگ‌ها تهیه و با رنگ‌های شناساگر موسیلاژ رنگ آمیزی شدند. نتایج نشان داد که تعداد عناصر موسیلاژی در مرحله برگچه‌ای بسیار کم و موسیلاژ فقط محدود به دیواره سلولی است. در مرحله رویشی، افزایش تعداد و قطر سلول‌های موسیلاژی و نیز بهم پیوستن آنها مشاهده شد. در برگ‌های بالغ، کانال‌ها و حفره‌های موسیلاژی، در ناحیه‌های نزدیک به اپیدرم تحتانی و رگبرگ اصلی، از بهم پیوستن سلول‌های موسیلاژی مجاور به وجود آمدند، این ویژگی باعث افزایش مقدار موسیلاژ نیز می‌گردد که یک واکنش تکوینی-حفاظتی در گیاه بنفشه معطر محسوب می‌شود. این ویژگی می‌تواند در راستای بهره‌برداری و افزایش تولید ترکیبات دارویی منحصر گیاه بنفشه معطر مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: تکوین برگ، عناصر موسیلاژی، بنفشه معطر.

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۸۲۸۸۴۴۴۰، پست الکترونیکی: zarinkamar@modares.ac.ir

### مقدمه

صورت منفرد روی دمگل و گیاه قرار گرفته‌اند (۱۹). بنفشه معطر از زمان‌های قدیم در طب سنتی به ویژه در درمان سرطان و سیاه سرفه استفاده می‌شده است (۱). از قسمت‌های مختلف این گیاه به عنوان ضد التهاب، معرق، ادرارآور، نرم کننده، خلط آور، ضد تب، ضد سرفه و ملین و همچنین در درمان اختلالات گوارشی استفاده می‌شود (۶). عصاره برگ‌های این گیاه فعالیت آنتی‌اکسیدانی در شرایط آزمایشگاهی از خود نشان می‌دهد (۷). پلی ساکاریدهای محلول در آب استخراج شده از گیاه بنفشه

جنس *Viola* شامل حدود ۱۲۹ گونه است و در بسیاری از مناطق عاری از یخبندان جهان پراکنده شده‌اند. این جنس احتمالاً از جنوب آمریکا منشأ گرفته است اما بیشتر مراکز تنوع مورفولوژیکی و تاکسونومی آن در نیمکره شمالی واقع شده است (۱۴). بنفشه معطر *Viola odorata* گیاهی علفی و بوته‌ای، پایا و چندساله، که توسط استولون‌های مویی شکل و نازک یا بذر گسترش می‌یابد و ارتفاع آن بین ۵ تا ۱۵ سانتی متر است. برگ‌ها معمولاً به شکل روزت هستند و به رنگ سبز تیره مشاهده می‌شوند. گل‌ها به

غلظت بالایی که گروه‌های هیدروکسیل در پلی ساکاریدها دارند، ترکیبات موسیلاژی به طور کلی دارای ظرفیت آبگیری بالایی هستند و این امر موجب بررسی نقش آنها در زمینه روابط آبی شده است. توانایی ترکیبات موسیلاژی برای آبرسانی ممکن است به عنوان یک مکانیسم در گیاهان در برابر تنش‌های غیر زیستی به خصوص تنش خشکی (۴) ارایه شود. توجه به دانش زیست‌شناسی تکوینی و مطالعه مراحل نموی بافت‌ها برای حفظ گیاهان، به ویژه گیاهانی که از نظر اقتصادی از ارزش بالایی برخوردارند، از اهمیت خاصی برخوردار است. هدف از این تحقیق توصیف جنبه‌های مورفولوژیکی و سیتولوژی عناصر موسیلاژی در طول تکوین و بررسی تغییرات انواع و فراوانی عناصر موسیلاژی طی مراحل نمو برگ گیاه بنفشه معطر برای دستیابی به اطلاعات تکمیلی جهت شناسایی دقیقتر این ترکیبات می‌باشد. اطلاعات حاصل به شناسایی ویژگی‌هایی منجر می‌گردد که می‌توان از آنها در موارد اقتصادی و مطالعات پایه‌ای دیگر همچون رده بندی دقیق‌تر گیاه و پی بردن به روابط تکاملی در تیره Violaceae استفاده کرد.

### مواد و روشها

**مواد گیاهی، شرایط رشد:** برای این مطالعه، بذرها گیاه از مرکز تحقیقات جهاد و کشاورزی اصفهان تهیه و پس از ضد عفونی شدن در شرایط تاریکی و مرطوب در قالب طرح کاملاً تصادفی کاشته شدند. پس از جوانه زدن گیاهان، به گلدان‌های حاوی پرلیت منتقل و تحت شرایط گلخانه ای (۱۶ ساعت نور / ۸ ساعت تاریکی، ۸۰٪ RH و دمای  $25 \pm 2$  درجه سانتی گراد) نگهداری شدند. به منظور بررسی صفات ریخت‌شناسی، تعدادی از نمون‌ها در محلول FAA ( فرمالین، اتانول و استیک اسید، به نسبت حجمی ۱: ۳: ۶ ) تثبیت شده و از برگ آنها برش گیری و اسلایدهای ثابت تهیه شد. این مقاطع با قرمز کنگو و سبز متیل رنگ آمیزی شدند. سپس با

معطر دارای فعالیت ضد التهابی می‌باشند، که این مورد از طریق سرکوب ترشح و تکثیر مراحل التهاب و با تغییر در نفوذ پذیری مویرگی مشخص شده است (۵) .

از مهم‌ترین ترکیبات گیاه بنفشه معطر می‌توان به موسیلاژ، آنتوسیانین، اسانس و مواد رنگی آن اشاره کرد (۱۶). ترکیبات موسیلاژی از جمله ترکیبات گیاهی با طیف وسیع کاربردهای دارویی می‌باشند که یک پروتئوگلیکان قطبی و ترکیبی از پلیمرهای با وزن مولکولی مشابه، شامل یک بخش خنثی (۷۵٪) و دو بخش اسیدی (۲۵٪) هستند. علاوه بر این، آثاری از پکتین و گلوکان هم در آنها دیده می‌شود (۲۴). این ترکیبات در گیاهان می‌توانند به عنوان بخشی از محتویات سلول، و یا در برخی موارد به عنوان یک محصول سازمان نیافته از محتویات سلولی هستند (۲۰). علاوه بر موارد ذکر شده، موسیلاژ ممکن است به عنوان یک محصول جانبی داخل سلولی از دیواره اولیه یا به عنوان یک ماده بین سلولی، لایه بیرونی سازنده پیت، اشعه مغزی، پارانشیم و سلول‌های دیگر بوجود آید (۲۰). همچنین می‌تواند توسط تعدادی از کرک‌های ترشح کننده (غدد) نیز ترشح شود.

در بسیاری از مطالعات فراساختاری به این نتیجه رسیدند که دستگاه گلژی در تولید ترکیبات موسیلاژی نقش دارد. دیکتیوزوم‌های متعددی در سلول‌های ترشح کننده موسیلاژ وجود دارند. وجود پلی‌ساکاریدها در ویزیکول‌های گلژی توسط روش‌های سیتوشیمی و هیستوشیمی به اثبات رسیده است (۲۳). بسیاری از محققان بر این باور هستند که ژلاتینه شدن اپیدرم برگ بیشتر برای ذخیره‌سازی در برگ است. ترکیبات موسیلاژی ممکن است در گیاه نقش‌های متفاوتی داشته باشند از جمله: تحمل سرما، انتقال آب، پاسخ به زخم، اثر متقابل پاتوژن و گیاه میزبان، تعادل یونی در سلول‌های گیاهی، ذخیره کربوهیدرات، ذخیره مواد (۱۰) تعادل آب (۳)، با این حال عملکرد فیزیولوژیکی آنها در بسیاری از موارد نامشخص است. علاوه بر این، با توجه به

ساعت ساکن باقی ماند. حجم اشغال شده توسط عامل تجزیه کننده از جمله موسیلاژ بهم پیوسته ثبت شد. موسیلاژ خام با آب (۵۰۰ میلی لیتر) از برگ های گیاه (۵ گرم) همگن شده، تحت تکان دادن به مدت ۴۰ ساعت در دمای اتاق استخراج شد. پس از سانتریفیوژ کردن (۵ دقیقه، ۴۱ °C درجه سانتی‌گراد، ۲۰۰۰ rpm)، مایع رویی برداشته شد و در دمای ۴۱ درجه سانتی‌گراد ذخیره شد. رسوب یک بار دیگر با استفاده از همین روش مجدداً استخراج شد و مایع رویی آبی توسط تبخیر به ۱۵۰ میلی لیتر تغلیظ شد. محلول موسیلاژ به ۶۰۰ میلی لیتر از مخلوطی از ۹۶٪ اتانول و ۱٪ استیک اسید اضافه شد. رسوب با اتانول سرد شسته و لیوفیلیزه شد. موسیلاژ خشک شده وزن شد (۱۱).

**آنالیزهای آماری:** آنالیز داده‌ها توسط آنالیز واریانس و آزمون دانکن با استفاده از نرم افزار Spss ۱۹ به منظور مقایسه میانگین داده‌ها برای پی بردن به اختلافات معنی‌دار در سری داده‌ها صورت گرفت. آنالیز مطالعات آناتومی توسط نرم افزار Ts View صورت گرفت.

### نتایج و بحث

**خصوصیات تشریحی و ریخت‌شناسی برگ:** از نظر تشریحی، برگ در گیاه بنفشه معطر شامل دو قسمت اصلی پهنک و رگبرگ میانی است. پهنک از لحاظ بافت‌شناسی شامل دو لایه اپیدرم تک ردیفه فوقانی و تحتانی و مزوفیل است. اپیدرم فوقانی دارای یک لایه نسبتاً ضخیم کوتیکول بر روی سطح بیرونی می باشد. مزوفیل شامل دو لایه پارانشیم نرده‌ای به سمت اپیدرم فوقانی و پارانشیم اسفنجی به سمت اپیدرم تحتانی (برگ از نوع برگ پستی-شکمی bifacial یا dorsiventral) است (شکل ۱-الف). پارانشیم نرده‌ای شامل یک لایه سلول‌های کشیده و مترکم است. پارانشیم حفره‌ای شامل سه تا پنج لایه سلول تقریباً مترکم می‌باشد و دستجات آوندی (رگبرگ‌های فرعی) به طور یکنواخت بین لایه‌های پارانشیم اسفنجی پراکنده شده‌اند. دسته‌های آوندی توسط یک ردیف از سلول‌های

میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفتند. تعداد سلول‌های روزنه در واحد سطح (شاخص روزنه) برای سطح رویین و زیرین برگ محاسبه و نوع آنها نیز شناسایی شد. برای اندازه‌گیری شاخص روزنه (SI) برحسب درصد، از معادله زیر استفاده شد (۲).

$$SI = \{S \div S+E\} \cdot 100$$

که در آن S و E به ترتیب تعداد روزنه و تعداد سلول‌های اپیدرمی در واحد سطح (میلی‌متر مربع) هستند. سایر اندازه‌گیری‌های آناتومی توسط نرم افزار Ts View صورت گرفت.

**شناسایی ترکیبات موسیلاژی:** جهت بررسی و ردیابی ترکیبات موسیلاژی در مراحل مختلف رشد گیاه، به ترتیب در ۲، ۶ و ۱۲ هفتگی پس از جوانه زنی برش عرضی از برگ‌ها در سه تکرار تهیه و شناسایی ترکیبات موسیلاژی توسط آلسین بلو (آلسین بلو ۰/۱٪ در استیک اسید ۳٪) (سیگما آلدردیج) در pH=۳ به مدت ۱۰ دقیقه و روتنیوم رد (۰/۰۵٪) به مدت ۳۰ دقیقه با برش‌های تازه دستی در دمای آزمایشگاه انجام شد. سپس برش‌ها در آب مقطر شسته و زیر میکروسکوپ نوری زمینه روشن مشاهده شدند.

**استخراج و اندازه‌گیری مقدار موسیلاژ:** برگ‌های گیاه بنفشه معطر در سه مرحله گیاهچه‌ای، رویشی و زایشی برداشت شدند. بافت‌ها در دمای ۴۰ °C توسط آون به مدت ۱ هفته خشک شدند و سپس با استفاده از آسیاب خرد و از غربال ۰/۳۱۵ میلی متری مش عبور داده شدند. نیم گرم از مواد پودر هموزن شده در یک استوانه مدرج شیشه‌ای ۲۵ میلی لیتری با ارتفاع بیش از ۱۲۰ تا ۱۳۰ میلی لیتری با تقسیمات ۰/۵ میلی لیتری، با چوب پنبه بسته شده بود، قرار داده شد. پودر با یک میلی لیتر اتانول (۹۶٪) خیس شد، آب مقطر تا ۲۵ میلی لیتر اضافه شد و سپس در استوانه بسته شد. این مخلوط هر ۱۰ دقیقه یک بار به مدت یک ساعت به شدت تکان داده شد و سپس به مدت ۳

می‌رسد این سلول‌ها محل ساخت و تجمع موسیلاژ هستند (شکل ۴-ب). علاوه بر آن، زیر اپیدرم فوقانی رگبرگ میانی یک لایه پارانشیم نرده‌ای وجود دارد که ادامه پارانشیم نرده‌ای پهنک است. بین دو لایه اپیدرم رگبرگ میانی یک دسته آوند هلالی شکل یک جانبه وجود دارد. آوندهای چوب به سمت اپیدرم فوقانی و آوند آبکش به سمت اپیدرم تحتانی قرار گرفته است و فضای مابین با پارانشیم زمینه پر شده است.

طبق جدول ۱ ضخامت بافت‌های برگ گیاه بنفشه معطر اندازه‌گیری شد و شواهد افزایش این ضخامت‌ها را در مراحل مختلف تکوین با افزایش سن گیاه بیان می‌کنند. نوع دستگاه روزنه‌ای در گیاه بنفشه معطر از نوع آنیزوسیتیک می‌باشد (شکل ۱-د) و تراکم روزنه در سطح فوقانی کمتر از سطح تحتانی است (جدول ۱).

پارانشیمی غلاف آوندی احاطه شده است. به این حالت که غلاف آوندی دستجات چوب و آبکش را در بر می‌گیرد پریدرمیک گفته می‌شود (شکل ۱-الف). سطح خارجی پهنک عموماً توسط کرک‌های ساده تک سلولی و طویل پوشیده شده است و کرک‌ها با تراکم بیشتری در سطح بالایی برگ مشاهده می‌شوند (شکل ۱-ب). این کرک‌ها در همه مراحل تکوین گیاه دیده می‌شوند و با افزایش سن گیاه بر تعداد آنها افزوده می‌شود. از ویژگی‌های منحصر به فرد بنفشه معطر وجود یک یا دو کرک تک سلولی در قسمت فوقانی رگبرگ میانی است (شکل ۱-ج). رگبرگ میانی تقریباً به صورت تخم مرغی شکل با یک برجستگی به سمت اپیدرم فوقانی مشاهده می‌شود. نکته قابل توجه در مورد رگبرگ میانی این است که در سطح فوقانی دقیقاً لایه زیر اپیدرم رویی، یک لایه سلول وجود دارد، به نظر

جدول ۱- میانگین و انحراف معیار پارامترهای آناتومیکی اندازه‌گیری شده در مراحل مختلف تکوین برگ

پارامترها/برگ	مرحله گیاهچه ای	مرحله رویشی	مرحله زایشی
ضخامت کوتیکول ( $\mu\text{m}$ )	۰/۸۲±۰/۱۷c	۲/۰۱±۰/۲b	۳/۶۹±۰/۴a
ضخامت اپیدرم تحتانی ( $\mu\text{m}$ )	۷/۳۲±۰/۸c	۹/۷۶±۰/۱b	۱۴/۹۴±۰/۳a
ضخامت اپیدرم فوقانی ( $\mu\text{m}$ )	۹/۶۲±۰/۹b	۱۸/۳۴±۰/۸a	۱۹/۶۱±۰/۴a
ضخامت مزوفیل تحتانی ( $\mu\text{m}$ )	۳۱/۷۴±۰/۷c	۳۷/۹۵±۰/۴b	۵۶/۷۹±۰/۳a
ضخامت مزوفیل فوقانی ( $\mu\text{m}$ )	۱۴/۸۱±۰/۸b	۲۰/۰۵±۰/۵c	۳۸/۳۶±۰/۲a
ضخامت پهنک برگ ( $\mu\text{m}$ )	۴۹/۲۲±۰/۳c	۵۷/۲۷±۰/۶b	۷۳/۵۳±۰/۱a
اندازه سلول اپیدرمی ( $\mu\text{m}$ )	۹/۶۶±۰/۷c	۱۵/۵۵±۰/۳ab	۱۷/۲۹±۰/۸a
اندازه سلول موسیلاژی ( $\mu\text{m}$ )	۶/۲۸±۰/۹c	۱۰/۱۵±۰/۱b	۱۵/۴۰±۰/۲a
مساحت کانال موسیلاژی ( $\mu\text{m}$ )	-	۶۰/۶۴±۰/۴b	۲۸۶/۰۹±۰/۱۲/۸a
مساحت حفره موسیلاژی ( $\mu\text{m}$ )	-	۵۵۳/۳۲±۰/۱۷/۵b	۶۴۵/۷۹±۰/۱۹/۷a
قطر دستجات آوندی ( $\mu\text{m}$ )	۳۰۴۲/۰۸±۰/۳۲/۵c	۳۶۴۳/۷۸±۰/۳۷/۴bc	۵۶۶۹/۳۸±۰/۴۱/۲a
تعداد سلول موسیلاژی (%)	۲۳±۰/۶c	۳۰±۰/۷b	۳۳±۰/۴a
ایندکس روزنه فوقانی (%)	۱۲/۸۶±۰/۱/۸c	۱۷/۷۹±۰/۲/۳b	۲۳/۸۶±۰/۲/۸a
ایندکس روزنه تحتانی (%)	۱۹/۵۸±۰/۲/۵c	۲۶/۰۷±۰/۲/۲b	۳۶/۷۷±۰/۳/۶a

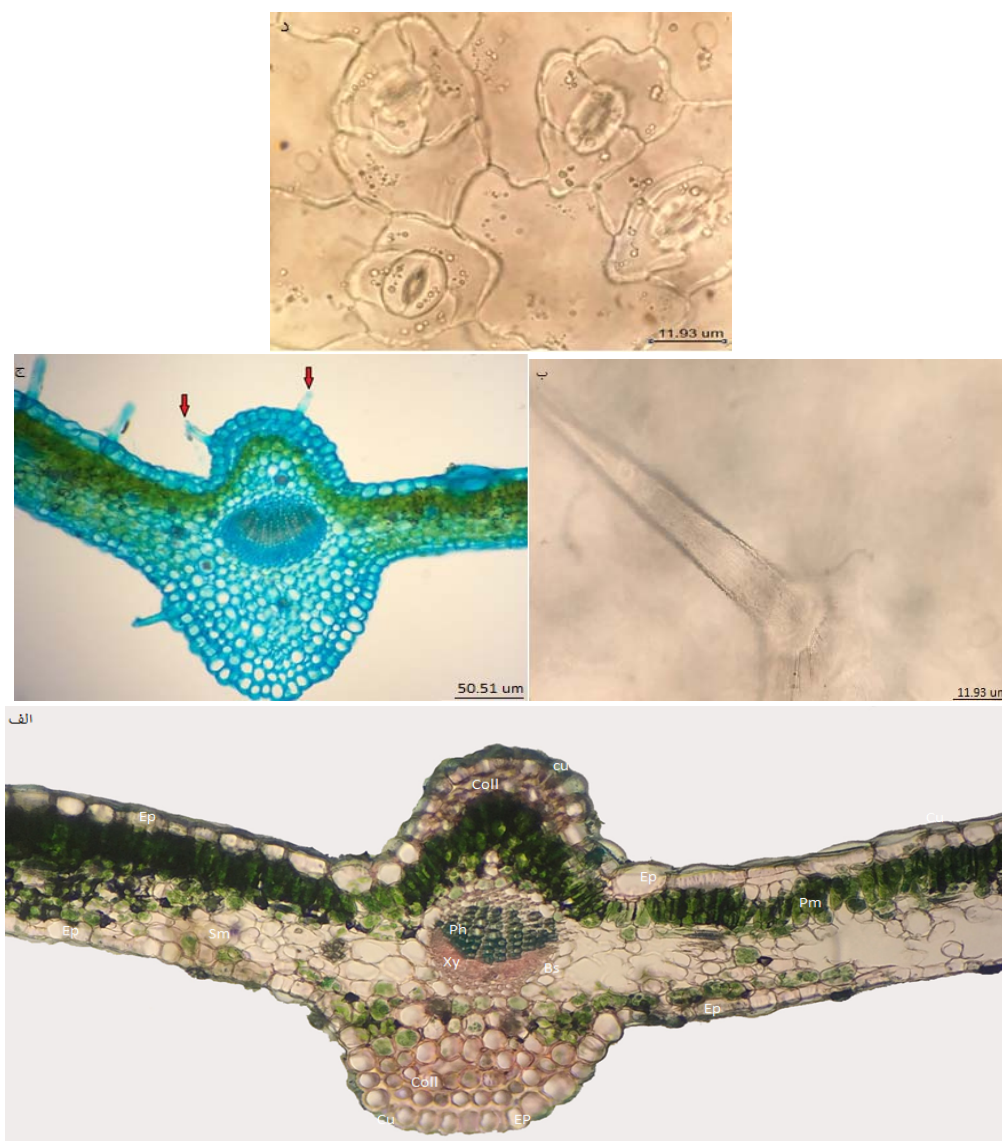
معطر که مورد مطالعه قرار گرفت با مشاهداتی که قبلاً در خانواده Violaceae گزارش شده مطابقت دارد (۲۲).  
عناصر موسیلاژی: براساس تصاویر تهیه شده از برش‌های عرضی برگ مشخص شد که، عناصر موسیلاژی در برگ

به طور کلی روزنه‌ها در هر دو سطح فوقانی و تحتانی دیده می‌شوند که بر این اساس از نوع آمفی استوماتیک است. تمام ویژگی‌های تشریحی و ریخت‌شناسی گیاه بنفشه

است و ترکیبات موسیلاژی بیشتر در دیواره‌های سلولی، که توسط آل‌سین بلو (یک رنگ پایه است، برای رنگ آمیزی پلی ساکارید اسیدی سولفات‌ها و گلیکو پروتئین سولفات‌ها بکار می‌رود و قابلیت جداسازی طیف‌ظرفی از ترکیبات موجود در دیواره سلولی را دارد) رنگ آمیزی شدند، این ترکیبات به رنگ آبی دیده شدند (شکل ۲-الف).

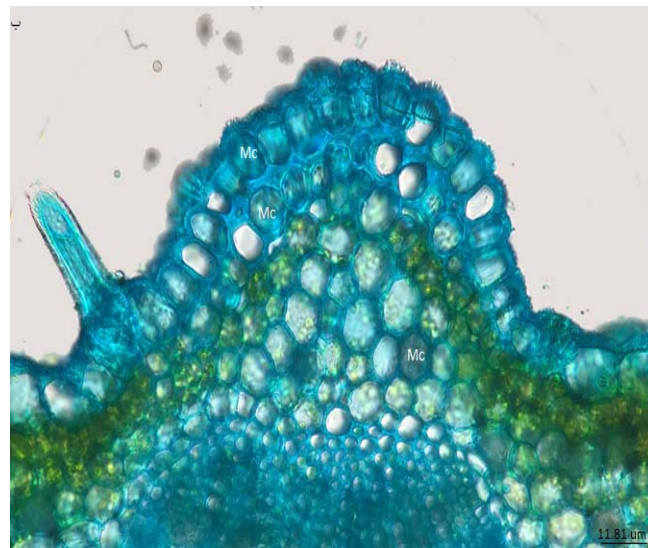
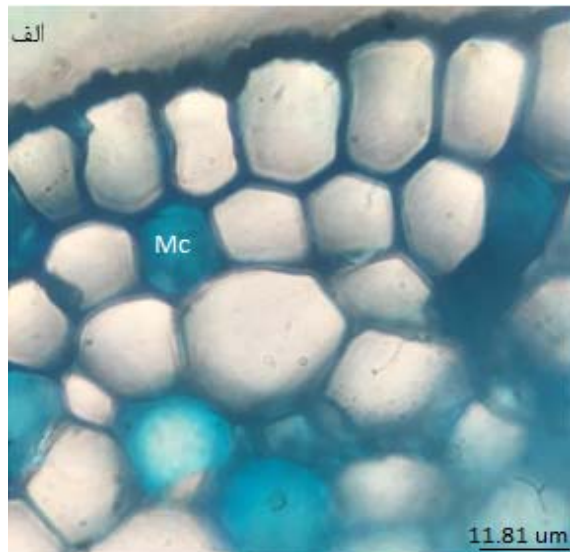
گیاه بنفشه معطر بر حسب سن برگ دارای اشکال و جایگاه متفاوتی می‌باشند (شکل‌های ۲، ۳ و ۴). به طور کلی تقریباً همه انواع عناصر موسیلاژی، شامل سلول‌ها، حفره‌ها و کانال‌های موسیلاژی در مراحل مختلف رشد و تکوین برگ‌های بنفشه معطر مشاهده شدند.

سلول‌های موسیلاژی: باتوجه به نتایج بدست آمده، در مراحل اولیه رشد گیاه تعداد سلول‌های موسیلاژی اندک

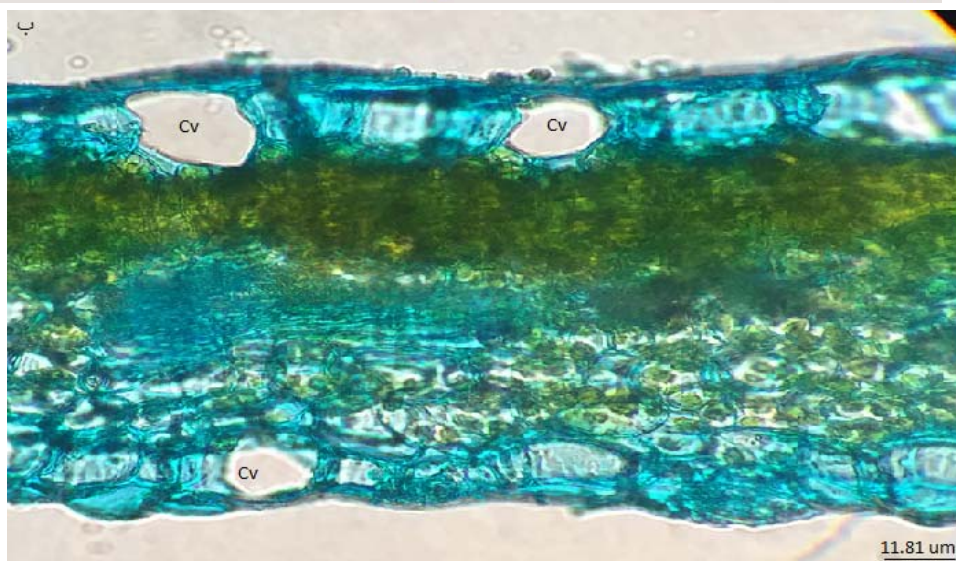
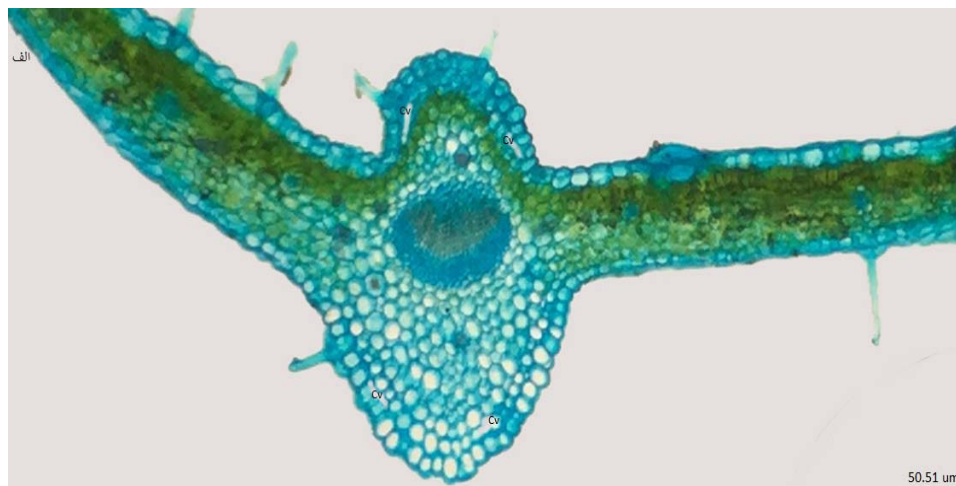


شکل ۱- برش عرضی از برگ بنفشه معطر. الف) بخش‌های مختلف برگ کوتیکول (Cu)، اپیدرم (Ep)، پارانشیم نرده ای (Pm)، پارانشیم اسفنجی (Sm)، آوند آبکش (Ph)، آوند چوب (Xy)، کلانشیم (Coll)، غلاف آوندی (Bs). ب) کرک‌های ساده تک سلولی. ج) کرک‌های تک سلولی منحصر به فرد بنفشه معطر در ناحیه رگبرگ میانی. د) روزنه‌های آنیزوسیتیک در برگ بنفشه معطر

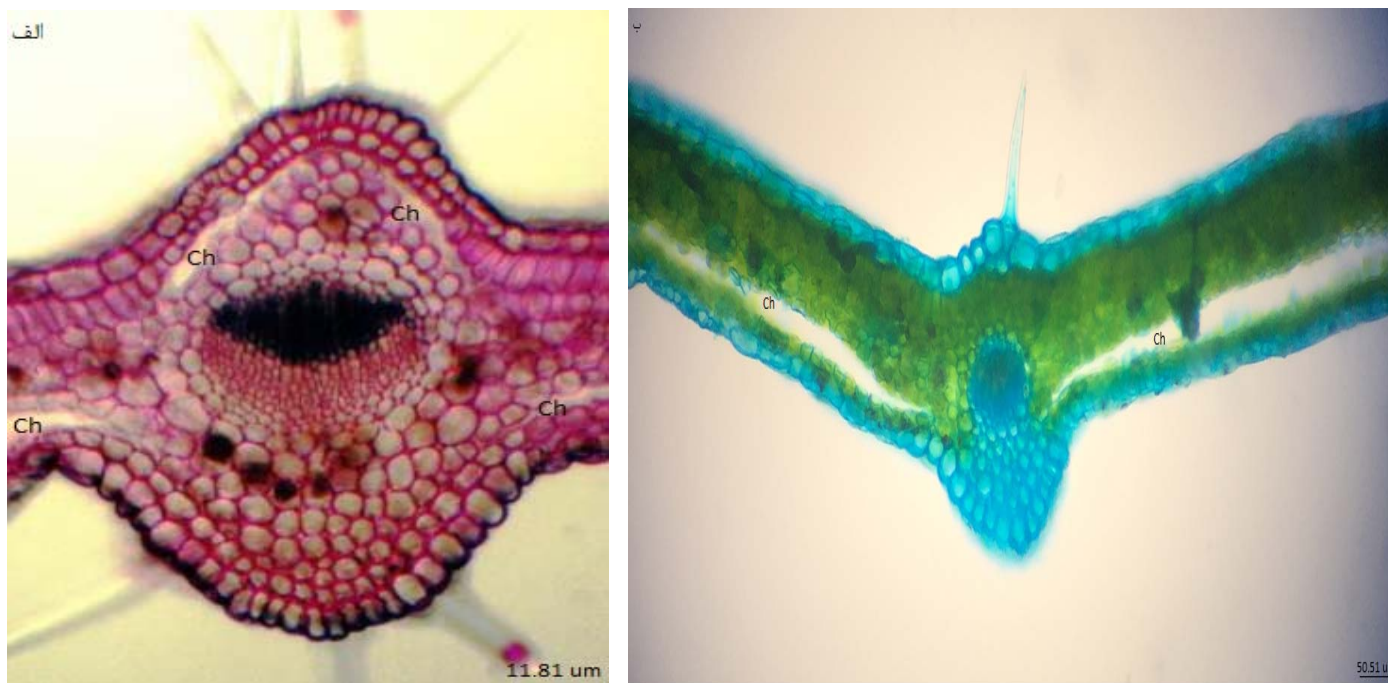




شکل ۲- الف) برش عرضی از برگ در مرحله رویشی و مشاهده سلول های موسیلاژی (Mc) و دیواره حاوی موسیلاژ (ب) سلول های موسیلاژی طی روند بلوغ از هم دور می شوند و این عمل آغاز تشکیل حفره های ترشچی را در پی دارد و جایگاه این سلول ها در بخش های مختلف بافت قابل رویت است.



شکل ۳- الف) حفره‌های موسیلاژی (Cv) در نواحی اپیدرمی، زیراپیدرمی و رگیبرگ اصلی برگ (ب) حفره‌های موسیلاژی ایجاد شده در لایه اپیدرم فوقانی برگ بنفشه معطر



شکل ۴- الف) برش عرضی برگ در مرحله زایشی (ب) افزایش ضخامت کانال (Ch) در مرحله زایشی

داشته باشند. برخی از نویسندگان با توجه به اهمیت الگوهای توزیع سلول‌های موسیلاژی به طبقه بندی‌های مختلف پرداخته‌اند. از جمله: توزیع سلول‌های موسیلاژی اپیدرمی در برگ که توسط رادل کوفر (۲۵) و کراچ (۱۷) مورد بحث قرار گرفت. سلول‌های موسیلاژی گیاه سرخدار، در سلول‌های مزوفیل طبیعی قرار دارند و در آیدوبلاست‌ها مشاهده نمی‌شوند. واکوئل‌های اغلب سلول‌های پاراننشیم نرده‌ای و در حدود یک سوم از سلول‌های پاراننشیم اسفنجی حاوی موسیلاژ هستند (۲۴). در گیاه *Thuja occidentalis* سلول‌های موسیلاژی در غلاف آوندی مشاهده شدند (۴). بسیاری از سلول‌های غلاف آوندی و برخی از سلول‌های پاراننشیم و آیدوبلاست‌ها در مزوفیل نیز دارای موسیلاژ هستند.

**حفره‌های موسیلاژی:** حفره‌های موسیلاژی در نواحی

تعداد این سلول‌ها در این مرحله طبق جدول ۱ مورد شمارش شدند و این تعداد در مقابل مراحل بعدی تکوین تعداد کمتری را به خود اختصاص می‌دهند. در این مرحله بدلیل اینکه موسیلاژ مانند یک لایه سوم دیواره رسوب می‌کند، برخی از سلول‌ها، دیواره ضخیم‌تری نسبت به سایر سلول‌ها دارند. رسوب لایه‌های سلولز در بالای رسوبات ترکیبات موسیلاژی در سلول‌های اپیدرمی به وفور در مطالعات میکروسکوپی نوری گزارش شده است و این لایه را به عنوان دیواره سوم در نظر گرفته‌اند (۱۳، ۲۷). طبق نتایج حاصل از این مطالعه سلول‌های موسیلاژی در نواحی اپیدرمی و زیراپیدرمی، مزوفیل اسفنجی و کلانشیمی مشاهده می‌شوند و فراوانی این سلول‌ها در مرحله رویشی برگ بیشتر می‌باشد (جدول ۱) (شکل ۲-ب). سلول‌های موسیلاژی ممکن است در تمام قسمت‌های گیاه وجود

(جدول ۱). میزان ترکیبات و عناصر موسیلاژی در برگ‌های مرحله زایشی گیاهان مختلف بسته به نوع گیاه متفاوت است. به عنوان مثال، کانتز (۱۸۹۱) اشاره کرد که کانال‌های موسیلاژی با افزایش سن در پنیکیان افزایش می‌یابند (۱۸). با این حال، با افزایش سن گیاه ابتدا تعداد سلول‌های موسیلاژی زیاد و موسیلاژ وارد فضای بین سلولی می‌شود (جدول ۱). همچنین با بلوغ گیاه از ضخامت دیواره کاسته شده و به مرور با از بین رفتن دیواره سلولی جای خود را به کانال موسیلاژی می‌دهند. لازم به ذکر است که با افزایش سن اندازه حفرات نیز بیشتر شده و تعداد آن افزایش یافت (جدول ۱).

**تغییرات میزان موسیلاژ در مراحل مختلف تکوین:** نتایج مربوط به تغییرات میزان موسیلاژ در مراحل مختلف تکوین برگ در نمودار ۱ ارائه گردیده است.

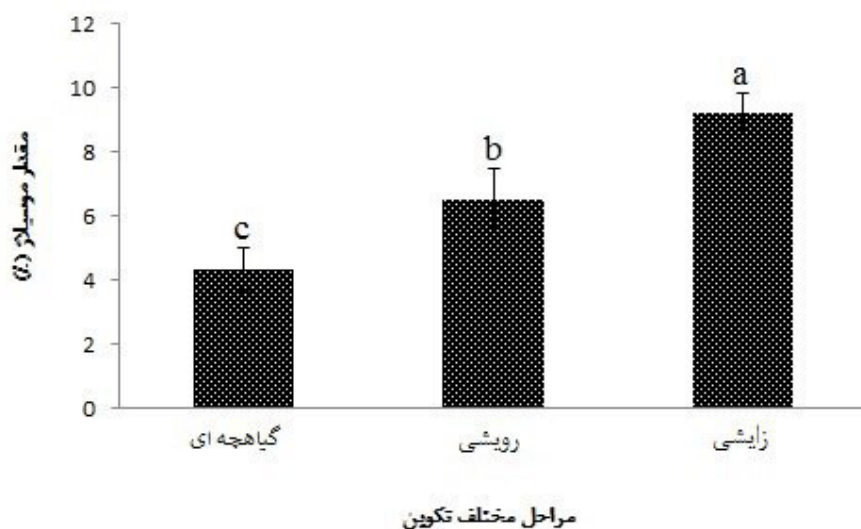
مشاهده می‌شود که مقدار موسیلاژ در مراحل مختلف تکوین برگ اختلاف معنی‌داری دارد. با توجه به اثر معناداری این تغییرات بر میزان موسیلاژ، در نمودار ۱ مقایسه موسیلاژ در مراحل مختلف ارائه شده است. مقدار موسیلاژ برگ در مراحل مختلف تکوینی متفاوت بود و با افزایش سن گیاه میزان موسیلاژ گیاه نسبت به مرحله گیاهچه‌ای افزایش می‌یابد. لیکن افزایش میزان موسیلاژ در شرایط مختلف رشد روند متفاوتی را نشان می‌دهد و در مرحله زایشی بیشترین میزان موسیلاژ نسبت به سایر مراحل مشاهده می‌شود. این میزان در مرحله گیاهچه‌ای از ۴/۳۳ درصد به ۹/۲ درصد در مرحله زایشی می‌رسد. سنتز، ترشح، ذخیره و اصلاحات ترکیبات موسیلاژی در مراحل مختلف رشد تحت تاثیر عوامل محیطی و داخلی هستند. لازم به ذکر است که سنتز و ترشح ترکیبات موسیلاژی در مراحل مختلف توسط شبکه تنظیمی از ژن‌های مختلف و عوامل رونویسی کنترل می‌شود. این عوامل طوری تنظیم می‌شوند که مقدار موسیلاژ در مرحله زایشی افزایش پیدا می‌کند (۹).

اپیدرمی، زیراپیدرمی و رگبرگ اصلی برگ مشاهده شدند و فراوانی این حفره‌ها در انتهای مرحله رویشی برگ بیشتر بود (شکل ۳-الف). در این مرحله تعداد و اندازه سلول‌های موسیلاژی افزایش یافته است (جدول ۱، شکل ۳-ب). ساختارهای ترشچی اکثر گونه‌های *Zornia* شامل اپیدرم حاوی موسیلاژ، حفره‌های موسیلاژی و ایدئوبلاست ترشح‌کننده ترکیبات فنلی می‌باشد. اپیدرم حاوی موسیلاژ در اکثر گونه‌ها یافت می‌شود و حفره‌های موسیلاژی در هر دو سطح اپیدرمی وجود دارند (۸). مطالعات انجام شده توسط تراچ تنبرگ و فاهن (۲۸)، در مورد آیدوبلاست‌های موسیلاژی و گروه‌های سلول‌های موسیلاژی که باعث ایجاد حفره‌ها و یا کانال‌ها می‌شوند، همگی نشان دادند که موسیلاژ توسط سیتوپلاسم به عنوان یک لایه (لایه‌ها) دیواره اضافی ذخیره می‌شود و حفرات ممکن است با شکست و یا لیز دیواره‌های عادی نازک در سلول‌های مجاور در اواخر مرحله نمو بوجود آیند. نتایج بدست آمده در این مطالعه با نتایج بدست آمده میکروسکوپی نوری توسط استوارت (۲۷)، و اسپچ (۲۶) مطابقت دارد.

**کانال‌های موسیلاژی:** کانال‌های موسیلاژی در نواحی زیر اپیدرمی اپیدرم تحتانی پهنک برگ، در قسمت فوقانی رگبرگ اصلی و همچنین در دمبرگ‌های برگ‌های مرحله زایشی که توسط رنگ روتنیوم قرمز (رنگ غیر اختصاصی کاتیونی شش ظرفیتی (هگزآ والانت) است که به پلی‌آنیون‌های متنوع متصل می‌شود) به وضوح مشاهده شدند (شکل ۳-الف). بیشترین تعداد این کانال‌ها در مرحله زایشی برگ توسط رنگ آمیزی با آلسین بلو مشاهده شدند (شکل ۳-ب). در راسته مالواسه حفره یا کانال حاوی موسیلاژ در مزوفیل قرار دارند. کانال‌های موسیلاژی در گیاه *M. Guatemalense* در دستجات آوندی قرار دارند (۱۵).

تعداد و اندازه سلول‌های موسیلاژی و مساحت حفرات در این مرحله به مقدار قابل توجهی افزایش یافته است





نمودار ۱: اثر مراحل مختلف تکوینی بر مقدار موسیلاژ. مقادیر میانگین  $\pm$  انحراف معیار بوده و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد انجام شده است. حروف غیر مشترک معرف تفاوت معنی‌دار است.

نشده است. در مطالعات قبلی مشخص شده است که بین مقدار موسیلاژ و تعداد سلول‌های موسیلاژی یا حفره ارتباط وجود دارد (۱۲).

به نظر می‌رسد که چون در این مرحله برگ از نظر میزان فتوسنتز در بیشترین مقدار خودش است، تولید کربوهیدرات در مراحل زایشی افزایش می‌یابد. تا به امروز در مورد تغییرات میزان موسیلاژ در برگ گزارشی منتشر

## منابع

- Ahmad, H., Khan, S. M., Ghafoor, S. and Ali, N. (2009). Ethnobotanical study of upper siran. *Journal of herbs, spices and medicinal plants*. 15(1): 86-97.
- Bird, S. M. and Gray, J. E. (2003). Signals from the cuticle affect epidermal cell differentiation. *New Phytologist*. 157(1): 9-23.
- Clarke, A., Anderson, R. and Stone, B. (1979). Form and function of arabinogalactans and arabinogalactan-proteins. *Phytochemistry*. 18(4): 521-540.
- Distelbarth, H. and Kull, U. (1985). Physiological investigations of leaf mucilages ii. The mucilage of *taxus baccata* L. and of *thuja occidentalis* L. *Israel journal of botany*. 34(2-4): 113-128.
- Drozdova, I. and Bubenchikov, R. (2005). Composition and antiinflammatory activity of polysaccharide complexes extracted from sweet violet and low mallow. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 39(4): 197-200.
- J.G. Graham, M.L. Quinn, (2000). Plants used against cancer – an extension of the work of Jonathan Hartwell. *Journal of Ethnopharmacology*. 73 : 347–377
- Ebrahimzadeh, M. A., Nabavi, S. M., Nabavi, S. F., Bahramian, F. and Bekhradnia, A. R. (2010). Antioxidant and free radical scavenging activity of *H. officinalis* L. var. *angustifolius*, *V. odorata*, *B. hyrcana* and *C. speciosum*. *Pak J Pharm Sci*. 23(1): 29-34.
- Fortuna-Perez, A. P., de Moraes Castro, M. and de Azevedo Tozzi, A. M. G. (2012). Leaflet secretory structures of five taxa of the genus *Zornia* JF Gmel. (Leguminosae, Papilionoideae, Dalbergieae) and their systematic significance. *Plant systematics and evolution*. 298(8): 1415-1424.
- Francoz, E., Ranocha, P., Burlat, V. and Dunand, C. (2015). Arabidopsis seed mucilage secretory cells: regulation and dynamics. *Trends in plant science*. 20(8): 515-524.

10. Franz, G. (1979). Metabolism of reserve polysaccharides in tubers of *Orchis morio* L. *Planta medica* 36(05): 68-73.
11. Ghanem, M. E., Han, R.-M., Classen, B., Quetin-Leclerq, J., Mahy, G., Ruan, C.-J., Qin, P., Perez-Alfocea, F. and Lutts, S. (2010). Mucilage and polysaccharides in the halophyte plant species *Kosteletzkya virginica*: localization and composition in relation to salt stress. *Journal of plant physiology*. 167(5): 382-392.
12. Gregory, M. and Baas, P. (۱۹۸۹). A survey of mucilage cells in vegetative organs of the dicotyledons. *Israel journal of botany*. 38(2-3): 125-174.
13. Haughn, G. and Chaudhury, A. (2005). Genetic analysis of seed coat development in Arabidopsis. *Trends in plant science*. 10(10): 472-477.
14. Hodálová, I., Mered'a Jr, P., Mártonfi, P., Mártonfiová, L. and Danihelka, J. (2008). Morphological characters useful for the delimitation of taxa within *Viola* subsect. *Viola* (Violaceae): a morphometric study from the West Carpathians. *Folia Geobotanica*. 43(1): ۱۱۷-۸۳.
15. Judd, W. S. and Manchester, S. R. (1997). Circumscription of Malvaceae (Malvales) as determined by a preliminary cladistic analysis of morphological, anatomical, palynological, and chemical characters. *Brittonia*. 49(3): 384.
16. Karioti, A., Furlan, C., Vincieri, F. F. and Bilia, A. R. (2011). Analysis of the constituents and quality control of *Viola odorata* aqueous preparations by HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 399(4): 1715-1723.
17. Kruch, O. (1895). 6 [1897] L'epidermide mucilagginosa nelle foglie delle Dicotiledoni. Ricerche anatomiche e biologiche. *Annuaire. r. Ist. bot. Roma*.(6): 191-274.
18. Kuntze, G. (1891). Beitrage zur vergleichenden Anatomie der Malvaceen. *Bot. Zbl*.(45): 161-168.
19. Lim, T. (2014). *Viola odorata*. In *Edible Medicinal and Non Medicinal Plants Springer*, 795-807:.
20. Malviya, R., Srivastava, P. and Kulkarni, G. (2011). Applications of mucilages in drug delivery-a review. *Advances in Biological Research*. 5(1): 1-7.
21. Mangin, M. L. (1893). Sur Les Cellules Mucifères Et Résinifères Du *Taxus Baccata*. *Bulletin de la Société Botanique de France*. 40(8): 313-316.
22. Mereacre, A., Toniuc, A. and Toma, C. (2014). Histo-Anatomical Observations Regarding *Viola* L. Species In The Gârboavele Reserve (County Of Galati). *Analele Stiintifice ale Universitatii" Al. I. Cuza" din Iasi*. 60(1): 13.
23. Naqvi, S. A., Khan, M., Shahid, M., Jaskani, M., Khan, I. A., Zuber, M. and Zia, K. M. (2011). Biochemical profiling of mucilage extracted from seeds of different citrus rootstocks. *Carbohydrate polymers*. 83(2): 623-628.
24. Naran, R., Chen, G. and Carpita, N. C. (2008). Novel rhamnogalacturonan I and arabinoxylan polysaccharides of flax seed mucilage. *Plant physiology*. 148(1): 132-141.
25. Radlkofer, L. *Ueber die Methoden in der botanischen Systematik, insbesondere die anatomische Methode*. im Verlage der kb Akademie (1883).
26. Spegg, H. (1959). Untersuchungen zur lage, ausbildung und funktion der schleimfuhrenden gewebe bei malvageen und tiliageen. *Planta medica*. 7(01): 8-23.
27. Stewart, E. G. (1919). Mucilage or slime formation in the cacti. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*. 46(5): 157-166.
28. Trachtenberg, S. and Fahn, A. (1981). The mucilage cells of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.-development, ultrastructure, and mucilage secretion. *Botanical Gazette*. 142(2): 206-213.
29. Western, T. L., Burn, J., Tan, W. L., Skinner, D. J., Martin-McCaffrey, L., Moffatt, B. A. and Haughn, G. W. (2001). Isolation and characterization of mutants defective in seed coat mucilage secretory cell development in Arabidopsis. *Plant physiology*. 127(3): 998-101.

## Tracing mucilage compounds in different stage of development of *viola odorata* L. leaf

Shafaghat Z. and Zarinkamar1 F.

Plant Sciences Dept., Faculty of Biological Sciences, University of Tarbiat Modares, Tehran, I.R. of Iran

### Abstract

*Viola odorata* belongs to the family Violaceae, has medicinal properties due to presence of compounds such as carbohydrates and mucilage found in its leaves and flowers. Polysaccharide hydrocolloids including mucilage compounds are abundant in nature and commonly found in many higher plants. These polysaccharides constitute a structurally diverse class of biological macromolecules with a broad range of physicochemical properties which are widely used for various applications in pharmacy and medicine. This study was conducted to investigate and trace the mucilage compounds in the various stages of development of the leaves of *V. odorata*, due to the economic and systematic values of these proprietary compounds. In this study, the disinfected seeds were maintained under greenhouse conditions and conducted in a completely randomized design. (16 hour light/8 hour dark, 80 % RH at  $25 \pm 2$  °C). To investigate and trace the mucilage compounds in various stages of plant growth, the cross-section of the leaves were made and were then painted with mucilage detection reagents. Results showed that the number of mucilage elements is very low at seedling stage and the mucilage compounds limited to cell wall. In the vegetative stage, an increase in the number and diameter of mucilage cells and their integration were observed. In the reproductive stage, the mucilage channels and cavities were created from fusion of adjacent cells especially in the area near the lower epidermis and main vein. Mucilage compounds increased with the increasing age of leaves, that this may be a developmental-protective reaction. This feature can be used in order to increase the production of pharmaceutical compounds of *V. odorata*.

**Key words:** Foliar development, Mucilage compounds, *Viola odorata*.