مورفولوژی کرک ها و بررسی ترکیبات اسانس در مراحل مختلف تکوین پونه معطر (Mentha pulegium L.)

فاطمه زرین کمر* و نسترن عرب زاده

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

تاریخ دریافت: ۹۵/۱/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۷/۴/۱۲

چکیده

پونه معطر، گیاهی است با نام علمی Mentha pulegium ازخانواده Lamiaceae، گیاهان این تیره شامل حدود ۲۰۰ سرده و بیش از ۴۰۰۰ گونه گیاهی هستند. پونه معطرگیاهی با ارزش های سودمند تجاری و صنعتی می باشد و در طب سنتی مصارف متعددی دارد. در این تحقیق آنالیز های تشریحی و ریخت شناسی کرک های موجود در این گونه با استفاده از میکروسکوپ نوری و الکترونی انجام گرفت. به منظور بررسی ترکیبات اسانس در دو مرحله رویشی و زایشی نمونه ها جمع آوری و آنالیز توسط دستگاه GC, GC/MS انجام گرفت. بررسی های ریخت شناسی انجام شده مشخص کردکه این گونه دارای سه نوع کرک غیر غده ای و سه نوع کرک غده ای می باشد. با استفاده از روش های رنگ آمیزی حضور ترکیباتی نظیر ترکیبات پکتیکی لیپیدهای خنثی، ترکیبات فنولی، آلکالوئیدها و اسانس در کرک های غده ای این گونه مشخص گردید. نتایج حاصل از آنالیز اسانس در دو مرحله تکوینی نشان دهنده حضور ترکیبات متنوعی می باشد از میان این ترکیبات بیش از ۹۰٪ اسانس از دو ترکیب پولگون و منتون تشکیل شده است. بررسی اسانس بیانگر کاهش میزان پولگون و افزایش منتون می باشد. با توجه به کاهش درصد این دو ترکیب و هم چنین حضور ترکیبات جدید در فاز زایشی و افزایش تراکم کرک در فاز زایشی به نسبت فاز رویشی گمان بر این است که گیاه مقداری از انرژی تولید این ترکیبات را برای تولید ترکیبات جدید که فراریت و عطر بیشتری دارند، به مصرف می رساند و مسیر سنتز ترپنوئیدها دستخوش تغییر می شود

واژه های کلیدی: پونه معطر، کرک های ساده و غده ای، ریخت شناسی، آنالیز اسانس.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۸۲۸۸۴۷۱۷ ، پست الکترونیکی: zarinkamar@modares.ac.ir

مقدمه

سرده Mentha عضوی از تیره Lamiaceae است که خود در رده Lamiales دسته بندی می شود. از آنجایی که تمامی گونه و هیبرید های Mentha تولید کننده اسانس هستند این سرده از مهم ترین اعضای تیره نعناعیان به شمار می آید (۱۷). این سرده دارای پراکنش جهانی است و به صورت همه جا زی بر روی تمامی قاره ها به جز منطقه قطب جنوب وجود دارد (۱۷). گونه های نعناعیان در بیشتر نقاط ایران بویژه در دامنه های البرز، شمال، شمال شرقی و برخی نقاط دیگر ایران انتشار دارند (۲). *Mentha pulegium* یک گیاه معطر با ارزش های سودمند تجاری و صنعتی می باشد و در طب سنتی به عنوان برطرف کننده سوء هاضمه، عفونت های مجاری تنفسی، سرفه، درد گلو و درد های عصبی مورد استفاده قرار می گیرد. روغن های ضروری پونه معطر دارای ویژگی های خاص و منحصر به فردی هستند به عنوان مثال دارای خاصیت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی می باشد همچنین توانایی جلوگیری از فساد و افزایش زمان ماندگاری مواد غذایی این ترکیبات طی تحقیقات به اثبات رسیده است (۱۶). ترکیبات ثانویه

گیاهان بسته به جنس، گونه و شرایط زیست محیطی می تواند متفاوت و متغیر باشد. (۴ و ۳). وجود اسانس فقط در حدود ۲۰۰۰ گونه از ۲۵۰۰۰ گونه گیاهان گلداری که تا کنون شناخته شده، گزارش گردیده است. مهم ترین گیاهان دارویی حاوی اسانس، متعلق به تیره های نعناع، سداب، مورد، گشنیز، کاسنی، کاج، سرو و تعداد کمی تیره های دیگر می باشند (۱). این ترکیبات موجب محافظت از گیاهان در برابر خورده شدن توسط گیاه خواران و آلوده شدن آنها به عوامل بیماری زای میکروبی می شوند. همچنینبه عنوان ترکیبات جاذب (از نظر بو، رنگ و طعم) حشرات گرده افشان و حیوانات پراکنش دهنده بذور گیاهان عمل می کنند. سطح اندام های هوایی در اغلب گیاهان توسط زوائد مو مانندی پوشیده شده که در زیر میکروسکوپ تنوعی از شکل و ساختار را نشان می دهند. کرک ها اغلب در مراحل ابتدایی تکوین اندام، از سلول های اپیدرمی یا زیر اپیدرمی منشاء گرفته شروع به تمایز می کنند (۱۰). دو مدل اساسی کرک ها متمایز می شود به: کرک های غده ای و غیر غده ای (۱۵) کرک های غده ای در گیاهان ساختارهای مناسبی برای تولید و ذخیره تولیدات ثانویه گیاهان هستند.

مواد و روشها

کاشت بذر: بذرهای پونه معطر پس از تهیه، به منظور ضد عفونی کردن به مدت ۱۰ دقیقه درون ظرف محتوی هیپوکلریت سدیم ۵٪ قرار گرفتند و سپس با آب مقطر شستشو داده شدند و به منظور جوانه زنی در گلدان های حاوی پیت و پرلیت به نسبت (۲به ۱) در شرایط گلخانه ای در دمای حداقل ۱۸ و حداکثر ۲۳ درجه سانتی گراد و ۴۰-۴۵ ٪ رطوبت کشت داده شدند. عمل آبیاری در طول فصل رشد هر ۲ روز یک بار صورت گرفت. پس از گذشت ۳۰ روز از کشت بذرها جوانه های گیاه به پرلیت منتقل شده و یک روز در میان به وسیله محلول هوگلند کامل آبیاری شدند.

بررسی های ریخت شناسی

میکروسکوپ نوری(LM): بررسی مورفولوژیکی کرک های اپیدرمی بر روی برش های دستی و تازه از برگ انجام شد. برای این منظور برش های عرضی از برگ ها تهیه و پس از قرار دادن برش ها بر روی لام و در گلیسرین ۳۰٪ ، با میکروسکوپ نوری Olympus مدل BH2 سا خت کشور ژاپن بررسی شدند. برگ ها، گلبرگ ها و کاسبرگ های گیاه در مراحل مختلف تکوین از گره و میان گره اول تا پنجم انتخاب و پس از قرارگیری در هیپوکلریدسدیم ۵٪ به مدت ۶ ساعت رنگ بری شد و به وسیله میکروسکوپ نوری مجهز به لنز مدرج ابتدا قطر عدسی با فرمول زیر بدست آمد سپس مساحت عدسی با بزرگ نمایی ۴۰× بدست آمده و تعداد کرک ها در واحد سطح محاسبه شد.

$$\text{قطر عدسی بزرگ} = \frac{\text{درشت نمایی عدسی کوچک} \times \text{قطر عدسی کوچک}}{\text{درشت نمایی عدسی بزرگ}}$$

$$S = \pi r^2$$

میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM): قطعات ریزی از برگ به مدت یک شبانه روز در محلول تثبیت کننده FAA (فرمالدئید، اسید استیک، اتانول) قرار داده شدند و سپس در اتانول با درجات رو به افزایش به تدریج عمل آبگیری صورت گرفت. نمونه ها جهت خشک شدن داخل هود قرار گرفتند. عمل پوشاندن سطح نمونه با لایه بسیار نازک فلز توسط دستگاه پوشاننده یون صورت گرفت و نمونه های پوشش دار به وسیله چسب هادی روی پایه های مخصوص چسبانده شدند و برای تهیه ریز نگاره با میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM)، مدل XL30 و KYKY-EM3200 ساخت شرکت فیلیپس از کشور هلند مورد مطالعه قرار گرفتند.

بررسی های هیستو شیمیایی: مطالعات هیستوشیمیایی بر روی برش های تازه برگ صورت گرفت. تست های هیستو شیمیایی شامل موارد فوق می باشد: $FeCl_3$ برای ترکیبات تانن (۱۴)، سافرانین برای ترکیبات پکتیکی (۶)،

قرمز سودان 7B برای لیپیدهای خنثی(۸)، معرف نادی برای اسانس (۹)، دی کرومات پتاسیم برای تمام ترکیبات فنولی (۱۲) و معرف واگنر برای آلکالوئیدها (۱۱).

آنالیز اسانس به وسیله GC-GC/MS: به منظور انجام این آنالیز نمونه ها در دو مرحله رویشی پس از گذشت ۹۰ روز از جابه جایی جوانه ها به پرلیت و در مرحله زایشی ۱۲۰ روز پس از انتقال نمونه ها به پرلیت جمع آوری شده و در سایه خشک شدند. استخراج اسانس از ۳۰ گرم پودر گیاه خشک شده در سایه به روش تقطیر با آب توسط دستگاه کلونجر به مدت ۵ ساعت انجام گرفت و بلافاصله توسط سولفات سدیم خشک آبگیری شده و در محل تاریک با دمای ۴ درجه سانتی گراد تا زمان تجزیه دستگاهی نگهداری شد.

مشخصات دستگاه GC: کروماتو گراف گازی TRACEGC، مجهز به ستون DB-5 به طول ۳۰ متر، قطر داخلی۰/۲۵ میلی متر، ضخامت لایه فاز ساکن ۰/۲۵ میکرومتر و دمای محفظه تزریق ۲۵۰ درجه سانتی گراد بود. در برنامه ریزی حرارتی، دمای اولیه ستون به مدت ۳ دقیقه در ۶۰ درجه سانتی گراد نگهداشته شد و تا دمای ۲۵۰ درجه سانتی گراد با سرعت ۵ درجه سانتی گراد در دقیقه افزایش یافت و در دمای ۲۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه متوقف شد. آشکارساز از نوع FID (آشکارساز یونیزاسیون شعله ای) با دمای ۲۸۰ درجه سانتی گراد و گاز حامل نیتروژن با سرعت جریان ۱ میلی لیتر بر دقیقه بود.

مشخصات دستگاه GC/MS: طیف سنج جرمی Quadrupole متصل به کروماتوگراف گازی TRACEGC، ستون DB-5 به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵، و به همراه ضخامت لایه نازک فاز ساکن ۰/۲۵ میکرومتر و دمای محفظه تزریق به همراه آشکار ساز به ترتیب ۲۵۰ و ۲۸۰ درجه سانتی گراد بود. برنامه ریزی حرارتی ستون از ۴۰ تا ۴۶۰ درجه سانتی گراد، دمای محفظه یونش ۲۰۰ درجه سانتی گراد، زمان روبش ۰/۴ ثانیه، گاز حامل هلیوم با سرعت جریان ۱,۱ میلی لیتر در دقیقه و انرژی یونیزاسیون معادل ۷۰ الکترون ولت بود.

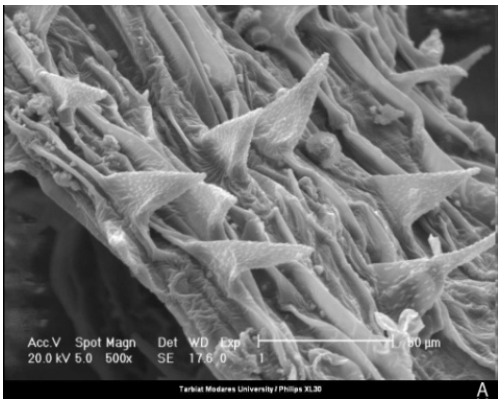
شناسایی ترکیبات تشکیل دهنده روغن های اساسی: شناسایی ترکیبات موجود در روغن های اساسی با مقایسه طیف های جرمی و شاخص های بازداری بدست آمده، با طیف های جرمی و شاخص های بازداری ترکیب های استاندارد صورت گرفت (۵). درصد نسبی هر یک از ترکیب های تشکیل دهنده اسانس ها با توجه به سطح زیر منحنی آن در طیف کروماتوگرام بدست آمد.

نتایج و بحث

بررسی های ریخت شناسی: مطالعات مورفولوژیک اولیه بر روی گیاه پونه معطر نشان داد، بر روی برگ، گلبرگ و کاسبرگ این گیاه کرک های ظریفی وجود دارد. این کرک ها، شامل کرک های پوششی و کرک های ترشحی می باشند.کرک های پوششی از لحاظ ساختاری به دو قسمت تقسیم می شوند، کرک های پوششی تک سلولی و کرک های پوششی چند سلولی که شامل یک سلول پایه که توسط چندین سلول اپیدرمی پشتیبانی می شود. در ساقه به دلیل تنوع در تعداد سلول های تشکیل دهنده، شاهد تقسیم بندی فرعی هستیم که این تقسیم بندی شامل کرک های پوششی چند سلولی کوتاه، دارای ۲ تا ۴ سلول و کرک های پوششی چند سلولی بلند، دارای ۶ تا ۸ سلول می باشد. سلول راسی[2] دارای انتهایی نوک تیز می باشد (شکل۱). کرک های غیر غده ای بر روی سطح خود دارای برجستگی های زگیل مانندی هستند.

کرک های ترشحی پونه معطر از نوع راسی و سپری می‌باشند. کرک های غده ای راسی به دو دسته تقسیم می شوند، دسته اول دارای یک سلول ساقه و سری گرد و تخم مرغی هستند که دارای سطحی صاف می باشند (شکل۲) و

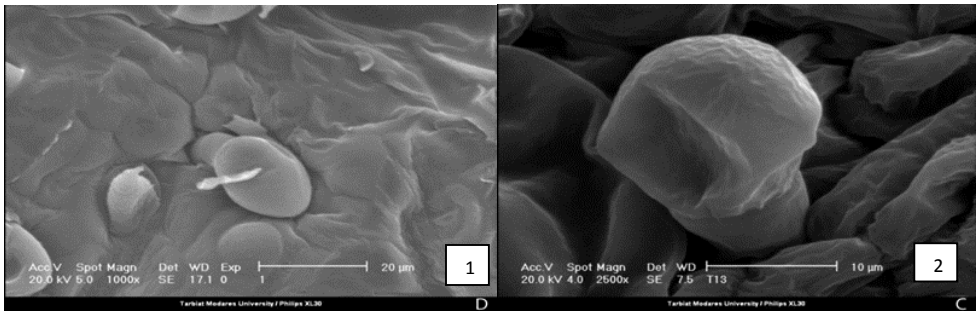
دسته دوم دارای یک سلول پایه برجسته یک تا دو سلول ساقه و سری گرد با سطحی صاف می باشند (شکل۳).



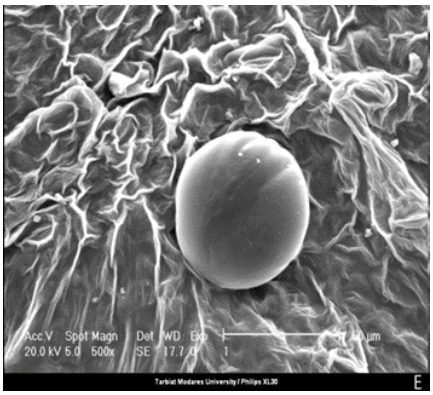
شکل ۱- کرک های غیر غده ای

کرک های راسی مشاهده شده با آنچه Werker و همکارانش (۱۹۸۵) به عنوان کرک راسی نوع اول و دوم شرح داده اند مطابقت دارند(۱۹).

کرک های غده ای سپری دارای یک سلول کوتاه به عنوان ساقه و سری بزرگ و صاف هستند (شکل ۴). نتایج حاصل از مطالعات ساختاری و رنگ آمیزی هسته ها نشان می دهد که کرک های غده ای سپری دارای ۱۲ تا ۱۶ سلول ترشحی هستند و در دو ردیف دایره ای شکل قرار می گیرند که شامل ۴ سلول در دایره داخلی و ۸ تا ۱۲ سلول در دایره خارجی می باشند. حضور کرک های سپری در گزارشات Turner و همکارانش (۲۰۰۰) بر روی نعناع فلفلی (Pipermint) مشاهده شده است(۱۸).



شکل های ۲ و ۳- کرک های راسی ۱. نوع اول ۲. نوع دوم

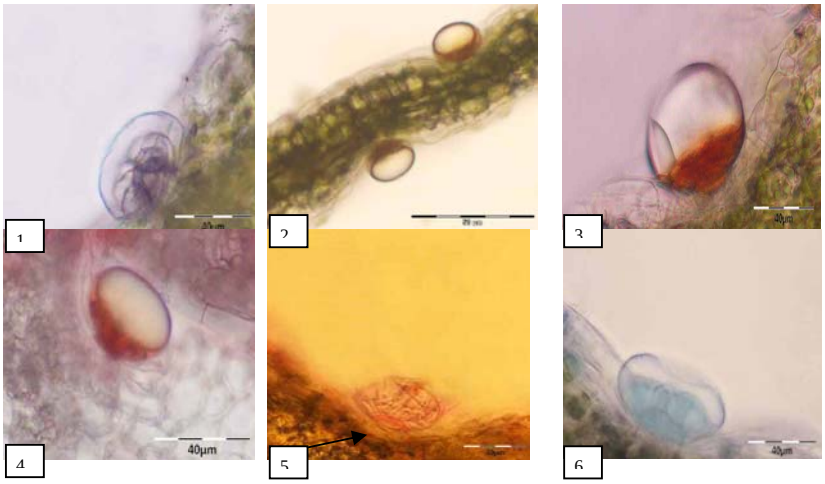


شکل ۴- کرک غده ای

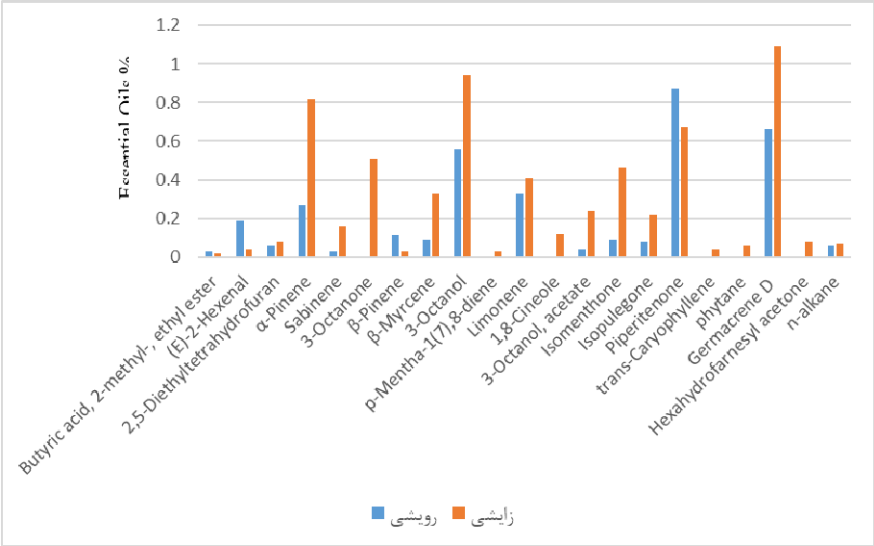
توزیع و تراکم کرک ها: میزان تراکم کرک ها در دو مرحله رویشی و زایشی متفاوت می باشد به طوری که تراکم هر دو نوع کرک غده ای و غیر غده ای در مرحله زایشی افزایش می یابد و این تراکم در سطح تحتانی برگ های مرحله زایشی بیشتر از سطح فوقانی می باشد. در مرحله رویشی نیز تراکم کرک های غیر غده ای در سطح فوقانی بیشتر از سطح تحتانی می باشد در حالی که تراکم کرک های غده ای در سطح تحتانی نسبت به سطح فوقانی بیشتر است. همچنین الگوی تراکم کرک ها در سطح برگ به گونه ای است که در منطقه ی پایه ای (Basal) میزان کرک ها به نسبت منطقه ی راسی (Apical) برگ متراکم تر می باشند و شاهد توزیع بیشتر کرک ها در منطقه ی پایه ای هستیم. توزیع مشابه از کرک های سپری، با بیشترین فراوانی بر روی سطح تحتانی برگ برای انواع گونه های تیره نعناعیان گزارش شد (۷، ۱۳).

هیستوشیمی کرک ها: نتایج تست های هیستوشیمیایی ماهیت پیچیده ی ترکیبات را مشخص می کند که شامل ترکیبات چربی دوست۷ و آبدوست۸ می باشد. نتایج آزمایشات هیستوشیمیایی انجام شده با معرف های اختصاصی برای شناسایی و تشخیص حضور ترکیبات تانن، آلکالوئیدها، فنول، پکتین، لیپید و اسانس ها حاکی از حضور تمامی این ترکیبات در کرک های راسی و سپری پونه معطر می باشد(شکل ۵).

بررسی اسانس: اسانس پونه معطر ۱۷ ترکیب مختلف را در مرحله رویشی و ۲۳ ترکیب را در مرحله زایشی نشان می دهد که در نمودار ۱ نشان داده شده است.

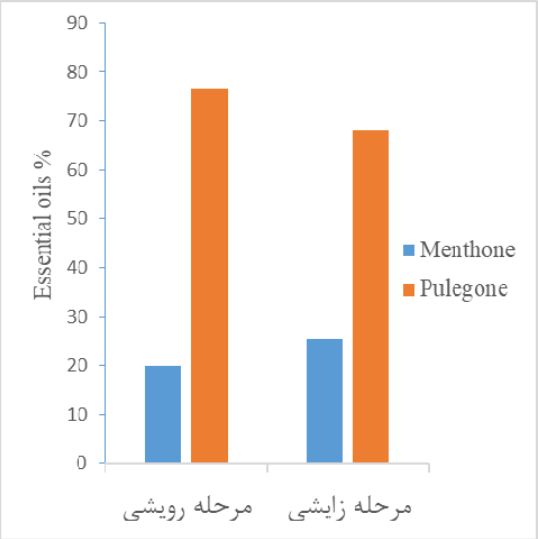


شکل ۵- ۱- حضور ترکیبات تانن ۲. حضور ترکیبات آلکالوئیدی ۳. حضور ترکیبات فنولی ۴. حضور ترکیبات پکتین ۵. حضور ترکیبات لیپیدی ۶. حضور ترکیبات اسانس



نمودار ۱- ترکیبات اسانس در دو مرحله رویشی و زایشی

اسانس پونه معطر شامل ترکیبات پیچیده ای است که به طور عمده حاوی مونوترپن های اکسیژنه پولگون۴ و منتون۵ است که در مرحله رویشی جمعاً ۹۶/۵۲ ٪ و در مرحله زایشی این دو ترکیب ۹۳/۵۳ ٪ از محتوای اسانس را به خود اختصاص داده اند که در نمودار شماره ۲ نمایش داده شده است.



نمودار ۲- دو ترکیب منتون و پولگون در دو مرحله رویشی و زایشی

مقایسه ترکیبات اسانس پونه معطر در مراحل رویشی و زایشی نشان دهنده تغییرات کمی و کیفی ترکیبات در این دو مرحله تکوینی می باشد. در مرحله زایشی کاهش درصد دو ترکیب پولگون و منتون از ۹۶/۵۲ ٪ به ۹۳/۵۹ ٪ و همچنین حضور شش ترکیب جدید شامل:

1, 8 Cineol, p-Mentha, 8-dien, 3 Octanone, Trans caryophyllen, Phytoene, Hexane hydro farnesyl acetone

می باشد. دو ترکیب از شش ترکیب فوق به عنوان مواد فرار معرفی شده اند و چهار ترکیب باقی مانده به عنوان رایحه و عطر شناسایی شده اند. حضور ترکیبات جدید فرار و خوشبو به همراه افزایش تراکم کرک غده ای در فاز زایشی نسبت به فاز رویشی، به عنوان رایحه در فاز زایشی به گیاه این امکان را می دهد تا برای عمل گرده افشانی و جذب حشرات گرده افشان دارای عطری مطبوع شود. به نظر می رسد که گیاه تولید این ترکیبات جدید را در عمل گرده افشانی در سلول های کرک غده ای به مصرف می‌رساند.

منابع

۱- امید بیگی ر. ۱۳۷۴. رهیافتهای تولید و فرآوری گیاهان دارویی. فکر روز.

۲- قهرمان ا. ۱۳۷۳. کروموفیت های ایران سیستماتیک گیاهی، جلد سوم. تهران مرکز نشر دانشگاهی چاپ اول.

۳- کشاورز ح، مدرس ثانوی م، زرین کمر ف. ۱۳۹۳. تفاوت در پاسخ آنتی اکسیدانی دو رقم کلزا بهاره و پاییزه در شرایط مزرعه ای تحت تاثیر اسید سالسیلیک. مجله پژوهش های گیاهی جلد۲۷ شماره ۲، ۲۸۸-۲۹۷.

۴- البوغبیش ن، زرین کمر ف. ۱۳۹۳. بررسی تغییر ساختاری در اندام زایشی بابونه آلمانی ناشی از تنش سرب. جلد ۲۷ شماره ۳، ۳۳۶-۳۴۵.

5- Adam, R. 2001. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. Allured: Carol Stream, IL.

6- Antunes, T. & Sevinate-Pinto, I. 1991. Glandular trichomes of Teucrium scorodonia L. Morphology and Histochemistry. Flora, 185, 65-70.

7- Ascensao, L. & PAIS, M. 1998. The leaf capitate trichomes of Leonotis leonurus: Histochemistry, ultrastructure and secretion. Annals of Botany, 81, 263-271.

8- Beckman, C. & Halmos, S. 1962. Relation of vascular occluding reactions in banana roots to pathogenicity of root-invading fungi. Phytopathology, 52, 893.

9- Bourett, T. M., Howard, R. J., Okeefe', D. P. & Hallahan, D. L. 1994. Gland development on leaf surfaces of Nepeta racemosa. International Journal of Plant Sciences 52, 623-632.

10- Brundrett, M. C., Kendrick, B. & Peterson, C. A. 1991. Efficient lipid staining in plant material with Sudan Red 7B or Fluoral Yellow 088 in polyethylene glycol-glycerol. Biotechnic & Histochemistry, 66, 111-116.

11- David, R. & Carde, J. 1964. Histochimie-coloration differentielle des inclusions lipidiques et terpeniques des pseudophylles du pin maritime au moyen du reactif NADI. Comptes rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences 258:1338-1340.

12- Fahn, A. 2000. Structure and function of secretory cells. Advances in botanical research, 31, 37-75.

13- Furr, M. & Mahlberg, P. G. 1981. Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in Cannabis sativa. Journal of Natural Products, 44**,** 153-159.

14- GABE, M. 1968. Techniques histologiques, Masson.

15- Gavalas, N., Bosabalidis, A. M. & Kokkini, S. 1998. Comparative study of leaf anatomy and essential oils of the hybrid Mentha x villoso-nervata and its parental species M. longifolia and M. spicata. Israel journal of plant sciences, 46**,** 27-33.

16- Guerin, H. P., Delaveau, P. 1971. Localisations histochimiques. II: Proceeds simples de localization de pigments flavoniques. Application à quelques Phanérogames. Bulletin de la Société botanique de France, 118**,** 29-36.

17- Salamaki, Y., Zarre, S., Jamzad, Z. & Brauchler, C. 2009. Trichome micromorphology of Iranian Stachys (Lamiaceae) with emphasis on its systematic implication. Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants, 204**,** 371-381.

18- Turner, G. W., Gershenzon, J. & Croteau, R. B. 2000. Development of peltate glandular trichome of peppermint. Plant physiology, 124**,** 665-680.

19- Werker, E., Ravid, U. & Putivsky, E. 1985. Structure of glandular hairs and identification of the main components of their secreted material in some species of the Labiatae. Israel Journal of Botany, 34**,** 31-45.

Trichomes micromorphology and essential oil variation at different developmental stages of Mentha pulegium L.

Zarinkamar F. and Arabzadeh N.

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

Abstract

Mentha pulegium is an aromatic plant in the Lamiaceae family. Plants of this family estimated to contain 200 genera with over 4,000 species. M. pulegium is an aromatic plant with high industrial and commercial values. In this study, morphological and anatomical analysis of the trichomes on leaves, sepals, and petals of M. pulegium were carried out using light microscopy and scanning microscopy. The essential oils were obtained using hydro distillation method and analyzed by Gas Chromatography (GC) and Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC/MS). Morphological investigation revealed that these species had three types of non-glandular trichomes and two types of glandular trichomes. Histochemical test demonstrated both of trichomes have a positive reaction to neutral lipids, pectin, alkaloid compounds, phenolic compounds, and terpenoids. The results of oil analysis in different development stages show the presence of several compounds. The composition analysis of the essential oils using GC and GC/MS in vegetative and flowering phases indicated that pulegone and menthone were the major compounds with more than 90% of total oil composition. In mentha pulegium, pulegone amount is reduced from 76.58% to 68.19% and menthone amount is increased from 19.94% to 25.40%.Regarding to the reduction of pulegone and menthone amount from 96.52% to 93.59% and also appearance of new chemical compounds in flowering phase and increasing in trichomes density at this phase, it can be concluded that the plant exchange some amount of energy to produce new compounds with special volatility and fragrance as well as changing the synthesis pathway in trichomes cells.

Key words: Mentha pulegium, simple and glandular trichomes, morphology, essential oil analyses.