

۱ بررسی میکرومورفولوژی و اجزای اسانس دو گونه پونه‌سا
۲ (*Nepeta binaludensis*, *Nepeta cataria*)
۳

۴ فاطمه زهرا امیرمحمدی؛ مجید عزیزی؛ سید حسین نعمتی

۵ دانشگاه فردوسی مشهد

۶ DOI: [10.22067/jhs.2021.60692.0](https://doi.org/10.22067/jhs.2021.60692.0)
۷

۸ چکیده

۹ جنس *Nepeta* متعلق به زیر خانواده *Nepeoidea* از بزرگترین قبیله در خانواده نعنائیان با حدود ۷۹ گونه در ایران می
۱۰ باشد. این مطالعه با هدف بررسی صفات میکرومورفولوژی و فیتوشیمیایی دو گونه (*Nepeta* و *Nepeta binaludensis*)
۱۱ (*cataria*) انجام شد. بررسی خصوصیات میکرومورفولوژی برگ و بذور (فندقه) با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی
۱۲ (SEM) صورت گرفت. نتایج بررسی برگها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی نشان داد که سطح برگ هر دو گونه
۱۳ دارای دو نوع کرک های ترشخی و غیر ترشخی بودند. کرک های غده ای ترشخی از نوع سپری بوده و شامل یک سلول
۱۴ پایه جایگذاری شده در حفره اپیدرم و یک سر (Head) تک یا چهار سلولی بودند. اندازه کرک های ترشخی بطور میانگین
۱۵ ۶۳ تا ۷۷ و ۴۷ تا ۶۷ میکرومتر و تراکم (۷ تا ۲۱ و ۲۰ تا ۳۰ عدد) به ترتیب در گونه *N. binaludensis* و *N. cataria* در
۱۶ هر میلی متر مربع سطح برگ مشاهده شد. سطح فندقه در هر دو گونه از نوع صاف بود. استخراج اسانس از پیکر رویشی در
۱۷ مرحله گلدهی با روش تقطیر با آب صورت گرفت. تجزیه اسانس با استفاده از GC و GC/MS انجام شد. ترکیبات تشکیل
۱۸ دهنده اسانس در گونه *N. binaludensis* (۵۱ ترکیب) با اجزای غالب ۸،۱- سینئول (۱۴/۸ درصد)، بتاپینن (۱۰/۴ درصد)
۱۹ و پارا سیمین (۹/۸ درصد) و در گونه *N. cataria* (۲۶ ترکیب) با اجزای اصلی ایزومرهای نپتالاکتون شامل: ۴a-آلفا، ۷-
۲۰ آلفا، ۷ a-بتا- نپتالاکتون (۷۲/۷۷ درصد)، ۴a-آلفا، ۷-آلفا، ۷ a-آلفا، نپتالاکتون (۱۷/۸۷ درصد) و ۴ a- آلفا، ۷-بتا،
۲۱ ۷-آلفا- نپتالاکتون (۲/۴۷ درصد) شناسایی شد.

۲۲ کلمات کلیدی: اسانس، کرک غده‌ای، میکرومورفولوژی، *Nepeta*.SEM.

۲۳ مقدمه

۲۴ گیاهان دارویی بعنوان یک منبع تجدید ناپذیر از مواد موثره در صنایع غذایی، داروسازی، آرایشی و بهداشتی مورد استفاده قرار
۲۵ می گیرند. در خانواده نعنائیان^۱ بیش از ۲۰۰ جنس از گیاهان اسانس دار وجود دارد (۲۲) که جنس پونه‌سا یا *Nepeta* یکی
۲۶ از بزرگترین جنس‌ها در زیر خانواده *Nepeoideae* از این خانواده دارای اهمیت اقتصادی و دارویی بالایی با حدود ۳۰۰ گونه
۲۷ گیاهی می باشد. گیاهان این جنس اکثرا در بخش وسیعی از اروپا، آسیای شرقی و مرکزی گسترش دارند. ایران یکی از مناطق
۲۸ اصلی پراکنش این جنس می باشد که اکثر گونه‌ها بصورت خودرو در نقاط مختلف ایران یافت می شوند. اکثر آنها چندساله و
۲۹ به ندرت یکساله دارای فرم های رویشی گوناگون، برگها با حاشیه صاف، دندانهای یا اره‌ای پوشیده از کرک‌هایی با شکل و
۳۰ تراکم متفاوت می باشند (۱۲، ۲۷).

¹ Lamiaceae

۱ گونه‌های مختلف این جنس به علت داشتن اثرات ضد عفونی‌کننده، ضد تشنج، ضدسرفه، فعالیت ضد میکروبی و فعالیت آنتی
 ۲ اکسیدانسی بطور گسترده‌ای در طب سنتی مورد استفاده قرار می‌گیرند. بطور کلی خواص دارویی این جنس به اسانس و اجزای
 ۳ اصلی آن (سزکویی‌ترین‌ها، مونوترپن‌ها، سیکلوپنتانوئید (نپتالاکتون‌ها) نسبت داده می‌شود (۱۰).
 ۴ میزان اسانس، تعداد و درصد ترکیبات تشکیل دهنده اسانس از جمله مواردی است که علاوه بر ژنتیک گیاه به شدت تحت
 ۵ تاثیر عوامل مختلف قرار می‌گیرد. این عوامل می‌تواند شرایط محیطی مختلف، رویشگاه، اقلیم، مرحله رشدی گیاه، عوامل
 ۶ پس از برداشت مانند روش خشک‌کردن، انبارداری و روش استخراج اسانس باشند (۲۱).
 ۷ از این حیث می‌توان گونه‌های پونه‌سا را بر اساس جز غالب اسانس به دو گروه یا کموتایپ اصلی تقسیم کرد. گونه‌های پونه
 ۸ سا حاوی نپتالاکتون و ایزومرهای آن، و گونه‌های فاقد نپتالاکتون، که نیز به دو زیرگروه تقسیم می‌شوند. گونه‌هایی که
 ۹ کاربوفیلین اکساید، (۸۰ سینثول یا لینالول بعنوان ترکیبات اصلی اسانس در آنها یافت می‌شوند (۱).
 ۱۰ گونه‌های که در کموتایپ نپتالاکتون‌ها قرار می‌گیرند به علت داشتن فعالیت‌های بیولوژیکی ارزشمند دارای اهمیت اقتصادی
 ۱۱ و دارویی بالایی می‌باشند. کشت در شرایط یکسان با به حداقل رساندن تاثیر عوامل محیطی بر مواد موثره، راه را برای
 ۱۲ سازگاری و اهلی کردن گونه‌های دارویی با ارزش که در معرض انقراض بوده و انتخاب ژنوتیپ‌های برتر برای اهداف اصلاحی
 ۱۳ هموار خواهد کرد (۲).
 ۱۴ در خانواده نعنائیان محل تولید اسانس کرک‌ها هستند. این اندام‌ها به صورت پرز یا کرک‌های غده‌ای بر روی تمام قسمت
 ۱۵ های گیاه وجود دارند و دارای تنوع گسترده‌ای هستند که بسیاری از آنها غده ای نمی‌باشند. کرک‌های غده ای که اسانس
 ۱۶ را ذخیره می‌کنند از نظر ریخت شناسی بین گونه‌های مختلف متفاوت می‌باشند و تنها در یک برگ بیش از یک نوع آن را
 ۱۷ می‌توان مشاهده نمود (۶) ولی اغلب آنها "سپری"^۱ یا "سرسان"^۲ هستند. کرک‌های غده ای سپری بعنوان مخازن ترشحي
 ۱۸ ترکیبات فیتوشیمیایی تخصص یافته اند (۳۱). هر یک از کرک‌های غده ای از یک سلول قاعده‌ای ساخته شده است که روی
 ۱۹ اپیدرم قرار گرفته است و بعنوان پایه حمایت کننده ۱ تا ۳ سلول دیگر است، که می‌تواند یک سلول تاجی منفرد (کرک
 ۲۰ سرسان) یا بیش از یکی و عمدتاً ۴ تا ۱۰ سلول (کرک سپری) باشد. اسانس تولید شده بوسیله کرک‌ها علاوه بر نقش محافظت
 ۲۱ کننده گیاه در برابر انواع تنش‌ها دارای فعالیت بیولوژیکی نیز می‌باشند، این متابولیت‌های ثانویه در صنایع مختلف داروسازی،
 ۲۲ عطرسازی و غذایی نیز مورد توجه می‌باشند. این کرک‌های غده ای ذخیره کننده اسانس از نظر ریخت‌شناسی بین گونه‌های
 ۲۳ مختلف، متفاوت می‌باشند (۳۳).
 ۲۴ در مطالعه میکرومورفولوژی کرک‌های برگگی گونه *Nepeta congesta var congesta* هر دو نوع کرک غده ای (سپری و
 ۲۵ سرسان) و غیر غده ای گزارش شده است (۱۷). هیبریداسیون و دگرگرده افشانی‌ها مکرر بین گونه‌ها باعث ایجاد تنوع فراوان
 ۲۶ در این جنس شده است و تشخیص گونه‌ها از یکدیگر را دشوار نموده است. از طرفی در فلور ایران تقسیم‌بندی این جنس بر
 ۲۷ اساس صفات مربوط به گل به ۵ زیر گروه انجام شده است و صفات میکرومورفولوژی و تزئینات سطح فندقه مورد توجه قرار
 ۲۸ نگرفته و یا بطور کلی چشم‌پوشی شده است (۱۶، ۱۳). در سالهای اخیر استفاده از میکروسکوپ الکترونی در مطالعات
 ۲۹ میکرومورفولوژی کرک خانواده نعنائیان (۸، ۱۹، ۲۵) و سطح فندقه جنس پونه‌سا (۱۲، ۱۶، ۲۳)، به علت اهمیت این صفات در
 ۳۰ تاکسونومی خانواده نعنائیان جهت تشخیص و تمایز گونه‌ها از یکدیگر بسیار مورد توجه می‌باشد. لذا در این مطالعه صفات

¹(peltate)

²(capitate)

۱ میکرومورفولوژی کرک و بذر گونه‌ی "پونه‌سای بینالودی"^۱ گونه در معرض انقراض انحصاری و اندمیک ایران و گونه پونه
۲ سای گربه ای^۲ با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) و نیز میزان و اجزای اسانس دو گونه فوق در گیاهان
۳ کشت شده در شرایط یکسان مورد کنکاش قرار گرفت.

مواد و روش ها

مواد گیاهی

۴ این مطالعه در سال زراعی ۹۷-۱۳۹۶ در باغ تحقیقاتی گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد انجام
۵ شد. دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد دارای عرض جغرافیایی ۳۶ درجه و ۱۶ دقیقه شمالی و طول جغرافیایی ۵۹
۶ درجه، ۳۶ دقیقه شرقی و ارتفاع ۹۸۵ متر از سطح دریا می باشد. شهر مشهد دارای آب و هوای متغیر اما معتدل و متمایل به
۷ سرد و خشک تابستانهای گرم و خشک و زمستانهای سرد و مرطوب دارای متوسط دمای روزانه ۲۱ درجه سانتی گراد و حداقل
۸ دما تا ۱۰- درجه می باشد. بذر گونه‌های مورد مطالعه (*N. cataria*, *N. binaloudensis*) از هر بار بوم پژوهشکده علوم
۹ گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه گردید. بذور در اسفند ماه در سینی‌های کشت حاوی پیت‌ماس، کوکوپیت و پرلیت
۱۰ (۴۰:۴۰:۲۰) به صورت سطحی کشت شدند، پس از رسیدن دانه‌ها به اندازه مناسب در (مرحله ۶ الی ۸ برگ) به گلدانهای
۱۱ دارای همان ترکیب محیط کشت انتقال داده شدند. یک هفته قبل از انتقال به زمین، گلدان‌ها به محیط بازتر (فضای نیمه
۱۲ پوشیده) جهت کاهش تنش‌های محیطی و مقاوم سازی منتقل شدند. دانه‌ها در اردیبهشت ماه به زمین اصلی در کرت
۱۳ های به ابعاد ۱ متر مربع و فاصله کشت ۲۵ سانتی متر با ۳ تکرار منتقل شدند. آبیاری در اوایل کشت تا استقرار کامل دانه‌ها
۱۴ بصورت یک روز در میان و پس از استقرار کامل بصورت ۳ روز در میان بر حسب نیاز آبی انجام شد. برداشت پیکر رویشی در
۱۵ مرحله گلدهی کامل در اواخر تابستان صورت گرفت.

استخراج اسانس

۱۶ نمونه‌های گیاهی جهت استخراج اسانس از گیاهان کشت شده در باغ تحقیقاتی گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه
۱۷ فردوسی مشهد در مرحله گلدهی کامل جمع‌آوری و در سایه خشک شدند. استخراج اسانس از ۳۰ گرم ماده خشک گیاهی با
۱۸ استفاده از دستگاه کلونجر^۳ به روش تقطیر با آب به مدت ۳ ساعت انجام شد. میانگین بازده اسانس بر اساس درصد وزنی/
۱۹ حجمی بر اساس ۳ تکرار اسانس‌گیری برای هر گونه محاسبه شد. رطوبت‌گیری اسانس با سولفات سدیم بدون آب انجام شد.
۲۰ نمونه‌های اسانس تا زمان تجزیه در محیط تاریک و دمای ۴ درجه سانتی گراد نگه داری شدند.

آنالیز آماری داده های مربوط به درصد اسانس

۲۱ این آزمایش در قالب طرح بلوک کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. از نرم افزار JMP نسخه ۹ جهت آنالیز داده ها
۲۲ استفاده شد. مقایسه میانگین داده ها با استفاده از آزمون LSD ($P \leq 0.01$) انجام شد.

مشاهدات میکرومورفولوژی برگ و بذر

¹ *Nepeta binaloudensis*

² *Nepeta cataria*

³ Clevenger apparatus

جهت مشاهدات میکرومورفولوژی بذر در گونه‌های مورد مطالعه، بذور اولیه تهیه شده از هر بار یوم استفاده شد. قبل از مشاهدات SEM فن‌دقه، در حدود ۱۰ عدد بذر با استریومیکروسکوپ به منظور تهیه نمونه سالم و بالغ مشاهده شد. جهت مشاهدات میکرومورفولوژی کرک با استفاده از میکروسکوپ الکترونی (SEM) نمونه‌های برگ به در مرحله رشد رویشی گیاه از برگ‌های توسعه یافته میانی گیاه تهیه گردید. نمونه برداری از برگ‌های سالم، شاداب و عاری از هرگونه آفت و بیماری در اوایل صبح انجام شد و نمونه‌ها بلافاصله در ظروف سربسته جهت انجام مراحل بعدی به آزمایشگاه منتقل شدند.

میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

تصویر برداری نمونه‌ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) مدل Leo 1450VP واقع در آزمایشگاه مرکزی دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد. قطعات برگ در محلول تثبیت کننده گلو تار آلدهید ۳ درصد به مدت نیم ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس ۳ بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه در بافر فسفات سدیم ۰/۱ مولار (pH ۷/۲) شستشو داده شدند. پس از شستشو مرحله آبیگری قطعات برگ با سری‌های صعودی ۱۰، ۳۰، ۵۰، ۷۰ و ۱۰۰ درصد اتانول به ترتیب انجام شد. سپس جهت خشک شدن و تبخیر اتانول، نمونه‌ها بر روی کاغذ صافی قرار داده شدند. مرحله چسباندن، پس از خشک شدن انجام شد. بدین صورت که بخش میانی نمونه‌های برگ نزدیک به محور اصلی با تیغ اسکالپل به قطعات کوچک میلی متری برش داده شده و با استفاده از چسب‌های دو طرفه به استاب‌های آلومینیومی مخصوص میکروسکوپ الکترونی SEM چسبانده شدند و در نهایت مرحله پوشش دهی نمونه‌ها با استفاده از ذرات پالادیوم و سپس قرار گرفتن در دستگاه خلا اسپاتر کوتر به مدت ۳۰ دقیقه انجام شد. جهت مشاهده تصاویر میکروسکوپی بذور تنها مراحل چسباندن و پوشش دهی انجام شد.

آنالیز تصاویر میکروسکوپی و توزیع کرک‌ها

آنالیز تصاویر میکروسکوپی و توزیع کرک‌های ترش‌حی و غیرترش‌حی، نسبت و اندازه کرک‌ها در هر میلی‌متر از سطح مقطع برگ با استفاده از نرم افزار ImageJ انجام شد.

آنالیز کمی و کیفی اسانس

کروماتوگرافی گازی (GC) و کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی (GC/MS)

آنالیز کمی اسانس با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی (GC) Agilent Technologies و مدل 7890 A، ستون HP-5 به طول ۳۰ متر و قطر ۰/۳۲ میلی متر ضخامت لایه فاز ساکن ۰/۲۵ میکرومتر بود. برنامه ریزی دمایی ستون از ۶۰ تا ۲۱۰ درجه سانتی‌گراد با افزایش دمای ۳ درجه سانتی‌گراد در دقیقه و از دمای ۲۱۰ تا ۲۴۰ با افزایش دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد در دقیقه و تاخیر به مدت ۸/۵ دقیقه در دمای نهایی انجام شد. آشکارساز از نوع FID (یونیزاسیون شعله ای)، با دمای ۲۹۰ درجه سانتی‌گراد، دمای محفظه تزریق ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد بود، که به تدریج از دمای ۲۴۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۲۰ درجه سانتی‌گراد در دقیقه افزایش یافت و تا ۲۸۰ درجه ادامه داشت. گاز حامل، نیتروژن با سرعت ۱ میلی‌لیتر در دقیقه بود. دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی (GC/MS) از نوع Agilent technologies و مدل 5975C، مجهز به آشکارساز FID (یونیزاسیون شعله ای)، ستون HP-5MS به طول ۳۰ متر و قطر ۰/۲۵ میلی‌متر، ضخامت لایه فاز

ساکن ۰/۲۵ میکرومتر مورد استفاده قرار گرفت. برنامه‌ریزی حرارتی ستون از ۶۰ تا ۲۱۰ درجه با افزایش دمای ۳ درجه سانتی
گراد در دقیقه انجام شد. سپس از دمای ۲۱۰ تا ۲۴۰ با افزایش دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد در دقیقه، و تاخیر به مدت ۸/۵
دقیقه در دمای نهایی تنظیم شد. دمای محفظه تزریق ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد. گاز حامل هلیوم، با سرعت
جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه بود. انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت و ناحیه جرمی از ۵۰ تا ۴۸۰ بود. اسانس با دی کلرومتان
رقیق شد و به دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی (GC/MS) تزریق شدند. شناسایی ترکیبات موجود در
اسانس با تزریق هیدروکربن‌های نرمال (C9-C25) به GC، با استفاده از شاخص بازداری (RI) و مقایسه طیف‌های جرمی
با ترکیبات استاندارد در منابع معتبر (Adams) استفاده از اطلاعات موجود در حافظه کامپیوتر دستگاه GC-MS کتابخانه
(Wiley, Nist) انجام شد. درصد نسبی ترکیبات با توجه به سطح زیر منحنی آن در طیف کروماتوگرام محاسبه شد.

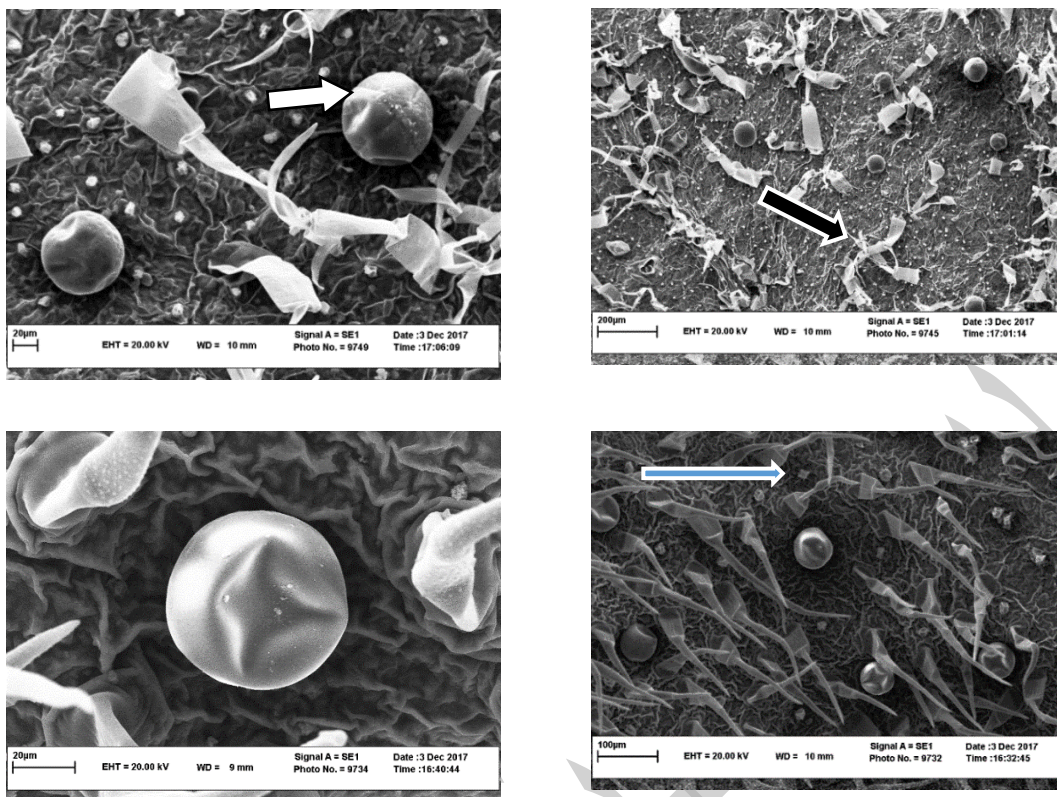
نتایج و بحث

میکرومورفولوژی برگ و توزیع کرک‌ها

نتایج حاصل از مشاهدات میکرومورفولوژی برگ‌ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی در شکل شماره ۱ آورده شده است. این
تصاویر وجود هر دو نوع کرک ترش‌حی و غیر ترش‌حی در سطح برگ را نشان می‌دهند. کرک‌های ترش‌حی غده‌ای و غیر
ترش‌حی در سطح برگ هر دو گونه مشاهده شد. در گونه *N. binaludensis* کرک ترش‌حی از نوع سپری با سر تک سلول و
چهار سلولی مشاهده شد (شکل ۱، بالا سمت چپ). تراکم کرک غده‌ای ترش‌حی در گونه *N. binaludensis* حدود ۲۱-۷ عدد
در هر میلی‌متر مربع سطح برگ بود و اندازه کرک در حدود ۶۳ تا ۷۷ میکرومتر برای کرک سپری با حفره ترش‌حی تقریباً
از اسانس، بصورت کروی شکل مشاهده گردید. در گونه *N. cataria* نیز کرک ترش‌حی از نوع سپری و کرک غیرترش‌حی
در سطح برگ مشاهده شد (شکل ۱، پایین سمت راست و پایین سمت چپ). اندازه کرک‌های ترش‌حی سپری در این گونه از
۴۷ تا ۶۷ میکرومتر متغیر بود و تراکمی در حدود ۲۰ تا ۳۰ عدد کرک در هر میلی‌متر مربع سطح برگ مشاهده شد. کرک
های غیر ترش‌حی در تراکم بیشتری نسبت به کرک ترش‌حی مشاهده شدند. نسبت کرک غیر ترش‌حی به ترش‌حی گونه *N.*
cataria حدود ۵ برابر بیشتر بود (شکل ۱ پایین سمت راست). در گونه *N. binaludensis* تراکم کرک غیرترش‌حی در حدود
۶۰ عدد در هر میلی‌متر مربع از سطح برگ مشاهده گردید.

تعداد کرک‌های غده‌ای موجود در سطح اپیدرم در بین گونه‌های خانواده نعنائیان به مقدار قابل توجهی تفاوت دارد. بعنوان
مثال برگ‌ها، ساقه‌ها و اندام‌های زایشی "گونه مرزنگوش"^۱ دارای هر دو نوع کرک‌های سپری و سرسان دارای ۴ تا ۱۰ سلول
تاجی می‌باشند (۳۳). در گونه‌های مورد مطالعه در این پژوهش کرک غده‌ای ترش‌حی از نوع "سرسان" مشاهده نشد، ولی
در مطالعات پیشین بر روی گونه‌های مختلف پونه‌سا کرک‌های غده‌ای از هر دو نوع سرسان و سپری در سایر اندام‌های گیاه
همچون کاسبرگ، گلبرگ و ساقه مشاهده شدند (۳، ۱۷، ۲۸)، احتمالاً این نوع کرک سرسان در سایر قسمت‌های گیاه به
تعداد بیشتر وجود داشته باشد و یا ممکن است در مراحل آماده‌سازی بافت چروکیده شده و قابل مشاهده نمی‌باشد. که نیاز به
مطالعات بیشتر در آینده دارد.

¹ *Origanum vulgare*



شکل ۱- تصاویر میکروسکوپ الکترونی و توزیع کرک های ترشچی غده ای و غیر ترشچی سطح برگ در گونه *N. binaludensis* و *N. cataria* کرک غده ای ترشچی چهار سلولی (نوک پیکان) و تک سلولی گونه *N. binaludensis* (بالا سمت چپ)، توزیع کرک غده ای ترشچی و غیر ترشچی (نوک پیکان) در گونه *N. cataria* (شکل پایین سمت راست)، کرک غده ای ترشچی سپری در گونه *N. cataria* (پایین سمت چپ). شاخص ها به ترتیب با بزرگنمایی یکسان: (بالا سمت راست) ۲۰۰ میکرومتر، (بالا سمت چپ) ۲۰ میکرومتر، (پایین سمت راست)، ۱۰۰ میکرومتر، (پایین سمت چپ) ۲۰ میکرومتر.

Fig.1: Glandular and non-glandular trichomes of *N. binaludensis* and *N. cataria* leaves surface by SEM micrograph. The peltate glandular trichomes four celled (arrow) of *N. binaludensis* and one celled (above left). Glandular and non-glandular (arrow head) trichomes of *N. binaludensis* (above right), Glandular and non-glandular (arrow head), trichomes of *N. cataria* (down right), the peltate glandular trichomes of *N. cataria* (down left). Scale bars: Figures, (above right) = 200 µm, (above left) = 20 µm, (down right) = 100 µm, (down left) = 20 µm.

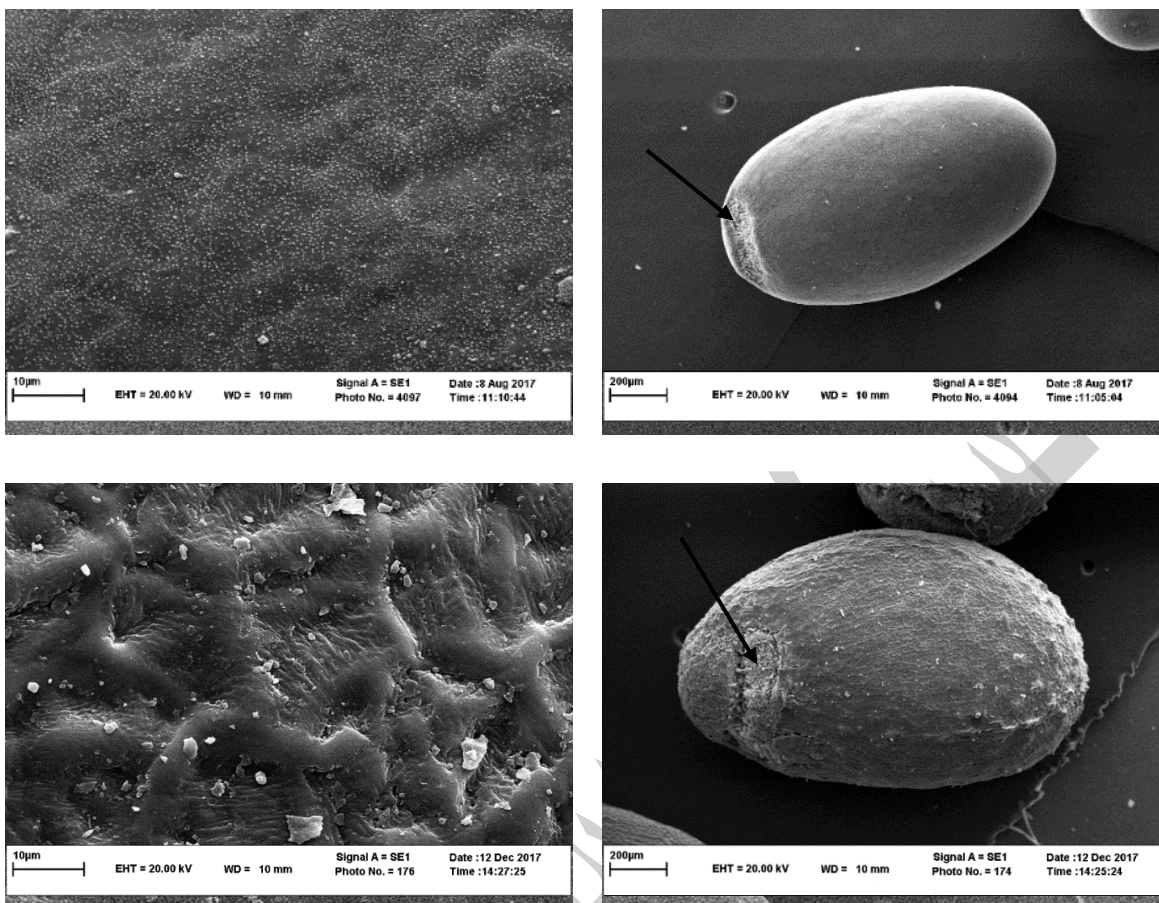
کرک های سپری از نظر اندازه و ساختار بسیار متنوع می باشند. کایا و همکاران (۱۷) با مطالعه بر روی میکرومورفولوژی کرک کاسبرگ، ساقه و برگ گونه *N. congesta* کرک های سپری متنوعی مشاهده نمودند که شامل سه گروه (۱) کرک های سرسان کوتاه (سر تک سلولی و پایه تک سلولی، سر تک سلولی و پایه دو سلولی، سر دو سلولی و پایه دو سلولی، ۲) کرک های سپری پایه کوتاه با ۴ سلول ترشچی و فضای زیرکوتیکولی بزرگ و کرک های غیر غده ای (تک سلولی و چند سلولی) گروه سوم کرک ها بودند. چنین نتایجی در سایر گونه های خانواده نعنائیان از جمله ریحان (*Ocimum basilicum*) و گونه مریم گلی (*Salvia blepharophylla*) نیز گزارش شده است (۳۳). کرک های غیر غده ای در همه بخش های گیاه پونه سا مشاهده می شود و کرک های چند سلولی بخصوص ۲ یا ۳ سلولی بسیار بیشتر از تک سلولی می باشند (۱۷). در این پژوهش نیز این نوع کرک ها به وضوح مشاهده شد (شکل ۱). بر اساس نتایج متکاف و همکاران (۲۰) کرک های غده ای سپری در سطح دور از محور اصلی برگ به تعداد بیشتری توزیع یافته اند و دارای سر ۴ سلولی می باشند، که این نوع کرک ها در گونه های پونه سا معمول می باشد و در این مطالعه نیز مشاهده گردید. بورت و همکاران نیز با مطالعه بر روی

۱ میکرومورفولوژی کرک در گونه *N. Racemosa* غدد سپری کوچک با سر دو سلولی مشاهده کردند (۳). در مطالعه حاضر
۲ تراکم کرک بین ۷ تا ۳۰ عدد در هر دو گونه مورد مطالعه متغیر بود. تراکم کرک ها بسته به مراحل رشد، نوع اندام و موقعیت
۳ بافت تفاوت دارد. تراکم کرک غده ای در مرزنگوش بین ۱۰ تا ۲۰ عدد در هر میلی متر مربع گزارش شد و نیز مشخص شده
۴ است که در گیاه مرزه (*Saturia thymbra*) کرک های سرسان در حدود ۶ درصد از سطح برگ را اشغال کردند (۳۳) بطوریکه
۵ مشاهده شده است که تراکم کرک های غده ای در گیاه نعناع فلفلی^۱ با افزایش فاصله از قاعده برگ کاهش می یابد (۱۹).
۶ همچنین مافی و همکاران (۱۹) با مطالعه بر روی برگ های در حال بزرگ شدن نعنا دریافتند که در جوانترین برگ ها تراکم
۷ کرک های سپری روی سطح فوقانی برگ بیشتر از سطح تحتانی می باشد. بنابراین نحوه نمونه برداری، سن و موقعیت اندام،
۸ نحوه آماده سازی و تصویر برداری بافت می تواند در مشاهدات کرک تاثیر بسیاری داشته باشد .
۹ کرک های شناسایی شده در پژوهش حاضر با مطالعات صورت گرفته بر روی سایر گونه های پونه سا از جمله
۱۰ گونه *N. sibthorpii*, *N. rasemosa*, *N. cataria* مطابقت دارد (۱۷، ۱۸، ۲۸). مطالعه بر روی کرک های آویشن باغی ()
۱۱ *Thymus vulgaris* نشان داد که تعداد کرک های سپری در مراحل اولیه رشد در دوران دولپه ای تعیین می شود. سایر
۱۲ گزارش ها نشان می دهند که میزان اسانس با تعداد غدد سپری موجود در برگ متناسب است (۳۴). همچنین مشخص شده
۱۳ است که غدد سپری در گونه های *N. cataria* و *N. cataria var. citriodora* از نظر آناتومیکی با داشتن لکوپلاست
۱۴ های متعدد غلاف دار با شبکه آندوپلاسمی صاف به عنوان محلی برای سنتز ترین ها باشند (۱۸). بنابراین تعداد کرک های غده
۱۵ ای ترشچی و همچنین تراکم آنها نسبت به کرک های غیر ترشچی بعنوان محل ذخیره و ترشح اسانس حائز اهمیت می باشد.
۱۶
۱۷

میکرومورفولوژی بذر

۱۸ فندقه دو گونه *N. binaludensis* و *N. cataria* با استفاده از SEM مورد بررسی قرار گرفت. الگوی سطح فندقه در هر دو
۱۹ گونه از نوع صاف بود. تزئینات فندقه در گونه *N. binaludensis* دارای الگوی صاف همراه با نقاط ریز بود (شکل ۲، بالاسمت
۲۰ راست)، درحالیکه در گونه *N. cataria* تزئینات سطح از نوع مشبک مشاهده شد (شکل ۲ پایین سمت راست). بذر گونه *N.*
۲۱ *binaludensis* قهوای رنگ و مستطیلی شکل بود. طول بذر در گونه *N. binaludensis* و *N. cataria* بترتیب از ۱/۴-۱/۲
۲۲ تا ۱/۹-۱/۴ میلی متر و عرض بذر از ۱/۵-۰/۷ تا ۰/۹-۰/۵ میلی متر متغیر بود. آرئول در هر دو گونه از نوع مستقیم مشاهده
۲۳ گردید. بطور خلاصه جزئیات و مشخصات مربوط به مشاهدات فندقه دو گونه مطالعه شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی
۲۴ (SEM) در جدول ۱ نشان داده شده است.
۲۵

¹ Peppermint (*Mentha × piperita*)



شکل ۲. مشاهدات فندقه، تزئینات سطح و شکل آرئول در دو گونه *Nepeta* با استفاده از SEM. شکل فندقه (بالا سمت راست) و آرئول (نوک پیکان) در گونه *N. binaludensis*، شکل فندقه (پایین سمت راست) و آرئول (نوک پیکان) در گونه *N. cataria* تزئینات سطح فندقه (شکل بالا سمت چپ) در گونه *N. binaludensis* و تزئینات سطح فندقه (پایین سمت چپ) در گونه *N. cataria* شاخص ها: (بالا و پایین سمت راست) ۲۰۰ میکرومتر، (بالا و پایین سمت چپ) ۱۰ میکرومتر.

Figs 2. Two *Nepeta* species nutlets and their surfaces ornamental and areol, by SEM. Nutlet shape (above right) and areol (arrow head) *N. binaludensis*, species, Nutlet shape (down right) and areol (arrow head) in *N. cataria* species and surface ornamental (above left) *N. binaludensis* species, surface ornamental (down left) *N. cataria* species. Scale bars: Figures, (above right and down right) = 200 μm, (above left and down left) = 10 μm.

۱
۲
۳
۴
۵
۶
۷
۸
۹
۱۰
۱۱
۱۲
۱۳ جزئیات فندقه ۳۹ تاکسا از جنس پونه سا در ترکیه توسط کایا و همکاران (۱۶) بررسی شد. سه گروه اصلی (سطح صاف،
۱۴ نسبتا صاف و برجسته) با زیرگروه های (مواج ، سلولی و مشبک) بر اساس تزئینات سطح شناسایی کردند نتایج آنها نشان داد
۱۵ که فندقه ها اکثرا از نوع صاف بودند و رنگ آنها از سیاه تا قهوه ای مایل به سیاه و قهوه ای روشن و تیره متغیر بود. شکل
۱۶ فندقه مستطیلی، نسبتا مستطیلی و گرد بودند. آرئول دو لبی و مستقیم بودند. طول فندقه ها بین ۳-۱ میلی متر و عرض آنها
۱۷ بین ۱/۵ - ۰/۵ میلی متر متفاوت بود. در سایر مطالعات، شکل بذور گونه های این جنس اغلب بصورت بیضی، دایره ای یا
۱۸ مستطیلی، آرئول دولبی یا مستقیم و تزئینات سطح فندقه صاف و برجسته گزارش شده است (۱۱،۱۲). در مطالعه
۱۹ میکرومورفولوژی گونه های پونه سا توسط کایا و همکاران (۱۶)، گونه *N. cataria* بر اساس تزئینات سطح در گروه صاف و

زیر گروه مواج قرار گرفت. فندقه این گونه نیز قبلا توسط موسکوار و همکاران (۲۳) بررسی شده بود و از نوع فندقه با سطح صاف گزارش شده است. جم زاد و همکاران (۱۴) نیز سطح فندقه گونه های پونه سا یکساله از ایران را بررسی کردند. بر طبق گزارش آنها گونه های پونه سا به دو بخش، فندقه های با سطح صاف و فندقه هایی با سطح برجسته و برآمده تقسیم می شوند. بعضی از گونه های پونه سا را می توان از طریق تزیینات سطح فندقه به آسانی از سایر گونه می توان تشخیص داد. ویژگی های فندقه بین گونه های پونه سا دارای اهمیت تاکسونومی می باشند. شکل و رنگ فندقه، شکل آرئول و تزیینات سطح فندقه در گونه های مختلف پونه سا متفاوت می باشد. گروه بندی بر اساس تزیینات سطح فندقه، می تواند در طبقه بندی گونه ها در جنس پیچیده *Nepeta* و همچنین تشخیص و تمایز گونه ها در آینده کمک کند.

جدول ۱- جزئیات فندقه در دو گونه پونه سا مورد مطالعه.

Table.1 Comparison of studied nutlets characters of two *Nepeta* species

گونه (Species)	شکل بذر (Seed shape)	اندازه (میلی متر) Size(mm) (length × width),	رنگ (Color)	آرئول (Areol form and location)	سطح فندقه (Nutlet surface)
<i>N. cataria</i>	بیضوی (Ovoid- rectangular)	1.4-1.9×0.5-0.9	(سیاه) Black	(مستقیم) Straight- subbasal	مشبک (Reticulate)
<i>N. binaludensis</i>	(مستطیلی) Oblong-liner	1.2-1.4×0.7-1.5	(قهوه ای) Brown	(مستقیم) Straight- basal	(صاف همراه با نقاط ریز) Smooth finely granulated

میزان و اجزای اسانس

نتایج حاصل از آنالیز واریانس نشان داد که بازده اسانس در دو گونه مطالعه شده در سطح ۱ درصد تفاوت معنی دار وجود نداشت (جدول ۲). بر اساس نتایج بدست آمده از استخراج اسانس دو گونه مورد مطالعه میانگین بازده اسانس برای گونه *N. binaludensis* به میزان ۰/۷ درصد (حجمی / وزنی) و برای گونه *N. cataria* به میزان ۰/۸ درصد حجمی بر اساس وزن خشک نمونه بدست آمد.

جدول ۲- تجزیه واریانس درصد اسانس دو گونه مطالعه شده *N. cataria* و *N. binaludensis*

Table 2. Analysis of variance for essential oils percent, two *Nepeta* species studied.

درصد اسانس		
Essential oils %		
منبع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
Sources of variation	DF	MS
بلوک	2	0.017
Block (R)		
گونه	1	0.004 ^{ns}

Species	
خطا	2
Error	0.047

۱ ns; عدم معنی داری

۲ ns: nonsignificant

۳ نتایج حاصل از آنالیز کمی و کیفی اسانس نشان داد که در اسانس *N. binaludensis* تعداد ۵۱ ترکیب شناسایی شد. از مجموع
 ۴ ۸۵/۶۹ درصد کل اجزای اسانس را ترکیبات، ۸،۱- سینئول با (۷۶/۱۴ درصد)، بتاپینن (۳۹/۱۰ درصد) و پاراسیمین (۷۱/۹
 ۵ درصد) اجزای اصلی اسانس را تشکیل می دهند. در گونه *N. cataria* تعداد ۲۶ ترکیب شناسایی شد. در این گونه ایزومر
 ۶ های نپتالاکتون با بیش از ۹۶ درصد از کل ترکیبات شناسایی شده اسانس این گونه، بعنوان اجزای غالب شناسایی شدند.
 ۷ بیشترین درصد نپتالاکتون مربوط به ایزومر II، (۴a-آلفا، ۷-آلفا، ۷ a-بتا- نپتالاکتون) با (۷۲/۷۷ درصد)، ایزومر I (۴a-
 ۸ آلفا، ۷-آلفا، ۷ a-آلفا- نپتالاکتون) (۱۷/۸۷ درصد) و سپس ایزومر III (۴ a - آلفا، ۷-بتا، ۷ a -آلفا- نپتالاکتون) به
 ۹ میزان (۲/۴۶ درصد) بود. مونوترپن ۸،۱- سینئول به مقدار جزئی ۰/۲ درصد در مقایسه با گونه *N. binaludensis* شناسایی
 ۱۰ شد. در اسانس گونه *N. binaludensis* ایزومر III (۴ a - آلفا، ۷-بتا، ۷ a -آلفا- نپتالاکتون) (۸/۰ درصد)، و ایزومر I
 ۱۱ (۴a-آلفا، ۷-آلفا، ۷ a-آلفا- نپتالاکتون) (۱۱۹/۱ درصد) نپتالاکتون شناسایی شدند. تعداد و ترکیبات شناسایی شده به همراه
 ۱۲ شاخص بازداری در جدول شماره ۳ آورده شده است.

۱۳ جدول ۳: ترکیبات اسانس دو گونه مورد مطالعه *N. binaludensis* and *N. cataria*

۱۴ Table3-The composition of the essential oil of *N. binaludensis* and *N. cataria* spciese

شماره NO.	شاخص بازداری (RI) Retention index	ترکیبات اسانس Compound	درصد ترکیبات %of Compound	شاخص بازداری (RI) Retention index	ترکیبات اسانس compound	درصد ترکیبات %of compound
		<i>N. binaludensis</i>			<i>N. cataria</i>	
1	923	Tricyclene	0/049	925	α -Thujene	0/042
2	926	α -Thujene	1/245	932	α -Pinene	0/266
3	933	α -Pinene	4/331	948	Camphene	0/009
4	948	Camphene	0/151	972	Sabinene	0/511
5	973	Sabinene	0/252	977	β -Pinene	2/225
6	977	β -Pinene	10/39	990	Myrcene	0/02
7	991	Myrcene	1/641	999	n-Octanal	0/023
8	1000	Unknown	6/239	1002	Unknown	0/045
9	1006	α Phellandrene	0/309	1024	p-Cymene	0/065
10	1016	α -Terpinene	2/652	1028	Limonene	0/062
11	1024	p-Cymene	9/71	1030	1,8-Cineole	0/228
12	1028	Limonene	2/214	1069	n-Octanol	0/048
13	1030	1,8-Cineole	14/76	1099	Linalool	0/025
14	1036	(Z)- β -Ocimene	0/904	1104	n-Nonanal	0/012

15	1046	(E)- β -cimene	0/166	1138	trans-Pinocarveol	0/024
16	1057	γ -Terpinene	4/478	1144	Camphor	0/013
17	1066	cis-Sabinene hydrate	0/287	1176	Terpinen-4-ol	0/068
18	1088	Terpinolene	1/279	1190	α -Terpineol	0/021
19	1099	Linalool	1/826	1196	Myrtenal	0/023
20	1104	Isopentyl 2-methyl butanoate	0/196	1360	4a- α ,7- α ,7a- α -Nepetalactone	17/865
21	1121	cis-p-Menth-2-en-1-ol	0/573	1388	4a- α ,7- α ,7a- β -Nepetalactone	72/766
22	1126	α -Campholenal	0/164	1393	4a- α ,7- β ,7a- α -Nepetalactone	2/468
23	1137	Nopinone	0/151	1419	(E)-Caryophyllene	0/733
24	1138	trans-p-Menth-2-en-1-ol	0/582	1452	α -Humulene	0/077
25	1144	cis-Verbenol	0/203	1457	(E)- β -Farnesene	0/408
26	1162	Pinocarpone	0/246	1581	Caryophyllene oxide	0/606
27	1166	δ -Terpineol	3/613	1607	Humulene epoxide II	0/038
28	1176	Terpinen-4-ol	4/199		Total	99/405
29	1184	p-Cymen-8-ol	0/326			
30	1190	α -Terpineol	6/966			
31	1196	Myrtenal	0/71			
32	1199	Unknown	3/459			
33	1207	trans-Piperitol	0/249			
34	1218	trans-Carveol	0/164			
35	1236	n-Hexyl2-methyl butanoate	0/225			
37	1290	Thymol	1/743			
38	1298	Carvacrol	0/58			
39	1359	4a- α ,7- α ,7a- α -Nepetalactone	1/199			
40	1374	α -Copaene	0/208			
41	1383	β -Bourbonene	1/016			
42	1391	4a- α ,7- β ,7a- α -Nepetalactone	0/853			
43	1399	Unknown	1/406			
44	1427	β -Copaene	0/085			
45	1475	γ -Muurolene	0/282			
46	1479	Germacrene D	0/183			
47	1485	(E)- β -Ionone	0/239			
48	1493	Valencene	0/127			
49	1510	(Z)- α -Bisabolene	0/271			
50	1522	δ -Cadinene	0/427			
51	1581	Caryophyllene oxide	0/117			
52	1599	n-Hexadecane	0/437			
53	1843	6,10,14-trimethyl-2-Pentadecanone	0/292			
54	1991	Manoyl oxide	1/388			
		Total	85/694			

- ۱
- ۲ در گزارشات قبلی، مقدار ایزومر نپتالاکتون III در گونه *N. cataria* به میزان ۱۱/۹ درصد گزارش شده است (۲۲). در نتایج
- ۳ حاصل از پژوهش حاضر میزان ایزومر نپتالاکتون II (۷۲/۷۷ درصد) در اسانس گونه *N. cataria* شناسایی شد. در گونه

۱ *N. binaludensis* نپتالاکتون II مشاهده نشد. بیشترین میزان نپتالاکتون II در گونه *N. meyeri* (۶۸ درصد) گزارش شده
 ۲ است (۵). حضور ترکیب نپتالاکتون I در گونه های *N. mahanensis*, *N. crassifoli*, *N. racemosa* نیز گزارش شده است
 ۳ (۱۵،۴). در مطالعه حاضر نیز نپتالاکتون I در گونه *N. cataria* (۱۷/۸۷ درصد) و در گونه *N. binaludensis* (۱/۱۹ درصد)
 ۴ شناسایی شد. صفایی قمی و همکاران (۵) با مطالعه روی ترکیبات اسانس گونه *N. cataria* حدود ۲۲ ترکیب شناسایی
 ۵ نمودند که ایزومر II، (۴a-آلفا، ۷-آلفا، ۷ a-بتا- نپتالاکتون) با (۷۰/۴ درصد) و ایزومر I (۴a-آلفا، ۷-آلفا، ۷ a-آلفا-
 ۶ نپتالاکتون) (۶ درصد) بعنوان ترکیبات اصلی اسانس گزارش نمودند در مطالعه حاضر جز غالب اسانس *N. binaludensis*
 ۷ مونوترپن ۸،۱- سینئول (۱۴/۷۶ درصد) شناسایی شد. سایر ترکیبات مانند، ۶- ترپینئول (۶/۹۶ درصد)، g- ترپینین (۴۷/
 ۸ درصد)، لیمونن (۲/۲۱)، ترپینین ۴- اول (۴/۱۹ درصد)، تیمول (۱/۷۴ درصد)، لینالول (۱/۸۱ درصد)، آلفا توجن (۱/۲۴ درصد)،
 ۹ لیمونن (۲/۲۱ درصد)، ترپینولن (۱/۲۷ درصد) در اسانس این گونه در حدود ۴۰ درصد از ترکیبات کل اسانس را تشکیل می
 ۱۰ دهند. بر اساس نتایج مطالعه نجفی و همکاران (۲۴) بر روی اسانس *N. binaludensis* ترکیب ۸،۱- سینئول با (۷۷ درصد)
 ۱۱ بعنوان ترکیب اصلی اسانس گزارش شد. همچنین در مطالعه دیگری مهمترین مواد موثره این گونه را نپتالاکتون (۰/۲۵ درصد
 ۱۲ و ۸،۱- سینئول (۴۲ درصد) گزارش کردند (۲۹).
 ۱۳ با مقایسه نتایج این پژوهش با گزارشات قبلی از گونه‌های مورد مطالعه می توان دریافت که تغییرات در میزان و اجزای اسانس
 ۱۴ از جمله صفاتی است که تحت کنترل عوامل محیطی و ژنتیکی می باشد. این عوامل شامل تغییرات محیطی، رویشگاهها و
 ۱۵ شرایط اکولوژیکی، وارته، تفاوت در روش استخراج، مرحله رشد گیاه روش های استخراج و آنالیز اسانس می باشد. در صورتی
 ۱۶ کلیه ژنوتیپ ها در یک محیط و در شرایط اقلیمی تقریباً یکسان کشت شوند (۲۶) اثرات محیط در بروز صفات رویشی، نوع
 ۱۷ و میزان مواد موثره کاهش یافته و تنوع حاصل از اختلافات ژنتیکی را بهتر نمایان می سازد. این تنوع راه را برای معرفی توده
 ۱۸ های مطلوب و مناسب از نظر صفات مورد نظر رویشی و ترکیبات مواد موثره هموار خواهد کرد (۲۰،۱۰).
 ۱۹ نتایج گزارش شده بر روی اسانس جنس پونه‌سا وجود چند شکلی‌های شیمیایی بین گونه‌ها را به وضوح نشان می دهد (۷).
 ۲۰ بطور کلی به نظر می‌رسد که سه کموتایپ اصلی در این جنس وجود دارد. اولین کموتایپ که شامل گونه‌های است که دارای
 ۲۱ ترکیبات دیاستروایزومریک نپتالاکتون می باشند. گروه دوم کموتایپ ۱،۸- سینئول و یا لینالول و گروه آخر کموتایپ‌های
 ۲۲ کاریوفیلین اکساید می باشد که بر اساس جز غالب آنها تقسیم بندی شده اند (۲۶، ۱).
 ۲۳ کموتایپ‌های مختلف تنها زمانی می تواند ممکن باشد که اگر اسانس تحت همان شرایط استخراج شده از یک اندام گیاه که
 ۲۴ در همان خاک رشد کرده باشد و تحت همان آب و هوا و در همان فصل برداشت می شود (۴). نتایج این گزارش و مطالعات
 ۲۵ قبلی بر روی این گونه‌ها بطور شفاف نشان می دهد که *N. binaludensis* در گروه ۲ (کموتایپ فاقد نپتالاکتون) و *N. cataria*
 ۲۶ در گروه ۱ (کموتایپ نپتالاکتون) قرار دارند. از آنجایی که کرک‌ها در سطح برگ و بخش‌های هوایی گیاه توزیع می شوند
 ۲۷ عملکردهای متفاوت داشته و در بخش‌های مختلف گیاه از نظر تراکم، شکل، اندازه و اندام متفاوت می باشند. بنابراین ساختار
 ۲۸ و مورفولوژی آنها می‌تواند دارای اهمیت تاکسونومی باشد. کرک‌های غده‌ای محل تجمع اسانس بوده و این ترکیبات ترشحي
 ۲۹ علاوه بر نقش محافظتی برای گیاه میتوان بصورت گسترده در صنایع دارویی و آرایشی و بهداشتی استفاده شوند.
 ۳۰
 ۳۱

منابع

1. Asgarpanah, J., Sarabian, S., and Ziarati, P. (2014). Essential oil of *Nepeta* genus (Lamiaceae) from Iran: a review. *Journal of Essential oil Research*, 26(1), 1-12.

- ۱ 2. Bernath, J. (2001, July). Strategies and recent achievements in selection of medicinal and
۲ aromatic plants. In International Conference on Medicinal and Aromatic Plants.
۳ Possibilities and Limitations of Medicinal and Aromatic Plant 576 (pp. 115-128).
- ۴ 3. Bourett, T. M., Howard, R. J., O'Keefe, D. P., and Hallahan, D. L. (1994). Gland
۵ development on leaf surfaces of *Nepeta racemosa*. International Journal of Plant Sciences,
۶ 155(6), 623-632.
- ۷ 4. Dabiri, M., and Sefidkon, F. (2003). Chemical composition of *Nepeta crassifolia* Boiss.
۸ And Buhse oil from Iran. Flavour and Fragrance Journal, 18(3), 225-227.
- ۹ 5. Esmaeili, A., Rustaiyan, A., Masoudi, S., and Nadji, K. (2006). Composition of the
۱۰ essential oils of *Mentha aquatica* L. and *Nepeta meyeri* Benth. From Iran. Journal of
۱۱ Essential Oil Research, 18(3), 263-265.
- ۱۲ 6. Fahn, A., 2000. Structure and function of secretory cells. In: Hallahon, D.L., Gray, J.C.
۱۳ (Eds.), Advances in Botanical Research. Incorporating Advances in Plant Pathology. Plant
۱۴ Trichomes, vol. 31. Academic Press, London, pp. 37-75.
- ۱۵ 7. Formisano, C., Rigano, D., and Senatore, F. (2011). Chemical constituents and biological
۱۶ activities of *Nepeta* species. Chemistry and Biodiversity, 8(10), 1783-1818.
- ۱۷ 8. Grubestic, R. J., Vladimir-Knezevic, S., Kremer, D., Kalodera, Z., and Vukovic, J. (2007).
۱۸ Trichome micromorphology in Teucrium (*Lamiaceae*) species growing in Croatia.
۱۹ Biologia, 62(2), 148-156.
- ۲۰ 9. Guedes, A. P., Franklin, G., and Fernandes-Ferreira, M. (2012). *Hypericum sp.*: essential
۲۱ oil composition and biological activities. Phytochemistry Reviews, 11(1), 127-152.
- ۲۲ 10. Hadi, N., Sefidkon, F., Shojaeiyan, A., Siler, B., Jafari, A. A., Anicic, N., and Misic, D.
۲۳ (2017). Phenolics' composition in four endemic *Nepeta* species from Iran cultivated under
۲۴ experimental field conditions: The possibility of the exploitation of *Nepeta* germplasm.
۲۵ Industrial crops and products, 95, 475-484.18.
- ۲۶ 11. Hassan, T., and DAR, G. H. (2012). Nutlet micromorphology in selected species of
۲۷ *Nepeta* L. (*Lamiaceae*) in Kashmir Himalaya.
- ۲۸ 12. Hedge, I. C., and Lamond, J. M. (1982). *Nepeta congesta* var. *congesta*. In Flora of Turkey
۲۹ and East Aegean Islands (Vol. 7, p. 178). University of Edinburgh Press Edinburgh.
- ۳۰ 13. Jamzad, Z., 2012. Flora of Iran, No.76: *Lamiaceae* Family. Agricultural Research,
۳۱ Education and Extension Organization, Research Institute of Forests and Rangelands,
۳۲ Tehran, pp. 801-880.22. (In Persian).
- ۳۳ 14. Jamzad, Z., Harley, M. M., Ingrouille, M., Simmonds, M. S. J., & Jalili, A. (2000). Pollen
۳۴ exine and nutlet surface morphology of the annual species of *Nepeta* L. (*Lamiaceae*) in
۳۵ Iran. Pollen and spores: morphology and biology. Kew: Royal Botanic Gardens, Kew, 385-
۳۶ 397.
- ۳۷ 15. Javidnia, K., Miri, R., Safavi, F., Azarpira, A., and Shafiee, A. (2002). Composition of the
۳۸ essential oil of *Nepeta persica* Boiss from Iran. Flavour and Fragrance Journal, 17(1), 20-
۳۹ 22.25.
- ۴۰ 16. Kaya, A., and Dirmenci, T. (2008). Nutlet surface micromorphology of the genus *Nepeta*
۴۱ L. (*Lamiaceae*) in Turkey. Turkish Journal of Botany, 32(2), 103-112.
- ۴۲ 17. Kaya, A., Demirci, B., Başer, K. H. C., and van Staden, J. (2003). Glandular trichomes and
۴۳ essential oils of *Salvia glutinosa* L. South African Journal of Botany, 69(3), 422-427.
- ۴۴ 18. Kolalite, M. R. (1998). Comparative analysis of ultrastructure of glandular trichomes in
۴۵ two *Nepeta cataria* chemotypes (*N. cataria* and *N. catena* var. *citriodora*). Nordic Journal
۴۶ of Botany, 18(5), 589-598.

- 1 19. Maffei, M., Chialva, F., and Sacco, T. (1989). Glandular trichomes and essential oils in
2 developing peppermint leaves. *New Phytologist*, 111(4), 707-716.
- 3 20. Metcalfe, C. R., and Chalk, L. (1950). Anatomy of the Dicotyledons. At The Clarendon
4 Press; vol. 2. Oxford University Press, London, pp. 1041–1051.
- 5 21. Mistic, D., Siler, B., Gasic, U., Avramov, S., Zivkovic, S., Nestorovic Zivkovic, J, and
6 Tesic, Z. (2015). Simultaneous UHPLC/DAD/ (+/-) HESI–MS/MS analysis of phenolic
7 acids and nepetalactones in methanol extracts of *Nepeta* species: a possible application in
8 chemotaxonomic studies. *Phytochemical Analysis*, 26(1), 72-85.
- 9 22. Morteza-Semnani, K. and Saeedi, M.,(2004). Essential oils composition of *Nepeta cataria*
10 L. and *Nepeta crassifolia* Boiss and Buhse from Iran. *Journal of Essential Oil Bearing*
11 *Plants*, 7(2): 120-124.
- 12 23. Mosquero MAM, Juan R, Pastor JE (2002). Morphological and anatomical studies on
13 nutlets of *Nepeta L. (Lamiaceae)* from South-West Spain *Acta Bot Malacitana* 27: 15-26.
- 14 24. Nadjafi, F., Koocheki, A., Honermeier, B. and Asili, J. (2009). Autecology, ethnomedicinal
15 and phytochemical studies of *Nepeta binaludensis* a highly endangered medicinal plant of
16 Iran. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 12(1), 97-110.
- 17 25. Navarro, T., and El Oualidi, J. (1999), December). Trichome morphology in *Teucrium*
18 (*Labiatae*). A taxonomic review. In *Anales del Jardín Botánico de Madrid* (Vol. 57, No. 2,
19 pp. 277-297).
- 20 26. Nemeth, E. Bernath, J., and Hethelyi, E. (2000). Chemotypes and their stability in *Achillea*
21 *crithmifolia* W. e t K. populations. *Journal of Essential Oil Research*, 12(1), 53-58.
- 22 27. Pojarkova AI (1954). *Nepeta L.* In: Shishkin B K (ed.), *Flora of the U.S.S.R.*, Vol. 20, and
23 pp. 191-293. Moskva-Leningrad: Academy Science of the U.S.S.R.
- 24 28. Rapisarda, A., Galati, E. M., Tzakou, O., Flores, M., and Miceli, N. (2001). *Nepeta*
25 *sibthorpii* *Benth* (*Lamiaceae*): Micromorphological analysis of leaves and flowers. *IL*
26 *Farmaco*, 56(5-7), 413-415.
- 27 29. Rustaiyan, A., and Nadji, K. (1999). Composition of the essential oils of *Nepeta isphahanica*
28 Boiss. and *Nepeta binaludensis* Jamzad from Iran. *Flavour and Fragrance Journal*, 14(1),
29 35-37.
- 30 30. Safaei-Ghomi, J., Djafari-Bidgoli, Z., and Batooli, H. (2009). Volatile constituent's
31 analysis of *Nepeta cataria* from central Iran. *Chemistry of Natural Compounds*, 45(6), 913-
32 915.
- 33 31. Siebert, D. J. (2004). Localization of salvinatorin A and related compounds in glandular
34 trichomes of the psychoactive sage, *Salvia divinorum*. *Annals of Botany*, 93(6), 763-771.
- 35 32. Vaya, J., Belinky, P. A., and Aviram, M. (1997). Antioxidant constituents from licorice
36 roots: isolation, structure elucidation and antioxidative capacity toward LDLoxidation.
37 *Free Radical Biology and Medicine*, 23, 302–313.
- 38 33. Werker, E. (1993). Function of essential oil-secreting glandular hairs in aromatic plans of
39 *Lamiacea*—a review. *Flavour and Fragrance Journal*, 8(5), 249-255.59.
- 40 34. Yamaura, T., Tanaka, S., and Tabata, M. (1989). Light-dependent formation of glandular
41 trichomes and monoterpenes in thyme seedlings. *Phytochemistry*, 28(3), 741-744.
- 42
- 43
- 44
- 45

The Study of Micromorphological and Essential oil Analysis of *Nepeta binaloudensis* and *Nepeta cataria* (Lamiaceae)

Introduction

The *Nepeta* is one of the largest genus of Nepetoide subfamily, in the Lamiaceae family with about 79 species in Iran. Most of the species are perennial rarely annual with different vegetative forms, leaves covered with trichome. Glandular trichomes are widely distributed all over the aerial part of *Nepeta* species, and their largely to its great importance and their structures can vary widely among plants species. Some species contain monoterpenes, sesquiterpenes, cyclopentanoid iridoids derivatives and nepetalactones which they are used in folk medicine as, diaphoretic, diuretic, antitussive, febrifuge agent. In the present work, scanning electron microscopy (SEM) was used to determine the nutlet micromorphology and also micromorphology and distribution of the glandular trichomes of *Nepeta binaloudensis* "an Iranian endemic species" and *Nepeta cataria* in order to improve the knowledge of the species and to evaluate the usefulness of this feature for phytochemical and systematic purpose. The chemical composition of its essential oil was also analyzed. This paper provides a detailed description of trichome morphology and nutlet in *Nepeta binaloudensis* and *Nepeta cataria* species growing in Iran, by scanning electron microscopy (SEM), and evaluates the systematic significance of such characteristics.

Materials and Methods

The research was conducted in research garden of Agricultural Faculty of Ferdowsi University of Mashhad during 2017. Seeds of two *Nepeta* species were provided by Institute of Plant Sciences in Ferdowsi University of Mashhad. The seeds were cultivation in greenhouse and the seedling (10 cm long) were transplanted in the field. During the summer aerial parts of the plants were harvested at flowering stage, dried in shade, and (30 g) were hydro distilled for 3 h using Clevenger apparatus. For SEM study, leaves were fixed with 3% glutaraldehyde in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.2 for 30 min at 4 °C. After washing in water the material was dehydrated through an ethanol gradient and critical point dried. Specimens were mounted onto SEM stubs using double-sided adhesive tape and coated with palladium. For nutlets observation, seed were directly mounted onto aluminum stubs using double-sided adhesive tape and coated with palladium and photographed.

Result

Based on the obtained data, the surface leaves of both species (*N. binaloudensis* and *N. cataria*) was observed for glandular and non-glandular trichomes distribution. (The glandular trichomes of the peltate types). Trichome density and size was variable as 7-21mm² leaf surface (63-77 μm) in *N. binaloudensis* and as 20-30 mm² leaf surface (47-67 μm) in *N. cataria*. In both species only one types of glandular trichome was identified. Peltate trichomes comprise of a basal cell situated in the leaf epiderm with a four-celled secretory head. Nutlets of *Nepeta* were blackish-brown or brown in color. One type surface ornamentation, can be distinguished: smooth-type.

The nutlet ornamental pattern was smooth type with finely granulated in *N. binaloudensis* and reticulate pattern in *N. cataria* species. Water-distilled essential oil of the aerial parts of two species cultivated in field, were analyzed by GC and GC/MS. In essential oil of *N. binaloudensis* and *N. cataria*, 51 and 26 components were identified, respectively. The main components of the essential oil of *N. binaloudensis* were 1.8-cineole (14.8%), β-Pinene (10.4%) and p-Cymene (9.8%). Main compounds of the essential oil of *N. cataria* were 4a-α, 7-α, 7a-β-Nepetalactone (72/76%) and 4a-α, 7-α, 7a-α-Nepetalactone (17.86%). Depending on the composition of key compound identified in essential oils, *Nepeta* species have been divided in two groups.

Conclusions

Depending on the composition of main compound identified in the essential oils, *Nepeta* species have been divided in two groups. On the basis of our research *N. binaloudensis* belong to 1.8-cineole chemotype and of *N. cataria* belong to the nepetalactone chemotype. The leaves of *N. binaloudensis*, *N. cataria* have be glandular and non-glandular trichomes. One types of glandular trichomes are identified: Peltate trichomes. Trichomes are distributed at the surface of leaves, having various functions and are extremely variable in the plants, plant organs location, density, form, therefore their morphology and structure could be of taxonomical importance in plant. Glandular trichomes contain or secrete substances which are widely used in pharmaceutical and cosmetic as well as in pesticide industry. The

١
٢
٣
٤

variation in the structure, morphology, density, secretion and function is noticed among these trichomes distributed on different plant organs. Nutlet surface can be useful as a taxonomic characteres.

Keywords: Essential oil; Glandular trichomes; Micromorphology; *Nepeta*; SEM

مؤسسه تخصصی زبان
موسسه تخصصی زبان