

آماده‌سازی بافت‌های گیاهان دارویی به منظور مطالعات میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

Preparation of medicinal plants tissue for scanning electron microscopy (SEM)

فاطمه زهرا امیرمحمدی^{*۱}

۱. دانش آموخته گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد. (نگارنده مسئول)

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۰/۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۴/۱۵

چکیده

امیرمحمدی، ف. ز. آماده‌سازی بافت‌های گیاهان دارویی به منظور مطالعات میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)
نشریه علمی ترویجی فناوری گیاهان دارویی ایران، دوره ۰۲- شماره ۰۲- پاییز و زمستان ۱۳۹۸: صفحه ۸۲-۷۰.

از آنجایی که کرک‌ها در گیاهان دارویی بعنوان محلی برای سنتز و ذخیره اسانس است. مطالعه مورفولوژی آنها علاوه بر اهمیت تاکسونومی بعلت کاربرد گسترده اسانس در صنایع داروسازی، آرایشی و بهداشتی دارای اهمیت است. کرک‌های ترشحي بطور گسترده‌ای در سراسر بخش‌های رویشی و زایشی گیاهان خانواده نعنائیان توزیع شده‌اند و ترشحات آنها عمدتاً باعث اهمیت آنها شده است. بنابراین در فرآیند آماده‌سازی بافت‌های بیولوژیکی (گیاهی) برای مطالعات میکروسکوپ الکترونی (SEM) شناسایی یک روش که اندازه و مورفولوژی کرک ترشحي را حفظ کند، می‌تواند بسیار مفید واقع شود. در این مطالعه دو روش آماده‌سازی کرک در برگ و کاسبرگ سه گونه گیاه دارویی از جنس "پونه‌سا" شامل: *Nepeta fissa*, *Nepeta assurgens*, *Nepeta eremophilla* مطالعه شد. قطعات برگ و کاسبرگ پس از شستشو با آب مقطر در محلول تثبیت‌کننده FAA شامل (فرمالدهید ۳/۷ درصد، اتانول ۵۰ درصد و اسیداستیک ۵ درصد) به مدت ۳ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از شستشو با بفرسفات سپس در سری‌های صعودی متانول (۳۰، ۵۰، ۷۰، ۹۵ و ۱۰۰ درصد) به مدت ۵ دقیقه در هر مرحله آگیری شده و به استاب مخصوص چسبانده شدند و پس از پوشش‌دهی با پالادیوم تصویربرداری با استفاده از میکروسکوپ SEM انجام شد. روش‌های استفاده شده بسته به گونه گیاهی و ضخامت بافت نتایج متفاوتی نشان دادند. بطور کلی متانول به عنوان روشی سریع و آسان جهت حفظ اندازه و چروکیدگی بافت‌های گیاهی بهتر است.

واژه‌های کلیدی: *Nepeta*، SEM، چروکیدگی، کرک.

* آدرس پست الکترونیکی نگارنده مسئول: fz_amirmohamadi@mail.um.ac.ir

مقدمه

یک مشکل شناخته شده در آماده سازی بافت های بیولوژیکی برای مطالعه با میکروسکوپ الکترونی روبشی (¹SEM)، چروکیدگی بافت ها در طول مراحل تثبیت کردن، آبیگری و نقطه بحرانی خشک شدن (²CLD) می باشد. در گذشته، آماده سازی اکثر بافت های گیاهی در مقایسه با بافت های حیوانی و بعضی از بافت های گیاهی برای مطالعه مورفولوژی سطح، با استفاده از روش های دشوار و هزینه بر انجام می شد. مطالعات متعدد نشان می دهند که بعد از تثبیت با گلو تار آلدهید و آبیگری با اتانول تا نقطه بحرانی خشک شدن، بافت های گیاهی و حیوانی تقریباً به اندازه ۷۵-۶۸ درصد از اندازه اصلی حجم، طول یا عرض خود منقبض و کوچکتر می شوند (Beckett et al., 1984; Talbot et al., 2013).

میزان تغییر کلی اندازه در اثر چروکیدگی در هر مرحله ی آماده سازی، بخصوص مرحله آبیگری و با نمونه های مختلف متفاوت است. روش های تهیه نمونه های بیولوژیک برای مطالعات در این سیستم بستگی به نوع بافت

گیاهی دارند. بسیاری از نمونه های بیولوژیک (خارج از بدن موجود زنده) به مرور زمان آب خود را از دست داده، چروکیده شده و دیگر به یک بافت زنده شباهت نخواهند داشت (Larsons et al., 1974). این مسئله باعث می شود که روش های متفاوتی برای آماده سازی نمونه ها اعمال شود.

بطور کلی چهار گام در آماده سازی نمونه ها شامل: تثبیت، آبیگری، خشک کردن تا نقطه بحرانی و پوشش دهی می باشند. هر چهار مرحله می توان برای کاربردهای خاص بطور قابل ملاحظه ای متفاوت باشد. آماده سازی مناسب نمونه برای حفظ یکپارچگی ساختار و کسب اطلاعات از ترکیبات سلولی مهم می باشد. آماده سازی ضعیف و نامناسب نمونه بدون شک سبب ایجاد خطا و ارائه نتایج اشتباه می شود (Boyde & Maconnachie, 1979).

اساساً، تثبیت و آبیگری باعث پایداری نمونه های نرم و مرطوب می شوند. در صورت عدم تثبیت و آبیگری، نمونه های بیولوژیک در دستگاه خلا تغییر شکل خواهند داد. بعد از استقرار بر قالب آلومینیومی نیاز به لایه پوشانی نمونه با یک لایه نازک فلزی برای رسانایی سطح نمونه می باشد. بدیهی است که برای هر

¹Scanning electron microscope

² Critical point dryer

نمونه ممکن است یک مرحله یا چند مرحله حذف شود، به طور مثال برای نمونه‌های خشک همچون بذر گیاهان نیازی به تثبیت و خشک‌کردن نیست و تنها مرحله پوشش‌دهی اعمال می‌شود (Read et al., 1983).

تثبیت و آگیری از بافت‌های گیاهی با متانول برای حفاظت بافت در مقایسه با روش‌های معمول گزارش شده است. این روش به منظور بررسی مورفولوژی بافت و آنالیز اندازه سول‌های اپیدرمی با استفاده از SEM و همچنین برای محافظت ریشه‌ها در تصویربرداری با میکروسکوپ نوری گزارش شده است (Prum et al., 2012; Melzer et al., 2010; Das et al., 2008).

با توجه به اینکه در فرآیند آماده‌سازی با استفاده از حلال آبی، حذف مرحله تثبیت ممکن است باعث محافظت بافت گیاهی شود (Boyde & Boyde, 1980)، شناسایی یک روش که اندازه و مورفولوژی بافت را برای بررسی با SEM حفظ کند مهم است. اگرچه مشخص شده است که روش تثبیت انجمادی (غوطه‌وری در نیتروژن مایع یا پروپان) برای حفاظت مورفولوژی بافت روش بهینه‌ای است (McCully et al., 2009)، اما این روش به

تجهیزات اختصاصی و گران قیمت نیاز دارد و تقریباً ۹ درصد افزایش حجم بافت را به دلیل تشکیل کریستال یخ در طی انجماد در بردارد. از دیگر معایب این روش این است که نمونه را پس از آماده‌سازی نمی‌توان برای تصویربرداری در آینده نگهداری کرد. در بافت‌های حیوانی روش خشک‌کردن انجمادی برای حفظ اندازه بافت، نسبت به روش CPD برتر است، اما برای بافت‌های گیاهی و قارچی در بهترین حالت، نتایجی به همان ترتیبی که تثبیت با گلو تارآلدئید و فرآیند CPD دارد را نشان می‌دهد که احتمالاً علت آن وجود رطوبت بیشتر در بافت‌های گیاهی نسبت به بافت‌های حیوانی است (Boyde & Maconnachie, 1979; Read et al., 1983). بافت‌های گیاهی برای مشاهدات میکروسکوپ الکترونی باید آگیری شوند.

اگر چه شماری از تکنیک‌های آماده‌سازی نمونه‌ها برای حفظ ساختار بافت‌های گیاهی در شکل اصلی آنها توسعه یافته است، اما هیچ کدام از این روش‌ها تضمین شده نمی‌باشند. گیاهان دارویی بعنوان یک منبع مهم از مواد موثره در صنایع غذایی، داروسازی، آرایشی و بهداشتی مورد استفاده قرار می‌گیرند. این مواد موثره در خانواده نعنائیان عمدتاً از نوع اسانس است و در

ساختارهای تخصص یافته‌ای به نام کرک سنتز و ذخیره می‌شوند. کرک‌های غده‌ای سپری بعنوان مخازن ترش‌هی ترکیبات فیتوشیمیایی تخصص یافته‌اند (Siebert, 2004).

کرک‌های غده‌ای ترش‌هی و غیرترش‌هی (محافظ) بر روی تمام بخش‌های گیاه وجود دارند و دارای تنوع گسترده‌ای از نظر شکل، اندازه و تراکم بین گونه‌های مختلف و حتی بین اندام‌های مختلف یک گیاه متفاوت است. حتی در یک برگ بیش از یک نوع کرک را می‌توان مشاهده نمود (Fahn, 2000). در سال‌های اخیر استفاده از میکروسکوپ الکترونی در مطالعات میکرومورفولوژی کرک خانواده نعنائیان Maffei et al., 1989; Grubescic et al., 2007; Kaya et al., 2008) و جنس "پونه‌سا" (Navarro&El, 1999; Mosquero et al., 2002; Yarmoohammadi et al., 2017) بعلت اهمیت این صفت در شناسایی انواع کرک‌های

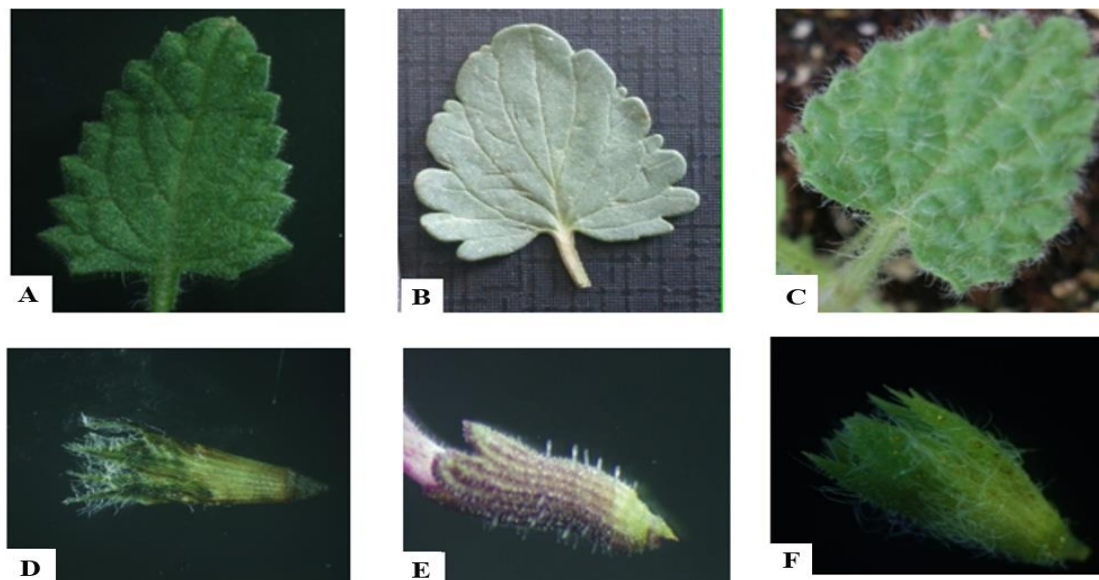
ذخیره‌کننده اسانس و تاکسونومی در تشخیص و تمایز گونه‌ها، از یکدیگر بسیار مورد توجه است.

این مطالعه با هدف شناسایی روش آماده‌سازی SEM برای بافت‌های گیاهان دارویی حاوی اسانس، بررسی ساختار کرک به شرط حفظ ابعاد طبیعی بافت انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

این مطالعه در سال ۱۳۹۶ در آزمایشگاه مرکزی دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد. برگ و کاسبرگ گونه‌های مختلف گیاه دارویی "پونه‌سا" (*Nepeta*) از خانواده نعنائیان، از گیاهان کشت‌شده در باغ تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه گردید. گونه‌های مورد مطالعه شامل *N. eremophilla*, *N. assurgens*, *N. fissa* بودند (شکل ۱).



شکل ۱- تصاویر برگ و کاسبرگ گونه‌های مورد مطالعه: (A و D) برگ و کاسبرگ گونه *N. assurgens*، (B و C) برگ و کاسبرگ گونه *N. fissa*، (E و F) برگ و کاسبرگ گونه *N. eremophilla*

جزئیات مراحل آماده‌سازی نمونه‌ها تا ۲- نمونه تثبیت شد، یعنی عوامل شیمیایی خاص تصویربرداری در SEM برای پایداری ساختار نمونه در آب استفاده شد.

جهت نمونه‌برداری از گیاه برای هر گونه ۳- آب نمونه گرفته شد. بخش‌های جوان، سالم و عاری از هر گونه آسیب و بیماری انتخاب شدند. نمونه بهتر است

در ابتدای روز بصورت تازه تهیه شود. قبل از تصویربرداری جهت انتخاب نمونه‌های مناسب

و آسیب ندیده با استرئومیکروسکوپ مطالعه و بررسی شدند. جهت گرفتن تصاویر میکروسکوپی کرک‌های

۱- نمونه‌ها به اندازه ۵ میلیمتر برش داده شدند، زیرا محلول‌های تثبیت‌کننده و خشک‌کننده به سرعت قادر به نفوذ در نمونه‌های ضخیم‌تر نیستند. سطح برگ، از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) مدل Philips Leo 1450VL واقع در آزمایشگاه مرکزی دانشگاه فردوسی مشهد استفاده شد.

روش‌های آماده‌سازی نمونه گیاهی

روش اول

این روش بر اساس روش آورده شده در منابع با اندکی تغییرات اعمال شد (Kaya et al., 2008). قطعات برگ و کاسبرگ گونه‌های مورد مطالعه در محلول گلوآلدهید ۳ درصد به مدت ۳ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از شستشو با آب مقطر با متانول آبگیری و در نهایت خشک شدند. نمونه‌ها پس از خشک‌شدن بر روی استاب‌های مخصوص SEM با استفاده از چسب‌های دو طرفه چسبانده شدند و سپس مرحله نهایی پوشش‌دهی با ذرات طلا-پالادیوم در خلا انجام شد.

روش دوم

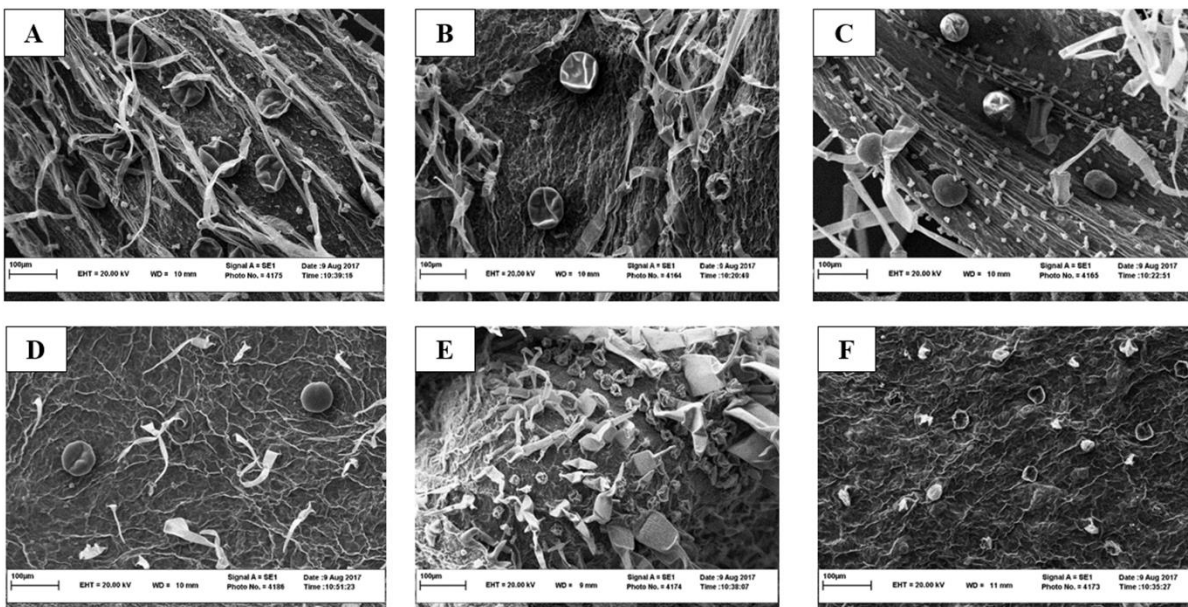
در این روش نمونه‌های گیاهی (برگ و کاسبرگ) در محلول تثبیت‌کننده FAA شامل (۳/۷ درصد حجمی/حجمی فرمالدهید، اتانول ۵۰٪ و استیک اسید ۰.۵٪) در دو مدت زمان متفاوت (۳۰ و ۶۰ دقیقه) غوطه‌ور شدند. سپس بافت‌ها ۳ بار و هر بار به مدت ۱۰ دقیقه در بافر فسفات سدیم ۲۵ میلی‌مولار، قبل از آبگیری شسته شدند و در سری‌های اتانول (۳۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۹۵ و ۱۰۰ درصد) به مدت ۱ دقیقه در هر

مرحله آبگیری شدند. سپس بافت‌ها روی کاغذ صافی قرار داده شدند تا در معرض هوا خشک شوند. پس از برش حاشیه آسیب دیده، نمونه‌ها در قطعات میلی‌متری بطور دقیق و بدون هیچ گونه آسیبی با استفاده از پنس بر روی استاب‌های مخصوص با چسب دوطرفه چسبانده شدند. سپس جهت آماده‌سازی نهایی با استفاده از ذرات پالادیوم-طلا پوشش‌دهی در خلا انجام و در نهایت تصویربرداری انجام شد.

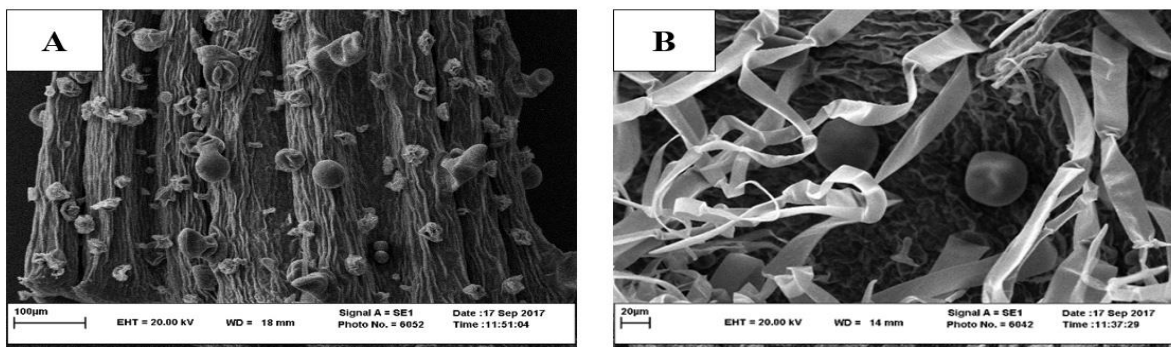
نتایج و بحث

در راستای معرفی روش بهینه، آماده‌سازی نمونه‌ها جهت مطالعات میکروسکوپ الکترونی، اثرات نوع بافت و گونه بر تعداد، اندازه کرک و میزان چروکیدگی بافت مورد بررسی قرار گرفت. اثرات سه روش متفاوت بر روی محافظت کرک‌های برگ و کاسبرگ ۳ گونه *Nepeta* با هم مقایسه شدند. نتایج حاصل از تصویربرداری بافت‌های گیاهی برگ و کاسبرگ در گونه‌های بررسی شده نشان داد که مدت زمان تثبیت و نوع بافت تاثیر مهمی بر میزان چروکیدگی بافت (شکل ۲ و ۳) اندازه و تعداد کرک دارد (جدول ۱). اگر بافت گیاهی بصورت تازه و قبل از خشک‌شدن تثبیت شود تغییرات کمتری حاصل می‌شود که در مطالعه حاضر

بافت گیاهی بصورت تازه مورد بررسی قرار گرفت. بسیاری از بافت‌های گیاهی خشک نشده به علت وجود کوتیکول در سطح بافت و نفوذ پذیری کم آب بر روی کوتیکول، می‌توانند با موفقیت در حالت تازه آبگیری شوند و مورد آزمایش قرار گیرند. همچنین نمونه‌های قابل نفوذ گلیسرولی و تازه، یک رسانایی الکتریکی داخلی کافی داشته و این نوع نمونه‌ها می‌توان بدون پوشش‌دهی مورد آزمایش قرار گیرند (Ensika et al, 2010).



شکل ۲- اثرات زمان تثبیت کردن و نوع بافت و گونه بر مورفولوژی کرک برگ و کاسبرگ در روش استفاده شده اول. A و B- کرک‌های غده‌ای ترش‌خ‌ی در کاسبرگ و برگ *N. assurgens* کرک غده‌ای ترش‌خ‌ی در حالت کاملاً پر و سالم، C و D- کرک‌های غده‌ای ترش‌خ‌ی در کاسبرگ و برگ گونه *N. eremophilla* کرک چروکیده غده‌ای ترش‌خ‌ی، (E, F) کرک‌های غده‌ای ترش‌خ‌ی در کاسبرگ و برگ در گونه *N. fissa*



شکل ۳- اثرات زمان تثبیت کردن و نوع بافت بر روی مورفولوژی کرک برگ و کاسبرگ در روش استفاده شده نوع ۲ در برگ و کاسبرگ. A- کرک‌های غده‌ای ترش‌خ‌ی در کاسبرگ در گونه *N. fissa* مدت زمان ۶۰ دقیقه، B- کرک‌های غده‌ای ترش‌خ‌ی در برگ گونه *N. eremophilla* مدت زمان ۳۰ دقیقه.

بسته به نوع بافت، روش تثبیت کردن و حتی نمونه گیاهی، تغییرات بافت و میزان چروکیدگی بسیار متفاوت می‌باشد. در این مطالعه برگ و کاسبرگ از سه گونه با دو روش متفاوت با هم مقایسه شد. هر چقدر ضخامت بافت کمتر باشد به همان نسبت سریعتر نسبت به مواد واکنش داده و میزان چروکیدگی بیشتری نشان می‌دهند. از طرفی اندام‌های ضخیم‌تر مانند کاسبرگ نسبت به از دست دادن آب مقاومت بیشتری داشته و میزان چروکیدگی کمتری نشان می‌دهند. تالبوت و وایت (۲۰۱۳) با بررسی روش‌های مختلف تثبیت بر روی برگ در سه گونه آراییدوپسیس، جو و کتان گزارش کردند که روش تثبیت کردن و نوع گونه در مورفولوژی و ابعاد بافت و میزان چروکیدگی تاثیر بسزایی دارد (Talbot & White, 2013).

عامل دیگری از چروکیدگی، فرآیند نقطه بحرانی خشک کردن و نگهداری پس از نقطه بحرانی خشک شدن می‌باشد که این می‌تواند بدلیل نگهداری و حفظ اتانول در بافت پس از خشک کردن باشد که سپس به آهستگی در طول ذخیره تبخیر می‌شود (Boyde & Maconnachie, 1979)

در مطالعه حاضر در روش اول نوع بافت و گونه گیاهی پاسخ‌های متفاوتی نشان دادند. در گونه *N. eremophilla* کرک‌های قابل مشاهده در بافت کاسبرگ کاملاً چروکیده و کرک‌های موجود در سطح برگ در حدود ۸۰ درصد چروکیدگی مشاهده شد. در گونه *N. assurgens* کمترین درصد چروکیدگی در بافت برگ و کاسبرگ (۳۲ درصد) مشاهده گردید. در گونه *N. fissa* بیشترین درصد چروکیدگی مشاهده گردید. در روش نوع ۲ با دو مدت زمان متفاوت بسته به نوع بافت و نوع گونه در مدت زمان کمتر درصد چروکیدگی کمتری در تعداد کرک مشاهده شد (جدول ۱).

به نظر می‌رسد در ساختار برگ، پوشش سطح اپیدرم، یا ترکیبات دیواره بین گونه‌ها متفاوت می‌باشد. گونه‌های جنس *Nepeta* برگ‌هایی با ساختار پستی-شکمی دارند و اپیدرم بالایی و پایینی تنها از یک لایه سلول تشکیل شده است. یاخته‌های پارانشیم نردبانی استوانه‌ای شکل و با فضای میان سلولی اندک هستند. در بررسی‌های انجام شده بر روی تشریح برگ گونه *N. fissa* ساختمان متفاوت تری نسبت به سایر گونه‌ها مشاهده شده است. تعداد کرک‌های پوششی کمتری نیز در سطح برگ آن وجود داشته است.

بنابراین نحوه آماده‌سازی بافت، نوع بافت، مدت زمان تثبیت، نوع مواد تثبیت‌کننده مورد استفاده، ضخامت پوشش‌دهی و نوع پوشش، مدت زمان خلا و نقطه بحرانی خشک شدن نیز تاثیرگذار می‌باشند. نحوه و نوع تاثیر هر کدام از این عوامل بر درصد سلامت بافت نیاز به مطالعات گسترده‌تر دارد و موضوع یک طرح پژوهشی است. همچنین نیاز به مطالعه ساختارهای بافت مورد نظر است (Acer et al., 2013). تفاوت در پاسخ بافت‌های متفاوت ممکن است ناشی از تفاوت‌های ساختاری برگ، پوشش سطح اپیدرم، واکس یا موم و یا ترکیبات دیواره بین گونه‌ها باشد. بعلاوه تغییرات بافت در طول آماده‌سازی نمونه‌ها در بخش‌های مختلف بافت متفاوت است (Beckett et al., 1984).

از میان روش‌های گزارش شده در منابع مشخص شده است که روش متانول تاثیر کمی یا بدون تاثیر بر روی ابعاد بافت می‌باشد، در حالی که فرمالدئید - استیک اسید الکل (FAA) یا گلو تار آلدئید سبب چروکیدگی و انقباض بافت می‌شوند. با این حال، اثر زمان تثبیت و نگهداری در گلو تار آلدئید بر ابعاد بافت و میزان چروکیدگی در نقطه بحرانی خشک شدن برای SEM مورد بررسی قرار نگرفته است، با توجه

به اینکه اندازه سلول و بخصوص اندازه کرک در سلول‌های گیاهی کرک‌دار برای آنالیز کمی نتایج بسیار مهم است (Edelmann, 1995).
تالبوت و وایت (۲۰۱۳)، با بررسی تاثیر روش‌های مختلف آماده‌سازی بر سه گونه گیاهی آراییدوپسیس، جو و پنبه گزارش کردند که در گیاه جو درصد چروکیدگی کمتری مشاهده شد، از آنجا سلول‌های اپیدرمی جو بصورت ردیفی مرتب شده‌اند. این بافت‌ها ممکن است مقاوم به چروکیدگی باشند. در حالی که چنین سازمانی در سلول‌های برگ پنبه یا آراییدوپسیس وجود نداشت. بر اساس گزارش آنها روش آماده‌سازی استفاده از تثبیت کننده به مدت زمان (۱ ساعت) و آبیگری با متانول و سپس مرحله آبیگری با اتانول وجود ۸ درصد چروکیدگی در هر ۳ گونه مورد مطالعه بهترین روش برای حفظ مورفولوژی توسط این محققین گزارش گردید (Talbot & White, 2013). روش‌های آماده‌سازی متفاوتی برای نمونه‌های گیاهی وجود دارد که با استفاده از آنها می‌توان بر مشکلات ناشی از ویژگی‌های بافت‌های گیاهی غلبه کرد.

یافته‌های ترویجی

سلولی دخیل در تولید اسانس و نقش دقیق هر یک از آنها از دیگر یافته‌های ترویجی مطالعه حاضر است و می‌توان موضوع پژوهش‌های بعدی در این زمینه باشد.

در مطالعه حاضر برخی روش‌های آماده‌سازی نمونه گیاهی برای SEM بررسی شده است. انتخاب یک تکنیک مناسب برای یک نمونه گیاهی خاص به ویژگی‌های مانند: ساختار اندام و بافت مورد بررسی، در دسترس بودن تجهیزات آماده‌سازی و قابلیت‌های تکنیکی میکروسکوپ الکترونی وابسته است. همچنین نتیجه‌گیری می‌شود این تفاوت‌ها ممکن است ناشی از تفاوت‌های ساختاری برگ، پوشش سطح اپیدرم، واکس، موم و یا ترکیبات دیواره بین گونه‌ها باشد. بعلاوه تغییرات نمونه‌ها در طول آماده‌سازی نمونه‌ها متفاوت می باشد. بیشتر روش‌ها را می‌توان با تجهیزات ساده و کم هزینه تولیدات داخلی انجام داد. یافته‌های این مطالعه مقدماتی برای تشویق و تامل سایر محققان و کاربران SEM، به منظور تحقیق در روش‌های استاندارد خود و یافتن گزینه‌های بهتر برای اهداف خاص قابل ترویج است. همچنین بررسی ساختار تشریحی انواع کرک‌های غده ای در گیاهان اسانس‌دار و تدوین یک نظام تاکسونومیک بر اساس ویژگی‌های ساختاری کرک آنها و استفاده از این تصاویر برای ردیابی مسیرهای بیوستتزی اسانس، تعیین اندامک‌های

جدول ۱- تعداد، اندازه و درصد چروکیدگی کرک در گونه‌های مورد مطالعه.

روش استفاده شده/ مدت زمان	گونه																		
	N. eremophilla						N. assurgens						N. fissa						
	اندازه کرک (میکرومتر)		تعداد کرک (میلی متر مربع سطح برگ)				اندازه کرک (میکرومتر)		تعداد کرک (میلی متر مربع سطح برگ)				اندازه کرک (میکرومتر)		تعداد کرک (میلی متر مربع سطح برگ)				
روش اول	کاسبرگی	بگی	کاسبرگی		بگی		کاسبرگی	بگی	کاسبرگی		بگی		کاسبرگی	بگی	کاسبرگی		بگی		
	۷۰	۷۹	۲۵		۷		۶۳	۷۰	۱۵		۵		۲۶	۳۴	۱۱۳		۴۴		
	-	-	سالم	هشده	۱۰۰٪	۰			سالم	هشده	۶۶٪	۳۳٪	۱۰۰٪	۰			سالم	هشده	۱۰۰٪
روش دوم / ۳۰ دقیقه	-	۴۹	-		۲۹		-	-	-		-		-	-	-		-		
					سالم	هشده													
					۶۹٪	۳۱٪													
روش دوم / ۶۰ دقیقه	-	-	-		-		-	-	-		-		۷۵	-	۱۲۶		-		
															سالم	هشده			
															۲۰٪	۸۰٪			

Reference

- Acar, M., Ozcan, T., Satil, F., and Dirmenci, T., 2011. A comparative anatomical study on two endemic *Nepeta* L. species (*N. baytolii* and *N. sorgerae*). *Biological Diversity and Conservation*, 4(3): 58-70.
- Beckett, A.N.D.R., Read, N.D., and Lorter, R., 1984. Variations in fungal spore dimensions in relation to preparatory techniques for light microscopy and scanning electron microscopy. *Journal of Microscopy*, 136 (1): 87-95.
- Boyde, A., and Boyde, S., 1980. Further studies of specimen volume changes during processing for SEM: including some plant tissue. *Scanning Electron Microscopy*, 2: 117-24.
- Boyde, A., and Maconnachie, E., 1979. Volume changes during preparation of mouse embryonic tissue for scanning electron microscopy. *Scanning*, 2(3): 149-163.
- Das, K., and Baruah, K.K., Methane., 2008. Emission associated with anatomical and morphophysiological characteristics of rice (*Oryza sativa*) plant. *Physiologia Plantarum*, 134(2): 303-312.
- Edelmann, H.G., 1995. Characterization of hydration-dependent wall-extensible properties of rye coleoptiles: evidence for auxin-induced changes of hydrogen bonding. *Journal of Plant Physiology*, 145(4): 491-497.
- Ensikat, H.J., Ditsche-Kuru, L., and Barthlott, W., 2010. Scanning electron microscopy of plant surfaces: simple but sophisticated methods for preparation and examination. *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education*, 1(13):248-255.
- Fahn, A., 2000. Structure and function of secretory cells. In: Hallahan, D.L., Gray, J.C. (Eds.), *Advances in Botanical Research. Incorporating Advances in Plant Pathology. Plant Trichomes*, Academic Press, London. 66 p.
- Grubisic, R.J., Vladimir-Knezevic, S., Kremer, D., Kalodera, Z., and Vukovic, J., 2007. Trichome micromorphology in *Teucrium* (Lamiaceae) species growing in Croatia. *Biologia*, 62(2): 148-156.
- Hedge, I.C., and Lamond, J.M., 1982. *Nepeta congesta* var. *congesta*. In *Flora of Turkey and East Aegean Islands*. University of Edinburgh, Press Edinburgh, 178lp.
- Kaya, A., Demirci, B., and Baser, K., 2007. Micromorphology of glandular trichomes of *Nepeta congesta* Fisch. & Mey. var. *congesta* (Lamiaceae) and chemical analysis of the essential oils. *South African Journal of Botany*, 73(1): 29-34.
- Maffei, M., Chialva, F., and Sacco, T., 1989. Glandular trichomes and essential oils in developing Peppermint leaves. *New Phytologist*, 111(4): 707-716.
- Mc Cully, M.E., Canny, M.J., and Huang, C.X., 2009. Cryo-scanning electron microscopy (CSEM) in the advancement of functional plant biology. *Morphological and anatomical applications. Functional Plant Biology*, 36(2): 97-124.
- Melzer, B., Steinbrecher, T., Seidel, R., Kraft, O., Schwaiger, R., and Sleck, T., 2010. The attachment strategy of English ivy: a complex mechanism acting on several hierarchical levels. *Journal of the Royal Society Interface*, 7(50): 1383-1389.

- Mosquero, M., Juan, R., Lastor, J.E., 2002. Morphological and anatomical studies on nutlets of *Nepeta* L. (Lamiaceae) from South-West Spain. *Acta Botanica Malacitana*, 27: 15-26.
- Navarro, T., and El Oualidi, J., 1999. Trichome morphology in *Teucrium* (Labiatae). A taxonomic review. In *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, 57(2): 277-297.
- Larsons, E., Bole, B., Hall, D.J., Thomas, D.E., 1974. A comparative survey of techniques for preparing plant surfaces for the scanning electron microscope. *Journal of Microscopy*, 101(1): 59-75.
- Prum, B., Seidel, R., Florian, H., Sleck, T., 2012. Impact of cell shape in hierarchically structured plant surfaces on the attachment of male Colorado potato beetles (*Leptinotarsa decemlineata*). *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 3(1): 57-64.
- Read, N.D., Lorter, R., Beckett, A., 1983. A comparison of preparative techniques for the examination of the external morphology of fungal material with the scanning electron microscope. *Canadian Journal of Botany*, 61: 2059-2078.
- Rodrigues, L., Lóvoa, O., Teixeira, G., Figueiredo, A.C., Moldão, M., and Monteiro, A., 2013. Trichomes micromorphology and essential oil variation at different developmental stages of cultivated and wild growing *Mentha pulegium* L populations from Portugal. *Industrial Crops and Products*, 43: 692-700.
- Siebert, D.J., 2004. Localization of salvinorin A and related compounds in glandular trichomes of the Psychoactive sage, *Salvia divinorum*. *Annals of Botany*, 93(6): 763-771.
- Talbot, M.J., and White, R.G., 2013. Methanol fixation of plant tissue for scanning electron microscopy improves preservation of tissue morphology and dimensions. *Plant Methods*, 9(1): 36-42.
- Yarmooohammadi, M., Talebi, S.M., Nohooji, M.G., 2017. Intraspecific variations in essential oil and glandular trichomes in *Nepeta heliotroliifolia*. *Biodiversitas*, 18(3): 964-970.

Preparation of medicinal plants tissue for scanning electron microscopy (SEM)

F. Z. Amirmohammadi^{1*}

1. Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashad, Iran (Corresponding author)

Received: July 2019

Accepted: December 2019

Abstract

Amirmohammadi, F. Z. Preparation of medicinal plants tissue for scanning electron microscopy (SEM)

Iranian Medicinal Plants Technology. Vol 02, No. 02, 2020. Page 06 :70-82(in Persian).

Since the glandular trichome in the medicinal plants is the location for storage and synthesis of essential oils, glandular trichomes are widely distributed all of the plant organs of the Lamiaceae, their secretions contribute largely to its great importance. They are the primary secretory organs of these plants, and their structures can vary widely among species. Therefore, their morphology could be, addition of taxonomical importance, to have essential oils which are widely used in pharmaceutical and cosmetic industry. Therefore, identification of a protocol that would preserve tissue size and morphology by usual methods can be useful. In this study compared two of the method by quantifying changes in size and trichome shrinkage percent at two different organs (leaf and calyx) in three *Nepeta* species studied: *Nepeta. fissa*, *Nepeta. assurgens* and *Nepeta. eremophilla*. Plant materials washed in distilled water, then immersed in FAA fixative (3.7% v/v formaldehyde, 50% ethanol, 5% acetic acid) and was then fixed (approximately 3 h) at 4°C. Tissue was rinsed three times in sodium phosphate buffer before dehydrating in a methanol series (30%, 50%, 70%, 95%, and 100%), 5 min each step. Specimens were mounted onto SEM stubs and coated with paladium. The method used depend on the type of plant species and different organs, in this study shows that generally the fixation and dehydration with methanol is a quick and simple method for preservation the size and shrinking of plant the tissues.

Keywords: *Nepeta*, SEM, Shrinking, Trichome.