

## تمایز یابی کیسه‌های ترش‌هی اسانس و رابطه آن با تکوین گل و میوه لیموترش (*Citrus limon* (L.) Burm.f.)

مریم رفیعی<sup>۱\*</sup> و هما رجایی<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ارسنجان، ارسنجان، ایران

<sup>۲</sup> بخش زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

### چکیده

کیسه‌های ترش‌هی اسانس در همه گونه‌های جنس *Citrus* از تیره مرکبات (Rutaceae) گزارش شده‌اند. در پژوهش حاضر، به ساختار و تکوین کیسه‌های ترش‌هی اسانس، در گل و میوه در حال نمو لیموترش (*Citrus limon* (L.) Burm.f.) پرداخته شده است. نمونه‌های جمع‌آوری شده در ۶ مرحله نمو با استفاده از تکنیک متداول میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) آماده‌سازی و در میکروسکوپ نوری بررسی شدند. غده‌های روغنی کاسبرگ، گلبرگ و تخمدان در زمان‌های متفاوتی ظاهر شدند، اما ویژگی‌های تشریحی یکسانی را نشان دادند. بنیان‌گذاری کیسه‌های ترش‌هی تا اولین مرحله نمو میوه ادامه داشت، اما پس از آن دیگر کیسه جدیدی تشکیل نشد و کیسه‌های موجود تنها افزایش اندازه نشان دادند. الگوی تکوین غده‌های روغنی گل و پوست میوه مشابه بود و بر اساس اختلافات سلولی و درجه تمایز کیسه‌های ترش‌هی، به ۴ مرحله تفکیک شد. تمایز یابی غده‌های روغنی از تقسیمات سلول‌های اپیدرمی و زیر اپیدرمی آغاز و به تشکیل یک حفره مرکزی وسیع در وسط کیسه‌ها منتهی شد. سلول‌های احاطه کننده حفره مرکزی، با ساختار و نقش متفاوت، از یکدیگر تفکیک شدند. دو پدیده جدا شدن دیواره‌ها و تجزیه سلولی با یکدیگر همپوشانی داشته، تکوین کیسه‌های ترش‌هی در لیموترش از نوع شیزولیزین است.

**واژه‌های کلیدی:** اسانس، تکوین، ساختار، غده روغنی، لیموترش

### مقدمه

جنس *Citrus* کیسه‌های ترش‌هی معمولاً غده روغنی نامیده می‌شوند و ساقه، مزوفیل برگ، اندام‌های گل (به جز پرچم‌ها) و برون بر میوه محل سنتز و تجمع اسانس هستند (Mauseth, 1988).

کیسه‌های ترش‌هی به طور طبیعی در تمام گونه‌های تیره مرکبات (Rutaceae) تشکیل می‌شوند و مهمترین صفت تشریحی این تیره هستند (Fahn, 1988). در

مطالعه رابطه بین تکوین اندام‌های زایشی و نمو غده‌های روغنی در لیموترش (*Citrus limon* (L.) Burm.f.) انجام شده است.

### مواد و روش‌ها

برای مطالعات ساختاری کیسه‌های ترش‌چی اسانس، نمونه‌های گل و پوست میوه لیموترش در ۶ مرحله نمودی (۲۰ نمونه به ازای هر مرحله فنولوژیک)، شامل غنچه کوچک سبز رنگ (مرحله ۱)، غنچه کروی با گلبرگ‌های سفید (مرحله ۲)، گل باز شده قبل از لقاح (مرحله ۳)، میوه سبز رنگ تازه تشکیل شده (مرحله ۴)، میوه در مرحله تغییر رنگ (مرحله ۵) و میوه رسیده (مرحله ۶) از شهرستان خضر استان فارس جمع‌آوری شده و در قطعات ۱×۱×۱ میلی‌متری، پس از تثبیت مضاعف به وسیله گلو تار آلدئید ۵ درصد و تتراکسید اسمیوم ۱ درصد در بافر فسفات ۰/۱ مولار، در سری‌های مختلف استون آبگیری شدند. نفوذپذیری و قالب‌گیری در رزین (Epon-Araldite) انجام شده، سپس برش‌های عرضی به ضخامت ۱-۰/۵ میکرون توسط تیغ شیشه‌ای اولترامیکروتوم LKB تهیه گردیدند. برش‌های آماده شده، با دو روش (۱) آبی تولوئیدین ۱ درصد و (۲) آبی متیلن-آزور ب-فوشین بازی رنگ آمیزی شدند (Roland, 1978; Ruzin, 1999). برای مشاهده و عکس‌برداری نمونه‌ها از میکروسکوپ نوری مدل Zeiss مجهز به سیستم عکس‌برداری آنالوگ Photoautomat استفاده شد.

### نتایج

#### تکوین غده‌های روغنی

بررسی‌های میکروسکوپی پژوهش حاضر از کوچک‌ترین اندازه غنچه آغاز شده، تا میوه کاملاً رسیده ادامه یافت. در این پژوهش، برش‌ها به دو روش

در رابطه با چگونگی تکوین کیسه‌های ترش‌چی اسانس در گونه‌های مختلف جنس *Citrus* اختلاف نظر وجود دارد. کتاب‌های معتبر آناتومی تشکیل حفره مرکزی کیسه را ناشی از شکستن و خرد شدن سلول‌ها (Lysigeny) می‌دانند (Esau, 1977; Fahn, 1990). در عین حال، تشکیل فضای حاصل از جدا شدن سلول‌ها (Schizogeny) در هنگام تقسیم سلولی (Turner et al., 1988; Knight et al., 2001) و یا ترکیبی از هر دو پدیده (Schizolysigeny)، که ابتدا فضا به وسیله جدا شدن سلول‌ها تشکیل و سپس بر اثر خرد شدن سلول‌های حفره عریض می‌شود، در تمایز یابی غده‌های روغنی برگ و میوه انواع مرکبات گزارش شده‌اند (Buvat, 1989; Bennici and Tani, 2004; Rafiei and Rajaei, 2007; Liang et al., 2009). مسأله لیزیزن و یا شیزولیزیزن بودن کیسه ترش‌چی اسانس از اهمیت خاصی برخوردار است زیرا اتولیز سلول‌های غده روغنی و آزادسازی ترشحات در فضای بین سلولی می‌تواند مثالی از پدیده مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی باشد.

گیاه لیموترش در طول سال گل‌دهی مکرر داشته، بدین لحاظ اهمیت اقتصادی ویژه‌ای دارد (McGregore, 1976). از طرفی، اسانس لیموترش هم به لحاظ طعم و هم رایحه، کاربرد بیشتری نسبت به اسانس‌های سایر مرکبات دارد (Lawless, 1995). مطالعات ساختاری کیسه‌های ترش‌چی در لیموترش محدود به پوست میوه رسیده (Bennici and Tani, 2004) و برگ آن (Turner et al., 1998) می‌گردد و تاکنون گزارشی مبنی بر تکوین غده‌های روغنی در طی فاز زایشی، از زمان تشکیل گل تا بلوغ میوه در گونه مورد نظر ارائه نشده است. پژوهش حاضر با هدف بررسی الگوی تمایز یابی کیسه‌های ترش‌چی اسانس و

احاطه می کردند، تشکیل شد (مرحله ۴- شکل ۵). از مرکز کیسه به طرف خارج، سلول‌های کناری (Bordering cells) دیواره سلولی ضخیم‌تر، پروتوپلاسم رقیق‌تر و میزان رنگ‌پذیری کمتری داشتند (شکل ۶).

#### رابطه بین تکوین کیسه ترش‌هی و نمو اندام‌ها

غده‌های روغنی در کاسبرگ لیموترش خیلی زود تشکیل می‌شوند، به طوری که در کوچک‌ترین اندازه غنچه نیز کیسه‌های بالغ در کاسبرگ مشاهده شدند. این کیسه‌ها در قسمت پارانشیم زمینه‌ای کاسبرگ واقع شده، به اپیدرم خارجی آن متصل بودند (شکل ۷).

تشکیل کیسه‌های ترش‌هی گلبرگ نیز، نظیر کاسبرگ، از اولین مرحله نمو گل صورت گرفت (شکل ۷). این کیسه‌ها اغلب بدون پایه بودند که در پارانشیم زمینه‌ای گلبرگ و در سطوح متفاوتی نسبت به اپیدرم خارجی آن متصل بودند. تمایزیابی و بلوغ کیسه‌های ترش‌هی همگام با تکوین گلبرگ انجام شد (شکل ۸)، اما به طور همزمان تعدادی کیسه در حال تشکیل نیز مشاهده شد.

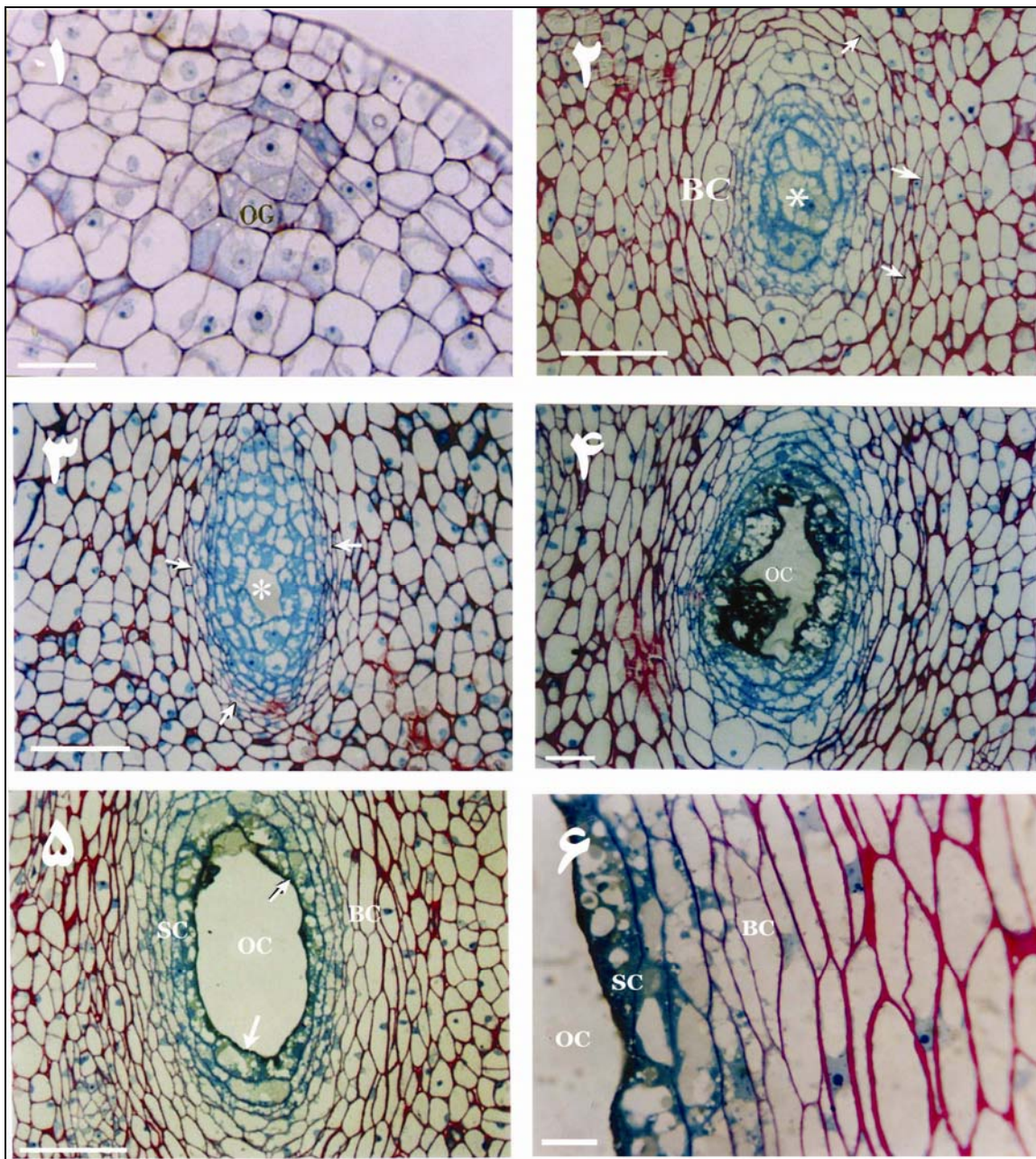
تشکیل کیسه‌های ترش‌هی تخمدان لیموترش، نسبت به کاسبرگ و گلبرگ، دیرتر آغاز شد. این کیسه‌ها از دومین مرحله نمو گل (غنچه‌کروی با گلبرگ‌های سفید رنگ) در دیواره تخمدان بنیان‌گذاری شدند (شکل ۱). غده‌های روغنی تخمدان در نزدیکی اپیدرم بیرونی، و به تعداد بیشتری نسبت به کاسبرگ و گلبرگ شکل گرفتند. اغلب این غده‌ها بدون پایه (بدون اتصال به اپیدرم) و تعداد کمتری از آن‌ها پایه‌دار بودند. در طی تکوین تخمدان بر تعداد کیسه‌های ترش‌هی بالغ (در مرحله ۴ نمو) افزوده شد، اما همزمان تعدادی کیسه نیز در مراحل قبلی نمودی مشاهده شدند.

رنگ آمیزی شدند که روش رنگ آمیزی با آبی متیلن - آزور ب - فوشین بازی در مقایسه با آبی تولوئیدین، با تفکیک رنگ، مطالعه کیسه‌های ترش‌هی و تکوین آنها را آسان‌تر می‌نمود. طی این بررسی، کیسه‌های ترش‌هی کاسبرگ، گلبرگ و تخمدان لیموترش الگوی تکوینی مشابهی را نشان دادند.

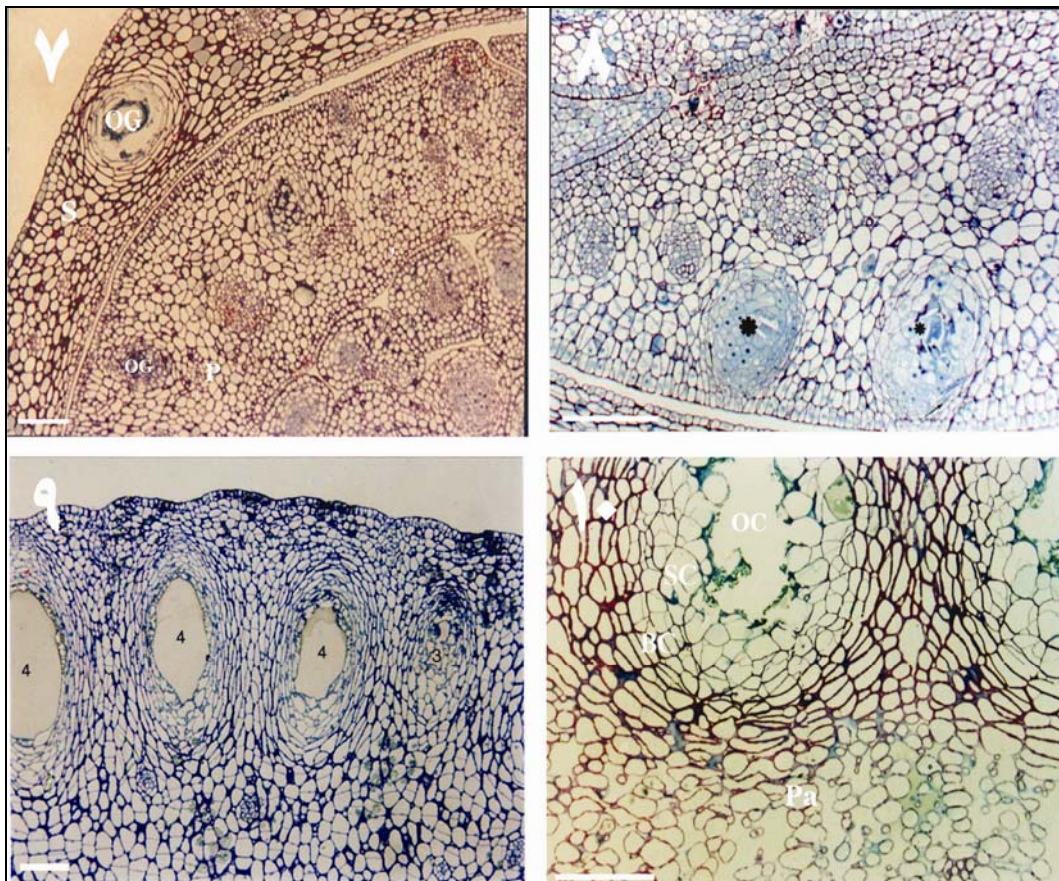
با در نظر گرفتن ویژگی‌های بافتی - سلولی، کیسه‌های ترش‌هی اسانس طی ۴ مرحله مشخص تشکیل شده، به بلوغ نهایی رسیدند: ابتدا تعدادی از سلول‌های اپیدرمی و زیر اپیدرمی شروع به تقسیم نمودند که این سلول‌ها با هسته درشت‌تر و پروتوپلاسم متراکم‌تر از سلول‌های پارانشیم زمینه‌ای و یا پروتودرم قابل تشخیص بودند (مرحله ۱ - شکل ۱). تقسیمات سلولی، همراه با افزایش ابعاد، تا زمانی ادامه یافت که یک خوشه سلولی کروی تا بیضی شکل با پایه‌ای متصل به سلول‌های اپیدرمی پدید آمد. سلول‌های مرکزی کیسه نسبت به سلول‌های اطراف درشت‌تر بوده، دیواره نازک‌تر، پروتوپلاسمی متراکم‌تر و میزان رنگ‌پذیری بیشتری داشتند، اما سلول‌های کناری کشیده‌تر با دیواره‌ای ضخیم‌تر بودند (مرحله ۲ - شکل ۲). در این مرحله سلول‌های خوشه فاقد فضای بین سلولی بودند. سپس روند تقسیمات در سلول‌های کناری کیسه ادامه یافت و بر تعداد لایه‌های احاطه‌کننده افزوده شد. به طور همزمان، تحلیل سلول‌های درونی کیسه ترش‌هی و تشکیل حفره مرکزی آغاز گشته (مرحله ۳ - شکل ۳) و اندازه حفره با ادامه روند اتولیز افزایش یافت. با گسترش حفره مرکزی، سلول‌های احاطه‌کننده آن به سمت لایه‌های خارجی فشرده شده و دارای شکل نامنظم شدند (شکل ۴). در پایان، کیسه بالغ با حفره مرکزی گسترده که Secretory cells با دیواره سلولی نازک و پروتوپلاسم متراکم همانند غلافی حفره را

کیسه‌ها افزایش یافت. تعداد لایه‌های احاطه‌کننده کیسه ترش‌حی با انجام تقسیمات فراوان افزایش یافته، خود سلول‌ها نیز حجیم شدند و دیواره آن‌ها نسبت به سلول‌های پارانشیمی اطراف ضخیم‌تر شد، در حالی که سلول‌های مرکزی دیواره نازک‌تر و سیتوپلاسم غلیظ‌تری داشتند (شکل ۱۰).

پس از لقاح و تبدیل تخمدان به میوه، روند تشکیل کیسه‌های ترش‌حی اسانس تا پایان مرحله اول نمو میوه ادامه یافت. اکثر غده‌های روغنی مشاهده شده در میوه سبز نارس لیموترش در مراحل پایانی تکوین خود مشاهده شدند (شکل ۹). اما در مراحل بعدی نمو میوه تشکیل کیسه‌های ترش‌حی متوقف شده، تنها اندازه



→ شکل‌های ۱ تا ۶ - مراحل تکوین کیسه‌های ترش‌چی اسانس در تخمدان لیموترش بر پایه برش‌های عرضی (رنگ‌آمیزی توسط آبی متیلن - آزر ب - فوشین بازی)؛ شکل ۱ - بنیان‌گذاری کیسه ترش‌چی. سلول‌های تشکیل‌دهنده کیسه ترش‌چی (OG) نسبت به سلول‌های اطراف هسته درشت‌تر، پروتوپلاسم غلیظ‌تر و رنگ‌پذیری بیشتری دارند. مقیاس = ۱۰ میکرومتر؛ شکل ۲ - مرحله دوم تکوین یک کیسه ترش‌چی. سلول‌های مرکزی (\*) نسبت به سلول‌های اطراف درشت‌تر، دیواره نازک‌تر و پروتوپلاسم غلیظ‌تر دارند، در حالی که سلول‌های کناری (BC) کشیده‌تر بوده، دیواره ضخیم‌تر دارند. نوک پیکان‌ها تقسیمات سلول‌های کناری را نشان می‌دهند. مقیاس = ۲۵ میکرومتر؛ شکل ۳ - آغاز تحلیل سلول‌های مرکزی کیسه ترش‌چی (\*) با فرآیند اتولیز و ادامه تقسیمات در سلول‌های کناری (نوک پیکان‌ها). مقیاس = ۲۵ میکرومتر؛ شکل ۴ - گسترش حفره مرکزی (OC) در فرآیند تکوین یک کیسه ترش‌چی. مقیاس = ۲۵ میکرومتر؛ شکل ۵ - مرحله نهایی تکوین یک کیسه ترش‌چی. حفره مرکزی (OC) گسترده شده و سلول‌های احاطه‌کننده ترش‌چی (SC) همانند غلافی حفره را در بر می‌گیرند (نوک پیکان‌ها)، (سلول‌های کناری=BC). مقیاس = ۲۵ میکرومتر؛ شکل ۶ - در یک کیسه ترش‌چی بالغ، سلول‌های کناری (BC) نسبت به سلول‌های ترش‌چی احاطه‌کننده حفره (SC)، دیواره سلولی ضخیم‌تر، پروتوپلاسم رقیق‌تر و رنگ‌پذیری کمتری دارند. OC = حفره مرکزی. مقیاس = ۵ میکرومتر.



شکل ۷ - برش عرضی قسمتی از غنچه لیموترش در مرحله اول نمو گل. کیسه‌های ترش‌چی (OG) در کاسبرگ (S) و گلبرگ (P) از همان مرحله اول نمو گل شکل گرفته، در مراحل مختلف نمودی مشاهده می‌شوند. رنگ‌آمیزی توسط آبی متیلن - آزر ب - فوشین بازی. مقیاس = ۲۵ میکرومتر؛ شکل ۸ - برش عرضی گلبرگ لیموترش در مرحله دوم نمو گل. کیسه‌های ترش‌چی در حال تمایز (\*). رنگ‌آمیزی توسط آبی متیلن - آزر ب - فوشین بازی. مقیاس = ۲۵ میکرومتر؛ شکل ۹ - برش عرضی تخمدان لیموترش در مرحله اول نمو میوه. بیشتر کیسه‌های ترش‌چی اسانس در مراحل نهایی تکوین هستند (3 و 4). رنگ‌آمیزی توسط آبی تولوئیدین. مقیاس = ۵۰ میکرومتر؛ شکل ۱۰ - برش عرضی قسمتی از فرابرسیده لیموترش. به حجیم شدن سلول‌های ترش‌چی (SC)، افزایش تعداد لایه‌های احاطه‌کننده کیسه ترش‌چی (BC) و ضخیم بودن دیواره سلولی آن‌ها نسبت به سلول‌های پارانشیمی (Pa) توجه شود. OC = حفره مرکزی. رنگ‌آمیزی توسط آبی متیلن - آزر ب - فوشین بازی. مقیاس = ۲۵ میکرومتر.

## بحث و نتیجه‌گیری

گزارش‌های ارائه شده از ویژگی‌های بافت‌شناختی و کیسه‌های ترش‌حی اسانس در لیموترش تنها شامل برگ و میوه بالغ شده (Turner *et al.*, 1998; Bennici and Tani, 2004) و نتایج پژوهش حاضر اولین گزارش در مورد تغییرات تکوینی گل و میوه و ارتباط آن‌ها با غده‌های روغنی در *Citrus limon* است.

در دید کلی، دو نوع کیسه ترش‌حی پایه‌دار و بدون پایه در اندام‌های زایشی لیموترش مشاهده شدند، اما با گرفتن برش‌های پشت سر هم (Serial sectioning) مشخص شد که کلیه کیسه‌های ترش‌حی، صرف‌نظر از درجه بلوغ آن‌ها، توسط پایه‌ای غالباً مخروطی شکل به اپیدرم متصل هستند و بر اساس آن که برش‌گیری از چه منطقه‌ای از کیسه صورت گرفته باشد، تعدادی از کیسه‌ها پایه‌دار و تعدادی بدون پایه دیده می‌شوند. محققان دیگر نیز در دیواره تخمدان (Bosabalidis and Tsekos, 1982a) در میوه پرتقال ناول (Knight *et al.*, 2001) و در میوه *C. medica* (Liang *et al.*, 2006) به کیسه‌های ترش‌حی پایه‌دار اشاره کرده‌اند.

مراحل تکوینی غده‌های روغنی در کاسبرگ، گلبرگ، تخمدان گل و پوست میوه لیموترش از الگوی یکسان و ثابتی پیروی می‌کند. در هیچ یک از گونه‌های مرکبات تاکنون گزارشی مقایسه‌ای ارائه نشده است، اما با توجه به الگوی تمایزیابی کیسه‌های ترش‌حی در برگ لیموترش (Turner *et al.*, 1998) و میوه آن (Bennici and Tani, 2004) و مقایسه آن با نتایج پژوهش حاضر به نظر می‌رسد که الگوی تمایزیابی جزء ویژگی‌های ذاتی بوده، در تمام اندام‌های رویشی و زایشی یک تاکسون مشخص ثابت است.

مراحل تمایزیابی کیسه‌های ترش‌حی اسانس در لیموترش به ۴ مرحله تفکیک شد که از تقسیم تعدادی از سلول‌های اپیدرمی و زیر اپیدرمی آغاز شده، تا تشکیل کیسه بالغ با یک حفره مرکزی احاطه شده توسط سلول‌های غلاف مانند ادامه می‌یابد. Knight و همکاران (۲۰۰۱) مراحل نمودی این کیسه‌ها در میوه پرتقال ناول را به ۶ مرحله تقسیم نمودند که از یک خوشه ۱۰ سلولی آغاز شده، به یک کیسه ترش‌حی بالغ با حفره مرکزی وسیع منتهی می‌گردد. اختلاف میان تعداد مراحل تمایزیابی غده‌های روغنی در لیموترش و نتایج Knight و همکاران (۲۰۰۱) می‌تواند مربوط به این باشد که در تحقیق حاضر تفکیک مراحل تکوینی بر اساس اختلافات سلولی و درجه تمایز کیسه‌ها، و نه تعداد سلول‌ها و اندازه کیسه‌ها، انجام شده است.

با توجه به مشاهده همزمان تقسیمات سلولی در قسمت‌های بیرونی کیسه ترش‌حی و تحلیل رفتن سلول‌های مرکزی الگوی تکوینی شیزوژنی برای اندام‌های زایشی لیموترش پیشنهاد می‌شود. این گزارش با نتایج پژوهش‌های قبلی ما بر روی لیمو عمانی (*Citrus aurantifolia*) همخوانی دارد (Rafiei and Rajaei, 2007). گزارش‌های متعدد و متناقضی در مورد نحوه تشکیل غده‌های روغنی در مرکبات ارائه شده است؛ Heinrich (۱۹۶۹) نمو این فضاها را در جنس‌های مختلف تیره مرکبات متفاوت توصیف کرد. وی تشکیل حفره در *Ruta graveolens* را به صورت شیزوژنی و در *Citrus limon* از نوع لیزوژنی دانست. Knight و همکاران (۲۰۰۱) تشکیل حفره‌های ترش‌حی در میوه پرتقال ناول را از نوع شیزوژنی اعلام نمودند. قبل از آن Turner و همکاران (۱۹۹۸) با مقایسه تکنیک‌های متفاوت آماده‌سازی نمونه‌ها، پیشنهاد کرده

گسترش حفره همراه بود. Liang و همکاران (۲۰۰۹) فعالیت آنزیم پکتیناز را در مراحل اولیه تشکیل حفره مرکزی در میوه انواع مرکبات گزارش نموده اند که معادل مرحله سوم تکوین غده روغنی در پژوهش حاضر است. آنزیم سلولاز باعث گسترش حفره (مرحله چهار پژوهش حاضر) می‌شود و فعالیت این آنزیم در کیسه‌های ترش‌هی بالغ به اوج می‌رسد (Liang et al., 2009).

اندازه کیسه‌های ترش‌هی اسانس در لیموترش ارتباطی با درجه بلوغ آنها نداشت، ممکن است یک کیسه ترش‌هی بالغ اندازه کوچکی داشته باشد و یا برعکس، یک کیسه نابالغ از اندازه بزرگی برخوردار باشد. در این رابطه تاکنون گزارشی در مرکبات ارائه نشده است.

غده‌های روغنی در کاسبرگ و گلبرگ لیموترش از مرحله اول نمو گل به صورت بالغ و متمایز بودند، در حالی که پیدایش کیسه‌ها در تخمدان از مرحله دوم نمو گل آغاز شد. در عین حال، رابطه مستقیمی بین درجه تمایز کیسه ترش‌هی و تکوین اندام‌های گل مشاهده شد. در این رابطه گزارشی در مورد گونه‌های دیگر مرکبات موجود نیست.

بنیان‌گذاری و تمایز یابی کیسه‌های ترش‌هی تا مرحله اول نمو میوه لیموترش (میوه سبز نارس) ادامه یافت. Knight و همکاران (۲۰۰۱) و همچنین Tani و Bannici (۲۰۰۴) به ترتیب با در نظر گرفتن مراحل مختلف نمو میوه پرتقال و لیموترش بنیان‌گذاری غده‌های روغنی را محدود به مرحله اول نمو میوه (مرحله تقسیم سلولی) دانستند. در عین حال، یافته‌های پژوهش حاضر در تضاد با گزارش‌های Schneider (۱۹۶۸) است که پیشنهاد نمود تشکیل کیسه‌های ترش‌هی اسانس در طی بلوغ میوه تداوم می‌یابد.

بودند که اصولاً مفهوم لیزیژنی در تکوین کیسه‌های ترش‌هی اسانس مرکبات می‌تواند مقوله نادرستی باشد که به دلیل تولید مواد غیر واقعی (artifact) در عملیات تثبیت نمونه حاصل شده است. محققان مزبور تکوین کیسه‌های ترش‌هی در برگ لیموترش را از نوع لیزیژن معرفی نمودند. در پژوهش حاضر از دو تثبیت‌کننده گلو تار آلدئید و تتراکسید اسمیوم استفاده شد. وجود لایه‌های منظم سلولی در اطراف حفره کیسه بالغ، نظم در تشکیل حفره، گسترده شدن آن و فشردگی لایه‌ها در اطراف حفره شکل گرفته، مخالف نظر Turner و همکاران (۱۹۹۸) در توصیف آن‌ها از پدیده lysis به علت تکنیک آماده‌سازی است. Bennici و Tani (۲۰۰۴) نیز با استفاده از تکنیک مشابه با پژوهش حاضر همپوشانی دو پدیده شیزوژنی و لیزیژنی را در پوست میوه‌های پرتقال و لیموترش گزارش نمودند. همچنین Liang و همکاران (۲۰۰۶ و ۲۰۰۹) تکوین غده‌های روغنی در میوه چند گونه از مرکبات را از نوع شیزو لیزیژن دانستند. در غده‌های روغنی بالغ گل و میوه لیموترش، لایه‌هایی از سلول‌های مسطح شده در اطراف حفره مرکزی مشاهده شد و ضخامت دیواره آن‌ها به سمت خارج کیسه افزایش نشان داد. داخلی‌ترین این سلول‌ها ویژگی‌هایی مشابه با سلول‌های ترش‌هی داشتند و می‌توانند معادل boundary cells معرفی شده توسط Bosabalidis و Tsekos (۱۹۸۲b) در *Citrus deliciosa* باشند. خارجی‌ترین این سلول‌ها با دیواره‌های ضخیم‌تر، احتمالاً نقش حفاظت از سلول‌های داخلی تر غده را به عهده دارند. گزارش‌های مشابهی در برگ لیموترش (Turner et al., 1998)، میوه پرتقال و میوه لیموترش (Bennici and Tani, 2004) ارائه شده است.

مراحل سوم و چهارم تکوین کیسه‌های ترش‌هی در تمام اندام‌های زایشی لیموترش با شروع اتولیز سلول‌ها و

مرکبات نشان داده‌اند (Bosabalidis and Tsekos, 1982b; Bennici and Tani, 2004). بررسی‌های تکمیلی با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری مکانیزم سلولی ترشح ترکیبات ترپنی را آشکار خواهند ساخت. همچنین، نتایج حاصل از پژوهش حاضر، در تعیین محدوده زمانی و نحوه تشکیل کیسه‌ها در گل و میوه، می‌تواند مقدمه‌ای برای پژوهش‌های بعدی در تشخیص زمان بهینه نمونه‌برداری جهت استخراج و شناسایی ترکیبات اسانس در لیموترش باشد.

اندازه کیسه‌های ترش‌چی در طی نمو میوه لیموترش افزایش یافت. این موضوع قبلاً در مورد پرتقال والنسیا (Bain, 1958) و پرتقال ناول (Knight *et al.*, 2001) نیز گزارش شده است. با شمارش کیسه‌های ترش‌چی در پوست میوه پرتقال ناول هنگام نمو، مشخص شد در طی افزایش اندازه میوه، تعداد کیسه‌های ترش‌چی نسبتاً ثابت می‌ماند (Knight *et al.*, 2001).

پژوهش‌های فراساختاری اختلافاتی را در چگونگی ترشح اسانس توسط اجزای سلولی در چند گونه از

### منابع

- Bain, J. M. (1958) Morphological, anatomical, and physiological changes in the developing fruit of the Valencia orange, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. Australian Journal of Botany 6(1): 1-24.
- Bennici, A. and Tani, C. (2004) Anatomical and ultrastructural study of the secretory cavity development of *Citrus sinensis* and *citrus limon*: evaluation of schizolysigenous ontogeny. Flora- Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants 199(6): 464-475.
- Bosabalidis, A. and Tsekos, I. (1982a) Ultrastructural studies on the secretory cavities of *Citrus deliciosa* Ten. I. Early stages of the gland cells differentiation. Protoplasma 112: 55-62.
- Bosabalidis, A. and Tsekos, I. (1982b) Ultrastructural studies on the secretory cavities of *Citrus deliciosa* Ten. II. Development of the essential oil – accumulating central space of the gland and process of active secretion. Protoplasma 112: 63-70.
- Buvat, R. (1989) Ontogeny, cell differentiation and structure of vascular plants. Springer Verlag, Berlin.
- Esau, K. (1977) Anatomy of Seed Plants. 2<sup>nd</sup> Ed, John Wiley & Sons, New York.
- Fahn, A. (1988) Secretory tissues in vascular plants. New Phytology 108: 229-257.
- Fahn, A. (1990) Plant Anatomy. 4<sup>th</sup> Ed, Pergamon Press, New York.
- Heinrich, G. (1969) Elektronenmikroskopische Beobachtungen zur Entstehungsweise der Exkretbehälter von *Ruta graveolens*, *Citrus limon* und *Poncirus trifoliata*. Österreichische Botanische Zeitschrift 117: 397-403.
- Knight, T. G., Klieber, A. and Sedgley, M. (2001) The relationship between oil gland and fruit development in Washington Navel orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). Annals of Botany 88: 1039-1047.
- Lawless, J. (1995) The illustrated encyclopedia of essential oils. Element Books, Inc. Rockport, Massachusetts.
- Liang, S. J., Wang, H., Yang, M. and Wu, H. (2009) Sequential actions of pectinases and cellulases during secretory cavity formation in Citrus fruits. Trees 23: 19-27.
- Liang, S. J., Wu, H., Lun, X. and Lu, D. W. (2006) Secretory cavity development and its relationship with the accumulation of essential oil in fruits of *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* (Noot.) Swingle. Journal of Integrative Plant Biology 48(5): 573-583.
- Mauseth, J. D. (1988) Plant Anatomy. The Benjamin/Cummins Publishing Company Inc., Menlo Park, California.



- McGregor, S. E. (1976) Insect pollination of cultivated crop plants. United States Department of Agriculture, Tucson, Arizona.
- Rafiei, M. and Rajaei, H. (2007) Structural and developmental studies on oil producing reproductive organs in lime (*Citrus aurantifolia* Swingle). *Journal of Biological Sciences* 6: 848-853.
- Roland, J. C. (1978) General preparation and staining of thin sections. In: *Electron microscopy and cytochemistry of plant cells.* (ed. Hall, J. J.) 1-62. Elsevier North Holland Biochemical Press, New York.
- Ruzin, S. E. (1999) *Plant Microtechnique and Microscopy.* Oxford University Press, New York.
- Schneider, H. (1968) The anatomy of citrus. In: *The citrus industry.* Vol. 2. 2<sup>nd</sup> Ed. (eds. Reuther, W., Webber, H. and Batchelor, L. D.) 14-18. University of California Press, Division of Agricultural Science, Berkeley.
- Turner, G. W., Berry, A. M. and Gifford, E. M. (1998) Schizogenous secretory cavities of *Citrus limon* (L.) Burm.f. and a reevaluation of the lysigenous gland concept. *International Journal of Plant Sciences* 159(1): 75-88.

## Differentiation of essential oil cavities in developing lemon (*Citrus limon*(L.)Burm.f.) flower and fruit

Maryam Rafiei \*<sup>1</sup> and Homa Rajaei <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Biology, Faculty of Sciences, Islamic Azad University, Arsanjan Branch, Arsanjan, Iran

<sup>2</sup> Department of Biology, Faculty of Science, University of Shiraz, Shiraz, Iran

### Abstract

Essence of oil secretory cavities (glands) have been reported in all *Citrus* species of the Rutaceae family. The present study has focused on the histological aspect of the oil gland ontogeny during flower and fruit development in lemon(*Citrus limon*(L.)Burm.f.). Samples taken at six successive ontogenic stages were processed according to routine transmission electron microscope procedure, and viewed under the light microscope. Oil glands in sepals, petals and ovary wall appeared different time intervals, but showed the same histological aspect. In fruits, oil gland appearance was restricted to the immature stage. No new gland was formed during the fruit maturation process, and the preformed ones continued to enlarge. Secretory glands of the flower and fruit peel showed a similar developmental pattern and separated into four stages, based on cell features and the degree of gland differentiation. Oil gland ontogeny started from the divisions in some epidermal and hypoeperidermal cells, and ended with an expanded central cavity. The flattened cells bordering the central cavity were structurally distinguishable and had probably different functions. Wall separation and autolysis overlapped each other; the oil gland ontogeny in *Citrus limon* is therefore of schizolysigenous type.

**Key words:** Essential oil, Ontogeny, Structure, Oil gland, *Citrus limon*