مقایسه آلکالوئید، فنل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی ارمک‌میانه (*Ephedra intermedia* Schrenket) طبیعی با جداکشت‌های درون‌شیشه

عذرا عطایی عظیمی*، بابک دلنواز هاشملویان و عاطفه امیرینیا

گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ساوه، ساوه، ایران

(تاریخ دریافت: ١٣٩٤/١١/٢٦، تاریخ پذیرش نهایی: ١٣٩٥/٠٦/٠٢)

چکیده:

ارمک میانه (*Ephedra intermedia* (Schrenket)) گیاهی دارویی از تیره ارمکسه (Ephedraceae)، راسته گنتال (Gnetales) از بازدانگان است. جداکشت ساقه‌ای ارمک، در محیط پایه MS با تیمارهای مختلف شامل ٢/٥ تا ١٥ میلی‌گرم بر لیتر اکسین اندول استیک اسید (IAA) و ٢/٥ تا ٢٠ میلی‌گرم بر لیتر کینتین (Kin)، کشت داده شدند. پودر اندام‌های مختلف ارمک و جداکشت های تیمار شده با اکسین و کینتین آن در کشت درون شیشه (in vitro)، برای استخراج و سنجش آلکالوئید، فنل و فعالیت آنتی‌اکسیدان استفاده شدند. در کشت درون شیشه، بعد از سه ماه، کالوس و شاخساره (جوانه) روی جداکشت‌ها تشکیل شد. اکسین و کینتین بدون اثر متقابل بر القای کالوس اثر داشته ولی برای تشکیل شاخساره، کینتین بهتر از اکسین عمل کرد. غلظت بالای اکسین محتوای آلکالوئید را افزایش و با افزایش غلظت کینتین اثر آن تحریک شد. جداکشت‌های تیمار شده با ترکیب ٢/٥ میلی گرم بر لیتر اکسین و همه مقادیر کینتین، فنل و آنتی‌اکسیدان بیشتری نسبت به سایر تیمارها داشتند، ولی کالوس قرمز رنگ حاصله از تیمار اکسین ٥ با کینتین ٢٠ میلی گرم بر لیتر، بالاترین فنل و فعالیت آنتی اکسیدانی را داشت. دانه و ریشه ارمک بیشترین آلکالوئید، و میوه و شاخساره بیشترین فنل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی را داشتند. نتایج این پژوهش نشان داد که اندام‌های ارمک میانه سرشار از آلکالوئید، فنل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی هستند. در مقایسه با دیگر پژوهش‌ها، اثر اکسین و کینتین بر القای کالوس، تشکیل شاخساره و محتوای آلکالوئید، فنل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه بازدانه ارمک میانه مشابه گونه‌های دیگر سرده ارمک بود.

کلمات کلیدی: اندام‌زایی، بازدانگان، جوانه، کالوس، کشت بافت.

مقدمه:

ارمک میانه (*Ephedra intermedia* (Schrenket)) گیاهی دارویی از تیره ارمکسه (Ephedraceae) از گیاهان بی گل از راسته گنتال (Gnetales) از بازدانگان است. ارمک‌ها، گیاهانی بسیار مقاوم به خشکی و گرما بوده و در مناطق بیابانی رشد می‌کنند (Friedman, 1996). گونه‌های مختلف ارمک در بسیاری از نقاط ایران پراکنش دارند که استان مرکزی از آن جمله است. گیاه ارمک میانه (*E. intermedia*) از گونه‌هایی است که در نواحی اطراف شهرستان ساوه از توابع استان مرکزی می‌روید (قهرمان، ١٣٨٣). گونه‌های مختلف ارمک کم و بیش دارای ساپونین، تانن، روغن و آلکالوئید هستند. آلکالوئیدهای معروف ارمک‌ها شامل افدرین، پزودوافدرین و نوروپزودوافدرین می‌باشند. جوانه‌زنی دانه با تغییر محتوای آلکالوئید و افدرین در ارمک درشت (*E. major*) همراه بوده

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی:attaei@iau-saveh.ac.ir

است (Mofid Bojnoordi *et al.*, 2015). مهم‌ترین خواص دارویی ارمک‌ها ناشی از وجود این آلکالوئیدها در آنها است (Konar and Singh, 1979). جوشانده شاخه‌ها و ریشه‌های ارمک برای معالجه روماتیسم و سفلیس، عصاره آبی گیاه با طعمی تلخ و قابض، برای کنترل حمله‌های آسمی استفاده می‌شود. عصاره میوه‌های ارمک برای رفع ناراحتی‌های تنفسی مؤثر است (Nawwar *et al.*, 1985). این گیاه قابل استفاده در تحقیقات بیوتکنولوژی برای افزایش محتوای آلکالوئید است (Inoko *et al.*, 2007).

آنتی اکسیدان‌ها نقش مهمی در جلوگیری از بیمار شدن انسان‌ها دارند. آنتی اکسیدان‌ها، ترکیباتی هستند که رادیکال‌های آزاد را جاروب می‌کنند و با عوامل پیش اکسیدان فلزی ترکیب می‌شوند. این ترکیبات عامل احیا کننده و خاموش ساز اشکال یونی اکسیژن هستند (Rice-Evans *et al.*, 1997). آنتی اکسیدان‌ها در روغن‌ها و مواد غذایی چرب استفاده می‌شوند تا ترکیبات اکسیدانی که خود به خود از اکسید شدن روغن‌ها و اسیدهای چرب در دمای بالا، هوای آزاد و نور در این غذاها، تولید می‌شوند، خنثی کنند (Zollman and Vickers, 1999). مشتقات فنلی و پلی فنلی در گیاهان فعالیت آنتی اکسیدانی دارند. آن‌ها مثل یک دهنده پروتون و یا الکترون عمل می‌کنند (Wojdylo *et al.*, 2007). از کالوس نوک ریشه دانه رست ارمک روند (*E. foliata*)، گیاهچه (Sankhla *et al.*, 1967) و از کشت درون شیشه تخمک همین گونه، ریشه و جوانه‌های هاپلوئید به دست آمده است (Singh and Konar, 1981 و Singh *et al.*, 1981؛ Konar and Singh, 1979). از کشت سلولی ارمک برگی برای تولید آمینواسید استفاده می‌شود (Uddin, 1977). از تیمار جداکشت‌های ساقه‌ای ارمک برگی با ۱ میلی گرم بر لیتر ۲ و ٤-دی کلروفنوکسی استیک (2,4-D) و ۱ میلی گرم بر لیتر کینتین کالوس‌هایی دارای ١٤ میلی گرم در گرم وزن خشک افدرین، حاصل شد (Hegazi and El-Lamy, 2011). کشت گره‌های ساقه‌ای نوعی ارمک (*E. gerardiana*) در محیط MS با NAA به تنهایی منجر به تشکیل کالوس و با کینتین به تنهایی منجر به تشکیل جوانه و شاخساره از محل گره شد (Garla *et al.*, 2011). رویان زایی بدنی در گونه‌های مختلف ارمک با به کارگیری تیمارهای مختلف هورمونی انجام گرفته است (O'Dowd *et al.*, 1998). جداکشت‌های ارمک رونده، در تیمارهای اکسین با سیتوکینین، کالوس‌های رویان زا تولید کردند (Dhiman *et al.*, 2010). کالوس های به دست آمده از تیمار جداکشت‌های ساقه‌ای ارمک ریش بز (*E. procera*) با ۱ میلی گرم بر لیتر کینیتین (kin) و ۲ میلی گرم بر لیتر نفتالین استیک اسید (NAA) دارای مقدار زیادی افدرین بودند. افدرین در این کالوس ها حدود ۱۰۸ میکروگرم در گرم وزن خشک بود (Parsaeimehr *et al.*, 2010b). مطالعه اثر نفتالین استیک اسید و کینتین روی سه گونه ارمک نشان داده است که این دو هورمون با مقادیر متفاوت قادر به القای کالوس روی جداکشت های این ارمک‌ها هستند. مقایسه محتوای فنلی و ترکیبات آنتی اکسیدان کالوس ها با گیاه طبیعی نشان داده است که محتوای فنل و فعالیت آنتی اکسیدانی کالوس‌ها کمتر از گیاه طبیعی است (Parsaeimehr *et al.*, 2010a). عصاره کشت سلولی و گیاه وحشی انواع ارمک دارای خاصیت ضد میکروبی، ضد قارچی و آنتی اکسیدانی هستند (Parsaeimehr *et al.*, 2010a؛ Bagheri, and Bigdeli. 2009). هدف از این پژوهش، تعیین اثر هورمون‌های اکسین و کینتین بر القای کالوس و جوانه روی جداکشت‌های شاخسارهای، تعیین محتوای آلکالوئید، فنل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی اندام‌های گیاه طبیعی ارمک و جداکشت-های کالوس‌دار و جوانه‌دار بود.

مواد و روش‌ها:

ماده گیاهی: گیاه پایه ماده ارمک میانه شناسایی شده در دانشگاه تهران با شماره هرباریومی THU۱۵۳۰۷-، از مناطق اطراف دانشگاه آزاد ساوه تهیه و از شاخساره (ساقه گره دار) تازه آن برای کشت بافت و از اندام‌های شاخساره، ریشه، میوه مانندها (ارمک میانه از بازدانگان است. بازدانگان فاقد میوه واقعی هستند. روی پایه‌های ماده ارمک میانه، اندام‌هایی قرمز رنگ ظاهر می‌شود (شکل ۱) که میوه واقعی نبوده و می‌توان

آنها را میوه مانند نامید (قهرمان، ۱۳۸۳) و دانه‌های خشک شده در اون با دمای ۶۰ درجه و مدت ۴۸ ساعت، برای عصاره گیری، استخراج آلکالوئید و فنل و اندازه‌گیری فعالیت آنتی اکسیدان، استفاده شد.

کشت بافت: جداکشت‌های گره‌دار ساقه‌ای (شاخساره) به مدت ۱۵ دقیقه در محلول وایتکس ۷۰٪ (هیپوکلریت سدیم ۵٪) ضدعفونی و پس از سه بار شستشو با آب مقطر استریل، در محیط پایه MS (Murashige and Skoog, 1962) با ۸ گرم در لیتر آگار و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز با تیمارهای مختلف دو هورمون کینتین (Kin) و اندول استیک اسید (IAA) کشت داده شدند. این تیمارها شامل مقادیر ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر کینتین با ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم بر لیتر اندول استیک اسید بودند (۱۶ تیمار بصورت آزمایش فاکتوریل). قبل از کشت، محیط کشت‌ها با اتوکلاو در دمای ۱۲۰ درجه سانتی گراد و فشار ۱/۵ اتمسفر به مدت ۱۵ دقیقه و ظروف به مدت یک ساعت در اون ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد، استریل شدند. بعد از کشت، نمونه‌ها به دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و تاریکی منتقل شدند. سه ماه بعد از کشت نتایج بررسی و یادداشت برداری گردیده و همه جداکشت‌ها از محیط خارج و برای آزمایش‌های آلکالوئید، فنل و آنتی‌اکسیدان، شستشو و در اون با دمای ۶۰ درجه و مدت ۴۸ ساعت خشک گردید.

استخراج و سنجش آلکالوئید تام از اندام‌های گیاه و جداکشت‌های تیمار شده Kin و IAA: برای استخراج و سنجش آلکالوئید از روش تغییر یافته Renaudin (۱۹۸۴) استفاده شد:

استخراج و جداسازی آلکالوئید: ۰/۵ گرم از پودر خشک اندام‌های گیاه و جداکشت‌های گره دار شاخساره سه ماهه (بدون و یا با کالوس و یا جوانه) در هر تیمار هورمونی با ۵۰ میلی لیتر اتانول ۹۶٪ مخلوط و پس از ۲۴ ساعت قرار گرفتن در بن ماری ۶۰ درجه صاف شد. عصاره صاف شده در دمای اتاق و تاریکی خشک و آلکالوئیدهای آن طی دو مرحله جدا گردید: ۱) عصاره خشک در اسید سولفوریک ۵ درصد و اتر به نسبت برابر حل و بخش اتری با دکانتور از بخش اسیدی جدا شد. ۲) pH بخش اسیدی با سود ۱۰ نرمال به ۱۰ رسانده و سپس با حجم مساوی با کلروفرم مخلوط شد. بخش کلروفرمی با دکانتور جدا شد.

سنجش آلکالوئید: برای سنجش آلکالوئید، بخش کلروفرمی در هوای اتاق و تاریکی خشک و در ۱۰ میلی لیتر اتانول حل گردید. سنجش با دستگاه اسپکتروفتومتر انجام گرفت. آلکالوئید ارگوتامین به عنوان آلکالوئید استاندارد برای رسم منحنی کالیبره استفاده شد. جذب مقادیر ۰ تا ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر، آلکالوئید استاندارد و نمونه‌های گیاهی، در طول موج ۲۵۴ نانومتر با اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری و بر اساس منحنی استاندارد حاصل، درصد آلکالوئید در هر گروه از هر نمونه گیاهی محاسبه شد (Thorburn Burns *et al.*, 2002).

استخراج و سنجش فنل تام از اندام‌های گیاه و جداکشت های تیمار شده با Kin و IAA: برای استخراج و سنجش فنل تام از روش تغییر یافته (Ebrahimzade and Bahramian, 2009) استفاده شد:

استخراج فنل تام: ۲ گرم پودر هر نمونه، با ۵۰ میلی لیتر اتانول ۷۰٪ مخلوط و بعد از ۱۰ دقیقه هم زدن، صاف و این فرآیند دو بار تکرار گردید تا فنل ها به طور کامل جدا شوند. عصاره اتانولی محتوی فنل‌ها، در دمای اتاق خشک و برای سنجش با اسپکتروفتومتر، در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد.

سنجش فنل با معرف فولین سیوکالتوس و روش اسپکتروفتومتری: در این روش ۱۰ لوله آزمایش، انتخاب و در هر یک ۱ میلی لیتر سدیم استات (۵ درصد با pH= ۵) و مقایر مختلف ۰/۵، ۰/۷۵، ۱، ۱/۲۵، ۱/۵، ۲/۵ میلی لیتر از محلول اسید گالیک ۰/۱ درصد، ۰/۲۵ میلی لیتر معرف فولن-سیوکالتیوس (مولار) ریخته، حجم هر لوله با کربنات سدیم (۲۰ درصد) به ۱۰ میلی لیتر رسانده شد. سپس جذب، با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۴۳ نانومتر اندازه‌گیری و بر اساس مقادیر گالیک اسید و جذب آن، منحنی استاندارد (کالیبره) به دست آمد. برای سنجش فنل تام، ۱ میلی لیتر از عصاره هر نمونه با ۱ میلی لیتر سدیم استات، ۷/۷۵ میلی لیتر سدیم کربنات و ۰/۲۵ میلی لیتر فولن سیوکالتیوس در لوله

مخلوط، و جذب در طول موج ۷٦٥ نانومتر اندازه گیری و با استفاده از منحنی استاندارد، میزان فنل تام محاسبه شد.

سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره الکلی اندام‌های گیاه و جداکشت های تیمار شده Kin با IAA: برای استخراج عصاره الکلی ۲ گرم پودر هر نمونه، با ۵۰ میلی لیتر اتانول ۷۰٪ مخلوط و بعد از ۱۰ دقیقه هم زدن، صاف و این فرآیند دو بار تکرار گردید. عصاره اتانولی، در دمای اتاق خشک شد.

برای سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی از روش تغییر یافته Gamez و همکاران (۱۹۹۸) و Brand-Williams و همکاران (۱۹۹۵) استفاده شد: سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌ها با ۱ و ۱- دی فنیل -۲- پیکریل هیدرازیل (DPPH) انجام گرفت. محلول ۰/۱ میلی مولار DPPH در اتانول آماده شد (۰/۰٤ گرم بر لیتر). ٤۰ میکروگرم از عصاره خشک در ۲ میلی لیتر اتانول حل شد (۰/۰٤ گرم بر لیتر عصاره گیاه). ۲ میلی لیتر از DPPH با ۲ میلی لیتر از عصاره مخلوط، بعد از ۱۵ دقیقه قرار گرفتن در تاریکی، جذب آن در ٥٤۰ نانومتر خوانده شد و درصد بازدارندگی با فرمول زیر به ازای ٤۰ میکروگرم در میلی لیتر عصاره، محاسبه شد.

$Td\% = 100\ (OD_{blank} - OD_{sample}) / OD_{blank}$

I%: درصد بازدارندگی

OD_{blank}: جذب شاهد (DPPH و اتانول بدون عصاره)

OD_{sample}: جذب نمونه (DPPH و عصاره هر نمونه گیاه)

تجزیه و تحلیل آماری: گردآوری اندام‌های ارمک حداقل از سه جمعیت (سه تکرار) انجام گرفت. از هر جمعیت، اندام‌های شاخساره، ریشه، میوه و دانه جدا و بعد از خشک شدن برای استخراج آلکالوئید، فنل و فعالیت آنتی اکسیدان استفاده شد. شاخساره تازه هر جمعیت (تکرار)، جداگانه در تیمارهای مختلف اکسین و کینتین (فاکتور اکسین و کینتین هر کدام در چهار سطح و درون شیشه کشت شد. استخراج آلکالوئید، فنل و سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی هر تکرار (جمعیت)، جداگانه انجام گرفت.

آزمایش بخش اول (نمونه‌های گردآوری شده) در قالب طرح کاملاً تصادفی و آزمایش تأثیر هورمون‌ها به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام و برای تجزیه آماری و مقایسه میانگین‌ها، به جهت اینکه در کشت درون شیشه غلظت ۰ هورمونی (شاهد) اعمال نمی‌شود از آزمون توکی در سطح ۱ و ۵ درصد، از نرم افزار Minitab استفاده شد.

نتایج و بحث:

اندام‌های گیاه وحشی: نتایج نشان داد اندام‌های ریشه، شاخساره، میوه مانند (شکل ۱) و دانه ارمک میانه، دارای مقادیر قابل ملاحظه‌ای آلکالوئید تام، فنل تام و فعالیت آنتی-اکسیدانی هستند. نتیجه آنالیز واریانس نشان داد که اختلاف آلکالوئید تام، فنل تام و فعالیت آنتی اکسیدانی، بین اندام‌ها معنی‌دار است (جدول ۱). ریشه بیشترین آلکالوئید (٤٦/۳ میلی گرم بر گرم ماده خشک) و دانه کمتر از ریشه آلکالوئید داشت، ولی مقایسه میانگین‌ها نشان داد که اختلاف ریشه و دانه معنی دار نیست و این دو اندام از نظر آلکالوئید تام در یک سطح قرار دارند (جدول ۲). آلکالوئید شاخساره و میوه کم و مشابه بود.

شاخساره در انواع ارمک دارای ۱۰ تا ۳۰ میلی گرم بر گرم وزن خشک (۱-۳٪)، آلکالوئید هستند. در ارمک میانه آلکالوئید ریشه ٤۸/۲، دانه ۳۲/۲ و شاخساره ۱۲/۹ میلی گرم بر گرم وزن خشک گزارش شده (Ganzera *et al.*,2005؛ Inoko *et al.*, 2007؛ Kitani *et al.*, 2009) که به مقادیر به دست آمده در این پژوهش بسیار نزدیک است ولی گزارشی از محتوای آلکالوئید میوه مانندها در دست نیست. نتایج تجزیه واریانس نماینگر اختلاف معنی دار بین اندام‌ها از نظر فنل تام و فعالیت آنتی اکسیدانی بود (جدول ۱). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که میوه مانندهای قرمز رنگ با ۹/۷۷ میلی گرم بر گرم وزن خشک بیشترین فنل تام و دانه با ۱/۱٦۳ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک کمترین فنل تام دارند. اختلاف فنل بین اندام‌ها معنی دار بود (جدول ۲). فعالیت آنتی اکسیدانی اندام‌ها نیز معنی دار بود (جدول ۲). فعالیت آنتی اکسیدانی دانه‌ها با اختلاف معنی دار بسیار کمتر از اندام‌های دیگر، به ویژه میوه‌مانندهای قرمز رنگ بود. میوه مانندهای قرمز رنگ ارمک میانه (شکل ۱) بیشترین فنل تام و بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی (۳۲۹ میکروگرم بر

شکل ۱- میوه مانند قرمز ارمک میانه

جدول ۱- تجزیه واریانس آلکالوئید تام، فنل تام و فعالیت آنتی اکسیدانی با نوع اندام در گیاه ارمک میانه

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		آلکالوئید	فنل	آنتی اکسیدان
اندام	۳	٦٧١/٥٨**	٤٦/٥٥**	٥٢٦٩٣**
خطای آزمایش	۸	۰/۰۹	۰/۰۳۳	۵
ضریب تغییرات		۰/٤٩	۰/٦٥	۰/۵۹

*** و **: به ترتیب معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد**

جدول ۲- مقایسه میانگین‌های آلکالوئید، فنل و فعالیت آنتی اکسیدان اندام‌های ارمک میانه

اندام	آلکالوئید (mg/g)	فنل (mg/g)	آنتی‌اکسیدان (µg/ml)
ریشه	٤٦/٤[a]	۳/۲[c]	۱۹٦[c]
شاخساره	۱۲/۷۱[b]	۷/۵٦[b]	۲۵۸[b]
میوه	۱۸/۳۹[b]	۹/۷۷[a]	۳۲۹[a]
دانه	۳۱/۱[a]	۱/۱٦۳[d]	۱۹/۲[d]

ستون‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشابه باشند دارای تفاوت معنی‌دار با هم نمی‌باشند

میلی‌لیتر) را داشتند. شاخساره با اختلاف معنی‌دار بعد از میوه بود. عصاره دانه کمترین فنل و کمترین فعالیت آنتی‌اکسیدان را داشت (جدول ۲). سنجش فنل و فعالیت آنتی‌اکسیدان در سه گونه ارمک نشان داده‌است که هر سه گونه محتوای فنل بالا و فعالیت آنتی اکسیدانی قابل ملاحظه‌ای دارند (Parsaeimehr *et al.*, 2010a). فنل تام شاخساره ارمک‌ریش‌بز (*E. procera*) ۰/۷۱۸ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک و عصاره الکلی آن خاصیت آنتی اکسیدان و ضد باکتری داشت (Dehkordi *et al.*, 2015). این نتیجه نشان داد که به طور کلی فنل تام در ارمک‌میانه خیلی بیشتر از شاخساره ارمک‌ریش‌بز است.

جداکشت‌های تیمار شده با اکسین (IAA) و و کینتین (Kin): تیمار جداکشت‌های ساقه‌ای ارمک با مقادیر مختلف اکسین و کینتین، بعد از ۳ ماه، منجر به تشکیل کالوس و جوانه شد. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر جداگانه و متقابل مقادیر مختلف هر دو هورمون روی کالوسزایی معنی‌دار است (جدول ۳) و یا به عبارتی اثر مقادیر مختلف این دو هورمون بر کالوسزایی روی جداکشت‌های شاخساره‌ای ارمک میانه، مستقل از دیگری نیست. رنگ و اندازه کالوس در این

جدول ۳- تجزیه واریانس اثر اندول استیک اسید (IAA)، کینتین (Kin) و اثر متقابل آن‌ها بر کالوسزایی، جوانه‌زایی، آلکالوئید تام، فنل تام و فعالیت آنتی اکسیدانی ارمک میانه.

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات				
		کالوس	جوانه	آلکالوئید	فنل	آنتی اکسیدان
IAA	۳	۷٦٥۳/۹**	۲٤۷۹/٦	۱۹٤٥/۰۸**	۱٥/۹۳۱ **	۲۹۷٦/۸ **
Kin	۳	۳۷٥۰/۳**	٥۱٥۲/۱**	۲۰۸/٤۸**	۱٦/۸٥۳	٤۳٥/۸
IAA* Kin	۹	۲٤۹٥/٦**	۳۱۸۹/٦**	۱۰۸/۹٥**	۱۹/٥۱۱**	۱٦٦۰/۸۳**
خطای آزمایش	۳۲	۱۸٥۸/٥	٥٦/۲	۱/۱٦	۰/۰٤۳	۱۲/۷
ضریب تغییرات	-	۰/۷۱	۰/۷۲٥	۰/۹۳۱	۱/۰۸٦	۰/٤٤

*** و **: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ٥ و ۱ درصد**

تیمارها متنوع بود و ظاهراً" ارتباطی با میزان و نوع هورمون نداشت (شکل ۲ و جدول ٤). جداکشت‌های ارمک‌رونده، در تیمارهای اکسین با سیتوکینین، کالوس‌های رویانزا تولید کردند (Dhiman, *et al.*, 2010). از تیمار جدا کشت‌های شاخساره‌ای ارمک‌ریش‌بز با ۱ میلی‌گرم در لیتر کینیتین (kin) و ۲ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید (NAA) کالوس حاصل شد (Parsaeimehr *et al.*, 2010b).

تجزیه واریانس اثر مقادیر مختلف اکسین (IAA) روی جوانه زایی غیر معنی دار ولی اثر مقادیر مختلف Kin و اثرمتقابل مقادیر مختلف IAA با مقادیر مختلف Kin، روی جوانه زنی معنی‌دار بود (جدول ۳). این نتیجه نشان داد که مقادیر مختلف Kin بر جوانه‌زایی جداکشت‌های ساقه‌ای ارمک میانه اثر دارند ولی IAA به تنهایی قادر به القای جوانه زایی نیست ولی اگر با مقادیر مختلف Kin همراه شود، اثر دارد. این اثر در مقادیر مختلف هورمون، متفاوت بود (جدول ٤). تعداد جوانه‌های تشکیل شده در تیمارهای مختلف، ۱ و ۳ عدد بود (شکل ۳). کشت گره‌های ساقه‌ای یک نوع ارمک (*E. gerardiana*) در محیط MS با NAA به تنهایی منجر به تشکیل کالوس و با کینتین به تنهایی منجر به تشکیل جوانه از محل گره شد (Garla *et al.*, 2011). کشت ساقه گره‌دار گیاه پایه ماده ارمک‌رونده در محیط MS با بنزیل آدنین (BA) منجر به تشکیل چند ساقه‌ای گردید. واکشت چند ساقه‌ای به محیط کشت MS رقیق با نصف غلظت برخی مواد معدنی و دارای اکسین (IAA) و تیمار ٥ دقیقه‌ای با اندول‌بوتریک اسید (IBA) منجر به تشکیل ریشه روی این شاخساره های نوپدید شده است (Lodha *et al.*, 2014). از کالوس جداکشت انتهای ریشه دانه‌رست ارمک‌رونده، گیاهچه (Sankhla *et al.*, 1967)، از کشت درون شیشه، تخمک ارمک رونده در تیمارهای اکسینی و سیتوکینینی، ریشه و جوانه‌های هاپلوئید به دست آمد (Singh and Konar, 1981؛ Singh *et al.*, 1981؛ Konar and Singh, 1979).

گونه‌های مختلف ارمک دارای آلکالوئیدهایی هستند که مصرف وسیع دارویی دارند. مقایسه اثر هورمون‌های اندول استیک اسید (IAA) با کینتین (Kin) نشان داد که این دو هورمون روی میزان آلکالوئید کل جداکشت‌ها اثر دارند. تجزیه واریانس آن‌ها نشان داد که اثر جداگانه و متقابل هر دو هورمون بر محتوای آلکالوئید جداکشت‌ها معنی دار است (جدول ۱). محتوای آلکالوئید شاخساره ۱۲/۷۱ میلی گرم بر گرم بود (جدول ۲) در حالیکه با تیمارهای هورمونی میزان آن ۱/٥ تا ۳۷/۲ میلی‌گرم بر گرم (جدول ٤) تغییر داشت. میزان بالای IAA (۱٥ میلی‌گرم بر لیتر) سبب افزایش آلکالوئید تا حدود ۳ برابر شاخساره گیاه طبیعی شد (جدول ۲ و ٤). به عبارتی تیمار ۱٥ میلی‌گرم بر لیتر IAA بیشترین اثر را روی افزایش محتوای آلکالوئید داشت و این اثر با افزایش غلظت Kin، از ۲/٥ تا ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر بیشتر شد. میزان آلکالوئید در تیمار ۱٥ میلی گرم بر لیتر IAA با ۲/٥ میلی گرم بر لیتر Kin، ۲۷/٤ میلی گرم بر گرم وزن خشک بود که در تیمار ۱٥

شکل ۲- تشکیل کالوس روی جداکشت‌های ساقه‌ای ارمک‌میانه با تیمارهای اندول‌استیک‌اسید (IAA)، کینتین (Kin).

۱ و ۲: کالوس کرم قرمز در تیمار ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر IAA با ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر Kin. ۳: کالوس قرمز در تیمار ۵ میلی‌گرم بر لیتر IAA با ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر Kin. ٤: کالوس سبز در تیمار ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر IAA با ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر Kin.

جدول ٤- مقایسه میانگین‌های اثر اندول‌استیک‌اسید (IAA) و کینتین (Kin) بر کالوسزایی، جوانه‌زایی و آلکالوئید کل جداکشت‌های ارمک‌میانه

شماره	IAA	Kin	کالوسزایی	جوانه‌زایی	اندازه (cm) و رنگ کالوس	تعداد جوانه	آلکالوئید (mg/g)	فنل (mg/g)	آنتی‌اکسیدان (µg/ml)
۱	۲/۵	۲/۵	۳۰^{c}	۵^{d}	۰/۵- سبز قرمز	۰	۰/۹^{g}	۲/۵٤^{b}	۸٦^{a}
۲	۲/۵	۵	۱۰۰^{a}	٦۳^{b}	۰/۵-سبز قرمز	۳	۱۰/۸^{e}	۲/٤۳^{b}	۷۹/۳^{a}
۳	۲/۵	۱۰	۱۰۰^{a}	۳۰^{c}	۰/۵- سبز قرمز	۱	۷/۱^{f}	۲/۷^{b}	۸۳/۸^{a}
٤	۲/۵	۲۰	۱۰۰^{a}	٦۵^{b}	۰/۵- سبز	۱	۸/۷^{f}	۲/۱^{b}	٦٦/۵^{b}
۵	۵	۲/۵	۵^{d}	٦٦^{b}	-	۱	۱/۵^{g}	۰/۸^{c}	۳۷^{d}
٦	۵	۵	۵^{d}	٦٦^{b}	-	۱	۲/٤^{g}	۰/۷٤^{c}	۳۵/۵^{e}
۷	۵	۱۰	۵^{d}	۵^{d}	-	۰	۸/۸^{f}	۰/٦٦^{c}	۳۳/۵۳^{e}
۸	۵	۲۰	۱۰۰^{a}	٦۵^{b}	۰/۵-قرمز	۱	۲٤/۳^{c}	٤/٤^{a}	۹۳/۳^{a}
۹	۱۰	۲/۵	۳۰^{c}	۵^{d}	۰/۵- کرم قرمز	۱	۱۰/۷^{e}	۱/۹۵^{b}	٦۷/۷^{b}
۱۰	۱۰	۵	۳۰^{c}	۱۰۰^{a}	۰/۲۵-کرم	۳	۱۲/۲^{d}	۰/۷۵^{c}	٤۵/۵۲^{c}
۱۱	۱۰	۱۰	۳۰^{c}	۵^{d}	۰/۲۵-کرم قرمز	۰	۲/۲^{g}	۱/۸۹^{b}	٦٦/٦^{b}
۱۲	۱۰	۲۰	۳۰^{c}	۵^{d}	۰/۱- قهوه‌ای	۰	۲/۰۹^{g}	۰/۹۸^{c}	۳۵/۳۱^{e}
۱۳	۱۵	۲/۵	٦۵^{b}	٦۵^{b}	۰/۲۵- کرم	۱	۲۷/٤^{b}	۰/٦۹^{c}	۲۳/۳۱^{f}
۱٤	۱۵	۵	۳۳^{c}	٦۵^{b}	۰/۲۵-کرم قرمز	۱	۲۸/٤^{b}	۱/۸۵^{b}	٦۵/٤۲^{b}
۱۵	۱۵	۱۰	٦۵^{b}	٦۵^{b}	۰/٤-کرم	۱	۳٤/۸^{a}	۰/۷۹^{c}	۱۹/۲۳^{g}
۱٦	۱۵	۲۰	٦۵^{b}	۳۳^{c}	۰/۲۵-کرم قرمز	۱	۳۷/۲^{a}	۱/۹^{b}	٦۳/٦٤^{b}

ستون‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشابه باشند دارای تفاوت معنی‌دار با هم نمی‌باشند.

میلی‌گرم بر لیتر IAA با ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر Kin، به ۳۷/۲ میلی گرم بر گرم وزن خشک رسید که خیلی بیشتر از مقادیر گزارش شده در تحقیقات مشابه است (جدول ۲). میزان آلکالوئید در گونه‌های ارمک و جداکشت های درون شیشه با تیمارهای اکسینی و سیتوکینینی بین ۲/۸ تا ۲۷/۹ (Ramawat and Arya, 1977, 1979) و ۱۰ تا ۲۵ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک (Kitani *et al.*, 2009، Kakiuchi *et al.*, 2007) گزارش شده است.

محتوای فنل و فعالیت آنتی‌اکسیدان در جداکشت‌های تیمار شده با اندول‌استیک‌اسید و کینتین پایین‌تر از اندام‌های ریشه، شاخساره و میوه ولی بیشتر از دانه بود (جدول ٤). نتیجه آنالیزواریانس فنل تام و فعالیت آنتی‌اکسیدان جداکشت های تیمار شده با IAA و Kin نشان داد که اثر IAA معنی‌دار ولی Kin به تنهایی اثری ندارد اگر چه اثر متقابل هر دو هورمون با هم معنی‌دار است (جدول ۳). بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و فنل تام در مقادیر کمIAA با مقادیر متفاوت Kin مشاهده شد. فنل تام و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در جداکشت های کالوس‌دار که رنگ قرمز داشتند به طور معنی‌داری بیشتر از جداکشت‌های بدون کالوس و جوانه و یا کالوس‌های کرم بود. این نتایج نشان دادند که رنگ قرمز کالوس ناشی از افزایش ترکیبات فنلی مثل آنتوسیانین‌ها است. در تیمار ۵ میلی‌گرم بر لیتر IAA با ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر Kin و کالوس قرمز، فنل تام (٤/٤ میلی‌گرم بر گرم) و فعالیت آنتی اکسیدانی (۹۳/۳ میکروگرم بر گرم DPPH)، بیشتر از همه تیمارها بود (جدول ٤). مقایسه فنل تام و فعالیت آنتی‌اکسیدان در گیاه وحشی و کالوس حاصل از تیمار سیتوکینین و اکسین، از سه گونه مختلف ارمک نشان داده است که محتوای فنل ٦-۷ برابر و فعالیت آنتی‌اکسیدانی ۳-٤ برابر کالوس است (Parsaeimehr et al., 2010a). مطالعه روی گیاهان مختلف نشان داده‌است که در اکثر گیاهان، همگام با افزایش فنل‌ها و فلاونوئیدها، فعالیت آنتی‌اکسیدان هم افزایش می‌یابد (Ebrahimzade and Bahramian, 2009).

نتیجه گیری:

ریشه و دانه ارمک میانه بیشترین آلکالوئید تام و میوه‌مانند و شاخساره آن بیشترین فنل و فعالیت آنتی‌اکسیدان را داشتند. اندول‌استیک‌اسید و کینتین به ترتیب از هورمون‌های اکسینی و سیتوکینینی هستند که به تنهایی و با اثر متقابل قادر به القای تشکیل کالوس روی جداکشت های گیاه بازدانه ارمک میانه بودند. در بیشتر گیاهان این دو هورمون با هم و در نسبت‌های مساوی کالوس ایجاد می‌کنند ولی به نظر می‌آید جداکشت‌های این بازدانه، دارای هورمون‌های درونی هستند که اثر متقابل هورمون خارجی را برای تشکیل کالوس تحت تأثیر قرار می‌دهد (Smith, 2000).

در القای تشکیل شاخساره روی جداکشت ارمک میانه، کینتین مؤثرتر از اکسین بود. کینتین از سیتوکینین ها یک هورمون جوانه‌زایی است و اثر آن روی این گیاه بی‌ربط با اثر عمومی آن نیست (Smith, 2000). هر دو هورمون روی محتوای آلکالوئید جداکشت‌های ارمک اثر داشتند ولی غلظت بالای اکسین اثر محرک بیشتری برای افزایش آلکالوئید داشت ولی این اثر با افزایش غلظت کینتین افزایش یافت. از آنجایی که اندام هوایی مرکز آمایش آلکالوئیدهاست (Ebrahimzade and Bahramian, 2009)، اکسین و کینتین با افزایش جوانه زایی (تولید شاخساره)، باعث افزایش محتوای آلکالوئید در جداکشت ها شدند. در بین جداکشت های تیمار شده، جداکشت هایی که کالوس قرمز رنگ داشتند با بیشترین فنل تام و بیشترین خاصیت آنتی اکسیدانی، مشابه میوه مانندهای قرمز رنگ ارمک میانه بودند. گیاه طبیعی ارمک در معرض تنش‌های مختلفی است که این تنش‌ها باعث افزایش ترکیبات ثانوی مثل آلکالوئیدها، فنل‌ها و فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌شود ولی در کشت درون‌شیشه تنش‌ها به حداقل رسانده می‌شود و جداکشت ها هتروتروف بوده و نیاز به فتوسنتز و ساخت ترکیبات ثانوی ندارند، به همین دلیل ساخت ترکیبات ثانوی به حداقل می‌رسد مگر اینکه مقادیری از هورمون‌ها ایجاد کننده تنش در محیط جداکشت ها باشند (Whitaker and Hashimoto, 1986). ارمک یک گیاه بازدانه کهن است که در بسیاری از مناطق خشک ایران رویش دارد. این گیاه سرشار از آلکالوئیدهای دارویی مثل افدرین و پزودوافدرین است. به

همین جهت پیشنهاد می‌شود که روی تکثیر این گیاه از طریق کشت درون شیشه و طبیعی، تحقیقات بیشتری انجام بگیرد تا راهی برای استفاده تجاری از این منبع گیاهی با ارزش فراهم شود.

منابع:

قهرمان، ا.(۱۳۸۳) کروموفیت‌های ایران. جلد ۱، نشر دانشگاهی، تهران.

Bagheri, G. and Bigdeli, M. (2009) Inhibitory Effects of *Ephedra major* Host.on *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production. Mycopathology 168: 249-255.

Brand-Williams, Cuvelier, M. E. and Berset, C. W. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Food Science Technology 28: 25–30.

Dehkordi, N. V., Kachouie, M. A., Pirbalouti, A. G., Malekpoor, F. and Rabei, M. (2015) Total phenolic content, antioxidant and antibacterial activities of the extract of *Ephedra procera* Fisch. ET Mey. Acta Poloniae Pharmaceutica Drug Research 72:341-345.

Dhiman, M., Sharma, V. and Moitra, S. (2010) Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Ephedra foliata* (Boiss.); a non-coniferous gymnosperm. Plant Tissue Culture. & Biotechnology 20: 133-143.

Ebrahimzade, M. A. and Bahramian, F. (2009) Antioxidant activity of *Crataegus pentargyna* subsp,elburensis fruits extracts uses in traditional medicine in Iran, Pakistan Journal of Biology Science 12: 413-419.

Friedman, W. E. (1996) Introduction to biology and evolution of the Gnetales. International Journal Plant Science 157: 51–55.

Gamez, E. J. C., Luyengi, L. Lee S. K., Zhu, L. F., Zhou, B. N. and Fong, H. H. S. (1998) Antioxidant flavonoid glycosides from *Daphniphyllum calycinum*. Journal of Natural Product 61: 706–708.

Ganzera, M., Lanser, C. and Stuppner, H. (2005) Simultaneous determination of *Ephedra sinica* and *Citrus aurantium* var. amara alkaloids by ion pair chromatography. Talanta 66: 889-894.

Garla, M., Pratush, A., Kumar, S., Singh, S. and Shivani, S. (2011) *In-vitro* callus induction and shoot regeneration in *Ephedra gerardiana*. Annual Biology Research 2:645-651.

Hegazi, G. and El-Lamy, T. M. (2011) Callus induction and extraction of ephedrine from *Ephedra alata*. American and European Journal of Agriculture Environ Science 11:1:19-25.

Kakiuchi, N., Inoue, K., Tsuda, Y. and Mikage, M. (2007) Survey of *Ephedra* resources in the northern areas of Pakistan and their genetic diversity. Journal of Natural Medical 61: 357-365.

Kitani, Y., Zhu, S., Omote, T., Tanaka, K., Batkhuu, J., Sanchir, C., Fushimi, H., Mikage, M. and Komatsu, K. (2009) Molecular analysis and chemical evaluation of *Ephedra* plants in mongolia. Biolology Pharmacology Bulletin 32: 1235-1243, 907-916.

Konar, R. N. and Singh, M. N. (1979) Production of plantlets from the female gametophyte of *E. foliata* Boiss. Journal Pflanzen physiology 95: 87-90.

Inoko, A., Kakiuchi, N., Yoshimitsu, M., Cai, S. Q. and Mikage, M. (2007) *Ephedra* resource in Sichuan and Yunnan provinces. Biology, Pharmacology Bulletin 32: 1621-1623.

Lodha D., Rathore N., Kataria V. and Shekhawat N. S. (2014) In vitro propagation of female *Ephedra foliata* Boiss. & Kotschy ex Boiss. Physiol Molecular Biology of Plants 20:375-83.

Mofid-Bojnoordi, M., Aghdasi, M., Mianabadi, M. and Nadaf, M., (2015) An investigation on optimization of germination and ephedrine level in *Ephedra major*. Journal of Plant Process and Function 3(:29-38.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Journal of Plant Physiology 15: 473-497.

Nawwar, M. A. M., Barakat, H. H., Buddrust, J. and Linscheidt, M. (1985) Alkaloid, lignan and phenolic constituents of *Ephedra alata*. Phytochemistry 24: 878 – 879.

O'Dowd, N.A., McCauley, G., Wilson, J. A. N., Parnell, T. A. K. and Kavanaugh, D. (1998) *In vitro* culture, micropropagation and the production of ephedrine and other alkaloids. Springer. P.41-354.

Parsaeimehr, A., Sargsyan, E. and Javidnia, K. (2010a) A comparative study of the antibacterial, antifungal and antioxidant activity and total content of phenolic compounds of cell cultures and Wild Plants of Three endemic species of *Ephedra*. Molecule 15: 1668-1678.

Parsaeimehr, A., Sargsyan, E. and Javidnia, K. (2010b) Influence of plant growth regulators on callus induction, growth, chlorophyll, ephedrine and pseudoephedrine contents in *Ephedra procera*. Journal of Medicinal Plant Research 4:13: 1308-1317.

Ramawat, K.G. and Arya, H. C. (1977) Carbohydrate nutrition of *Ephedra* tissue grown in culture. Indian Journal of Experimental Biology 15: 524-527.

Ramawat, K. G. and Arya, H. C. (1979) Alkaloid content of *Ephedra in vivo* and *in vitro*. Indian Journal of Experimental Biology 17: 106-107.

Renaudin, J. P. (1984) Reversed phase High performance liquid chromatographic. J. Chromatography 291: 165-174.

Rice-Evans, C.A., Miller, N. J. and Paganaga G. (1997) Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends Plant Science 2: 152–159.

Sankhla, N., D. Sankhla and U.N. Chatterji, (1967) Production of plantlets from callus derived from root tip of excised embryos of *Ephedra foliata* Boiss. Natural wisdom haft. 54, 349-350.

Singh, M. N. and Konar, R. N. (1981) *In vitro* induction of haploid roots and shoots from female gametophyte of *Ephedra foliata* Boiss. Jornal of Biology Pflanzen 55: 169-177.

Singh, M. N., Konar, R. N. and Bhatnagar, S. P. (1981) Haploid plantlet formation from female gametophyte of *Ephedra foliata* Boiss. *In vitro* Annals Botany 48: 215-220.

Smith, R.H. (2000) Plant tissue culture. Academic Press, San Diego.

Thorburn Burns D., Danzer K. and Townshend A. (2002) Use of the terms "recovery" and “apparent recovery" in analytical proce dures (IUPAC Recommendations 2002). Pure and Applied Chemistry 74: 2201-2205.

Uddin, A. (1977) Production of amino acids in *Ephedra foliata* suspension cultures. Current Science 46: 825-826.

Whittaker, R.J. and Hashimoto, T. (1986) Production of Secondary metabolites. *In:* D.A. Evans et al., Hand book of Plant Cell Culture, vol.4, Macmillan Publishing Co., New York.

Wojdylo, A., Oszmianski, J. and Czemerys, R. (2007) Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. Food Chemistery. 105, 940–949.

Zollman, C. and Vickers, A. (1999) Complementary medicine and the patient. Breeding Medicinal Journal 319 :1486–1494.