

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

عذرا عطایی عظیمی\*، بابک دننواز هاشملویان و عاطفه امیرینیا

گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ساوه، ساوه، ایران  
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۱/۲۶، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۵/۰۶/۰۲)

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 ۲/۵ تا ۱۵ میلی‌گرم بر لیتر اکسین اندول استیک اسید (IAA) و ۲/۵ تا ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر کینتین (Kin)، کشت داده شدند. پودر اندام‌های مختلف ارمک و جداکشت‌های تیمار شده با اکسین و کینتین آن در کشت درون‌شیشه (in vitro)، برای استخراج و سنجش آلکالوئید، فنل و فعالیت آنتی‌اکسیدان استفاده شدند. در کشت درون‌شیشه، 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 ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر اکسین و همه مقادیر کینتین، فنل و آنتی‌اکسیدان بیشتری نسبت به سایر تیمارها داشتند، ولی کالوس قرمز رنگ حاصله از تیمار اکسین ۵ با کینتین ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر، بالاترین فنل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی 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:

جمله است. گیاه ارمک میانه (*E. intermedia*) از گونه‌هایی است که در نواحی اطراف شهرستان ساوه از توابع استان مرکزی می‌روید (قهرمان، ۱۳۸۳). 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

ارمک میانه (*Ephedra intermedia* (Schrenket)) گیاهی دارویی از تیره ارمکسه (Ephedraceae) از گیاهان بی‌گل 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

\*نویسنده مسئول، نشانی پست الکترونیکی: ataei@iau-saveh.ac.ir

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 را تولید کردند (Dhiman et al., 2010). کالوس‌های به دست آمده از تیمار جداکشت‌های ساقه‌ای ارمک ریش بز (*E. procera*) با ۱ میلی گرم بر لیتر کینتین (kin) و ۲ میلی گرم بر لیتر نفتالین استیک اسید (NAA) دارای مقدار زیادی افدرین بودند. افدرین در این کالوس‌ها 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 جداکشت‌های این ارمک‌ها هستند. مقایسه محتوای فنلی و ترکیبات آنتی اکسیدان کالوس‌ها 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 آنتی اکسیدانی اندام‌های گیاه طبیعی ارمک و جداکشت‌های 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 ماندها (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

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 ۴-دی کلروفونوکسی استیک (2,4-D) و ۱ میلی گرم بر لیتر کینتین کالوس‌هایی دارای ۱۴ 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

جدا شد. ۲) pH بخش اسیدی با سود ۱۰ نرمال به ۱۰ رسانده و سپس با حجم مساوی با کلروفورم مخلوط شد. بخش کلروفومی با دکانتور جدا شد.

**سنجش آلکالوئید:** برای سنجش آلکالوئید، بخش کلروفومی 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

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٪) ضد عفونی 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 کیتینین (Kin) و اندول استیک اسید (IAA) کشت داده شدند. این تیمارها شامل مقادیر ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی گرم بر لیتر کیتینین با ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی گرم 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 با 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 اثر به نسبت برابر حل و بخش اتری با دکانتور از بخش اسیدی

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 (۶۶۳ میلی گرم بر گرم ماده خشک) و دانه کمتر از ریشه آلکالوئید داشت، ولی مقایسه میانگین‌ها نشان داد که اختلاف ریشه و دانه معنی‌دار 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 (۱-۰.۳٪)، آلکالوئید هستند. در ارمک میانه آلکالوئید ریشه ۴۸/۲، 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 ماندها در دست نیست. نتایج تجزیه واریانس نمایانگر اختلاف معنی‌دار بین اندام‌ها از نظر فنل تام و فعالیت آنتی اکسیدانی بود (جدول ۱). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که میوه ماندهای قرمز رنگ با ۹/۷۷ میلی گرم بر گرم وزن خشک بیشترین فنل تام و دانه با ۱/۱۶۳ میلی گرم بر گرم وزن خشک کمترین فنل تام دارند. اختلاف فنل بین اندام‌ها معنی‌دار بود (جدول ۲). فعالیت آنتی اکسیدانی اندام‌ها نیز معنی‌دار بود (جدول ۲). فعالیت آنتی اکسیدانی دانه‌ها با اختلاف معنی‌دار بسیار کمتر از اندام‌های دیگر، به ویژه میوه ماندهای قرمز رنگ بود. میوه ماندهای قرمز رنگ ارمک میانه (شکل ۱) بیشترین فنل تام و بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی (۳۲۹ میکروگرم بر

مخلوط، و جذب در طول موج ۷۶۵ نانومتر اندازه گیری و با استفاده از منحنی استاندارد، میزان فنل تام محاسبه شد.

### سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره الکلی اندام‌های گیاه و جداگشت های تیمار شده Kin با IAA:

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- دی فنیل ۲- پیکریل هیدرازیل (DPPH) انجام گرفت. محلول ۰/۱ میلی مولار DPPH در اتانول آماده شد (۰/۰۴ گرم بر لیتر). ۴۰ میکروگرم از عصاره خشک در ۲ میلی لیتر اتانول حل شد (۰/۰۴ 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 ۵۴۰ نانومتر خوانده شد و درصد بازدارندگی با فرمول زیر به ازای ۴۰ میکروگرم در میلی لیتر عصاره، محاسبه شد.

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

I%: درصد بازدارندگی

OD<sub>blank</sub>: جذب شاهد (DPPH و اتانول بدون عصاره)

OD<sub>sample</sub>: 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 کیتین (فاکتور اکسین و کیتین هر کدام در چهار سطح و درون شیشه کشت شد. استخراج آلکالوئید، فنل و سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی هر تکرار (جمعیت)، جداگانه انجام گرفت.

آزمایش بخش اول (نمونه‌های گردآوری شده) در قالب طرح کاملاً تصادفی و آزمایش تأثیر هورمون‌ها به صورت



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

| میانگین مربعات |         | درجه آزادی | منبع تغییرات |
|----------------|---------|------------|--------------|
| آنتی اکسیدان   | فنل     | آلکالوئید  |              |
| ۵۲۶۹۳**        | ۴۶/۵۵** | ۶۷۱/۵۸**   | اندام        |
| ۵              | ۰/۰۳۳   | ۰/۰۹       | خطای آزمایش  |
| ۰/۵۹           | ۰/۶۵    | ۰/۴۹       | ضریب تغییرات |

\* 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

| آنتی اکسیدان (μg/ml) | فنل (mg/g)         | آلکالوئید (mg/g)   | اندام   |
|----------------------|--------------------|--------------------|---------|
| ۱۹۶ <sup>c</sup>     | ۳/۲ <sup>c</sup>   | ۴۶/۴ <sup>a</sup>  | ریشه    |
| ۲۵۸ <sup>b</sup>     | ۷/۵۶ <sup>b</sup>  | ۱۲/۷۱ <sup>b</sup> | شاخساره |
| ۳۲۹ <sup>a</sup>     | ۹/۷۷ <sup>a</sup>  | ۱۸/۳۹ <sup>b</sup> | میوه    |
| ۱۹/۳ <sup>d</sup>    | ۱/۱۶۳ <sup>d</sup> | ۳۱/۱ <sup>a</sup>  | دانه    |

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

بیشتر از شاخساره ارمک ریش‌بز است.

**جداکشت‌های تیمار شده با اکسین (IAA) و کیتین (Kin):** تیمار جداکشت‌های ساقه‌ای ارمک با مقادیر مختلف اکسین و کیتین، 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

میلی لیتر) را داشتند. شاخساره با اختلاف معنی‌دار بعد از میوه بود. عصاره دانه کمترین فنل و کمترین فعالیت آنتی اکسیدان را داشت (جدول ۲). سنجش فنل و فعالیت آنتی اکسیدان 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 ارمک ریش‌بز (*E. procera*) ۰/۷۱۸ میلی گرم 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 ارمک میانه خیلی

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   |                |
| ۷۶۵۳/۹**     | ۲۴۷۹/۶   | ۱۹۴۵/۰۸**  | ۱۵/۹۳۱** | ۲۹۷۶/۸**       | ۳ IAA          |
| ۳۷۵۰/۳**     | ۵۱۵۲/۱** | ۲۰۸/۴۸**   | ۱۶/۸۵۳   | ۴۳۵/۸          | ۳ Kin          |
| ۲۴۹۵/۶**     | ۳۱۸۹/۶** | ۱۰۸/۹۵**   | ۱۹/۵۱۱** | ۱۶۶۰/۸۳**      | ۹ IAA* Kin     |
| ۱۸۵۸/۵       | ۵۶/۲     | ۱/۱۶       | ۰/۰۴۳    | ۱۲/۷           | ۳۲ خطای آزمایش |
| ۰/۷۱         | ۰/۷۲۵    | ۰/۹۳۱      | ۱/۰۸۶    | ۰/۴۴           | - ضریب تغییرات |

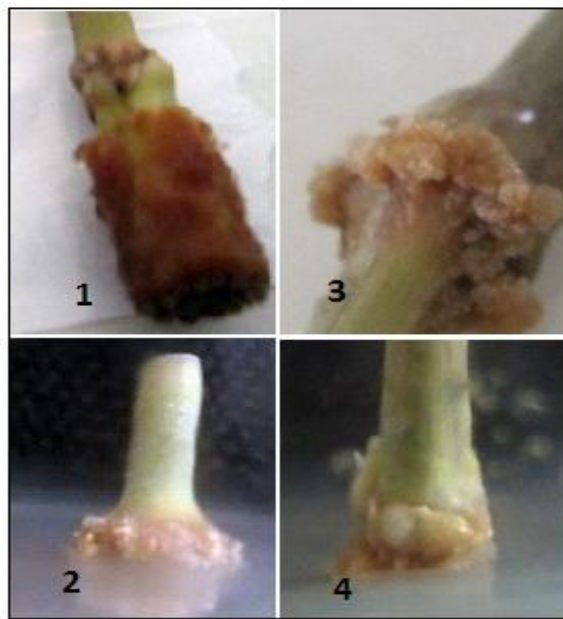
\* و \*\*: به ترتیب معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

اکسین (IAA) و تیمار ۵ دقیقه‌ای با اندول بوتریک اسید (IBA) منجر به تشکیل ریشه روی این شاخساره‌های نوپدید شده است (Lodha et al., 2014). از کالوس جداگشت انتهایی ریشه دانه‌رست ارمک‌رونده، گیاهچه (Sankhla et al., 1967)، از کشت درون شیشه، تخمک ارمک‌رونده 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 جداگشت‌ها اثر دارند. تجزیه واریانس آنها نشان داد که اثر جداگانه و متقابل هر دو هورمون بر محتوای آلکالوئید جداگشت‌ها معنی دار است (جدول ۱). محتوای آلکالوئید شاخساره ۱۲/۷۱ میلی گرم بر گرم بود (جدول ۲) در حالیکه با تیمارهای هورمونی میزان آن ۱/۵ تا ۳۷/۲ میلی گرم بر گرم (جدول ۴) تغییر داشت. میزان بالای IAA (۱۵ میلی گرم بر لیتر) سبب افزایش آلکالوئید تا حدود ۳ برابر شاخساره گیاه طبیعی شد (جدول ۲ و ۴). به عبارتی تیمار ۱۵ میلی گرم بر لیتر IAA بیشترین اثر را روی افزایش محتوای آلکالوئید داشت و این اثر با افزایش غلظت Kin، از ۲/۵ تا ۲۰ میلی گرم بر لیتر بیشتر شد. میزان آلکالوئید در تیمار ۱۵ میلی گرم بر لیتر IAA با ۲/۵ میلی گرم بر لیتر Kin، ۲۷/۴ میلی گرم بر گرم وزن خشک بود که در تیمار ۱۵

تیمارها متنوع بود و ظاهراً ارتباطی با میزان و نوع هورمون نداشت (شکل ۲ و جدول ۴). جداگشت‌های ارمک‌رونده، در تیمارهای اکسین با سیتوکینین، کالوس‌های رویانزا تولید کردند (Dhiman, et al., 2010). از تیمار جداگشت‌های شاخساره‌ای ارمک‌ریش‌بز با ۱ میلی گرم در لیتر کینتین (kin) و ۲ میلی گرم در لیتر نفتالین استیک اسید (NAA) کالوس حاصل شد (Parsaeimehr et al., 2010b).

تجزیه واریانس اثر مقادیر مختلف اکسین (IAA) روی جوانه‌زایی غیر معنی دار ولی اثر مقادیر مختلف Kin و اثر متقابل مقادیر مختلف IAA با مقادیر مختلف Kin، روی جوانه زنی معنی دار بود (جدول ۳). این نتیجه نشان داد که مقادیر مختلف Kin بر جوانه‌زایی جداگشت‌های ساقه‌ای ارمک میانه اثر دارند ولی IAA به تنهایی قادر به القای جوانه‌زایی نیست ولی اگر با مقادیر مختلف Kin همراه شود، اثر دارد. این اثر در مقادیر مختلف هورمون، متفاوت بود (جدول ۴). 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. واگشت چند ساقه‌ای به محیط کشت MS رقیق با نصف غلظت برخی مواد معدنی و دارای



شکل ۲- تشکیل کالوس روی جداگشت‌های ساقه‌ای ارمک میانه با تیمارهای اندول استیک اسید (IAA)، کینتین (Kin).  
 ۱ و ۲: کالوس 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.  
 ۴: کالوس سبز در تیمار ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر IAA با ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر Kin.

جدول ۴- مقایسه میانگین‌های اثر اندول استیک اسید (IAA) و کینتین (Kin) بر کالوسزایی، جوانه‌زایی و آلکالوئید کل جداگشت‌های ارمک میانه

| 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 <sup>c</sup>  | ۵ <sup>d</sup>   | ۰/۵- سبز قرمز           | ۰           | ۰/۹ <sup>g</sup>  | ۲/۵۴ <sup>b</sup> | ۸۶ <sup>a</sup>      |
| ۲     | ۲/۵ | ۵   | ۱۰۰ <sup>a</sup> | ۶۳ <sup>b</sup>  | ۰/۵- سبز قرمز           | ۳           | ۱۰/۸ <sup>e</sup> | ۲/۴۳ <sup>b</sup> | ۷۹/۳ <sup>a</sup>    |
| ۳     | ۲/۵ | ۱۰  | ۱۰۰ <sup>a</sup> | ۳۰ <sup>c</sup>  | ۰/۵- سبز قرمز           | ۱           | ۷/۱ <sup>f</sup>  | ۲/۷ <sup>b</sup>  | ۸۳/۸ <sup>a</sup>    |
| ۴     | ۲/۵ | ۲۰  | ۱۰۰ <sup>a</sup> | ۶۵ <sup>b</sup>  | ۰/۵- سبز                | ۱           | ۸/۷ <sup>f</sup>  | ۲/۱ <sup>b</sup>  | ۶۶/۵ <sup>b</sup>    |
| ۵     | ۵   | ۲/۵ | ۵ <sup>d</sup>   | ۶۶ <sup>b</sup>  | -                       | ۱           | ۱/۵ <sup>g</sup>  | ۰/۸ <sup>c</sup>  | ۳۷ <sup>d</sup>      |
| ۶     | ۵   | ۵   | ۵ <sup>d</sup>   | ۶۶ <sup>b</sup>  | -                       | ۱           | ۲/۴ <sup>g</sup>  | ۰/۷۴ <sup>c</sup> | ۳۵/۵ <sup>e</sup>    |
| ۷     | ۵   | ۱۰  | ۵ <sup>d</sup>   | ۵ <sup>d</sup>   | -                       | ۰           | ۸/۸ <sup>f</sup>  | ۰/۶۶ <sup>c</sup> | ۳۳/۵۳ <sup>e</sup>   |
| ۸     | ۵   | ۲۰  | ۱۰۰ <sup>a</sup> | ۶۵ <sup>b</sup>  | ۰/۵- قرمز               | ۱           | ۲۴/۳ <sup>c</sup> | ۴/۴ <sup>a</sup>  | ۹۳/۳ <sup>a</sup>    |
| ۹     | ۱۰  | ۲/۵ | ۳۰ <sup>c</sup>  | ۵ <sup>d</sup>   | ۰/۵- کرم قرمز           | ۱           | ۱۰/۷ <sup>e</sup> | ۱/۹۵ <sup>b</sup> | ۶۷/۷ <sup>b</sup>    |
| ۱۰    | ۱۰  | ۵   | ۳۰ <sup>c</sup>  | ۱۰۰ <sup>a</sup> | ۰/۲۵- کرم               | ۳           | ۱۲/۲ <sup>d</sup> | ۰/۷۵ <sup>c</sup> | ۴۵/۵ <sup>c</sup>    |
| ۱۱    | ۱۰  | ۱۰  | ۳۰ <sup>c</sup>  | ۵ <sup>d</sup>   | ۰/۲۵- کرم قرمز          | ۰           | ۲/۲ <sup>g</sup>  | ۱/۸۹ <sup>b</sup> | ۶۶/۶ <sup>b</sup>    |
| ۱۲    | ۱۰  | ۲۰  | ۳۰ <sup>c</sup>  | ۵ <sup>d</sup>   | ۰/۱- قهوه‌ای            | ۰           | ۲/۰۹ <sup>g</sup> | ۰/۹۸ <sup>c</sup> | ۳۵/۳ <sup>e</sup>    |
| ۱۳    | ۱۵  | ۲/۵ | ۶۵ <sup>b</sup>  | ۶۵ <sup>b</sup>  | ۰/۲۵- کرم               | ۱           | ۲۷/۴ <sup>b</sup> | ۰/۶۹ <sup>c</sup> | ۲۳/۳ <sup>f</sup>    |
| ۱۴    | ۱۵  | ۵   | ۳۳ <sup>c</sup>  | ۶۵ <sup>b</sup>  | ۰/۲۵- کرم قرمز          | ۱           | ۲۸/۴ <sup>b</sup> | ۱/۸۵ <sup>b</sup> | ۶۵/۴ <sup>b</sup>    |
| ۱۵    | ۱۵  | ۱۰  | ۶۵ <sup>b</sup>  | ۶۵ <sup>b</sup>  | ۰/۴- کرم                | ۱           | ۳۴/۸ <sup>a</sup> | ۰/۷۹ <sup>c</sup> | ۱۹/۲۳ <sup>g</sup>   |
| ۱۶    | ۱۵  | ۲۰  | ۶۵ <sup>b</sup>  | ۳۳ <sup>c</sup>  | ۰/۲۵- کرم قرمز          | ۱           | ۳۷/۲ <sup>a</sup> | ۱/۹ <sup>b</sup>  | ۶۳/۶۴ <sup>b</sup>   |

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

شاخساره آن بیشترین فنل و فعالیت آنتی اکسیدان را داشتند. اندول استیک اسید و کیتین به ترتیب از هورمون‌های اکسینی و سیتوکینینی هستند که به تنهایی و با اثر متقابل قادر به القای تشکیل کالوس روی جداگشت‌های گیاه بازدانه ارمک میانه بودند. در بیشتر گیاهان این دو هورمون با هم و در نسبت‌های مساوی کالوس ایجاد می‌کنند ولی به نظر می‌آید جداگشت‌های 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 جداگشت ارمک میانه، کیتین مؤثرتر از اکسین بود. کیتین از سیتوکینین‌ها یک هورمون جوانه‌زایی است و اثر آن روی این گیاه بی‌ربط با اثر عمومی آن نیست (Smith, 2000). هر دو هورمون روی محتوای آکالوئید جداگشت‌های ارمک اثر داشتند ولی غلظت بالای اکسین اثر محرک بیشتری برای افزایش آکالوئید داشت ولی این اثر با افزایش غلظت کیتین افزایش یافت. از آنجایی که اندام هوایی مرکز آمایش آکالوئیدهاست (Ebrahimzade and Bahramian, 2009)، اکسین و کیتین با افزایش جوانه‌زایی (تولید شاخساره)، باعث افزایش محتوای آکالوئید در جداگشت‌ها شدند. در بین جداگشت‌های تیمار شده، جداگشت‌هایی که کالوس قرمز رنگ داشتند با بیشترین فنل تام و بیشترین خاصیت آنتی اکسیدانی، مشابه میوه ماندهای قرمز رنگ ارمک میانه بودند. گیاه طبیعی ارمک در معرض تنش‌های مختلفی است که این تنش‌ها باعث افزایش ترکیبات ثانوی مثل آکالوئیدها، فنل‌ها و فعالیت آنتی اکسیدانی می‌شود ولی در کشت درون‌شیشه تنش‌ها به حداقل رسانده می‌شود و جداگشت‌ها 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 جداگشت‌ها باشند (Whitaker and Hashimoto, 1986). ارمک یک گیاه بازدانه کهن است که در بسیاری از مناطق خشک ایران رویش دارد. این گیاه سرشار از آکالوئیدهای دارویی مثل افدرین و پزودوافدرین است. به

میلی‌گرم بر لیتر IAA با ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر Kin، به ۳۷/۲ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک رسید که خیلی بیشتر از مقادیر گزارش شده در تحقیقات مشابه است (جدول ۲). میزان آکالوئید در گونه‌های ارمک و جداگشت‌های 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 (Kakuchi et al., 2007) گزارش شده است.

محتوای فنل و فعالیت آنتی اکسیدان در جداگشت‌های تیمار شده با اندول استیک اسید و کیتین پایین‌تر از اندام‌های ریشه، شاخساره و میوه ولی بیشتر از دانه بود (جدول ۴). نتیجه آنالیزواریانس فنل تام و فعالیت آنتی اکسیدان جداگشت‌های 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 آنتی اکسیدانی و فنل تام در مقادیر کم IAA با مقادیر متفاوت Kin مشاهده شد. فنل تام و فعالیت آنتی اکسیدانی در جداگشت‌های کالوس دار که رنگ قرمز داشتند به طور معنی‌داری بیشتر از جداگشت‌های 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 (۴/۴ میلی‌گرم بر گرم) و فعالیت آنتی اکسیدانی (۹۳/۳ میکروگرم بر گرم DPPH)، بیشتر از همه تیمارها بود (جدول ۴). مقایسه فنل تام و فعالیت آنتی اکسیدان در گیاه وحشی و کالوس حاصل از تیمار سیتوکینین و اکسین، از سه گونه مختلف ارمک نشان داده است که محتوای فنل ۶-۷ برابر و فعالیت آنتی اکسیدانی ۳-۴ برابر کالوس است (Parsaeimehr et al., 2010a). مطالعه روی گیاهان مختلف نشان داده است که در اکثر گیاهان، همگام با افزایش فنل‌ها و فلاونوئیدها، فعالیت آنتی اکسیدان هم افزایش می‌یابد (Ebrahimzade and Bahramian, 2009).

### نتیجه گیری:

ریشه و دانه ارمک میانه بیشترین آکالوئید تام و میوه مانند و



همین جهت پیشنهاد می‌شود که روی تکثیر این گیاه از طریق راهی برای استفاده تجاری از این منبع گیاهی با ارزش کشت درون شیشه و طبیعی، تحقیقات بیشتری انجام بگیرد تا 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.
- Ganзера, 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. *Biology 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 Pflanzenphysiology* 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.