

بررسی شرایط بهینه جوانه‌زنی و میزان افدرین در گیاه ارمک (*Ephedra major*)

مرتضی مفید بجنوردی^۱، مهناز اقدسی^{۱*}، منیژه میان آبادی^۱ و محبت نداف^۲

^۱گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گلستان، گرگان، ایران، ^۲گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور بجنورد، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۰/۰۵، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۳/۰۴/۰۲)

چکیده:

ارمک (*Ephedra major*) درختچه‌ای دوپایه متعلق به خانواده افدراسه است. امروزه مشخص شده است که بیشترین اثرات درمانی ارمک مربوط به آلکالوئیدهای افدرین است که در ساقه‌های سبز تجمع می‌یابد. هدف از این تحقیق بررسی جوانه‌زنی گیاه ارمک در شرایط گلخانه و میزان الکلویید کل و افدرین آن است. بذره‌های گیاه از ارتفاعات بجنورد جمع‌آوری و بر روی کاغذ صافی مرطوب و محیط موراشیگ و اسکوگ (MS) تحت دو شرایط کنترل و تیمار سرما کشت شدند. نتایج نشان داد که تیمار سرما اثر معنی‌داری بر جوانه‌زنی بذرها ندارد. به منظور تعیین شرایط بهینه جوانه‌زنی، آزمایش دیگری در قالب طرح بلوک‌های کاملاً تصادفی با شش تیمار بستر کشت (خاک جنگل، خاک جمع‌آوری شده از منطقه بجنورد، مخلوط خاک جنگل و خاک بجنورد، کوکوپیت، کمپوست و ماسه) و با چهار تکرار انجام شد. نتایج نشان داد که بیشترین و کمترین درصد جوانه زنی به ترتیب در خاک جنگل (۹۰٪) و در بستر کمپوست (۸٪) مشاهده می‌شود. همچنین گیاهچه‌های رویش یافته در خاک جنگل بیشترین طول ریشه و ساقه و وزن خشک و تر ساقه و ریشه را نشان دادند. از طرفی دیگر میزان الکلویید کل در ساقه گیاهان ۵ ماهه ارمک رشد یافته بر روی خاک جنگل ۱/۰۴ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک بوده در حالی که در ریشه مقدار الکلویید کل ۰/۰۴ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک است. نتایج حاصل از HPLC نیز نشان داد در حالی که میزان افدرین در ریشه بسیار ناچیز است، میزان افدرین در ساقه ۰/۰۴ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک است.

کلمات کلیدی: الکلویید، ارمک، افدرین، جوانه‌زنی، دانه.

مقدمه:

بدست آمده نشان می‌دهد Genetales با مخروطیان ارتباط نزدیک‌تری دارند (Huang and Price, 2003). خانواده افدراسه تنها یک جنس با نام ارمک دارد. این جنس در ایران دارای ۱۱ گونه است که در بیشتر مناطق مانند اصفهان، جاده قم به کاشان، کرمان، سیستان، فارس، باختران، هرمزگان، قشم، خراسان، بیرجند، کاشمر، تربت‌جام، بجنورد، خوزستان، بوشهر، سمنان، گرمسار، مسیر تهران به قم، جنگل گلستان، رودبار گیلان، آذربایجان، جاده زنجان- تبریز، یزد،

گیاه ارمک با نام علمی *Ephedra major* متعلق به خانواده افدراسه و حد واسط بازدانگان و نهاندانگان است. خانواده افدراسه همانند دیگر اعضای Genetales برخی از ویژگی‌های نهاندانگان نظیر حضور عناصر وسل درجوب، لقاح مضاعف و گرده‌افشانی انتوموفیلیک را نشان می‌دهد. این مشخصات باعث شده که این گروه از گیاهان به عنوان خویشاوندان نزدیک گیاهان گلدار در نظر گرفته شوند. اما اخیراً شواهد مولکولی

فیروزکوه، آبعلی و جاده کرج- چالوس گزارش شده است (اسدی، ۱۳۷۶).

گیاه ارمک درختچه‌ای به ارتفاع ۲۰ تا ۱۵۰ سانتیمتر، دو پایه، بدون کرک، سرشاخه‌های انتهایی نازک به قطر حدود یک میلیمتر به رنگ سبز و یا خاکستری، برگ‌ها به طول ۲ تا ۲/۵ میلیمتر، ۲ عدد تا دو سوم پیوسته و غلافی شکل، ابتدا سفید شفاف ولی بعد قهوه‌ای تیره می‌باشند. ارمک به دو روش رویشی (ریزوم) و زایشی (بذر) تکثیر می‌شود. وجود جمعیت های ارمک در طبیعت و ریزوم‌های افقی که از یک پایه به پایه دیگری به صورت افقی امتداد دارد نشان از تکثیر غیرجنسی گیاه دارد (ارزانی و همکاران، ۱۳۷۹). تکثیر جنسی این گیاه از طریق بذر صورت می‌گیرد. بذرها این گیاه قابلیت زیست بالایی داشته و تا ۱۵ سال قابلیت جوانه زدن دارند اما با گذشت زمان درصد جوانه‌زنی آن کاهش می‌یابد (Meyer, 1998).

آلکالوئید افدرین و مشتقات ایزومری آن مهمترین ترکیبات سازنده گیاه ارمک می‌باشند که بیشترین کاربرد دارویی این گیاه مربوط به همین ترکیبات است. این گیاه در طب سنتی چین در درمان بیماری‌هایی مثل سرماخوردگی، آنفولانزا، برونشیت، گرفتگی بینی، تب یونجه، آرتريت، کهیر، سردرد، دردهای استخوان و مفاصل و کاهش فشارخون توصیه می‌شود. علاوه بر کاربردهای سنتی گیاه، امروزه مکمل‌های غذایی حاوی ارمک برای کاهش وزن و تقویت ماهیچه‌ها در ورزشکاران استفاده گسترده‌ای دارد (Fukushima, 2004). مطالعات بالینی نشان داده‌اند که افدرین دارای اثرات مستقیم و غیرمستقیم روی بدن است. در اثر مستقیم، افدرین به دلیل شباهت ساختاری به آدرنالین، محرک دستگاه سمپاتیکی است که گیرنده‌های و آدرنالین را تحریک می‌کند. همچنین افدرین مانند آمفتامین‌ها باعث تحریک دستگاه عصبی مرکزی می‌شود (Schaneberg et al., 2003; Kim et al., 2010).

میزان و نوع آلکالوئیدهای افدرین بر حسب گونه، وارته، بخش‌های مختلف گیاه، فصل برداشت و ناحیه جغرافیایی و ارتفاعی که گیاه رشد می‌کند متفاوت بوده و در گونه‌های مختلف از ۳/۴ - ۰/۱ درصد متغیر است. افدرین ایزومر اصلی است که در بیشتر موارد ۳۰ تا ۹۰ درصد آلکالوئید کل

راتشکیل می‌دهد (Abourashed et al., 2003). سودوافدرین ایزومر دیگری از افدرین است که اهمیت دارویی دارد. سایر آلکالوئیدها نیز به مقدار ناچیز در گیاه ارمک یافت می‌شوند (Schaneberg et al., 2003). تاکنون انواع دیگری از متابولیت‌های ثانویه مانند فلاوون‌ها، فلاوونول‌ها، تانن‌ها، اسیدهای کربوکسیلیک و ترپن‌های فرار نیز در گیاه ارمک گزارش شده‌است (Abourashed et al., 2003).

گیاه ارمک قدمت طولانی و جایگاه ویژه‌ای در پزشکی دارد. با توجه به اهمیت آلکالوئیدهای افدرین در داروسازی و با توجه به اینکه کشور ما واردکننده این ماده مهم دارویی است، ضرورت بررسی و تحقیق در ارتباط با منابع استخراج یا سنتز این ترکیبات با ارزش احساس می‌شود. لذا در این راستا سعی شده تا در آغاز جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌های ارمک در شرایط آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفته و همچنین میزان الکالوئید کل و افدرین در گیاهان کشت شده مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها:

جمع آوری نمونه‌ها: بررسی‌های اولیه با توجه به ویژگی‌های ظاهری گیاه نشان داد که دو گونه در منطقه رویش دارند. این دو گونه پس از جمع‌آوری جهت شناسایی به آزمایشگاه گیاهشناسی دانشگاه پیام‌نور بجنورد ارسال شد. پس از تشخیص گونه *Ephedra major* بذرها در ماه مرداد ۱۳۹۱ از رویشگاه گیاه ارمک واقع در ۴۵ کیلومتری جنوب شرقی بجنورد با طول و عرض جغرافیایی به ترتیب "۴۴ ۱۹' ۳۷° و "۳۰' ۳۸' ۵۷° جمع آوری شد.

به منظور ضدعفونی کردن، بذرها پس از شستشو با آب، به مدت ۵۰ ثانیه در الکل ۷۰ درجه قرار گرفتند. سپس بذرها به مدت ۵ تا ۷ دقیقه در آب ژاول ۲۰ درصد قرار گرفته و در آخرین مرحله ۵ مرتبه با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. به منظور بررسی اثر تیمار سرما بر میزان جوانه‌زنی، بذرها بر روی کاغذصافی مرطوب و نیز محیط‌کشت پایه MS (Murashige and Skoog, 1962) حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۰/۸ درصد آگار کشت شدند. سپس تحت دو شرایط تیمار بدون سرما و تیمار سرما در دمای ۴ درجه‌ی سانتیگراد

گرم افدرین خالص در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد. منحنی استاندارد بر اساس مقادیر مختلف افدرین رسم شد.

سنجش افدرین به روش HPLC: ۱ گرم بافت گیاهی با ۱۰ میلی لیتر متانول ۵۰ درصد به مدت ۲۰ دقیقه توسط شیکر و در دمای اتاق عصاره گیری و سپس در ۱۵۰۰ دور برای ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. روش استخراج سه مرتبه تکرار و در نهایت حجم عصاره‌ها با متانول ۵۰ درصد به ۵۰ میلی لیتر رسانیده شد عصاره‌ها با فیلتر ۰/۴۵ میکرون فیلتر و به دستگاه HPLC تزریق شدند. به منظور سنجش افدرین از دستگاه HPLC با آشکار ساز UV/VIS، دکتور Diod Array، پمپ L-Merck Hitachi 7100 با نرم‌افزار EZ chrome (Hitachi- Japon) به روش ایزوکراتیک استفاده شد (Sheu et al., 2001). فاز متحرک شامل محلول ۰/۱٪ اسید فسفریک، محلول ۲۵ میلی مولار سدیم دودسیل سولفات (SDS) و استونیتریل ۴۰/۷٪ بود. فاز تهیه شده به مدت ۱۵ دقیقه در دستگاه اولتراسونیک در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا حباب‌های هوا از آن خارج شود. سپس فاز تهیه شده در دستگاه فیلتراسیون با فیلتر ۰/۴۵ میکرون صاف شد. مقدار جریان ۰/۸ سی سی بر دقیقه و طول موج ۲۱۰nm بود. مدت زمان خروج نمونه‌ها از ستون ۴۵ دقیقه بود. به منظور رسم منحنی استاندارد، محلول‌هایی با غلظت‌های ۰، ۰/۰۰۰۴، ۰/۰۰۰۸، ۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۱۴ میلی‌گرم از افدرین تهیه و به دستگاه HPLC تزریق شد. منحنی استاندارد بر اساس مقادیر مختلف افدرین رسم گردید.

تجزیه شیمیایی خاک: میزان هدایت الکتریکی خاک با استفاده از عصاره اشباع و هدایت سنج الکتریکی (EC متر)، اسیدیته خاک (pH) با استفاده از گل اشباع و pH متر، درصد گچ (CaSO₄) به روش استون، درصد ازت کل به روش کج‌دال، بافت خاک به روش هیدرومتری بایکاس و درصد آهک خاک (CaCO₃) با اندازه گیری مواد خنثی شونده بر حسب کربنات کلسیم (درصد T.N.V) و با استفاده از تیتراسیون اندازه‌گیری شد (غازان‌شاهی، ۱۳۷۶).

روش آماری: آنالیز آماری داده‌ها، توسط نرم‌افزار SPSS انجام گرفت. از آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون دانکن جهت

به مدت ۱ هفته قرار داده شدند. برای هر تیمار ۱۰ عدد پتری و در هر پتری ۱۰ عدد بذر قرار داده شد. جوانه‌زنی و رشد بعدی بذرها به مدت ۴ هفته مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی جوانه زنی بذر در خاک: آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با شش تیمار بستر کشت (خاک جمع‌آوری شده از منطقه رویش گیاه در بجنورد، خاک جنگل نهارخوران گرگان که از این پس به اختصار خاک جنگل ذکر می‌شود، کوکوپیت، کمپوست و ماسه) و با چهار تکرار (۴ گلدان) انجام شد. در هر گلدان ۱۰ عدد بذر در عمق ۱-۲ سانتی متری کشت شدند. گلدان‌ها در شرایط گلخانه در فاصله فروردین ماه تا مرداد نگهداری شدند. تا شروع جوانه زنی آبیاری هر دو روز یک بار و پس از آن هر ۴ روز یک بار انجام شد.

$$\text{درصد جوانه زنی} = \frac{\text{تعداد بذر جوانه زده}}{\text{تعداد کل بذرها کاشته}} \times 100$$

عصاره گیری: در این روش ۰/۱ گرم بافت گیاهی توزین و در ۱۰ میلی لیتر متانول ۸۰ درصد به مدت ۲۴ ساعت خیسانیده و سپس عصاره بدست آمده صاف شد. عملیات عصاره‌گیری سه بار تکرار و در نهایت عصاره‌ها با هم ترکیب شدند. حجم نهایی عصاره‌ها با متانول ۸۰٪ به ۳۰ میلی لیتر رسانیده شد.

سنجش آلکالوئید کل: سنجش آلکالوئید کل با روش اسپکتروفتومتری انجام شد (Shamsa et al., 2008). در این روش، ۵/۵ میلی لیتر از عصاره متانولی بدست آمده در ۱ میلی لیتر اسید هیدروکلریک غلیظ حل و پس از ۳۰ دقیقه صاف شد. سپس عصاره صاف شده سه بار با ۱۰ میلی لیتر کلروفرم شستشو داده شده و فاز آبی جدا شد. فاز آبی حاصل با سود ۰/۱ نرمال خنثی شد (pH:7). سپس عصاره با ۵ میلی لیتر معرف برومکروزول گرین و ۵ میلی لیتر بافر فسفات pH: 4.7 مخلوط و فاز کلروفرمی زرد رنگ حاوی آلکالوئیدها در لوله آزمایش جمع‌آوری و حجم آن با کلروفرم به ۱۰ میلی لیتر رسانده شد. مقدار جذب عصاره در طول موج ۴۷۰nm نانومتر خوانده شده و با استفاده از منحنی استاندارد میزان آلکالوئید کل عصاره‌ها تعیین گردید. برای رسم منحنی استاندارد، ۱ میلی

مشخص نمودن اختلاف معنی‌دار بین نتایج استفاده شد. رسم نمودارها و جداول توسط نرم‌افزار اکسل صورت گرفت.

نتایج:

تجزیه شیمیایی خاک: نمونه خاک جمع‌آوری شده از منطقه رویش ارمک و نمونه خاک سطحی جنگل نهارخوران گرگان بر طبق روش‌های استاندارد تجزیه خاک مورد تجزیه شیمیایی قرار گرفت (جدول ۱). این نتایج نشان می‌دهد که بافت خاک منطقه نمونه‌برداری، لومی‌سیلتی بوده و خاک از نوع آهکی با pH قلیایی ضعیف و شوری نسبتاً کم است. نمونه خاک جنگل نهارخوران نیز دارای بافت لومی‌سیلتی بوده و در مقایسه با خاک منطقه نمونه‌برداری (بجنورد) دارای مقادیر بیشتر درصد ازت و کربن آلی و مقادیر کمتر آهک و EC می‌باشد. pH خاک جنگل تقریباً خنثی است.

اثر تیمار سرما بر جوانه‌زنی بذر: نتایج حاصل از بررسی جوانه‌زنی بذر بر روی کاغذ صافی مرطوب و محیط کشت MS نشان داده که بعد از ده روز جوانه‌زنی شروع شده و بعد از مدت سه هفته تمامی بذرهای جوانه زدند. اما تیمار سرما اثر معنی‌داری بر جوانه زنی بذرهای نشان نداده است (جدول ۲). اگر چه تمامی بذرهای کاشته شده بعد از مدت ۳ هفته جوانه زدند اما تعداد کمی از بذرهای مراحل بعدی رشد و نمو را نشان داده و سبز شدند. به‌طوریکه بعد از مدت یک ماه تنها ۱۲ درصد از بذرهای رویش یافته بر روی کاغذ صافی که با سرما تیمار شدند گیاهچه تولید کردند. از بین بذرهایی که بر روی کاغذ صافی و بدون تیمار سرما جوانه زدند تنها ۱۵ درصد بذرهای گیاهچه تولید کرده و سبز شدند. از طرفی دیگر تنها ۲ درصد بذرهایی که در محیط کشت MS و با تیمار سرما جوانه زدند سبز شدند. همچنین باید خاطر نشان کرد که گیاهچه‌های رویش یافته در محیط کشت MS رشد بسیار کندی داشتند.

بررسی جوانه‌زنی بذر در خاک: توجه به درصد پایین تولید گیاهچه‌های ارمک بر روی کاغذ صافی مرطوب و محیط کشت MS، جوانه‌زنی بذر و رشد گیاهچه در بسترهای مختلف خاک بجنورد، خاک جنگل، مخلوط خاک جنگل و خاک بجنورد، کوکوپیت، کمپوست و ماسه مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج حاصل نشان داده که اولین گیاهچه در بسترهای مختلف کشت در هفته سوم تا چهارم ظاهر می‌شوند (شکل ۱-a و ۱-b). بیشترین درصد جوانه‌زنی در خاک جنگل (۹۰ درصد) و کمترین درصد جوانه‌زنی در بستر کشت کمپوست (۸ درصد) مشاهده شد (جدول ۳). این نتایج نشان داد که درصد جوانه زنی در بسترهای مختلف کشت اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد. در بین گیاهچه‌های رویش یافته در خاک جنگل، کوکوپیت، ماسه و مخلوط خاک جنگل و خاک بجنورد تعدادی از گیاهچه‌ها سفید رنگ بوده و قادر به سنتز کلروفیل نبودند (شکل ۱-c). درصد فراوانی این گیاهچه‌ها در بسترهای مختلف کشت متفاوت بود. بیشترین درصد گیاهچه‌های سفید در بین گیاهچه‌های کشت شده در خاک جنگل (۱۷ درصد) و کوکوپیت (۱۷/۵) و کمترین درصد گیاهچه‌های سفیدرنگ در بستر ماسه (۵ درصد) مشاهده شد. این گیاهچه‌ها قادر به رشد نبوده و پس از گذشت سه الی چهار هفته از بین رفتند. اما در بذرهای کشت شده در خاک بجنورد و ماسه گیاهچه‌های سفیدرنگ مشاهده نشد. گیاهچه‌های سبز رشد یافته در بسترهای کوکوپیت و کمپوست دارای ریشه‌های سستی بوده و رشد کندی داشتند. گیاهچه‌های سبز رشد یافته در خاک بجنورد و ماسه نیز رشد بسیار کندی داشته و بعد از گذشت چهار ماه فقط دو گره بر روی ساقه تشکیل دادند. اما گیاهچه‌های رشد یافته در خاک جنگل بعد از گذشت پنج ماه با تشکیل ۸ گره روی ساقه، بهترین شرایط رشد را نشان دادند (شکل ۱-d و ۱-e).

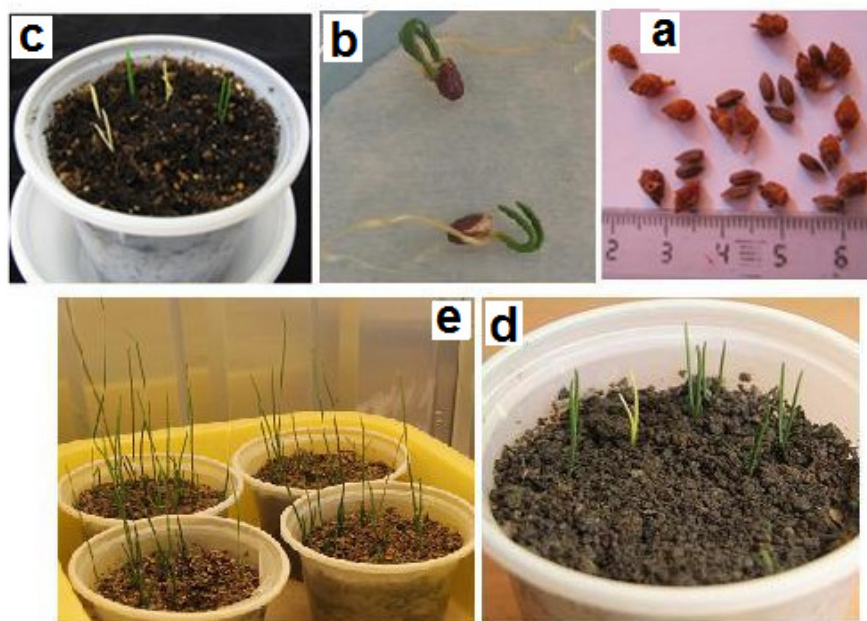
اندازه‌گیری طول ریشه و ساقه گیاهچه‌های ۵ ماهه کشت شده در بسترهای مختلف نشان داده که بیشترین طول ریشه و ساقه در گیاهچه‌های رشد یافته در خاک جنگل مشاهده شده در حالی که کمترین طول ریشه و ساقه در گیاهچه‌های رشد یافته در بستر کمپوست دیده می‌شود (شکل ۲-a). از طرفی دیگر اندازه‌گیری وزن تر ساقه و ریشه نشان داد که گیاهچه‌های رشد یافته در خاک جنگل بالاترین وزن تر ساقه و ریشه را داشته در حالی که گیاهچه‌های رشد یافته در خاک بجنورد کمترین میزان وزن تر ساقه و ریشه را نشان می‌دهند. همچنین نتایج نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین وزن تر ساقه گیاهچه‌های رشد یافته در مخلوط خاک جنگل و بجنورد با گیاهچه‌های رشد یافته در

جدول ۱- تجزیه شیمیایی نمونه خاک منطقه رویش گیاه و خاک سطحی جنگل نهارخوران گرگان (عناصر مورد بررسی به درصد بوده و میزان EC خاک ds/m می‌باشد).

محل جمع آوری	نوع بافت	ماسه	لای	رس	ازت کل	کربن	آهک	EC	pH
بجنورد	لومی-سیلیسی	۲۰	۵۶	۲۴	۰/۱۴	۱/۴۴	۱۷	۳/۸	۷/۵
جنگل	لومی-سیلیسی	۴۰	۵۰	۲۶	۰/۴۲	۷/۱	۲/۵	۱/۳	۷

جدول ۲- درصد جوانه‌زنی بذر و تولید گیاهچه ارمک بر روی کاغذ صافی مرطوب و محیط کشت پایه MS در شرایط بدون و با تیمار سرما

درصد جوانه زنی		درصد گیاهچه های تولید شده		
بدون تیمار سرما	با تیمار سرما	بدون تیمار سرما	با تیمار سرما	
۱۰۰ ± ۰/۰ ^a	۱۰۰ ± ۰/۰ ^a	۱۵ ± ۱/۲۹ ^a	۱۲ ± ۱/۸۳ ^a	محیط کشت
۱۰۰ ± ۰/۰ ^a	۱۰۰ ± ۰/۰ ^a	۳ ± ۱/۱۸ ^b	۲ ± ۱/۰۸ ^b	کاغذ صافی مرطوب
				محیط کشت MS



شکل ۱- رشد گیاه ارمک در بسترهای مختلف: (a) بذر ارمک، (b) بذر جوانه زده، (c) گیاهچه‌های یک ماهه سبز و سفید در بستر کوکوپیت، (d) گیاهچه‌های یک ماهه سبز و سفید رشد یافته در خاک جنگل و (e) گیاهان پنج ماهه رشد یافته در خاک جنگل.

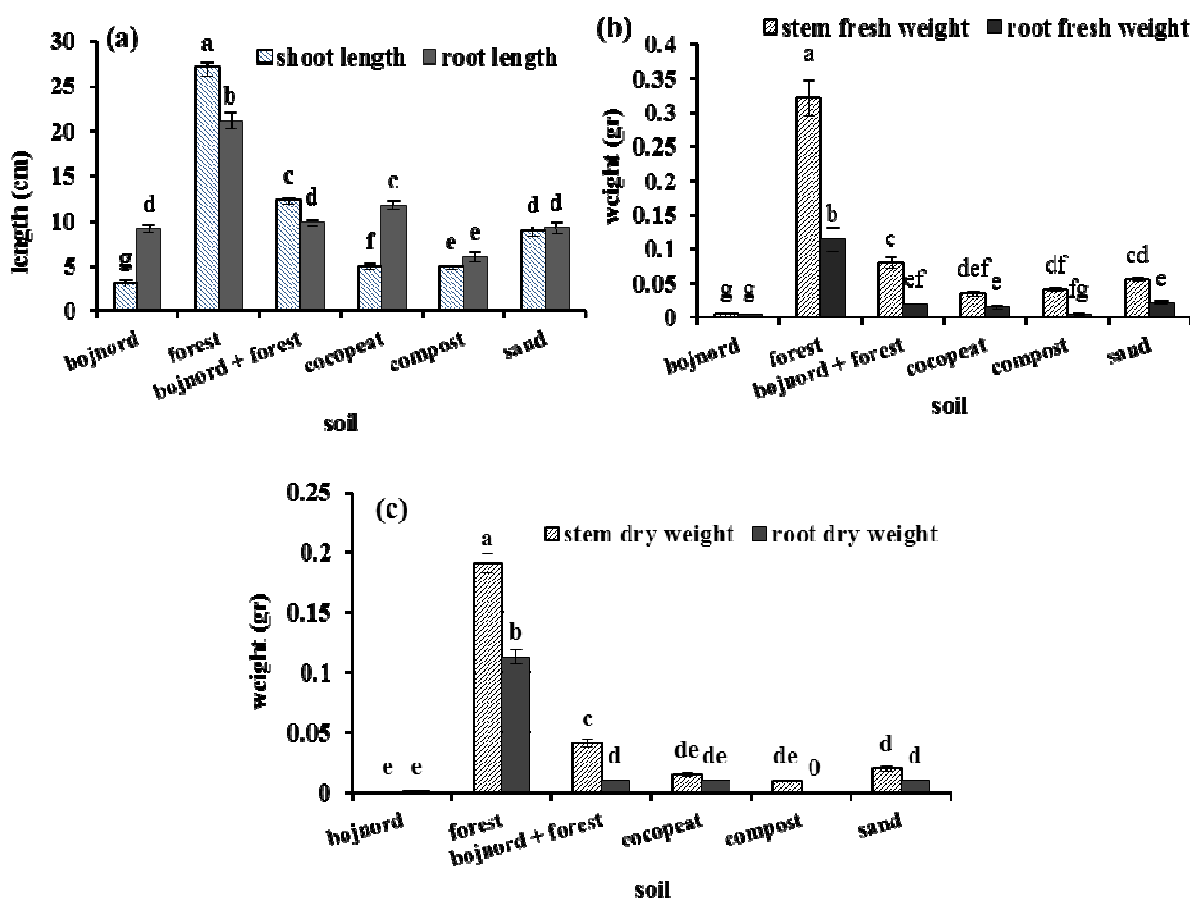
در گیاهچه‌های رشد یافته در خاک بجنورد مشاهده شده است. همچنین نتایج نشان داد که وزن خشک ساقه در گیاهچه‌های رشد یافته در بستر کوکوپیت، کمپوست و ماسه اختلاف معنی داری را نشان نمی‌دهد. همچنین اختلاف معنی داری بین وزن خشک ریشه در گیاهچه‌های رشد یافته در بستر ماسه، کمپوست، کوکوپیت و مخلوط خاک جنگل و خاک بجنورد دیده نمی‌شود (شکل ۲- c).
میزان آلکالوئید کل در گیاهان کشت شده در خاک جنگل:

بستر ماسه و نیز گیاهچه‌های رشد یافته در بستر کوکوپیت و کمپوست وجود ندارد. همچنین اختلاف معنی داری بین وزن تر ریشه در گیاهچه‌های رشد یافته در بستر کوکوپیت، ماسه و مخلوط خاک جنگل و بجنورد وجود ندارد (شکل ۲- b).
اندازه گیری وزن خشک ساقه و ریشه گیاهچه‌های رشد یافته در بسترهای مختلف نشان داد بالاترین وزن خشک ریشه و ساقه در گیاهچه‌های رشد یافته در خاک جنگل دیده شده و کمترین آن

جدول ۳- درصد جوانه‌زنی، رویش بذر و تعداد گره تشکیل شده در گیاه ارمنک (*Ephedra major*) در بسترهای مختلف کشت.

نوع خاک	جوانه زنی	گیاهیچه سبز	گیاهیچه سفید	گیاهیچه زنده	تعداد گره
بجنورد	$20 \pm 1/22^d$	$100 \pm 0/0^a$	$0 \pm 0/0^d$	$100 \pm 0/0^a$	$1/6 \pm 0/18^e$
جنگل	$90 \pm 1/25^a$	$81 \pm 1/47^b$	$19 \pm 1/14^c$	$81 \pm 1/05^b$	$8/5 \pm 0/18^a$
بجنورد+جنگل	$50 \pm 1/02^c$	$80 \pm 0/96^b$	$20 \pm 1/09^c$	$80 \pm 1/29^c$	$5/75 \pm 0/25^b$
کوکوپیت	$70 \pm 1/4^b$	$75 \pm 1/34^c$	$25 \pm 1/41^a$	$39 \pm 1/31^d$	$2/5 \pm 0/18^d$
کمپوست	$8 \pm 0/4^e$	$100 \pm 0/0^a$	$0 \pm 0/0^d$	$100 \pm 0/0^a$	$3/4 \pm 0/18^c$
ماسه	$22/5 \pm 1/07^d$	$78 \pm 1/19^c$	$22 \pm 1/12^b$	$44 \pm 1/2^c$	$3/03 \pm 0/07^f$

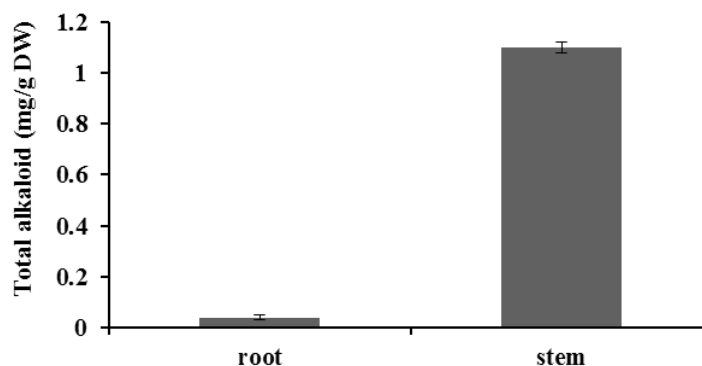
*حروف مشترک نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد است. (اعداد بدست آمده نشان دهنده میانگین داده‌ها \pm انحراف استاندارد است).



شکل ۲- (a) میانگین طول ساقه و ریشه، (b) میانگین وزن تر ریشه و ساقه و (c) میانگین وزن خشک ریشه و ساقه در گیاهان ارمنک کاشته شده در بسترهای مختلف پس از ۵ ماه. (هر ستون نشان دهنده میانگین داده‌ها \pm انحراف استاندارد است). حروف مشترک نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد است.

نتایج حاصل از مقایسه میانگین میزان آلکالوئید در گیاهان کشت شده در خاک جنگل با استفاده از آزمون T نشان داد که بین میانگین الکلویید کل در دو اندام ریشه و ساقه در سطح یک

نتایج بدست آمده نشان داد که میزان آلکالوئید کل در ساقه $1/10$ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک است که ۲۷ برابر بیشتر از این میزان در ریشه ($0/04$ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) است (شکل ۳-).



شکل ۳- میزان آلکالوئید کل در ساقه و ریشه گیاه ارمک (*Ephedra major*) هر ستون نشان‌دهنده میانگین داده‌ها ± انحراف معیار است.

جدول ۴- آزمون T دو نمونه مستقل مربوط به میزان آلکالوئید کل و افدرین در ساقه و ریشه گیاه ارمک (*Ephedra major*).

منبع تغییرات	درجه آزادی	ارزش T
میزان الکلویید کل	۳	۵۲/۰۵۱*
میزان افدرین	۳	۳۷/۱۶۵*

* در سطح کمتر از یک درصد معنی‌دار است.

درصد تفاوت معنی‌دار وجود دارد (جدول ۴).

میزان افدرین در گیاهان کشت شده در خاک جنگل:

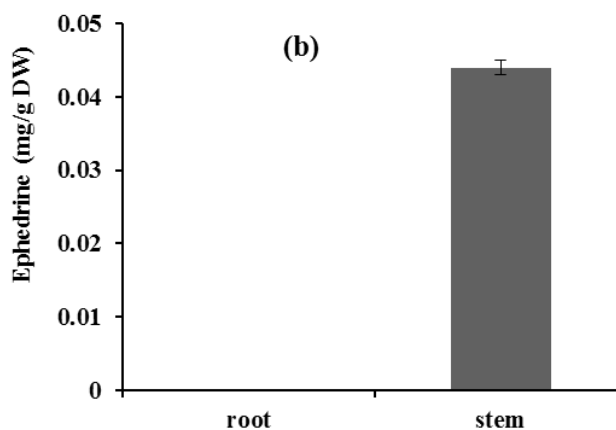
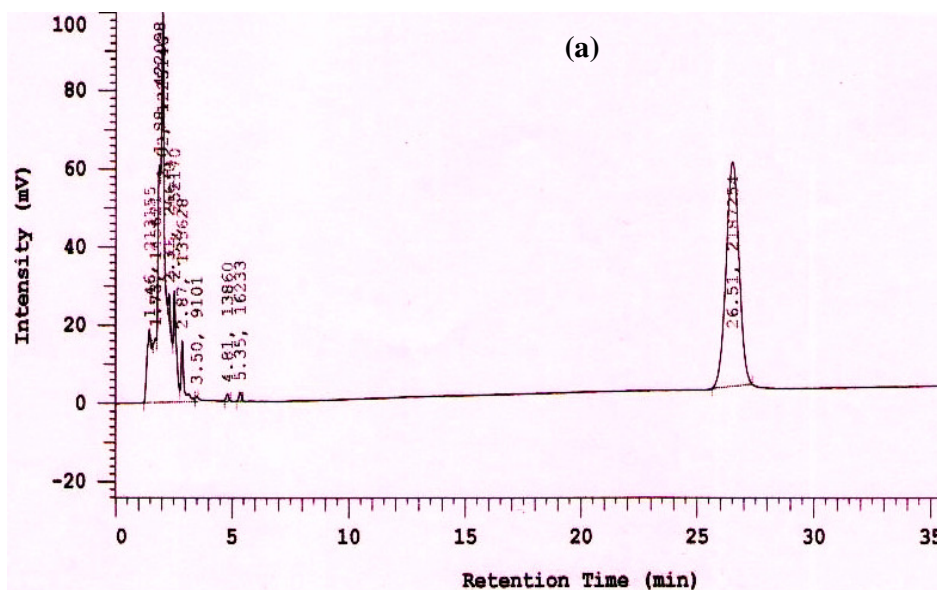
نتایج حاصل از اندازه‌گیری افدرین با استفاده از دستگاه HPLC نشان داد که میزان افدرین در ساقه ۰/۰۴ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک بوده، در حالی که میزان افدرین در ریشه بسیار ناچیز می‌باشد (شکل ۴-ا و ۴-ب). نتایج حاصل از مقایسه میانگین میزان افدرین با استفاده از آزمون T نشان داد که بین داده‌ها در سطح یک درصد تفاوت معنی‌دار وجود دارد (جدول ۴).

بحث:

نتایج بدست آمده از این تحقیق نشان داد که خاک جنگل مناسب‌ترین بستر جهت جوانه‌زنی و رشد بعدی گیاهچه‌های ارمک است. به طوری که بالاترین میزان طول و وزن خشک و تر ریشه و ساقه در گیاهچه‌های رشد یافته در خاک جنگل مشاهده شده است. در حال حاضر اطلاعات چندانی در ارتباط با جوانه‌زنی بذر ارمک (*Ephedra major*) وجود ندارد و گزارش‌های موجود بیشتر در خصوص گونه‌های بومی چین یا آمریکا می‌باشد. Segibateer و همکاران (۲۰۰۹) روش‌های مختلف استریفیکاسیون را بر روی بذر *Ephedra sinica*

بررسی کرده و نشان دادند که درصد جوانه‌زنی در بذرهایی که هیچ تیماری بر روی آنها اعمال نشده ۴۴ درصد، بذرهایی که به مدت ۱۲ ساعت در آب خیسانده شده بودند ۶۱ درصد، بذرهایی که به مدت ۱۲ ساعت با آب شستشو داده شده بودند ۷۹/۹ درصد و بذره‌های تیمار شده با اسید جیبرلیک ۹۴ درصد است. نتایج تحقیق حاضر و نیز نتایج Seqinbateer و همکاران (۲۰۰۹) نشان می‌دهد که بذر ارمک حاوی عوامل بازدارنده‌ای است که مانع جوانه‌زنی آن می‌شود. به هر حال در نتایج حاضر، تمامی بذره‌های کشت شده بر روی کاغذ صافی مرطوب و محیط کشت MS جوانه زده اما قادر به ادامه مراحل رشد و نمو نبودند.

با توجه به اینکه درصد رطوبت در کاغذ صافی مرطوب و محیط کشت MS بالا می‌باشد، به نظر می‌رسد که رطوبت بالا یکی از عوامل بازدارنده رویش گیاهچه‌های گیاه ارمک باشد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تیمار سرما بر جوانه زنی بذر ارمک بی تأثیر است. اما Young و همکاران (۱۹۷۷) در تجربیات خود بر روی جوانه زنی بذر *Ephedra navadensis* که در بیابان‌های آمریکا رشد می‌کند نشان دادند تیمار سرما سبب افزایش ۴۰ درصدی جوانه‌زنی بذرها می‌شود. با توجه



شکل ۴- (a) کروماتوگرام عصاره متانولی گیاه ارمنک (*Ephedra major*). پیک مربوط به افدرین با فلش مشخص شده است و (b) میزان افدرین در ساقه و ریشه گیاه ارمنک. هر ستون نشان‌دهنده میانگین داده‌ها \pm انحراف معیار است.

رشد ارمنک فراهم کرده است. باهرنیک (۱۳۸۱) نیز در مطالعات خود نشان داده که گونه های *Ephedra major* و *Ephedra procera* تنها گونه‌هایی هستند که علاوه بر رویش در مناطق رویشگاهی ایران- تورانی، در مناطق هیرکانی نیز پراکنش وسیعی دارند. با توجه به این گزارش به نظر می‌رسد این دو گونه توانایی سازگاری با شرایط اقلیمی متفاوت و در خاک‌هایی با درصد املاح و مواد آلی متغیر را دارند. با توجه به درصد پایین جوانه‌زنی بذر در خاک بجنورد به نظر می‌رسد گیاه در این شرایط بیشتر با تکثیر غیرجنسی با ریزوم‌های رونده گسترش یافته است. البته پراکندگی دسته‌های جدا از هم

به تفاوت الگوی پراکنش جغرافیایی بین *Ephedra major* و *Ephedra nevadensis* احتمال می‌رود که شرایط جوانه‌زنی و رشد این دو گونه از یکدیگر متفاوت باشد.

نتایج حاصل از درصد جوانه‌زنی در بسترهای مختلف مورد بررسی نشان داد که خاک جنگل نهارخوران گرگان با بیشترین درصد جوانه‌زنی (۹۰ درصد) بهترین بستر کشت برای ارمنک است. مقایسه نتایج آنالیز خاک منطقه رویش ارمنک (بجنورد) با خاک جنگل نشان می‌دهد که خاک جنگل با داشتن مواد آلی زیاد، درصد ازت بیشتر، EC و درصد آهک کمتر نسبت به خاک بجنورد شرایط بهتری برای جوانه‌زنی و

را دارا است. در تحقیق حاضر نیز میزان الکلویید کل در گیاهچه های ۵ ماهه تقریباً ۱/۰٪ بوده است. در مجموع نتایج حاضر نشان داده که خاک جنگل بستر مناسبی برای کشت و تولید افدرین از این گیاه می‌باشد. علاوه بر این گیاه ارمک اغلب در مناطق خشک و بیابانی با شدت نور زیاد و دمای بالا یا در مناطق کوهستانی با شیب تند و سطح سفره آب زیرزمینی پایین رشد می‌کند (Dhiman et al., 2010).

نتیجه‌گیری کلی:

ارمک گیاهی فوق‌العاده مقاوم به خشکی و تغییرات شدید دما (۵۰+ تا ۳۰- درجه سانتیگراد) است. به نظر می‌رسد با توجه به سازگاری گیاه با شرایط آب و هوایی مختلف ممکن است بتوان از این گیاه علاوه بر تولید افدرین در طرح‌های بیابان‌زادایی مخصوصاً در نواحی خشک و کم‌بارش استفاده کرد.

سپاسگزاری:

نویندگان مقاله از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه گلستان به جهت حمایت مالی این تحقیق نهایت تشکر و قدردانی را دارند.

غازان‌شاهی، ج، (۱۳۷۶) آنالیز خاک و گیاه، انتشارات هما. صفحات ۱۳۵-۲۱.

کاشکی، م. (۱۳۷۹) بررسی پیرامون گونه‌های ارمک در ایران از جهت تولید افدرین و پزدوافدرین طرح تحقیقاتی مرکز تحقیقات منابع طبیعی و امور دام استان خراسان.

Abourashed, E. A., Abir, T., El-Alfy, A.T., Khan, I. A. and Walker, L. (2003) Ephedra in perspective – a current review. *Phytotherapy Research* 17: 703-712.

Fukushima, k. (2004) Bioactivity of Ephedra: integrating cytotoxicity assessment with real- time biosensing. the Faculty of the Graduate School of the University of Maryland, College Park, in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science.

Huang, J. and Price, R. A. (2003) Estimation of the Age of Extant Ephedra Using Chloroplast *rbcL* Sequence Data. *Molecular Biology and Evolution* 20: 435-440

Kim, I. S., Park Y. J., Yoon S. J., Lee, H. B. (2010) Ephedrin A and B from roots of *Ephedra sinica* inhibit

در شیب‌های کوهستانی، نشان از تکثیر گیاه با بذر می‌باشد (مشاهدات عینی نویسنده از منطقه نمونه‌برداری).

اندازه‌گیری الکلویید کل و میزان افدرین در ساقه و ریشه گیاهچه‌های ۵ ماهه کشت شده در خاک جنگل نشان داده که در ریشه میزان الکلویید کل در مقایسه با ساقه بسیار اندک است. همچنین در ریشه میزان افدرین بسیار ناچیز است. میزان نوع آلکالوئیدهای افدرین بر حسب گونه، وارسته، بخش‌های مختلف گیاه، فصل برداشت و ناحیه جغرافیایی و ارتفاعی که گیاه در آن رویش می‌یابد، متفاوت است. تاکنون بالاترین میزان افدرین در *Ephedra sinica* به میزان ۴/۳٪ وزن خشک گزارش شده است. در حالی که در گونه‌های دیگر نظیر *Ephedra equistina* و *Ephedra monosperma* تا ۵/۲٪ وزن خشک گزارش شده است (Schaneberg et al., 2003, Fukushima, 2004). باهر نیک و همکاران (۱۳۷۹) نیز با جمع‌آوری ۹ گونه مختلف ارمک از مناطق مختلف ایران و اندازه‌گیری افدرین در این گیاهان نشان دادند که بیشترین مقدار افدرین در *Ephedra amajor* به میزان ۱/۸٪ - ۰/۸٪ دیده می‌شود. همچنین کاشکی و همکاران (۱۳۷۹) با شناسایی گونه‌های مختلف ارمک در خراسان اندازه‌گیری آلکالوئید کل نشان دادند که *E. major* بیشترین میزان آلکالوئید کل (۰/۹٪)

منابع:

- ارزانی، ح.، مظفری، م.، مقدم، م.ر.، دادخواه، م. (۱۳۷۹) بررسی بوم‌شناختی گونه‌های *Ephedra spp* در منطقه بیارجمند شاهرود. مجله منابع طبیعی ایران. ۲: ۹۹-۱۱۱.
- اسدی، م. (۱۳۷۶) فلور ایران، شماره ۲۲: تیره ارمک. مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع.
- باهر، ز.، احمدی، ل.، باباخانلو، پ. (۱۳۷۹) بررسی مقایسه‌ای مقادیر آلکالوئیدهای افدرین و پزدوافدرین در گونه‌های ارمکی ایران. تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران. ۶: ۴۸-۶۵.
- باهرنیک، ز. (۱۳۸۱) بررسی ویژگیهای گیاه‌شناختی و اکولوژیکی گونه‌های مختلف جنس ارمک در ایران. مجله تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران. ۱: ۵۳-۷۵.

- Schaneberg, B. T., Crockett, S., Bedir, E. and Khan, I. A. (2003) The role of chemical fingerprinting: application to *Ephedra*. *Phytochemistry* 62: 911–918.
- Seqinbater, A., Khasbagan, X., Wurina, B. and Wei, X. J. (2009) Study on physiological characteristics of seed germination of *Ephedra sinica*. *Journal of Chinese Medicinal Materials* 32: 656–659.
- Sheu, S. J. and Huang, M. H. (2001) Determination of Ephedra alkaloids by high performance liquid chromatography. *Chromatographia* 54: 117–119.
- Young, J. A., Evans, R. A. and Kay, B. L. (1977) Ephedra seed germination. *Agronomy Journal* 61: 209–211.
- lipopolysaccharide-induced inflammatory mediators by suppressing nuclear factor- κ B activation in RAW 264.7 macrophages. *International Immunopharmacology* 10: 1616–1625.
- Meyer, S. E., Kitchen, S. G., Wilson, G. R. and Stevens, R. (1988) Proposed rule: *Ephedra Viridis* greenmormon tea. *Association of Official Seed Analysts Newsletter* 62: 18–19.
- Murashige T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology* 15: 473–479