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]

[۱]گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گلستان، گرگان، ایران، [۲]گروه 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 الکالوییدکل و افدرین آن است. بذرهای 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 جمع آوری 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 الکالوییدکل در ساقه گیاهان ۵ ماهه ارمک رشد یافته بر روی خاک جنگل ۱/۰۴ میلی گرم بر گرم وزن خشک بوده در حالی که در ریشه مقدار الکالوییدکل 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: الکالوییدکل، ارمک، افدرین، جوانه‌زنی، دانه.

مقدمه:

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 درچوب، لقاح مضاعف و گرده‌افشانی انتوموفیلیک را نشان می‌دهد. این مشخصات باعث شده که این گروه از گیاهان به عنوان خویشاوندان نزدیک گیاهان گلدار درنظر گرفته شوند. اما اخیراً شواهد مولکولی 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،

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: m.aghdasi@gu.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir

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 قطرحدود یک میلیمتر به رنگ سبز و یا خاکستری، برگ‌ها به طول ۲ تا ۲/۵ میلیمتر، ۲ عدد تا دو سوم پیوسته و غلافی‌شکل، 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 وهمکاران، ۱۳۷۹). تکثیر جنسی این گیاه از طریق بذر صورت می‌گیرد. بذرهای 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 درطب سنتی چین در درمان بیماری‌هایی مثل سرماخوردگی، آنفولانزا، برونشیت، گرفتگی‌بینی، تب‌یونجه، آرتریت، 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. دراثرمستقیم، 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، واریته، بخش‌های مختلف گیاه، فصل برداشت و ناحیه جغرافیایی و ارتفاعی که گیاه رشد می‌کند متفاوت بوده و در گونه های مختلف از ۳/۴ – ۰/۰۱ 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 وجایگاه 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 قرارگرفته و همچنین میزان الکالویید 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. به‌منظور 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

Archive of SID

www.SID.ir

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 ۲-۱ سانتی‌متری 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.

$$\text{درصد جوانه زنی} = \frac{\text{تعداد بذر جوانه زده}}{\text{تعداد کل بذرهای کاشته}} \times ۱۰۰$$

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 آلکالویید کل: سنجش آلکالویید کل با روش اسپکتروفتومتری انجام شد (Shamsa *et al*., 2008). در این روش، ۵/۵ میلی لیتر از عصاره متانولی بدست آمده در۱ میلی لیتراسید هیدروکلریک غلیظ حل و پس از ۳۰ دقیقه صاف شد. سپس عصاره صاف شده سه بار با ۱۰ میلی لیترکلروفرم 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 لیترمعرف بروموکرزول گرین و ۵ میلی لیتر بافر فسفات pH: 4.7 مخلوط و فاز کلروفرمی زرد رنگ حاوی آلکالوییدها در لوله‌آزمایش جمع‌آوری و حجم آن با کلروفرم به ۱۰میلی لیتر رسانده شد. مقدار جذب عصاره در طول موج ۴۷۰nm نانومتر خوانده شده و با استفاده از منحنی استاندارد میزان آلکالویید کل عصاره‌ها تعیین گردید. برای رسم منحنی استاندارد، ۱ میلی گرم افدرین خالص در ۱۰ میلی لیترآب مقطر حل شد. منحنی استاندارد بر اساس مقادیر مختلف افدرین رسم شد.

سنجش افدرین به روش HPLC: ۱ گرم بافت گیاهی با ۱۰ میلی لیترمتانول ۵۰ درصد به مدت ۲۰ دقیقه توسط شیکر ودر 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 لیتررسانیده شد عصاره ها با فیلتر ۰/۴۵ میکرون فیلتر و به دستگاه HPLC تزریق شدند. به منظور سنجش افدرین از دستگاه HPLC با آشکار ساز UV/VIS، دتکتور Diod Array، پمپ L–Merck Hitachi7100 با نرم‌افزا EZ chrome (Hitachi- Japon) به روش ایزوکراتیک استفاده شد (Sheu *et al*, 2001). فاز متحرک شامل محلول ۰/۱٪ اسیدفسفریک، محلول ۲۵ میلی مولارسدیم دودسیل سولفات (SDS) و استونیتریل۴۰v/v٪ 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 وطول موج ۲۱۰nm بود. مدت زمان خروج نمونه‌ها از ستون ۴۵ دقیقه بود. به منظور رسم منحنی استاندارد، محلول هایی با غلظت‌های ۰، ۰/۰۰۰۴، ۰/۰۰۰۸، ۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۱۴ میلی‌گرم از افدرین تهیه وبه دستگاه HPLC تزریق شد. منحنی استاندارد بر اساس مقادیر مختلف افدرین رسم گردید.

تجزیه شیمیایی خاک: میزان هدایت الکتریکی خاک با استفاده از عصارهٔ اشباع و هدایت‌سنج 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 کجلدال، بافت خاک به روش هیدرومتری بایکاس و درصدآهک خاک ($CaCo_3$) 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

Archive of SID

www.SID.ir

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 بذرها جوانه زدند. اما تیمار سرما اثر معنی‌داری بر جوانه زنی بذرها نشان نداده است (جدول ۲). اگر چه تمامی بذرهای کاشته شده بعد از مدت ۳ هفته جوانه زدند اما تعداد کمی از بذرها 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 تیمارشدند گیاهچه تولید کردند. از بین بذرهایی که بر روی کاغذ صافی و بدون تیمار سرما جوانه زدند تنها ۱۵ درصد بذرها 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 (شکل۱-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 می دهد. 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 (۱۷درصد) 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).

اندازه گیری طول ریشه و ساقه گیاهچه‌های ۵ ماهه کشت شده در بسترهای مختلف نشان داده که بیشترین طول ریشه و ساقه در گیاهچه‌های رشدیافته در خاک جنگل مشاهده شده در حالی‌که کمترین طول ریشه و ساقه در گیاهچه‌های رشد یافته در بستر کمپوست دیده می‌شود (شکل۲-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

Archive of SID

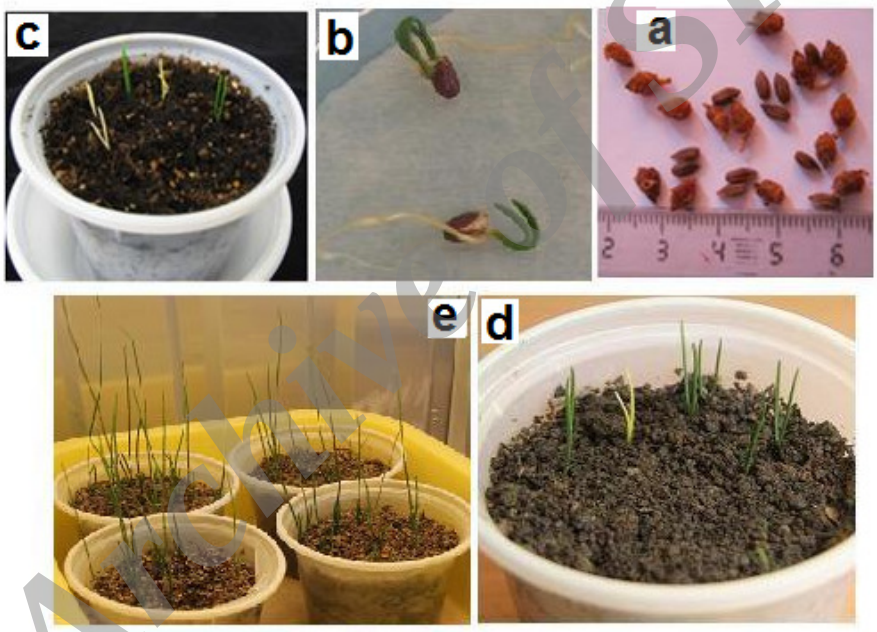
www.SID.ir

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	
محیط کشت	بدون تیمار سرما	با تیمار سرما	بدون تیمار سرما	با تیمار سرما
کاغذ صافی مرطوب	۱۰۰ ± ۰/۰ [a]	۱۰۰ ± ۰/۰ [a]	۱۵ ± ۱/۲۹ [a]	۱۲ ± ۱/۸۳ [a]
محیط کشت MS	۱۰۰ ± ۰/۰ [a]	۱۰۰ ± ۰/۰ [a]	۳ ± ۱/۱۸ [b]	۲ ± ۱/۰۸ [b]



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 وسفید رشدیافته در خاک جنگل و e) گیاهان پنج ماهه رشدیافته در خاک جنگل.

بستر ماسه و نیز گیاهچه‌های رشد یافته در بستر کوکوپیت و کمپوست وجود ندارد. همچنین اختلاف معنی‌داری 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 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 معنی‌داری را نشان نمی‌دهد. همچنین اختلاف معنی داری بین وزن خشک ریشه در گیاهچه‌های رشدیافته در بستر ماسه، کمپوست، کوکوپیت و مخلوط خاک جنگل و خاک بجنورد دیده نمی‌شود (شکل ۲- c).

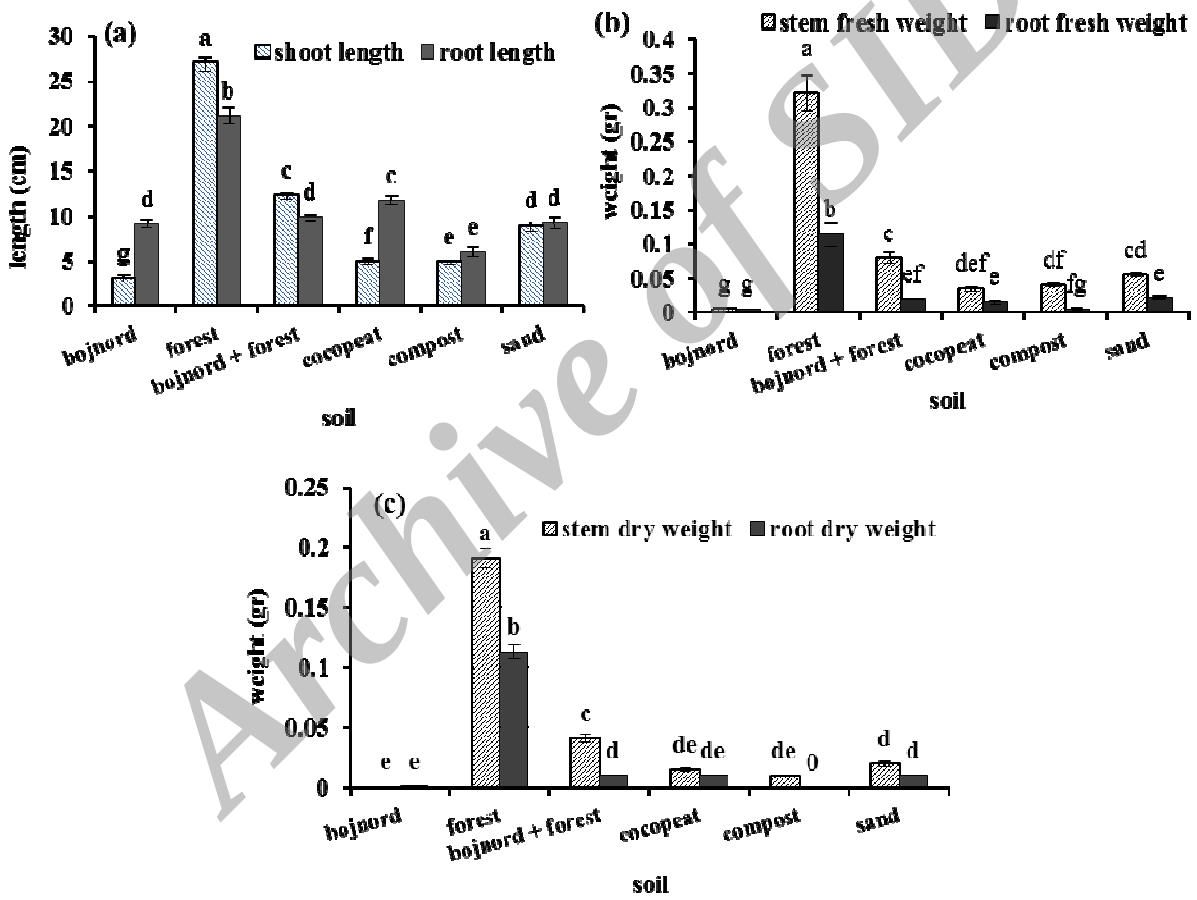
میزان آلکالوئید کل در گیاهان کشت شده در خاک جنگل:

www.SID.ir

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

نوع خاک	جوانه زنی	گیاهچه سبز	گیاهچه سفید	گیاهچه زنده	تعداد گره
بجنورد	۲۰ ± ۱/۲۲ ^{d}	۱۰۰ ± ۰/۰ ^{a}	۰ ± ۰/۰ ^{d}	۱۰۰ ± ۰/۰ ^{a}	۱/۶ ± ۰/۱۸ ^{e}
جنگل	۹۰ ± ۱/۲۵^{a}	۸۱ ± ۱/۴۷ ^{b}	۱۹ ± ۱/۱۴ ^{c}	۸۱ ± ۱/۰۵ ^{b}	۸/۵ ± ۰/۱۸^{a}
بجنورد+جنگل	۵۰ ± ۱/۰۲^{c}	۸۰ ± ۰/۹۶ ^{b}	۲۰± ۱/۰۹^{c}	۸۰ ± ۱/۲۹^{c}	۵/۷۵ ± ۰/۲۵ ^{b}
کوکوپیت	۷۰ ± ۱/۴^{b}	۷۵ ± ۱/۳۴^{c}	۲۵ ± ۱/۴۱ ^{a}	۳۹ ± ۱/۳۱^{d}	۲/۵ ± ۰/۱۸^{d}
کمپوست	۸ ± ۰/۴ ^{e}	۱۰۰ ± ۰/۰ ^{a}	۰ ± ۰/۰ ^{d}	۱۰۰ ± ۰/۰ ^{a}	۳/۴ ± ۰/۱۸^{c}
ماسه	۲۲/۵ ± ۱/۰۷ ^{d}	۷۸ ± ۱/۱۹ ^{c}	۲۲± ۱/۱۲^{b}	۴۴ ± ۱/۲ ^{c}	۳/۰۳ ± ۰/۰۷^{f}

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



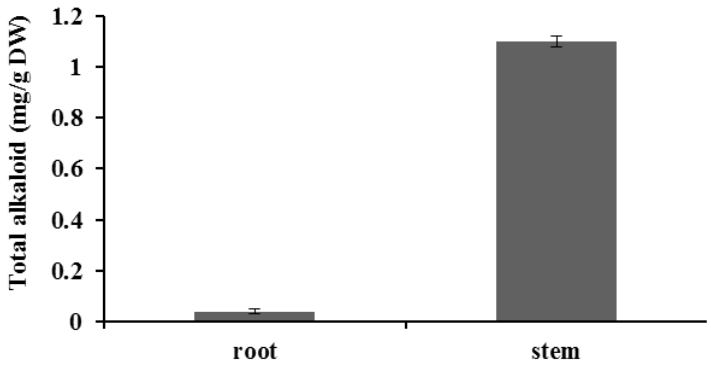
شکل۲-a) میانگین طول ساقه و ریشه، b) میانگین وزن تر ریشه وساقه و c) میانگین وزن خشک ریشه و ساقه در گیاهان ارمک کاشته‌شده در بسترهای مختلف پس از ۵ ماه. (هر ستون نشان دهنده میانگین داده‌ها± انحراف استاندارد است). حروف مشترک نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد است.

نتایج بدست آمده نشان داد که میزان آلکالوئید کل در ساقه ۱/۱۰ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک است که ۲۷ برابر بیشتر از این میزان در ریشه (۰/۰۴ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) است (شکل -۳).

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

Archive of SID

www.SID.ir



شکل۳- میزان آلکالوئید کل در ساقه و ریشه گیاه ارمک (*Ephedra major*) هر ستون نشان‌دهنده میانگین داده‌ها ± انحراف معیار است.

جدول۴- 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 الکالویید 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 حالی‌که میزان افدرین در ریشه بسیار ناچیز می‌باشد (شکل۴-a و ۴-b). 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).

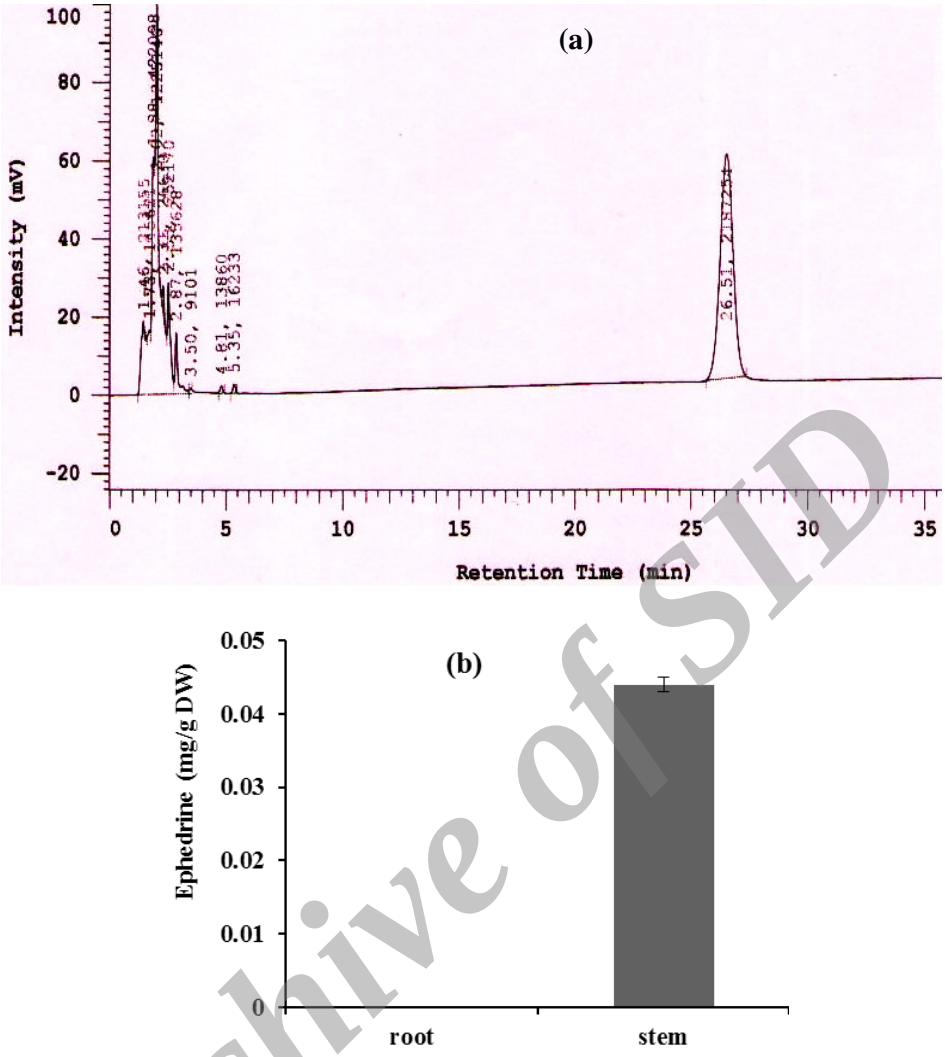
بحث:

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 امریکا می باشد. Segibateer وهمکاران (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 بذرهای تیمارشده 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 هرحال در نتایج حاضر، تمامی بذرهای 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 وهمکاران (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

Archive of SID

www.SID.ir



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

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 ارمک است. مقایسه نتایج آنالیز خاک منطقه رویش ارمک (بجنورد) با خاک جنگل نشان می‌دهد که خاک جنگل با داشتن مواد آلی زیاد، درصد ازت بیشتر، EC و درصد آهک کمترنسبت به خاک بجنورد شرایط بهتری برای جوانه‌زنی و رشد ارمک 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 به‌نظر 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

Archive of SID

www.SID.ir

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

اندازه‌گیری الکالویید کل و میزان افدرین در ساقه و ریشه گیاهچه‌های ۵ ماهه کشت شده در خاک جنگل نشان داده که در ریشه میزان الکالویید کل در مقایسه با ساقه بسیار اندک است. همچنین در ریشه میزان افدرین بسیار ناچیز است. میزان و نوع آلکالوئیدهای افدرین بر حسب گونه، واریته، 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 ۳/۴٪ وزن خشک گزارش شده است. در حالی که در گونه‌های دیگر نظیر *Ephedra equistina* و *Ephedra monosperma* تا ۲/۵٪ وزن خشک گزارش شده است (Schaneberg *et al.*, 2003, Fukushima, 2004). باهر نیک و همکاران (۱۳۷۹) نیز با جمع آوری ۹ گونه مختلف ارمک از مناطق مختلف ایران و اندازه-گیری افدرین در این گیاهان نشان دادند که بیشترین مقدار افدرین در *Ephedr amajor* به میزان ۱/۸٪ – ۰/۸٪ دیده می شود. همچنین کاشکی و همکاران (۱۳۷۹) با شناسایی گونه‌های مختلف ارمک در خراسان اندازه گیری آلکالوئید کل نشان دادند که *E. major* بیشترین میزان آلکالوئید کل (۰/۹٪) را دارا است. در تحقیق حاضر نیز میزان الکالویید کل در گیاهچه های ۵ ماهه تقریبا ۰/۱٪ 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+ تا۳۰- 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 بیابان‌زدایی مخصوصاً در نواحی خشک و کم‌بارش استفاده کرد.

سپاسگزاری:

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

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: ۱۱۱-۹۹.

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: ۶۵-۴۸.

باهرنیک، ز. (۱۳۸۱) بررسی ویژگیهای گیاه‌شناختی واکولوژیکی گونه‌های مختلف جنس ارمک درایران. مجله تحقیقات گیاهان دارویی ومعطر ایران.۱: ۷۵-۵۳.

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

کاشکی، م. (۱۳۷۹) بررسی پیرامون گونه‌های ارمک درایران 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 fulfillmentof 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 *rbc*L 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

Archive of SID

www.SID.ir

Schaneberg, B. T., Crockett, S., Bedir, E. and Khan, I. A. (2003) The role of chemical fingerprinting: application to *Ephedra*. Phytochemistry62: 911–918.

Seqinbateer, 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-κB 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

Archive of SID

www.SID.ir