بهینه‌سازی تشکیل کالوس و تولید افدرین در گیاه افدرا (*Ephedra major*)

مرتضی مفید بجنوردی[۱]، مهناز اقدسی[۱*]، منیژه میان آبادی[۱] و محبت نداف[۲]

[۱] گرگان، دانشگاه گلستان، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

[۲] بجنورد، دانشگاه پیام نور بجنورد، گروه زیست‌شناسی

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۱/۳۰ تاریخ پذیرش: ۹۳/۲/۱۲

چکیده

افدرین مهمترین الکالویید گیاه افدرا (*Ephedra major*) است که در درمان بیماری آسم مورد استفاده قرار می‌گیرد. هدف از تحقیق حاضر بررسی امکان کشت بافت این گیاه به‌منظور تولید کالوس و افدرین است. در این تحقیق اثر غلظت‌های مختلف 2,4-D و Kin (۰، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) بر روی تولید کالوس قطعات جداکشت ساقه مورد بررسی قرار گرفته است. آزمایش در قالب طرح تصادفی انجام شد. به این منظور بذرها پس از جمع‌آوری از ارتفاعات بجنورد در گلدان‌های حاوی خاک جنگل کشت شدند. قطعات جداکشت ساقه از گیاهچه‌های ۵ ماهه جدا و پس از ضدعفونی در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) حاوی غلظت‌های مختلف 2,4-D و Kin کشت شدند. نتایج نشان داد که قطعات جداکشت ساقه در محیط کشت حاوی ۰/۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و Kin بیشترین درصد کالوس‌زایی و آلکالوئید کل را نشان دادند. اندازه‌گیری افدرین به روش HPLC نشان داد که بیشترین میزان افدرین (۰/۰۵۳ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) در کالوس‌های تولیدشده در محیط کشت حاصل از تیمار ۲ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر از هورمون‌های 2,4-D و Kin تولید شد. در مجموع نتایج تحقیق حاضر نشان داد که در شرایط کشت بافت می‌توان از کالوس حاصل از قطعات جدا کشت افدرین تولید کرد.

واژه‌های کلیدی: آلکالوئید کل، افدرین، کالوس، 2,4-D، Kin، افدرا

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۱۷۳۲۳۲۲۸۱۰ ، پست الکترونیکی: m.aghdasi@gu.ac.ir

مقدمه

گیاه افدرا با نام علمی *Ephedramajor* متعلق به تیره ارمک یا افدراسه است. این تیره دارای یک جنس و بیش از ۵۰ گونه است (۱۷). جنس افدرا در ایران ۱۱ گونه و بیش از ۱۰ واریته دارد (۱ و ۹). گونه *Ephedr amajor* اغلب در کوهستان‌های مناطق ایرانی و تورانی و در ارتفاع ۱۵۰۰ تا ۳۰۰۰ متر در مناطق مازندران، جنگل گلستان، آذربایجان، اردبیل، همدان، فارس، هرمزگان، کرمان، خراسان، سمنان، تهران، ارتفاعات فیروزکوه، دماوند و چالوس رویش دارد (۴).

افدرا گیاهی درختچه‌ای، دو پایه، بندرت یک‌پایه، با شاخه‌های ایستاده، یا کم‌وبیش افتان یا خیزان بر سطح خاک است. انشعابات ساقه‌ها معمولا دارای شاخک‌های فراوان سبز و فتوسنتزکننده هستند. ارتفاع گیاه ۲۰ تا ۱۸۰ سانتی‌متر است. برگها بسیار کوچک و در هر بند ۲ تا ۳ عدد، گاهی ۴ عدد، معمولا تحلیل‌یافته و به صورت فلس‌های غشایی هستند (۸). افدرا به دو روش رویشی (ریزوم) و زایشی (بذر) تکثیر می‌شود (۳). این گیاه در طب سنتی چین در درمان بیماری‌هایی مانند سرماخوردگی، ورم مخاط بینی در اثر حساسیت، آسم، آنفولانزا، برونشیت، گرفتگی بینی، تب‌یونجه، آرتریت، کهیر، عدم تعریق، سردرد، صرع، شب‌ادراری، ضعف عضلات، حساسیت‌های پوستی، دردهای استخوان و مفاصل و کاهش فشارخون توصیه می‌شود (۷).

مهمترین متابولیت ثانویه این گیاه افدرین نام دارد که از گروه الکالوئیدها بوده و ۹۰ –۳۰ درصد آلکالوئید کل را تشکیل می‌دهد. گونه‌های مختلف افدرا دارای ۳/۴ – ۰/۰۱ درصد آلکالوئیدهای افدرین هستند که در بخش‌های هوایی گیاه تجمع پیدا می‌کنند. میزان و نوع آلکالوئیدهای افدرین بر حسب گونه، واریته، بخش‌های مختلف گیاه، فصل برداشت و ناحیه جغرافیایی و ارتفاعی که گیاه رشد می‌کند، متفاوت است (۲و ۷). ایزومرهای دیگری نیز از افدرین در گیاه افدرا گزارش شده‌است که می‌توان به نورافدرین، متیل‌افدرین، نورسودوافدرین، سودوافدرین و متیل‌سودوافدرین اشاره کرد. مکانیسم‌های بیوشیمیایی پیچیده‌ای که منجر به تشکیل و تجمع آلکالوئیدهای افدرین در افدرا و دیگر گیاهان می‌شود تا حدود زیادی ناشناخته است. مطالعات اولیه نشان داده که این ماده از اسید امینه فنیل‌آلانین مشتق می‌شود (۱۰ و۱۳).

در حال حاضر سه روش مختلف برای تولید تجاری افدرین و آلکالوئیدهای مربوطه وجود دارد. ۱- روش‌های سنتی که شامل استخراج افدرین از ساقه افدرا می‌باشد. ۲- سنتز شیمیایی روش دیگری در تولید این ماده است. اما این روش منجر به تولید مخلوط راسمیک آلکالوئیدها می‌گردد. ۳- تولید انتخابی انانتیومر (1R, 2S)-افدرین از ترکیبی به نام فنیل‌استیل‌کربینول یا R-PAC است. امروزه تولید تجاری افدرین و سودوافدرین بر این روش نیمه‌سنتزی تکیه دارد. در این روش مخمرهای ساکارومیس سروزیه (*Saccharomyce scerevisiae*) و کاندیدا یوتیلیس (*Candida utilis*) و همچنین باکتری زیموموناس موبیلیس (*Zymomonas mobilis*) از بنزآلدئید طی فرایند تخمیر میکروبی، R-PAC تولید می‌کنند (۱۰). کشت بافت نیز روش دیگری است که امروزه برای تولید متابولیت‌های ثانویه از آن استفاده می‌شود. تاکنون گزارش‌های اندکی در مورد کشت‌بافت گونه‌های مختلف افدرا منتشر شده است. O'Dowd و همکاران با بررسی تولید کالوس در ۷ گونه مختلف افدرا در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) حاوی غلظت‌های مختلف تنظیم‌کنندگان رشد گیاهی کینتین (kin)، ۲و۴- دی کلروفنوکسی استیک اسید (2,4-D) و نفتالن استیک اسید (NAA) نشان دادند که بیشترین میزان افدرین در سوسپانسیون سلولی حاوی 2,4D و Kin مشاهده شده است (۱۲). Parsaeimehr و همکاران نیز تولید کالوس و میزان افدرین و سودوافدرین را در شرایط کشت بافت در سه گونه *E. strobiliacea, E. procera* و *E. Pachyclada* مورد بررسی قرار دادند (۱۴). همچنین گزارش‌ها نشان داده که با افزودن پیش‌ماده فنیل‌آلانین به محیط کشت MS می‌توان تولید افدرین را در کالوس *E. alata* سه برابر افزایش داد (۱۳). گزارش دیگری نیز مبنی بر تولید کالوس و گیاهچه از گونه *E. gerardiana* منتشر شده است (۶ و ۸).

با توجه به اهمیت افدرین در صنایع داروسازی (۵) در این تحقیق سعی شده است تا با بهینه سازی شرایط کشت بافت گونه *Ephedra major* تولید این ماده با ارزش در شرایط کشت بافت برای اولین بار در ایران مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روشها

جمع آوری بذر و تولید گیاهچه: بذر گیاه افدرا از رویشگاه خود واقع در ۴۵ کیلومتری جنوب شرقی بجنورد به ترتیب با طول و عرض جغرافیایی "۴۴ '۱۹ °۳۷ و "۳۰ '۳۸ °۵۷ در اواخر مردادماه جمع‌آوری شد. سپس بذرها در گلدان-های پلاستیکی حاوی خاک جنگل در عمق ۲-۱ سانتی-متری کاشته شدند. سپس گلدان‌ها در اتاق کشت با دمای ۲± ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی نگه‌داری شدند.

تولید کالوس: قطعات جداکشت از ساقه‌های سبز گیاهچه-های ۵ ماهه جدا و به مدت ۱ دقیقه با آب شستشو داده شده و در مرحله بعد با الکل ۷۰ درصد به مدت ۵۰ ثانیه و

آب‌ژاول ۲۰ درصد به مدت ۵ دقیقه ضدعفونی شدند. سپس قطعات جداکشت۵ بار با آب مقطر استریل در زیر هود لامینار شستشو شده و در محیط‌کشت موراشیگ و اسکوگ یا MS (۱۲) حاوی ویتامین تیامین‌کلراید، اسید-نیکوتینیک، پیرودوکسین‌کلراید و میواینوزیتول، غلظت‌های مختلفD-2-4 و Kin ، ساکارز (۳٪) و آگار (۱٪) با pH=5.8 کشت شدند. شرایط اتاق‌کشت با دمای۲± ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی در نظر گرفته شد. برای هر تیمار هورمونی ۵ پتری‌دیش حاوی محیط‌کشت و در هر ظرف ۵ قطعه جداکشت قرار داده شد. عملیات واکشت هر ۲۰ روز یکبار انجام شد. بعد از ۸۰ روز کالوس‌ها برداشت‌شده و درصد کال‌زایی، شکل و اندازه ظاهری، وزن خشک و تر، نوپدیدی و رنگ کالوس‌ها مورد مطالعه قرار گرفتند.

شرایط کشت: آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شد. اثرات اصلی شامل دو نوع تیمار هورمونی (Kin و 2,4D) و چندین سطح هورمونی (۰، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) بود.

اندازه‌گیری وزن تر و خشک کالوس: برای تعیین وزن تر، کالوس‌ها با ترازو (GX- K&A-Japon) توزین شدند. برای تعیین وزن خشک، کالوس‌ها در آون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ روز خشک شده و با ترازو توزین شدند.

عصاره‌گیری: در این روش ۱ گرم کالوس با ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۵۰ درصد به مدت ۲۰ دقیقه شیکر و در دمای اتاق عصاره‌گیری و بعد در ۱۵۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. روش استخراج سه مرتبه تکرار و درنهایت حجم عصاره‌ها با متانول ۵۰ درصد به ۵۰ میلی‌لیتر رسید. سپس عصاره‌ها با فیلتر (۰/۴۵ میکرون) صاف شدند.

سنجش آلکالویید کل: سنجش آلکالویید کل به روش اسپکتروفتومتری انجام شد (۱۵). در این روش ۵/۵ میلی لیتر از عصاره متانولی بدست آمده در ۱ میلی لیتر اسیدهیدروکلریک 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 شده و با سود ۰/۱ نرمال خنثی شد (pH=7). در مرحله بعد عصاره با ۵ میلی‌لیتر معرف بروموکرزول گرین و ۵ میلی‌لیتر بافر فسفات pH= 4.7 مخلوط و فاز کلروفرمی زردرنگ حاوی آلکالوییدها در لوله آزمایش جمع‌آوری و حجم آن با کلروفرم به ۱۰ میلی‌لیتر 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 لیتر آب مقطر حل شد. منحنی استاندارد براساس مقادیر مختلف افدرین رسم شد.

سنجش افدرین به روش HPLC : **عصاره‌گیری:** یک گرم از نمونه گیاهی با ۱۰ میلی لیتر متانول ۵۰ درصد به مدت ۲۰ دقیقه توسط شیکر و در دمای اتاق عصاره‌گیری و بعد در ۱۵۰۰ دور برای ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. روش استخراج سه مرتبه تکرار و درنهایت حجم عصاره‌ها با متانول ۵۰ درصد به ۵۰ میلی لیتر رسانده شد. عصاره‌ها با فیلتر ۰/۴۵ میکرون فیلتر و به دستگاه HPLC تزریق شدند.

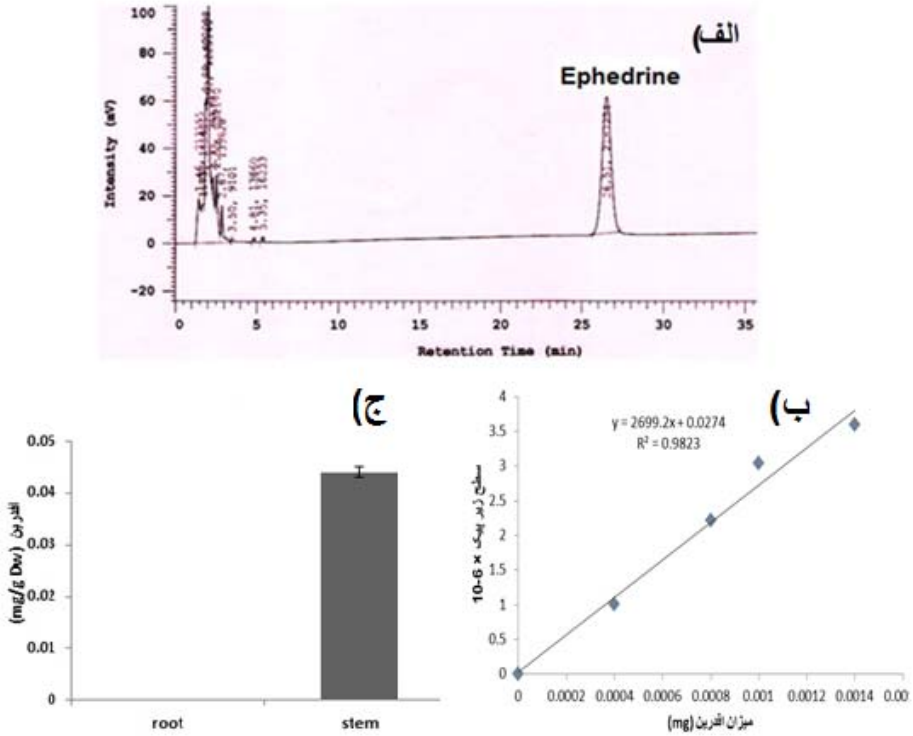
به منظور سنجش افدرین از دستگاه HPLC با آشکارساز UV/VIS، پمپ L–Merck Hitachi7100 با نرم‌افزار EZ chrome (Hitachi- Japon) به روش ایزوکراتیک استفاده شد (۱۶). فاز متحرک شامل محلول ۰/۱٪ اسیدفسفریک، محلول ۲۵ میلی مولار سدیم دودسیل سولفات(SDS) و استونیتریل۴۰v/v٪ بود. فاز تهیه شده به مدت ۱۵ دقیقه در دستگاه اولتراسونیک در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا حباب‌های هوا از آن خارج شود. سپس فاز تهیه شده در دستگاه فیلتراسیون (Altech-Germany) با فیلتر ۰/۴۵ میکرون صاف شد. مقدار جریان ۰/۸ میلی‌لیتر 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 میلی‌لیتر از افدرین (Sterop- USA) تهیه و به دستگاه HPLC تزریق شد. منحنی استاندارد براساس مقادیر مختلف افدرین رسم گردید.

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده توسط نرم‌افزار SPSS انجام شد. از آزمون دانکن برای مشخص نمودن اختلاف معنی‌دار بین نتایج استفاده شد. رسم نمودارها و جدولها توسط نرم‌افزار اکسل انجام گردید.

سنجش میزان افدرین در اندام‌های ساقه و ریشه گیاهچه‌های افدرا: اندازه‌گیری افدرین با استفاده از روش HPLC نشان داد که در اندام ریشه افدرین وجود نداشته و تنها در اندام ساقه افدرین وجود داشت. نتایج حاصل نشان داد که میزان افدرین در ساقه ۰/۰۴ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک است (شکل ۱). بنابراین با توجه به عدم وجود افدرین در اندام ریشه، تنها از قطعات جداکشت ساقه برای تولید کالوس در مرحله بعد استفاده شد.

نتایج



شکل ۱- الف) کروماتوگرام عصاره متانولی گیاه افدرا (*Ephedra major*)، ب) منحنی استاندارد افدرین و ج) میزان افدرین در ساقه و ریشه گیاهچه افدرا

اثر غلظت‌های مختلف 2,4-D و Kin بر تولید کالوس: از ۱۴ تیمار هورمونی استفاده شده در ۱۱ تیمار حداقل در یک قطعه جداکشت کالوس‌زایی مشاهده شد و در ۳ تیمار (۰ و ۰، ۰/۵ و ۰، ۱ و ۰/۵ میلی گرم در لیتر Kin و 2,4D) هیچ کالوسی تولید نشد. رنگ کالوس‌های تولید شده در تیمارهای مختلف متفاوت بوده و از سبز روشن، سبز تیره تا نارنجی و قهوه‌ای متفاوت بوده است. شکل کالوس‌های تولید شده نیز در برخی تیمارها نرم و در برخی دیگر سفت بوده است (شکل ۲). بیشترین درصد کالوس‌زایی (۹۹/۶٪) در تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر از 2,4-D و Kin مشاهده شده است. پس از آن در تیمارهای ۱و ۲ میلی-گرم در لیتر 2,4-D و Kin نیز درصد بالایی از کالوس‌زایی

(۸۹/۴٪) مشاهده شده است. کمترین درصد کالوس‌زایی در تیمار ۲ و ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و Kin دیده شده است (جدول ۱). نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تفاوت معنی‌داری در سطح ۱ درصد بین تیمار هورمونی و درصد کالوس‌زایی وجود دارد (جدول ۲).

نتایج نشان داد که در تیمار ۱ و ۰ و نیز ۲ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و Kin بیشترین میزان وزن تر کالوس‌ها دیده شد. کمترین وزن تر کالوس‌ها نیز در تیمارهای حاوی ۱ و ۰/۵ (۰/۰۷ گرم) و ۱ و ۲ (۰/۰۹ گرم) میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و Kin تولید شده است. بیشترین وزن خشک کالوس در تیمار ۱ و ۰ و نیز ۲ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D وKin دیده شد (شکل۳). نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های حاصل از سنجش وزن تر و وزن خشک کالوس نشان داد که بین داده‌ها در سطح کمتر از یک درصد تفاوت معنی‌داری وجود داشت (جدول۳).

در برخی از تیمارهای بکار رفته نیز باززایی ساقه مشاهده شده است. نوساقه‌های ایجاد شده ابتدا سبزرنگ بوده اما بعد از یک ماه به رنگ ارغوانی درآمده و با واکشت‌های متوالی رشد چندانی نداشتند (شکل ۴-الف و ب). بیشترین درصد باززایی نوساقه در محیط کشت حاوی ۲ و ۲ و نیز ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و Kin مشاهده شد. در-حالی‌که در محیط‌های کشت حاوی ۰ و ۰،۰ و ۰/۵، ۰/۵و ۰، ۲ و۰ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و Kin باززایی انجام نشد. از طرفی دیگر در غلظت ۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و Kin ریشه‌زایی نیز مشاهده شد (شکل ۴-ج). همچنین در تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D ریشه به طور مستقیم از قطعه جداکشت ساقه (بدون تشکیل کالوس) ایجاد شد.

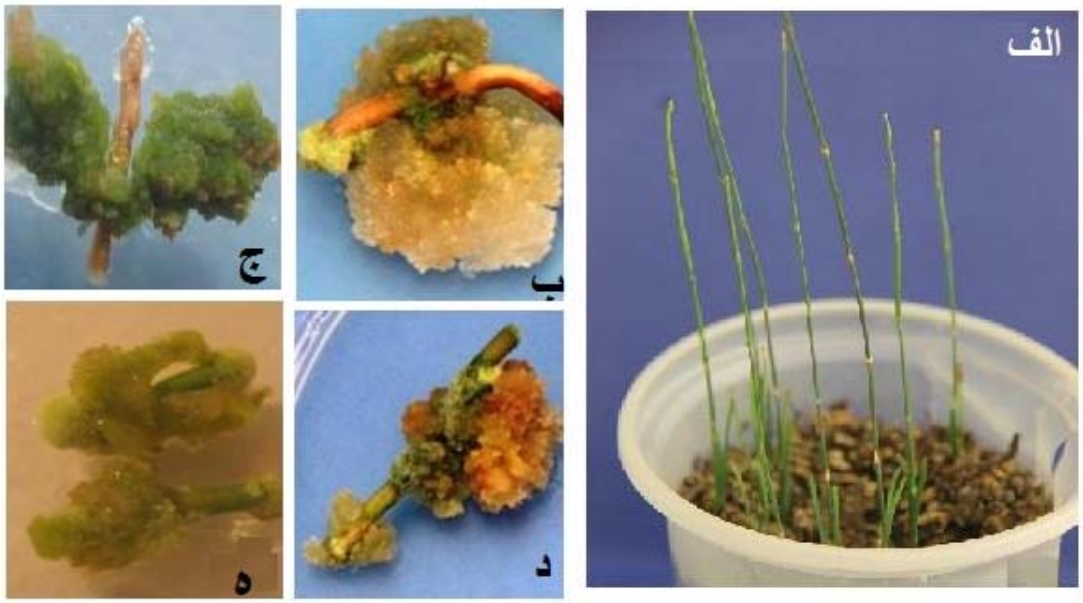
جدول ۱- اثر غلظت‌های مختلف 2,4-D و Kin بر تولید کالوس و باززایی قطعات جداکشت ساقه گیاه *Ephedra major*

Kin (mg/L)	2,4 D (mg/L)	درصد کالوس‌زایی (٪)	کیفیت کالوس	میانگین وزن تر کالوس (gr)	میانگین وزن خشک کالوس (gr)	درصد باززایی ساقه (٪)
۰	۰	۰	--------	---	---	۰
۰	۰/۵	۳۲	سبز روشن	ناچیز	ناچیز	۰
۰	۱	۷۵	سبز روشن یا تیره، نرم	۰/۷۴	۰/۰۸۶	۲۷
۰	۲	۷۶	سبز تیره، نرم	۰/۱۲	۰/۰۲۵	۰
۰/۵	۰	۰	--------	---	---	۰
۰/۵	۰/۵	۱۰۰	سبز روشن یا تیره، نرم	۰/۲۴	۰/۰۵۰	۶۲
۰/۵	۱	۲۲	سبز روشن، سفت	۰/۰۷	ناچیز	۲۳
۰/۵	۲	۶۴	نارنجی، نرم	۰/۸۰	۰/۰۶۳	۱۶
۱	۰/۵	۰	--------	---	---	۸۹
۱	۱	۶۸	قهوه‌ای، سفت	۰/۲۲	۰/۰۳۴	۳۴
۱	۲	۱۵	سبز روشن، نرم	۰/۰۹	۰/۰۲۳	۹
۲	۰/۵	۲۲	سبز روشن، نرم	۰/۲۴	۰/۰۲۲	۲۶
۲	۱	۸۹	سبز روشن، نرم	۰/۰۹	۰/۰۲۵	۵۹
۲	۲	۲۵	سبز روشن، نرم	۰/۱۶	۰/۰۲۶	۹۸

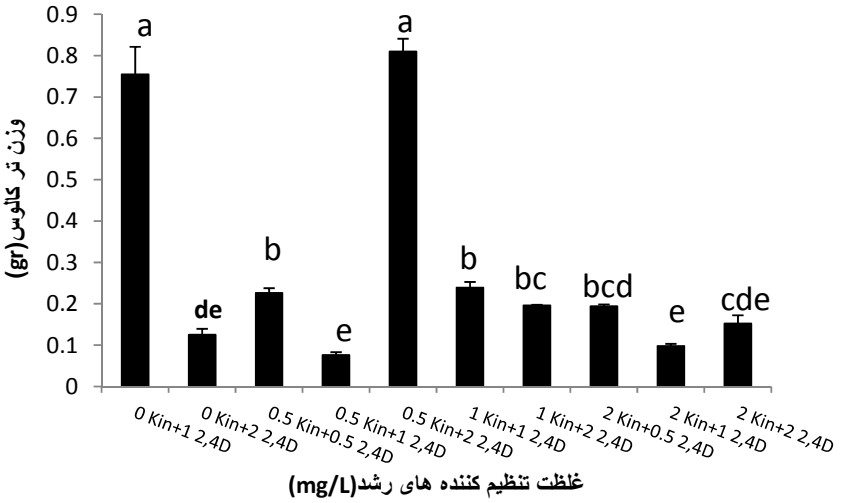
جدول۲- تجزیه واریانس داده‌های مربوط به اثر ترکیب‌های مختلف هورمونی بر درصد کالوس‌زایی و باززایی قطعات جداکشت ساقه *Ephedra major*

منبع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات درصد باززایی	میانگین مربعات درصد کالوس‌زایی
ترکیبهای مختلف هورمونی	۱۳	۵۴۷۴/۳۰۳**	۶۱۵۵/۸۷۴**
خطا	۵۶	۳۷/۴	۱۸/۱۳۰

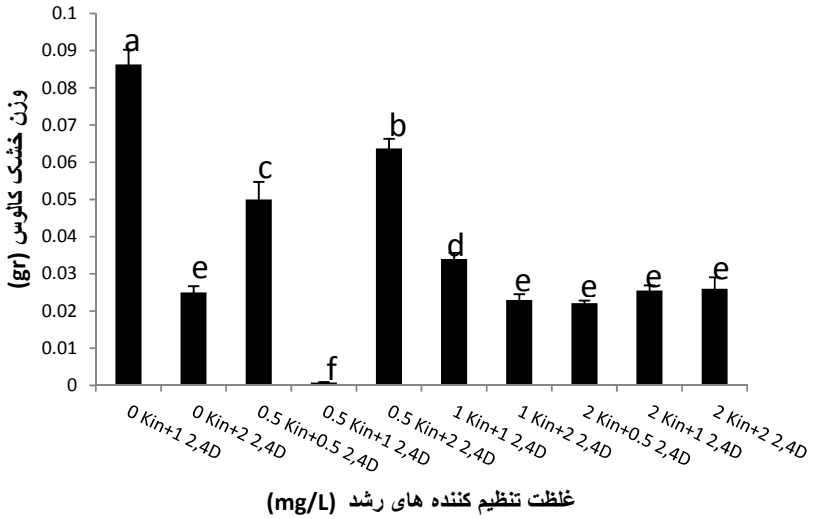
**: تفاوت معنی‌دار در سطح کمتر از ۱ درصد



شکل۲- الف) گیاهچه پنج ماهه افدرا، کالوس‌زایی قطعات جداکشت ساقه گیاه افدرا در محیط کشت پایه MS ..... ب) ۲ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و Kin، ج) ۰/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و Kin، د)۱ و ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و Kin و ه)۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D



الف)



ب)

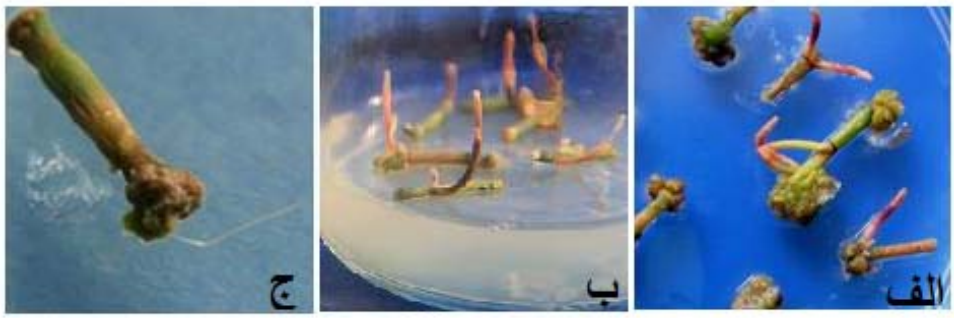
شکل ۳- اثر غلظت‌های مختلف 2,4-D و Kin بر الف) وزن تر و ب) وزن خشک کالوس

هر ستون نشان‌دهنده میانگین داده‌ها ± انحراف معیار است. ستون‌های دارای حداقل یک حرف مشترک در سطح اطمینان ۵ درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.

جدول۳- تجزیه واریانس داده‌های مربوط به اثر تیمار هورمونی بر وزن تر و وزن خشک کالوس حاصل از قطعات جدا کشت *Ephedra major*

منبع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات وزن تر کالوس	میانگین مربعات وزن خشک کالوس
ترکیبهای مختلف هورمونی	۹	۰/۷۱۱**	۰/۰۰۶**
خطا	۹۰	۰/۰۰۶	۰/۰۰۰

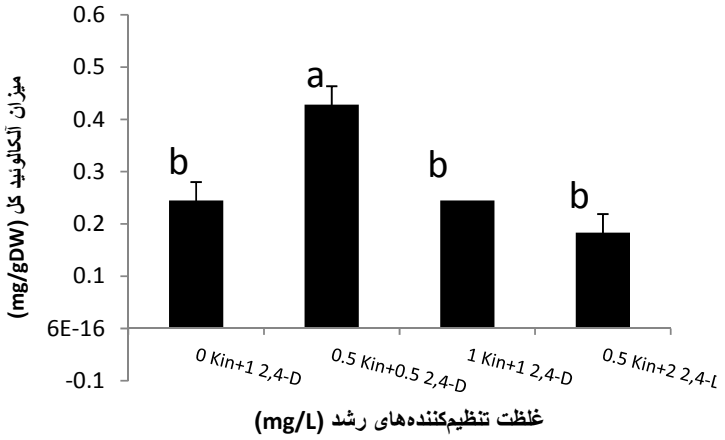
**: معنی‌دار در سطح کمتر از ۱ درصد



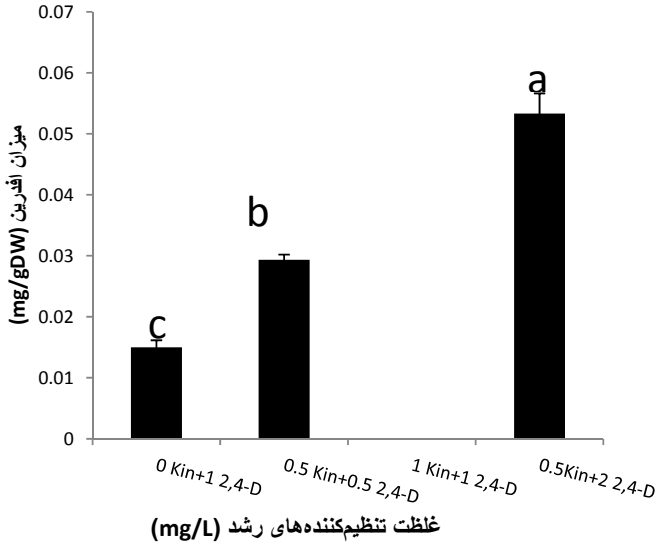
شکل۴- باززایی در قطعات جدا کشت ساقه. (الف): ساقه‌زایی در کالوس‌های رشد کرده در محیط کشت MS حاوی ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و Kin، ب) ساقه‌زایی در کالوس‌های رشد کرده در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و Kin، ج) ریشه‌زایی در کالوس‌های رشدکرده در محیط کشت MS حاوی ۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و Kin

سنجش آلکالوئید کل و افدرین در کالوس‌های تولید شده: سنجش میزان الکالویید کل و افدرین تنها در کالوس-هایی که بیشترین میزان وزن خشک را داشتند، انجام شد. بیشترین میزان آلکالوئید کل (۰/۴۲ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) در تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر از هر یک از هورمون‌های 2,4-D و Kin دیده شده است (شکل ۵-الف). بیشترین میزان افدرین (۰/۰۵۳ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) نیز در کالوس‌های حاصل از تیمار ۲ و ۰/۵ میلی-

گرم در لیتر از هورمون‌های 2,4-D و Kin تولید شد (شکل ۵-ب). در تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر از هورمون‌های 2,4-D و Kin میزان افدرین کالوس‌ها بسیار ناچیز بوده است. تجزیه واریانس داده‌های حاصل از سنجش افدرین و آلکالوئید کل کالوس در این چهار تیمار نشان داد که بین داده‌ها در سطح کمتر از یک درصد تفاوت معنی‌داری وجود دارد (جدول ۴).



الف)



ب)

شکل۵- میزان آلکالوئید کل (الف) و افدرین (ب) در کالوس‌های حاصل از کشت قطعه جدا ساقه در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف 2,4-D و Kin

جدول ۴- تجزیه واریانس داده‌های میزان آلکالوئید کل و افدرین در نمونه‌های کالوس حاصل از قطعه جداکشت ساقه *Ephedra major*

منبع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات میزان آلکالوئید کل	میانگین مربعات میزان افدرین
تیمار هورمونی	۳	۰/۰۳۴*	۰/۰۰۲*
خطا	۱۱	۰/۰۰۳	۰/۰۰۰

*: معنی‌دار در سطح کمتر از ۱ درصد

بحث

از ۱۴ تیمار هورمونی استفاده شده در ۱۱ تیمار هورمونی حداقل در یک نوع قطعه جداکشت کالوس‌زایی مشاهده شد. بررسی صفات ظاهری کالوس‌های تولیدشده نشان داد که رنگ کالوس با توجه به غلظت هورمونی مورد استفاده نارنجی، نارنجی مایل به سبز، نارنجی مایل به کرم، سبز روشن و سبز تیره است. داده‌های حاصل از جدول تجزیه واریانس نشان داد که اثر غلظت‌های مختلف 2,4-D و Kin بر کالوس‌زایی قطعات جداکشت در سطح کمتر از ۱ درصد معنی‌دار است. در حالی‌که در تیمار شاهد، کالوس‌زایی مشاهده نشد. این نتیجه نیاز قطعات جداکشت به هورمون اگزوژن برای تولید کالوس را نشان می‌دهد. ترکیب هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر از هورمون‌های 2,4-D و Kin با بیشترین درصد کالوس‌زایی (۹۹/۶٪) بهترین ترکیب برای کالوس‌زایی شناخته شد. این نتیجه با گزارش-های منتشر شده در مورد سایر گونه‌ها متفاوت است. به عنوان مثال نشان داده شده که بیشترین درصد کالوس‌زایی (۱۰۰٪) در گونه *Ephedra alata* در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و Kin دیده می‌شود (۱۱).

نتایج مربوط به بررسی کالوس‌زایی ۷ گونه افدرا نشان داده است که در غلظت‌های مختلف 2,4-D و Kin کالوس‌های تولید شده سبز روشن بوده و ساختاری نرم دارند (۱۲). اما در این پژوهش رنگ کالوس‌ها در تیمارهای مختلف از نارنجی تا قهوه‌ای متفاوت بوده و نیز در برخی موارد کالوس‌ها ساختاری نرم و در برخی دیگر فشرده و سفت دارند. نکته قابل ذکر آن است که در بیشتر تیمارها کالوس-ها در ابتدا به رنگ سبز روشن بوده و با گذشت زمان و واکشت‌های متوالی کالوس‌ها به رنگ نارنجی و قهوه‌ای درآمدند.

بررسی میزان افدرین در کالوس‌ها نشان داد که تیمار حاوی ۲ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-Dو Kin دارای بیشترین میزان افدرین است که نسبت به میزان افدرین در گیاه مادر افزایش نشان می‌دهد. در حالی‌که بررسی‌های انجام شده بر روی ۷ گونه مختلف افدرا نشان داده که میزان افدرین در کالوس‌های تولیدشده در شرایط کشت-بافت کمتر از میزان افدرین در گیاه مادر است (۱۰). همچنین این محققان نشان دادند که با واکشت‌های متوالی میزان افدرین کاهش می‌یابد. بنابراین در پژوهش حاضر با توجه به زمان طولانی برداشت کالوس و واکشت‌های متعدد (۸۰ روز) ممکن است میزان افدرین کاهش یافته باشد. اما برخی گزارش‌ها نیز نشان داده‌اند که بیشترین میزان افدرین در کالوس گیاه *Ephedra alata* در محیط کشت MS حاوی۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D وKin مشاهده شد. این محققان اشاره کرده‌اند که میزان افدرین در کالوس این گونه از افدرا نسبت به گیاهان وحشی ۴/۸ برابر افزایش یافته است (۱۰). مقایسه نتایج حاضر با یافته‌های دیگر محققان نشان می‌دهد که گونه‌های مختلف افدرا در شرایط کشت‌بافت پاسخ‌های متفاوتی می‌دهند. همچنین بررسی کالوس‌زایی *Ephedra procera* در غلظت‌های مختلف Kin و NAA نشان داده که استفاده از غلظت ۲ و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و Kin سبب تحریک ریشه‌زایی در ۱۸ درصد قطعات جداکشت می‌شود و نکته قابل توجه در این تحقیق آن بود که میزان افدرین در کالوس‌های ریشه‌دار شده نسبت به کالوس‌های فاقد ریشه افزایش قابل توجهی نشان داد (۱۴). از طرفی دیگر نتایج حاضر نشان داد که بیشترین میزان افدرین در کالوس‌های نارنجی رنگ در تیمار ۲ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و Kin مشاهده می‌شود. رنگ سبز روشن کمترین میزان افدرین را در خود داشته و در کالوس‌های قهوه‌ای با ساختار شکننده نیز میزان افدرین بسیار اندک بود. این امر نشان‌دهنده آن است که میزان رشد و سازمان‌بندی سلول‌ها در شرایط کشت بافت می‌تواند تولید متابولیت‌های ثانویه را تحت تأثیر قرار دهد (۱۲).

نتیجه‌گیری

نتایج تحقیق حاضر نشان داده که محیط کشت MS به همراه تیمارهای مناسب هورمون‌های 2,4-D و Kin شرایط مناسبی برای تحریک کالوس‌زایی از قطعات جدا کشت ساقه گیاه افدرا است. همچنین این نتایج نشان داده که امکان تولید این ماده با ارزش دارویی در شرایط کشت بافت وجود داشته اما مطالعات بیشتری باید در این خصوص انجام شود.

منابع

۱- ارزانی، ح.، مظفری، م.، مقدم، م.ر.، دادخواه، م. ۱۳۷۹. بررسی بوم‌شناختی گونه‌های Ephedra spp در منطقه بیارجمند شاهرود. مجله منابع طبیعی ایران. جلد۵۳. شماره ۲. ۱۱۱-۹۹.

۲- اسدی، م.، ۱۳۷۶، فلور ایران، شماره ۲۲: تیره ارمک. مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع.

۳- باهر، ز.، احمدی، ل.، باباخانلو، پ.، ۱۳۷۹. بررسی مقایسه‌ای مقادیر آلکالوئیدهای افدرین و پزدوافدرین در گونه‌های افدرای ایران. تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران. (۶): ۶۵-۴۸.

۴- قهرمان،ا،۱۳۷۳. کورموفیتهای ایران(سیستماتیک گیاهی)،جلداول مرکزنشردانشگاهی تهران.

5- Abourashed, E.A., Abir, T., El-Alfy, A.T., Khan, I.A., Walker, L. 2003.Ephedra in Perspective – a Current Review.Phytotherapy Research. 17: 703–712.

6- Dhiman, M., Sharma, V. 2010.Regeneration of Plants from Somatic Embryos Derived from Stem Culture in *Ephedra foliate*.Plant Tissue Cult.& Biotech. Dhaka, Bangladesh. pp. 19-25.

7- 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.

8- Garla, M., Pratush, A., Kumar, S., Singh, S., Shivani, S. 2011. *In-vitro* callus induction and shoot regeneration in *Ephedra* – A medicinal Plant. Annals of Biological Research. 2 (6):645-651.

9- Hagel, J.M., Krizevski, R., Marsolais, F., Lewinsohn, E., Facchini, P.J. 2012.Biosynthesis of amphetamine analogs in plants.Trends in Plant Science. 17: 404-412.

10- Hejazi, G.A.E., El-lamey, T.M. 2011. Callus induction and extraction of ephedrine from *Ephedra alata*Decne. Culture.American-Eurassian JournalAgriculture and Invironmental Science. 11: 19-25.

11- O'Dowd, N.A., Mccauley, P G., David, H.S, Richardson & Graham, Wilson. 1993 Callus production, suspension culture and in vitroalkaloid yields of Ephedra. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 34: 149-155.

12- Murashige, T.,Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. PhysiologiaPlantarum. 15: 473- 497.

13- Okada, T., Mikage, M., Sekita, S. 2008. Molecular characterization of the phenylalanine ammonia lyase from *Ephedra sinica*. Biological & Pharmaceutical Bulletin.31: 2194-2199.

14- Parsaeimehr, A., Sargsyan, E., Javidnia, K. 2010. 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 ofEphedra.Molecules. 15, 1668-1678.

15- Shamsa, F., Monsef, H., Ghamooshi, R., Verdian-rizi, M. 2008.Spectrophotometric determination of total alkaloids in some Iranian medicinal plants. The Thai Journal of Pharmaceutical Sciences. 32: 17-20.

16- Sheu, S.J., Huang, M.H. 2001.Determination of Ephedra alkaloids by high performance liquid chromatography.Chromatographia. 54: 117-119.

17- Yang, Y., Geng, B.Y., Dilcher, D.L., Chen, Z.D., Lott, T.A. 2005.Morphology and affinities of an Early Cretaceous Ephedra (Ephedraceae) from china.American Journal of Botany. 92(2): 231-241.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه گلستان به دلیل حمایت مالی انجام این طرح نهایت تشکر و قدردانی را دارند.

Optimization of callus induction and ephedrine production in *Ephedra major*

MofidBojnordi M.[1], Aghdasi M[1], Mianabadi M.[1] and Nadaf M.[2]

[1] Biology Dept., Faculty of Science, Golestan University, Gorgan, I.R. of Iran

[2] Biology Dept., Bojnoord Payame Noor University, Bojnoord, I.R. of Iran

Abstract

Ephedrin is the most important alkaloid in *Ephedra*which used as anti-asthmatic medicine. The aim of current study was optimization of callus induction for ephedrine production in tissue culture condition. In the current work the effect of different concentration of 2,4-D and Kin (0, 0.5, 1 and 2 mg/l) was investigated on callus induction of stem explants. The experiment was performed in complete randomized test. For this purpose, seeds were collected from Bojnoordelevations and then planted in forest soil. After 5 months, stem explants were transferred to MS medium supplemented with 2,4-D and Kin. The results showed that the highest percentage of callus formation and total alkaloid amount were observed at 0.5 and 0.5 mg/L 2,4-D and Kin. Meanwhile, Ephedrine measurement by HPLC methods showed that the highest amount of ephedrine (0.053 mg/g Dry weight) was observed in callus which induced in MS medium supplemented with 2 and 0.5 mg/l of 2,4-D and Kin.In conclusion, the current result showed that the callus which is produced by the explant can be used to make ephedrine in tissue culture condition.

Key words: Total Alkaloids, Callus, Ephedrine, 2,4-D, Kinetin, *Ephedra major* .