



دانشگاه گورگان، دانش‌پژوهی منابع طبیعی گورگان

نشریه پژوهش‌های علوم و فناوری چوب و جنگل

جلد بیست و پنجم، شماره سوم، ۱۳۹۷

<http://jwfst.gau.ac.ir>

DOI: 10.22069/jwfst.2018. 14432.1723

اثر میزبان‌های مختلف بر تغییرات متابولیت‌های ثانویه دارویش اروپایی (*Viscum album L.*)

* وحیده پیام‌نور^۱، حلیمه امیریان^۲ و فرزانه رزمجو^۲

^۱دانشیار دانشکده علوم جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران،

^۲دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، دانشکده علوم جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۹/۲۶؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۶/۰۴

چکیده

سابقه و هدف: دارویش‌ها گروهی قابل توجه و متنوع از نهان‌داندانگان‌اند که انگل شاخه‌ها محسوب شده و دارای طیف گسترده‌ای از میزبان‌ها بوده و محدوده پراکنش بسیار وسیعی در دنیا داشته و ترکیبات مؤثره زیادی در خود دارند. با توجه به اینکه مقدار و نوع این ترکیبات در گیاهان به عوامل بسیار زیاد محیطی و ژنتیکی وابسته است، در تحقیق حاضر اثر میزبان‌های مختلف شامل انجیلی، ممرز، توسکای قشلاقی و صنوبر بر تغییرات متابولیت‌های ثانویه فنل، فلاونوئید، خواص آنتی‌اکسیدانی، بتولین و بتولینیک اسید در دارویش اروپایی بررسی شده است.

مواد و روش‌ها: نمونه‌برداری برای این مطالعه آزمایشگاهی در اواخر شهریور ماه ۹۴ از دارویش‌های میزبانی شده توسط گونه‌های انجیلی، صنوبر، ممرز و توسکا قشلاقی در ۳ تکرار در نقاط پایین‌بند تا میان‌بند طرح جنگلداری دکتر بهرام‌نیا واقع در محدوده جنگل شصت کلاته گرگان انجام و سپس نمونه‌ها خشک، آسیاب و عصاره‌گیری با سه حلال اتانول، متانول و استون صورت گرفت. پس از عصاره‌گیری، فرایند آزمایشات موردنیاز طی شد و داده‌های به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد میزبان‌های مختلف بر ترکیبات مؤثره دارویش اروپایی اثرات معناداری دارند. مطابق نتایج به دست آمده بیشترین میزان آنتی‌اکسیدان (۹۳/۰۳ درصد رادیکال آزاد) و فنل کل (۴/۴۵ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) به ترتیب مربوط به عصاره اتانولی ساقه و برگ دارویش میزبانی شده توسط گونه انجیلی، و بیشترین میزان فلاونوئید (۲/۰۷ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) مربوط به عصاره اتانولی ساقه دارویش با میزبانی گونه صنوبر می‌باشد. بیشترین میزان بتولین (۱۴۸/۳ میلی‌گرم بر گرم) در برگ دارویش موجود بر میزبان گونه ممرز اندازه‌گیری شد. بیشترین مقدار بتولینیک‌اسید ۲۸۶/۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود که در اندام ساقه دارویش با میزبانی گونه صنوبر به‌دست آمد.

نتیجه‌گیری: نتایج حاکی از آن است که درخت میزبان می‌تواند نقش کلیدی بر میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی و خواص آنتی‌اکسیدانی برگ و ساقه گیاه نیمه انگل دارویش بگذارد. از طرفی وجود این متابولیت‌های ثانویه با ارزش دارویی و حتی صنعتی در این گیاه لزوم توجه ویژه را بر این‌گونه باارزش مورد تأکید قرار می‌دهد. با توجه به این‌که

*مسئول مکاتبه: Mnoori56@gmail.com

دو ماده مؤثره ضد سرطانی بتولین و بتولینیک‌اسید به لحاظ دارویی ارزش زیاد و در عین حال قیمت بالایی دارند می‌توان برای این منظور، از داروهای میزبانی شده با ممرز و صنوبر بهره برد.

واژه‌های کلیدی: بتولین، بتولینیک‌اسید، متابولیت‌های ثانویه، میزبان‌های مختلف، *Viscum album*

مقدمه

داروهای اروپایی با نام علمی *Viscum album* L. یک گونه از گروه متنوع خانواده داروهای (Viscaceae) می‌باشد. داروهای (Mistletoes) از گونه‌های بسیار جذاب در بین گیاهان گل‌دار نهاندانه محسوب شده و در زمره گیاهان نیمه انگل تا تمام انگل طبقه‌بندی شده و بر روی شاخه‌های میزبان‌های درختی و درختچه‌ای زیست می‌کنند (۱۲). همیشه سبز و فاقد ریشه حقیقی‌اند و از طریق اندام نفوذی و ریشه ماندی (مکینه یا هاستریوم^۱) به شاخه‌ها و تاج زنده درختان و درختچه‌ها در جنگل‌ها و درخت‌زارها چسبیده و مدت زیادی از زندگی خود را با میزبان سپری و آب و مواد معدنی (در گونه‌های نیمه انگل) و مواد قندی (در گونه‌های تمام انگل) مورد نیاز خود را جهت انجام فرایندهای سنتزی خود از این طریق جذب می‌کنند (۱۴ و ۳۷). هاستریوم با ترکیبی از نیروهای مکانیکی و تجزیه آنزیمی به داخل اپیدرم و پوست میزبان نفوذ نموده و رویش خود را تا جایی ادامه می‌دهد که به آب و مواد غیر آلی در آوندهای چوبی میزبان دست یابد (۳۷). پس از اینکه داروهای آب و املاح خود را با توسعه مکینه از آوندهای میزبان جذب نمودند طی فرایند فتوسنتز به تولید قندهای خود می‌پردازند (۱۹).

داروهای دارای طیف گسترده‌ای از میزبان‌ها بوده و محدوده پراکنش بسیار وسیعی در دنیا دارد. این گونه از داروهای در مناطق مختلف اروپا، آسیا و از جمله ایران یافت می‌شوند (۱۵، ۱۱). داروهای اروپایی در

ایران بیشتر بر روی درختان ممرز، انجیلی، ملج، اوجا، نمدار، پلت، آلوچه، توسکا، سفید پلت، جل و گاهی هم بید و صنوبر و گردو می‌روید (۱۶، ۱۲، ۳۲). این گونه بر روی شاخه گیاه میزبان به صورت کلنی‌های ۵۰-۶۰ سانتی‌متری دیده می‌شود، دوپایه است و برگ‌های کامل و چرمی دارد. دیده شده حضور داروهای باعث افزایش پتاسیم و کاهش نیتروژن به ترتیب در شاخه و برگ میزبان می‌شود (۱۴). علاوه بر آن میزان فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز از میزبان افزایش می‌یابد (۸). در بسیاری از مواقع طول شاخه، طول ریشه، قطر یقه، زی‌توده، تعداد برگ و کارایی رویش نهال‌های آلوده به داروهای نیز کاهش می‌یابد (۱۷).

متابولیت‌های ثانویه در سلول‌های مختلف گیاه ذخیره شده و به‌عنوان اسانس و عصاره با به کارگیری روش‌های مختلف قابل استخراج هستند و در عین حال مقدار و حتی نوع این متابولیت‌ها در گیاهان با توجه به نوع گونه، شرایط محیطی و جغرافیایی محل رویش متفاوت است. به‌نظر می‌رسد بسیاری از ترکیبات ثانویه گیاه میزبان توسط داروهای جذب می‌شود، مضاف بر این‌که گونه‌های مختلف به‌طور اختصاصی نیز ترکیبات ویژه‌ای در خود دارند. عصاره *V. album* به‌طور گسترده‌ای حاوی تری‌ترین‌های پنتاکسیل مانند بتولین و بتولینیک‌اسید می‌باشد که اثرات ضد سرطانی دارند (۱۳).

ماشیتو و همکاران، ۲۰۱۱ اظهار داشتند بتولینیک‌اسید و مشتقات آن خاصیت سیتوتوکسیسیستی در برابر انواع تومور و خطوط سلول‌های سرطانی از خود

1- *Haustorium*

فعالیت زیستی و خواص آنتی‌اکسیدانی داروаш با میزبان‌های مختلف به این نتیجه رسیدند که دارواش‌های موجود بر میزبان زبان گنجشک دارای بالاترین سطح اسیدهای فنلی کل (۱۰۸/۶۸ میکرو گرم در ماده خشک) و دارواش موجود بر میزبان سیب پایین‌ترین سطح از پلی فنل (۳۹/۳۷ میکرو گرم) را دارا می‌باشد. همچنین عصاره ساقه دارواش سطوح فنلی پایین‌تری نسبت به عصاره برگ آن دارد (۳۱). تحقیق حاضر جهت بررسی اثر میزبان‌های مختلف (انجیلی، صنوبر، مرمر و توسکا بیلاقی) بر تغییرات برخی ترکیبات ثانویه (فنل، فلاونوئید، خواص آنتی‌اکسیدان، بتولین و بتولینیک اسید) گونه *V. album* انجام شده است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری برای این مطالعه آزمایشگاهی، در اواخر شهریور ماه سال ۱۳۹۴ از بافت‌های رویشی دارواش‌های موجود بر روی پایه‌های بالغ میزبان‌های انجیلی، صنوبر، مرمر و توسکای قشلاقی در ۳ تکرار در نقاط پایین‌بند تا میان‌بند جنگل شصت کلاته (طرح دکتر بهرام‌نیا- گرگان) انجام شد. نمونه‌ها پس از انتقال به محیط آزمایشگاه به مدت ۱ ماه در دمای اتاق خشک و سپس برگ و ساقه به صورت مجزا آسیاب شد. جهت عصاره‌گیری، مقدار ۱ گرم از هر نمونه در ۱۰ میلی‌لیتر از حلال‌های اتانول، متانول و استون مخلوط و به مدت ۲۴ ساعت بر روی شیکر قرار گرفت. سپس به مدت ۵ دقیقه در ۳۵۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد تا فاز عصاره از مواد جامد جدا شود. سپس عصاره‌های حاصل در ظروف مخصوص در دمای ۱۸- درجه نگهداری شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH: با استفاده از روش به دام‌اندازی رایکال‌های آزاد، ابتدا دو میلی‌لیتر DPPH (دی فنیل پیکریل

نشان داده‌اند. یافته‌های آن‌ها نشان می‌دهد که بتولینیک اسید به عنوان یک عامل ایمنی است که در بالا بردن سیستم ایمنی بدن مفید عمل می‌کند (۲۳). مشخص شده عصاره دارواش می‌تواند رادیکال‌های آزاد اکسیژن تولید شده در طی رادیوتراپی و شیمی درمانی را سرکوب کند. جاگر و همکاران، ۲۰۰۹ میزان بتولینیک اسید را در شاخه سبز دارواش حدود ۰/۰۵ گرم در صدگرم ماده خشک گزارش کردند (۱۳). در شاخه سبز و برگ دارواش، ماده ضد سرطانی بتولین نیز دیده شده است (۹). طبق تحقیقی که ویکاس و همکاران، ۲۰۱۱ بر روی میزان بتولینیک اسید در دارواش‌هایی با میزبان‌های مختلف انجام دادند در دارواش‌هایی با میزبان‌های کرکو^۱، شالک^۲، افاقیا^۳ بتولینیک اسید یافت نشد، اما عصاره برگ زبان گنجشک^۴، (۰/۰۳ ± ۲/۳۵ میکروگرم بر گرم ماده خشک) بتولینیک اسید دارد. ساقه و برگ سیب^۵، به ترتیب (۲/۰۵ ± ۰/۰۲ و ۱/۸۷ ± ۰/۰۲ میکروگرم بر گرم ماده خشک) بتولینیک اسید دارند. در پژوهشی دیگر فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارواش تحت تأثیر فصول و میزبان‌های مختلف زبان گنجشک، شالک، افاقیا، کرکو و سیب تحقیقاتی انجام دادند، نتایج نشان داد که دارواش میزبانی شده با افاقیا دارای بالاترین سطح از فعالیت آنتی‌اکسیدانی بود، این محققین اذعان داشتند فعالیت آنتی‌اکسیدانی بین برگ و ساقه دارواش برداشت شده از درختان مختلف را می‌توان به عوامل محیطی مانند آب و هوا و درجه حرارت نسبت داد که به طور قابل توجهی می‌تواند باعث تجمع اجزای آنتی‌اکسیدانی متفاوت در بافت‌های گیاهی شود (۳۱). همین محققین در بررسی دیگری در مورد بررسی

- 1- *Acer campestre*
- 2- *Populus nigra*
- 3- *Robinia pseudocacica*
- 4- *Fraxinus excelsior*
- 5- *Malus domestica*

نمونه گیاه دارویش توزین و با ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد مخصوص دستگاه HPLC مخلوط و به مدت ۴۸ ساعت بر روی شیکر مغناطیسی بدون حرارت قرار داده شد. پس از این مرحله به مدت ۱۲ دقیقه نمونه‌ها در حمام اولتراسونیک قرار گرفتند. عصاره‌ها از صافی عبور و جهت تزریق به دستگاه HPLC در آزمایشگاه نگهداری شدند. استاندارد بتولین و بتولینیک اسید از شرکت سیگما خریداری شد. غلظت‌های متفاوت از استاندارد بتولین و بتولینیک اسید جهت رسم منحنی استاندارد آن، تهیه و به دستگاه HPLC تزریق و منحنی کالیبراسیون ترسیم گردید. با استفاده از معادله خط با ضریب همبستگی بالا حاصل از منحنی کالیبراسیون، غلظت بتولین و بتولینیک اسید در هر یک از نمونه‌ها با استفاده از مساحت سطح زیر پیک آن‌ها محاسبه گردید (۳۵).

تجزیه و تحلیل آماری: تجزیه و تحلیل داده‌ها بر اساس آزمایش فاکتوریل سه عاملی در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی انجام گرفت. جهت آنالیز داده‌های فنل و فلاونوئید و خواص آنتی‌اکسیدان با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ و مقایسه میانگین‌ها از آزمون Tukey HSD استفاده شد. جهت آنالیز و تعیین سطح زیر پیک منحنی بتولین و بتولینیک اسید، از نرم‌افزار IZCO استفاده شد و منحنی کالیبراسیون ترسیم گردید.

نتایج

در جدول ۱ تجزیه واریانس اثر گونه میزبان، اندام و حلال‌های مختلف بر مقادیر فنل، فلاونوئید و خواص آنتی‌اکسیدان دارویش ارائه شده است. مطابق جدول، اثر گونه میزبان بر این مقادیر در سطح احتمال ۱ درصد اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد. در بین اندام‌های مورد بررسی در میزان فنل و فلاونوئید اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد و برای مقادیر

هیدرازیل) در ظرف تهیه محلول قرار گرفت و به آن دو میلی‌لیتر عصاره حلال‌های اتانولی، متانولی و استونی اضافه و به شدت تکان داده شد. محلول آماده شده به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار گرفت و میزان جذب آن در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت و در نهایت با استفاده از رابطه زیر درصد به دام‌اندازی رادیکال‌های آزاد DPPH اندازه‌گیری شد و از رابطه ۱ محاسبه گردید (۲۴).

$$\text{Equation 1: } I\% = [(A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{blank}}] \times 100$$

A_{blank} : جذب نمونه شاهد (بدون عصاره گیاهی)

A_{sample} : جذب نمونه

اندازه‌گیری میزان فنل کل: مقدار ترکیبات فنل‌های کل با معرف فولین-سیکالتو تعیین شد. ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین به ۲۰ میکرولیتر از عصاره‌های گیاهی، اضافه شد. پس از اضافه کردن ۱/۱۶ میلی‌لیتر آب مقطر به محلول آماده شده، نمونه‌ها ۵ دقیقه در تاریکی قرار گرفتند. پس از آن ۳۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم ۲۰ درصد اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و حمام بخار توام (بن‌ماری) ۴۰ درجه قرار گرفتند. جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۶۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت و منحنی استاندارد توسط غلظت‌های مختلفی از گالیک اسید تهیه گردید (۲۲).

اندازه‌گیری میزان فلاونوئید کل: جهت اندازه‌گیری میزان فلاونوئید کل، ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره با حلال‌های مختلف، ۱/۵ میلی‌لیتر حلال ۸۰ درصدی، ۰/۱ میلی‌لیتر آلومینیوم کلرید، ۰/۱ میلی‌لیتر استات پتاسیم ۱ مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر ترکیب شده و محلول‌های آماده شده ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار گرفتند. جذب هر ترکیب واکنشی در ۴۱۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری و منحنی استاندارد با محلول کوئرستین در غلظت‌های مختلف تهیه گردید. **تعیین مقدار بتولین و بتولینیک اسید:** ۱۰ گرم از هر

اندازه‌گیری شد. اثرات متقابل میزبان، اندام و حلال در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دار برای فنل و خواص آنتی‌اکسیدان نشان می‌دهد ولی در مقادیر فلاونوئید اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.

آنتی‌اکسیدان این اختلاف در سطح ۱ درصد اندازه‌گیری شد. تجزیه واریانس اثر حلال بر میزان فنل، غیر معنی‌دار، برای مقادیر فلاونوئید اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد و برای خواص آنتی‌اکسیدان این اختلاف در سطح ۱ درصد

جدول ۱- تجزیه واریانس مقادیر فنل، فلاونوئید و خواص آنتی‌اکسیدانی دارویش در گونه، اندام و حلال‌های مختلف.

Table 1. Analysis of variance related of phenols, flavonoids and antioxidant properties of mistletoe in different species, organs and solvents

فعالیت آنتی‌اکسیدانی Antioxidant activity	فلاونوئیدکل Total flavonoids	فنل کل † Total phenol	درجه آزادی df	منبع تغییرات Source of variance
169.005**	0.0876**	347.64**	3	میزبان Host tree
1181.79**	0.08*	87.052*	1	اندام Organ
2848.169**	0.052*	0.02593 ^{ns}	2	حلال Solvent
170.761**	0.016 ^{ns}	3.289**	3	میزبان × اندام Organ × Host tree
658.858**	0.031 ^{ns}	179.911**	6	میزبان × حلال Solvent × Host tree
9.853 ^{ns}	0.068**	13.144 ^{ns}	2	اندام × حلال Solvent × Organ
600.240**	0.162**	72.911**	6	میزبان × اندام × حلال Solvent × Organ × Host tree
11.32	0.016	16.91	46	خطا Error
-	-	-	71	کل Total

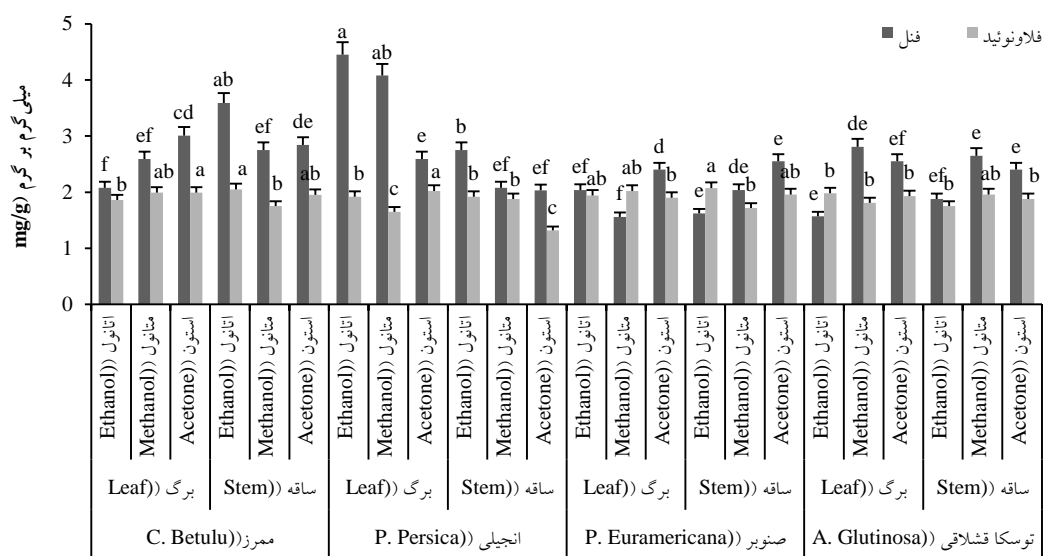
** معنی‌داری در سطح یک درصد، * معنی‌داری در سطح پنج درصد و ns عدم وجود رابطه معنی‌دار آماری.

† کلیه مقادیر ارائه شده در جدول برای متغیرها، میانگین مربعات می‌باشد.

† Presented values in the table are related to mean square.

میزان فنل عصاره اتانولی برگ دارویش موجود بر میزبان انجیلی تفاوت معنی‌دار ندارد. مطابق همین جدول بیشترین میزان فلاونوئید ۲/۰۷ میلی‌گرم بر گرم مربوط به عصاره اتانولی ساقه دارویش موجود بر میزبان صنوبر می‌باشد که از لحاظ آماری با سایر تیمارهای ارائه شده در جدول اختلاف معنی‌داری نشان نداد.

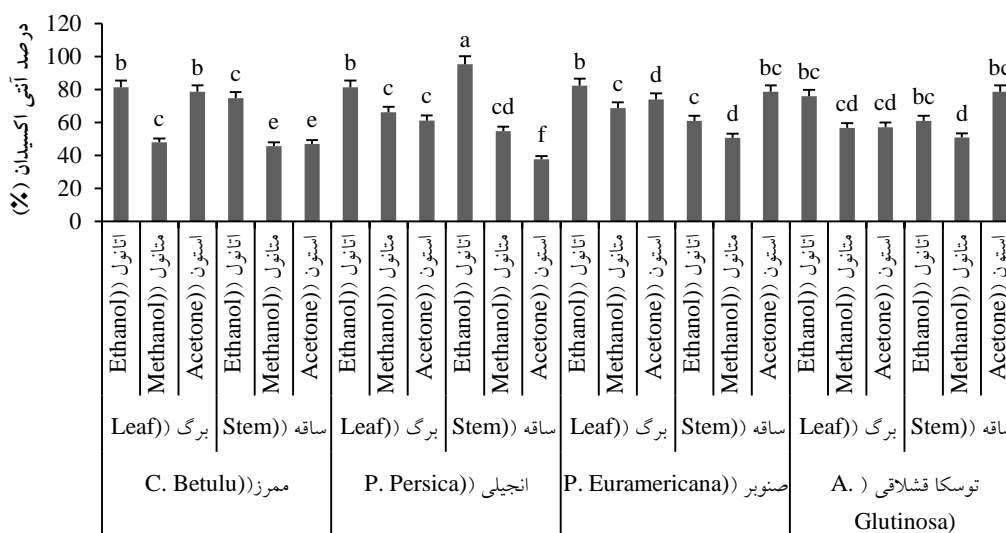
در شکل ۱ مقایسه میانگین اثرات متقابل گونه میزبان، اندام و حلال بر میزان فنل و فلاونوئید دارویش اروپایی بر میزبان‌های مختلف ارائه شده است. بر همین اساس بیشترین میزان فنل اندازه‌گیری شده (۴/۴۵ میلی‌گرم بر گرم) مربوط به عصاره اتانولی برگ دارویش موجود بر میزبان انجیلی می‌باشد که از لحاظ آماری با



شکل ۱- مقایسه میانگین اثر میزبان، اندام و حلال بر میزان فنل، فلاونوئید داروهای اروپایی.
Figure 1. Mean Comparison of host, Organ and solvent effects of the average of phenol, flavonoids properties of *Viscum album* L.

گروه‌های مختلفی قرار گرفته‌اند که در شکل ۲ مشاهده می‌شود.

بیشترین میزان خواص آنتی‌اکسیدانی (۹۵/۰۳ درصد) مربوط به عصاره اتانولی ساقه داروهای موجود بر میزبان انجیلی می‌باشد. مقادیر آنتی‌اکسیدان در



شکل ۱- مقایسه میانگین اثر میزبان، اندام و حلال بر خواص آنتی‌اکسیدانی داروهای اروپایی.
Figure 1. Mean comparison of host, Organ and solvent effects on the values of antioxidant properties of *Viscum album* L

بتولینیک اسید داروهای مختلف، اختلاف معنی‌داری را در سطح احتمال ۱ درصد نشان می‌دهد.

همان‌طور که جدول ۲ نشان می‌دهد، تجزیه واریانس همه تیمارهای اعمال شده بر میزان بتولین و

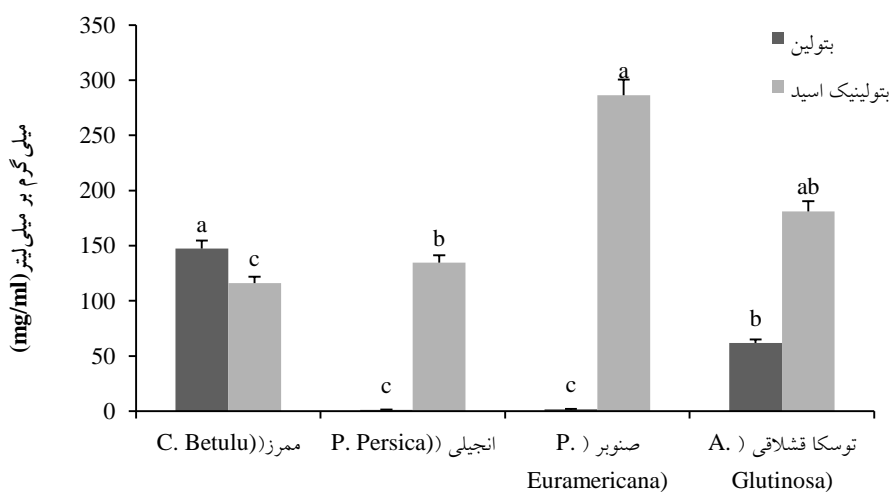
جدول ۲- تجزیه واریانس مقادیر بتولین و بتولینیک اسید داروش در میزبان‌ها و اندام‌های مختلف.

Table 1. Analysis of variance related of Betulin and Betulonic acid of mistletoe in different species and organs

میانگین مربعات Mean Square		درجه آزادی DF	منبع تغییرات Source of Change
بتولینیک اسید Betulinic Acid	بتولین Betulin		
393310**	5263252**	3	میزبان Host tree
444083**	6600993**	1	اندام Organ
287747**	219674**	3	میزبان × اندام Host tree*Organ
8125	1826	14	خطا Error
-	-	23	کل Total

اسید با ۲۸۶/۳ میلی‌گرم بر گرم به ترتیب در داروش موجود بر میزبان ممرز و صنوبر اندازه‌گیری شد.

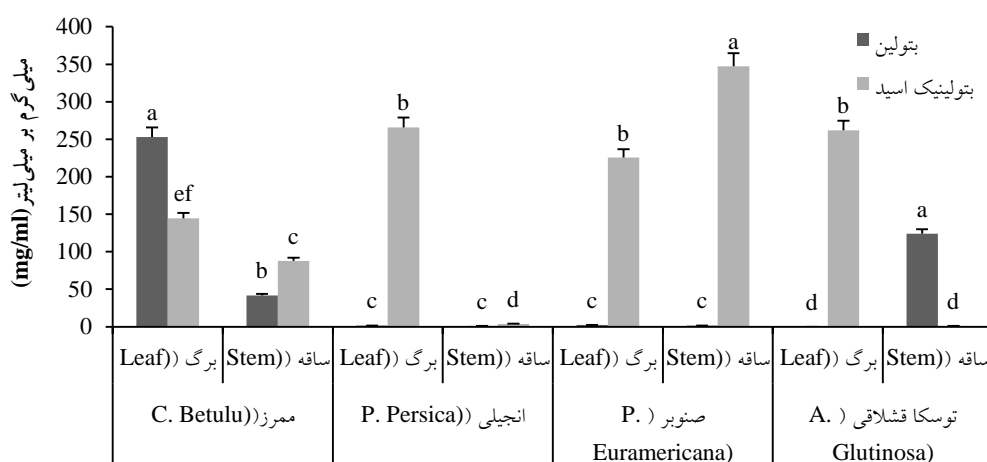
همان‌طور که شکل ۳ مشاهده می‌شود بیشترین میزان بتولین با ۱۴۷/۴ میلی‌گرم بر گرم و بتولینیک



شکل ۳- مقایسه اثر میزبان‌های مختلف بر میزان بتولین و بتولینیک اسید.

قشلاقی یافت شد. همچنین مقادیر میزان بتولینیک اسید اندازه‌گیری شده در کلاس‌های مختلفی جای گرفت که بیشترین مقدار آن ۳۴۷ میلی‌گرم در میلی‌لیتر که در اندام ساقه داروش موجود بر میزبان صنوبر به دست آمد.

نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل گونه میزبان و اندام بر میزان بتولین و بتولینیک اسید داروش در شکل ۴ ارائه شده است. بر همین اساس بیشترین میزان بتولین (۲۵۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) در برگ داروش موجود بر میزبان ممرز و کمترین مقدار آن که صفر بود در اندام برگ و به میزبانی گونه توسکا



شکل ۴- مقایسه میانگین اثر میزبان و اندام بر مقادیر بتولین و بتولینیک اسید دارویش (میلی بر میلی‌لیتر)

Figure 4. Mean comparison of host and Organ effects on Betulin and Betulonic acid of mistletoe (mg/ml) of *Viscum album* L.

استخراج متابولیت‌های ثانویه گیاهان، متانول، اتانول و آب هستند. برخی محققان از ترکیب حلال‌های مختلف برای کسب نتایج بهتر استفاده می‌کنند (۳۳). بر اساس نتایج به دست آمده بیشترین میزان فنل اندازه‌گیری شده (۴/۴۵ میلی‌گرم بر گرم) مربوط به عصاره اتانولی برگ دارویش موجود بر میزبان انجیلی می‌باشد که با میزان فنل عصاره متانولی آن اختلاف معنی‌دار ندارد. محققان در تحقیقی خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی دارویش موجود بر میزبان کاکائو و درختان بادام را در نیجریه مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد توانایی مهار رادیکال‌های آزاد دارویش با میزبان کاکائو بیشتر از دارویش موجود بر میزبان بادام است. در حقیقت میزان ترکیبات فنلی که خواص آنتی‌اکسیدانی را سبب می‌شوند به ترتیب ۱۸۲ میلی‌گرم در صد گرم و ۱۶۰ میلی‌گرم در صد گرم بود (۲۶). لوزکویس و همکاران (۲۰۰۱) در بررسی ترکیبات فنلی موجود در عصاره دارویش موجود بر ۶ میزبان مختلف به این نتایج رسیدند که دارویش موجود بر میزبان *Malus domestica* دارای بیشترین میزان فنل (۱۷ میلی‌گرم در صد گرم) و ترکیب اصلی آن رزمارینیک اسید بود

بحث

فنل و فلاونوئیدها دسته‌ای از ترکیبات فیتوشیمیایی هستند که طی فرایند تمایز یابی سلول‌ها ایجاد می‌گردد. فعالیت بیولوژیکی متنوع این ترکیبات از جمله خواص ضد آلرژی، ضد باکتریال، ضد ویروس، ضد التهاب و گشاد کنندگی عروق آن‌ها در بسیاری از بررسی‌ها گزارش شده که بیشتر مربوط به حذف رادیکال‌های آزاد و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها می‌باشد (۹، ۶). در این تحقیق اثر میزبان‌های مختلف (ممرز، انجیلی، توسکای قشلاقی و صنوبر) بر تغییرات متابولیت‌های ثانویه دارویش اروپایی (*V. album*) در اندام‌های برگ و ساقه با سه حلال استون، اتانول و متانول مورد بررسی قرار گرفت. برای افزایش کارایی عمل استخراج، باید عوامل مؤثر در این مسیر شناسایی شود. ویژگی حلال‌ها بسته به غلظت و قطبیت آن‌ها، کمیت ترکیبات شیمیایی موجود در عصاره‌های گیاهی را تحت تأثیر قرار خواهد داد. مقادیر مربوط به متابولیت‌های زیست فعال ثانویه نمونه‌های عصاره‌گیری شده، ممکن است بسته به حلال‌های عصاره‌گیری استفاده شده، متفاوت باشند (۳۴). رایج‌ترین حلال‌های استفاده شده جهت

طبیعی است که از گیاهان جداسازی شده است. این ماده در طب سنتی چینی برای درمان رماتیسم و دردهای عصبی از گیاهان جدا می‌شده است (۲۰۰۸). بتولینیک اسید نیز یک تری ترپن لوپئولی است که در نتیجه اکسیداسیون بتولین وجود آمده و در برابر توده‌های سرطانی نقش پیشگیری کننده (۱۸) و تخریب‌گری (۲۷) دارد. بیشترین میزان بتولین (۱۴۷/۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) در برگ داروаш موجود بر میزان ممرز و کمترین مقدار آن که صفر بود در اندام برگ و به میزبانی گونه توسکا قشلاقی اندازه‌گیری شد در حالی که میزان بتولینیک اسید در این گونه بسیار بالا (۲۶۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) بود. بیشترین مقدار بتولینیک‌اسید (۳۴۷ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) در ساقه دارواش موجود بر میزان صنوبر به‌دست آمد. رزمجو و همکاران، ۱۳۹۳ خواص آنتی‌اکسیدانی میزان فنول و فلاونوئید کل و همچنین دو ترپنوئید بتولین و بتولینیک‌اسید را در سه اندام برگ، شاخه و پوست گونه‌های توسکا بیلاقی، توسکا قشلاقی، ممرز، داغداغان، گردو، چنار، خرمندی و گلابی وحشی بررسی نمود. بیشترین خواص آنتی‌اکسیدانی در گونه ممرز و فنول و فلاونوئید کل در گلابی وحشی و بالاترین میزان بتولین و بتولینیک اسید به‌ترتیب در ساقه درختان توسکا قشلاقی و چنار مشاهده شد (۲۸). در نتایج تحقیق حاضر نیز بتولین استخراج شده از دارواش موجود بر میزان توسکای قشلاقی بالاتر از سایر موارد بوده است. بالا بودن میزان بتولین در توسکای قشلاقی توسط فلپولدی-گاوا و همکاران در سال ۲۰۱۲ نیز تأیید شده است تا جایی که این محققین آن را جایگزینی مناسب برای گونه توس به‌عنوان منبع بتولین معرفی می‌نمایند (۷). دارواش (*V. album*) یک گیاه انگل فاقد ریشه حقیقی است که قادر به زیستن در خاک نیست و جهت تأمین بخشی از عناصر غذایی خود، برای انجام فرآیند

و کمترین مقدار آن (۱۲/۳۴ میلی‌گرم در صد گرم) در دارواش موجود بر میزان *Populus nigra* ترکیب اصلی آن اسید کلروژنیک بود. با این حال ترشح این مواد وابستگی کامل به ژنتیک گونه‌ها دارد. برخی گونه‌ها متابولیت‌های ویژه و منحصر به فرد خود را دارند و برخی نیز مقادیر بالاتری از این متابولیت‌ها را نسبت به سایرین تولید می‌کنند (۲۰). بیشترین میزان فلاونوئید اندازه‌گیری شده در این تحقیق (۲/۰۷ میلی‌گرم بر گرم) مربوط به عصاره اتانولی ساقه دارواش موجود بر میزان صنوبر می‌باشد. در بررسی که کاندرات، ۲۰۰۹ بر روی محتوای فلاونوئید ۹ گیاه دارویی شامل دارواش اروپایی انجام دادند غلظت کوئرستین و کامفرول در عصاره دارواش بسیار کم و به‌ترتیب ۰/۲ و ۰/۱۶ میکرومول در وزن خشک برآورد شد (۳). عوامل بسیار زیادی از جمله اقلیم، خاک و ارتفاع، اختلاف در گونه‌های گیاهی، روش‌ها و حلال‌های استخراج و روش‌های مختلف اندازه‌گیری در میزان متابولیت‌های ثانویه از جمله فنل، فلاونوئید و خواص آنتی‌اکسیدانی دخالت دارند (۲۵). در این پژوهش بیشترین میزان آنتی‌اکسیدان (۹۵/۰۳ درصد) مربوط به عصاره اتانولی ساقه دارواش موجود بر میزان انجیلی می‌باشد. چوئی و همکاران، ۲۰۰۸ میزان خاصیت آنتی‌اکسیدانی در برگ‌های ممرز را ۳۳ درصد گزارش کردند. داهیجا و همکاران نیز در سال ۲۰۱۴ بیان کردند در برگ توسکا قشلاقی فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری نسبت به پوست آن وجود دارد (۴). در اغلب گیاهان، برگ‌ها منبع مهم تولید متابولیت‌های ثانویه با ارزش هستند (۲۹). سیمونا و همکاران، ۲۰۱۱ تفاوت در مقادیر آنتی‌اکسیدانی بین برگ و ساقه دارواش برداشت شده از میزبان‌های مختلف در فصول مختلف را به عوامل محیطی مانند آب و هوا و درجه حرارت مربوط دانستند (۳۱). بتولین نوعی تری‌ترپن و یکی از اولین محصولات

است (۱۴). امید است جامعه علمی کشور به این مهم دست یابد.

نتیجه‌گیری نهایی

نتایج حاکی از آن است که درخت میزبان می‌تواند نقش کلیدی بر میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی و خواص آنتی‌اکسیدانی برگ و ساقه گیاه نیمه انگل دارویش (*Viscum album*) بگذارد. بیشترین میزان فنل و خواص آنتی‌اکسیدانی در دارویش‌های با میزبان انجیلی، بیشترین مقدار فلاونوئید و بتولینیک اسید در دارویش‌های با میزبان صنوبر و بیشترین بتولین در دارویش با میزبان ممرز یافت شد. با توجه به این‌که این‌گونه در جنگل‌های شمال ایران به فراوانی یافت می‌شود، به نظر می‌رسد می‌تواند به‌عنوان یک گیاه دارویی با خواص متعدد برداشت و بهره‌برداری گردد (علی‌الخصوص در مورد دو ماده مؤثره ضد سرطانی بتولین و بتولینیک‌اسید که قیمت بالایی دارند) ضمن این‌که آسیب وارده از طریق دارویش به جنگل‌های شمال که جنگل‌های تجاری ایران به‌شمار می‌روند، کمتر خواهد شد.

فستونز نیازمند گیاه دیگری به نام میزبان بوده تا آب و عناصر غذایی موردنیاز خود را از آن به‌دست آورد (۱۴، ۳۷). درخت میزبان می‌تواند نقش کلیدی بر میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی و خواص آنتی‌اکسیدانی برگ و ساقه گیاه نیمه انگل دارویش بگذارد. گسترش دارویش‌ها در سال‌های اخیر در مناطق دارای درختان صنعتی و آسیب به پایه‌های مرغوب باعث شد در بسیاری موارد حکم حذف آن‌ها از جنگل‌ها صادر و حتی سوزانده شوند. اما به‌نظر می‌رسد با توجه به این‌که از دارویش‌ها به‌عنوان محرک سیستم ایمنی، گیاهی با خواص ضد سرطانی (۲۱ و ۳۶) آنتی میکروبی و آنتی‌باکتریایی (۵) و همین‌طور آنتی‌ویروسی القاکنندگی آپوپتوز (۲) نام می‌برند و نتایج تحقیق حاضر نیز موید وجود متابولیت‌های ثانویه با ارزش است، لازم است با لحاظ تمهیداتی از لحاظ دارویی و حتی صنعتی مورد توجه ویژه قرار بگیرند. این مساله توسط محققین دیگری از جمله کرتولی‌نژاد و همکاران، ۲۰۰۷ نیز تأکید شده

منابع

- 1- Aderbauera, B., Clausenb, P., Kershawc, O., and Melziga, M. 2008. In vitro and in vivo trypanocidal effect of lipophilic extracts of medicinal plants from Mali and Burkina Faso. *Journal of Ethnopharmacology*, 119: 225-231.
- 2- Büssing, A., and Schietzel, M. 1999. Apoptosisinducing properties of *Viscum album* L. extracts from different host trees, correlate with their content of toxic mistletoe lectins. *Anticancer Research*, 19: 23-28.
- 3- Condrat, D., Szabo M.R., Crisan, F., and Lupea, A.X. 2009. Antioxidant activity of some phanerogam plant extracts. *Food Science and Technology Research*, 15(1): 95-98.
- 4- Dahija, S., Čakar, J., Vidic, D., Maksimović, M., and Parić, A. 2014. Total phenolic and flavonoid contents, antioxidant and antimicrobial activities of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn., *Alnus incana* (L.) Moench and *Alnus viridis* (Chaix) DC. Extracts. *Natural product research*, 28(24): 2317-2320.
- 5- Deliorman, D., Ergun, F., Şener, B., and Palittapongarnpim, P. 2001. Evaluation of antimycobacterial activity of *Viscum album* subspecies. *Pharmaceutical biology*, 39: 381-383.
- 6- Durmaz, G., and Alpaslan, M. 2007. Antioxidant properties of roasted apricot (*Prunus armeniaca* L.) kernel. *Food Chemistry*, 100(2): 1177-1181.
- 7- Felfoldi-Gava, A., Szarka, S., Simandi, B., Blazics, B., Simon, B., and Kery, A.

- album* with some ecological parameters of host trees. International Journal of Environmental Research, 1(2): 143-149.
- 16- Kartoolinejad, D., Hosseini, S.M., Mirnia, S.K., Akbarinia, M., and Shayanmehr, F. 2008. Investigation of the Relationship between Infection Intensity to mistletoe (*Viscum album* L.) with Some Host Species Features in Nour Forest Park. Iranian Journal of Natural Resources, 61(1): 111-122. (In Persian)
 - 17- Karunaichamy, K.S.T.K., and Paliwal, k., Arp, P.A. 1999. Biomass and nutrient dynamics of mistletoe (*Dendrophthoe falcate*) and Neem (*Azadirachta indica*) Seedlings. Rubber Research Institute of India, Kottayam. 8p.
 - 18- Kvasnica, M., Sarek, J., Klinotova Dzubakb, P., and Hajduch, M. 2005. Synthesis of phthalates of betulinic acid and betulin with cytotoxic activity. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 13: 3447-3454.
 - 19- Lopez, D.B.L., Ornelas, F.J., and Garcia-Franco, G. 2001. Mistletoe Infection of Trees Located at Fragmented Forest Edges in the Cloud Forests of Central Veracruz, Mexico. Journal of Forest Ecology and Management, 164: 293-302.
 - 20- Luczkiewicz, M., Cisowski, W., Kaiser, P., Ochocka, R., and Piotrowski, A. 2001. Comparative analysis of phenolic acids in mistletoe plants from various hosts. Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research, 58: 373-379.
 - 21- Maier, G., and Fiebig, H.H. 2002. Absence of tumor growth stimulation in a panel of 16 human tumor cell lines by mistletoe extracts in vitro. Anticancer Drugs, 13: 4. 373-379.
 - 22- Mashayekhi, K., and Atashi, S. 2014. The analyzing methods in plant physiology. Sirang press. Gorgan, 310p. (In Persian)
 - 23- Mashitoh, A., Yeap, S., Ali, A., Faujan, A., Suhaimi, M., Ng, M., Lam, H., and Alitheen, N. 2012. Immunomodulatory Effects of Betulinic Acid Isolation from the Bark of Melaleuca cajuputi. Pertanika Journal of Tropical
 2012. Supercritical fluid extraction of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. The Journal of supercritical fluids, 61: 55-61.
 - 8- Ghorbanli, M., Sateyi, A., and Kaboli Qarehtapeh, H. 2012. Effect of two species of mistletoe (*Viscum album* L. and *Arceuthobium oxycedri* (D.C.) M. Bieb.) on activity of antioxidant enzyme of infected host species in Gorgan forests. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 28(2): 372-383. (In Persian)
 - 9- Hayek, E., Jordis, U., Moche, W., and Sauter, F. 1989. A bicentennial of botulin Dhytochemistry, 28: 2229-2242.
 - 10- Hoseini, A. 2013. Effect of *Viscum album* on some morphological characteristics and nutritional elements of *Quercus percica* leaves in Zagros forests. Journal of Natural Ecosystems of Iran, 4(2): 1-11. (In Persian)
 - 11- Hosseini, S.M., Kartoolinejad, D., Mirnia, S.K., Tabibzadeh, Z., Akbarinia, M., and Shayanmehr, F. 2007. The effects of *Viscum album* L. on foliar weight and nutrients content of host trees in Caspian forests (Iran). Polish Journal of Ecology, 55(3): 579-583.
 - 12- Hosseini, S.M., Kartoolinejad, D., Mirnia, S.K., Tabibzadeh, Z., Akbarinia, M., and Shayanmehr, F. 2008. The European mistletoe effects on leaves and nutritional elements of two host species in Hyrcanian forests. Silva Lusitana, 16(2): 229-237.
 - 13- Jager, S., Trojan, H., Kopp, T., Laszczyk, M., and Scheffler, A. 2009. Pentacyclic Triterpene Distribution in Various Plants – Rich Sources for a New Group of Multi-Potent Plant Extracts. Molecules. 14: 2016-2031.
 - 14- Kartoolinejad, D., Hosseini, S.M., Mirnia, S.K., Tabib Zadeh, G.Z., and Akbarinia, M. 2007. Effect of Mistletoe (*Viscum album*) on Macronutrients N, P, K and Ca of Hornbeam and Ironwood tree in Hyrcanian Forests. Iranian Journal of Biology, 20(1): 72-79.
 - 15- Kartoolinejad, D., Hosseini, S.M., Mirnia, S.K., Akbarinia, M., and Shayanmehr, F. 2007. The relationship among infection intensity of *Viscum*

- from different host trees. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 39: 1. p.48.
- 31- Vicas, S., Ruginǎ, D., and Socaciu, C. 2011. Comparative study about antioxidant activities of *Viscum album* from different host trees, harvested in different seasons- *Journal of Medicinal Plants Research.*, 5: 11. 2237-2244.
- 32- Sabeti, H. 1994. Forest trees and Shrubs of Iran. University of Yazd Press. 527p. (In Persian)
- 33- Slinkard, K., and Singleton, V.L. 1977. Total phenol analysis; automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28: 49-55.
- 34- Tabari, S.H., Ghorbanli, M., Safaian, S.H., and Moosazade, S. 2013. Comparison of antioxidant and phytochemical properties of *Trametes gibbosa*. *Journal of Cellular-Molecular biotechnology*. 10: 3. 73-78.
- 35- Zhao, G., Yan, W.D., and Cao, D. 2007. Simultaneous determination of Betulin and Betulinic acid in white birch bark using RP-HPLC, *Journal of Pharmacology Biomedical Anal.*, 43: 959-962.
- 36- Zarkovic, K., Vukovic, T., Loncaric, I., Miletic, M., Zarkovic, K., Borovic, S., Cipak, A., Sabolovic, S., Konitzer, S., and Mang, S. 2001. An overview on anticancer activities of the *Viscum album* extract isorel. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*. 16: 55-62.
- 37- Zuber, D. 2004. Biological flora of central Europe *Viscum album* L. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 199(3): 181-203.
- Agricultural Science, 35: 293-305.
- 24- Miliauskas, G., Venskutonis, P.R., and Van Beek, T.A. 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food chemistry*. 85: 2. 231-237.
- 25- Mirzaei, A., Mohammadi, J., Mirzaei, N., and Mirzaei, M. 2011. The antioxidant Capacities and total phenolic contents of some medicinal plants in Iran. *Journal of Fasa University of Medicinal Sciences*, 1: 3. 160-166.
- 26- Oluwaseun, A.A., and Ganiyu, O. 2008. Antioxidant properties of methanolic extracts of mistletoes (*Viscum album*) from cocoa and cashew trees in Nigeria. *African J Biotech* 7: 17.3138-3142.
- 27- Qi-he, Ch., Ming-liang, F., Jin, L., Hai-feng, Z., Guo-qing, H., and Hui, R. 2009. Optimizations of ultrasonic-assisted extraction (UAE) of betulin from white birch bark using response surface methodology. *Ultrasonics sonochemistry*. 16: 599-604.
- 28- Razmjju, F., Payamnoor, V., and Ebrahimi, P. 2015. Assesment of amount of betulin and betulinic acid and total phenolic and flavonoid contents and investigation on antioxidant properties of some species of Hyrcanian forest, Sirang press. 89p.
- 29- Roesenzweig, M.L., and Abransky, Z. 1993. How is diversity and productivity related In: Ricklefs RE, Schluter D (Eds) *Species diversity in ecological communities*, University of Chicago Press, Pp: 52-65.
- 30- Vicas, S.I., Rugina, D., Leopold, L., Pintea, A., and Socaciu, C. 2011. HPLC fingerprint of bioactive compounds and antioxidant activities of *Viscum album*



The effect of different hosts on secondary metabolites of European mistletoe (*Viscum album* L.)

*V. Payame noor¹, H. Amirian² and F. Razmjoo²

¹Associate Prof., Faculty of Forest Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran, ²M.Sc., Graduated, Faculty of Forest Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran

Received: 12/17/2017; Accepted: 08/26/2018

Abstract

Background and Aim: The mistletoes are a significant and diverse group of parasitic species, which are parasites and have a wide range of hosts and a very wide range of distribution areas in the world. They have high levels of effective compounds. Considering the fact that the amount and type of these compounds in plants are highly dependent on environmental and genetic factors, the present study aims at the investigation of the effect of different hosts e.g. Persian ironwood (*Parrotia persica*), hornbeam (*Carpinus betulus*), alder (*Alnus glutinosa*) and poplar (*Populus euramericana*) on the mistletoe secondary metabolites (phenol, flavonoids, antioxidants, Betulin and Betulinic acid) changes.

Materials and Methods: Sampling for this laboratory study was carried out in late September in mistletoe hosted by Persian ironwood, Poplar, Hornbeam and alder, this species in 3 replications in lower points to the middle of the forest of Dr. Bahramnia forestry plantation located in Shast Kalateh forest of Gorgan. Then, samples were dried, milled and extracted with three ethanol, methanol and acetone solvents. After the extraction, the required test process was performed and the obtained data were analyzed using SAS software.

Results: The results showed that different hosts had significant effects on effective compounds of mistletoe. According to the results, the highest levels of antioxidant (95.03% free radical) and phenol (4.45 mg/g dry weight) were related to the stem acetonic extract and leaves ethanolic extract of mistletoes hosted by Persian ironwood, respectively and the highest amount of flavonoids 2.07 mg/g is related to the mistletoe stem ethanolic extract hosted by alder species. The highest amount of betulin (147.3 mg/ml) was measured in the mistletoe leaf hosted by hornbeam species. The highest amount of betulinic acid was found to be 347 mg/ml, which was obtained from the mistletoe stems hosted by the poplar species.

Conclusion: The results indicate that the host trees can play a key role in the amount of secondary metabolites and the antioxidant properties of leaf and stem of the mistletoe half-parasite. The presence of these secondary metabolites with medicinal and even industrial value in this plant emphasizes the need for special attention on this valuable species. Due to the fact that two effective anti-cancer agents of betulin and betulinic acid are important and highly costly drugs, the mistletoes hosted with hornbeam and poplar can be used.

Keywords: Betulin, Betulinic acid, Various hosts, Secondary metabolites, *Viscum album*

*Corresponding author: Mnoori56@gmail.com

