Archive of SID

دوماهنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۲، شماره ۶، صفحه ۱۰۴۷-۱۰۳۷ (۱۳۹۵)

تأثیر متیل‌جاسمونات و سالیسیلیک اسید بر تولید بتولین و بتولینیک اسید در کشت سوسپانسیون سلولی توس (*Betula pendula* Roth.)

راضیه جعفری حاجتی[1*]، وحیده پیام نور[2]، کمال قاسمی بزدی[3] و نجمه احمدیان چاشمی[4]

۱*- نویسنده مسئول، دانشجوی دکترا، گروه جنگل‌شناسی و اکولوژی جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران
پست الکترونیک: R.jafari.hajati@gmail.com

۲- استادیار، گروه جنگل‌شناسی و اکولوژی جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران

۳- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، مؤسسه تحقیقات پنبه کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، گرگان، ایران

۴- استادیار، گروه علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

تاریخ دریافت: مهر ۱۳۹۴ تاریخ اصلاح نهایی: اسفند ۱۳۹۴ تاریخ پذیرش: فروردین ۱۳۹۵

چکیده

این پژوهش با هدف افزایش تولید بتولین و بتولینیک اسید با استفاده از کشت سوسپانسیون سلولی گیاه توس (*Betula pendula* Roth.) و محرک‌های متیل‌جاسمونات و سالیسیلیک اسید انجام شد. در این تحقیق ابتدا رشد سلولی طی دوره ۱۶ روزه بررسی شد. سپس دو محرک متیل‌جاسمونات (در غلظت‌های ۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرومولار) و سالیسیلیک اسید (در غلظت‌های ۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میکرومولار) به‌طور جداگانه به محیط کشت‌های ۸ روزه اضافه شدند و سلول‌ها ۱، ۲، ۳، ۵ و ۷ روز پس از اعمال تیمارها برداشت شدند. وزن تر، خشک و درصد زنده‌مانی سلول‌ها بررسی شد و میزان بتولین و بتولینیک اسید با استفاده از دستگاه HPLC ارزیابی شد. نتایج بدست آمده افزایش معنی‌دار غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید و متیل‌جاسمونات را بر میزان ماده مؤثره، وزن تر و خشک سلول‌ها نشان داد. به‌طوری که حداکثر میزان بتولین (۲/۵ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) تحت تأثیر غلظت ۱۰۰ میکرومولار سالیسیلیک، دو روز پس از اعمال تیمار مشاهده شد که ۴ برابر نسبت به شاهد افزایش نشان داد. همچنین در میزان بتولینیک اسید، یک روز پس از اعمال تیمار ۲۰۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید افزایش ۴/۵ برابری نسبت به شاهد، حدود ۵ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک مشاهده شد. بیشترین محتوی بتولین تحت تأثیر متیل‌جاسمونات در غلظت ۵۰ میکرومولار، هفت روز پس از اعمال این غلظت، به میزان ۲/۳ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک بدست آمد. همچنین حداکثر سطح بتولینیک اسید در غلظت ۱۰۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات، دو روز پس از اعمال این غلظت به میزان ۳ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک مشاهده شد. در مجموع تأثیر تیمار سالیسیلیک اسید بر تولید بتولین و بتولینیک اسید به‌طور معنی داری بیشتر از تیمار متیل‌جاسمونات بود.

واژه‌های کلیدی: بتولین، بتولینیک اسید، محرک، HPLC.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

گونه توس (*Betula pendula* Roth.) از خانواده Betulaceae، یکی از سه گونه توس در ایران است. این گونه ازجمله گیاهان دارویی ارزشمند دارای تاریخچه طولانی در طب سنتی به‌شمار می‌آید. بتولین و بتولینیک اسید از مشتقات لوپان (lupan) دو نوع تری‌ترپنوئید ارزشمند در پوست جنس توس و غنی‌ترین منبع آن می‌باشند. بتولین به‌طور معمول برای درمان در مرکز سرطان ملی چین مورد استفاده قرار می‌گیرد (Yin *et al*., 2013). به‌علاوه از بتولینیک اسید به‌صورت موفقیت‌آمیزی در فاز داروهای شاخه بیماری‌های مسری برای درمان ایدز استفاده می‌شود (Smith *et al*., 2007). منبع اصلی تولید بتولین و بتولینیک اسید، پوست درخت می‌باشد. از طرف دیگر، با توجه به محدود و صعب‌العبور بودن رویشگاه‌های توس در ایران، و در عین حال خطر انقراض این گونه (I.U.C.N., 2001)، امکان استفاده از پوست توس برای اهداف ذکر شده وجود ندارد. تولید متابولیت‌های ثانویه و نادر در گیاهان از طریق کشت سوسپانسیون سلولی یکی از زمینه‌هایی است که به‌دلیل دارا بودن ارزش اقتصادی بالای این ترکیب‌ها و یا هزینه بالای فرآوری ترکیب‌ها به‌صورت گسترده مورد استفاده قرار گرفته است (Sato *et al*., 2001). علاوه‌بر آن بکارگیری محرک‌ها یا الیسیتورها که معمولاً یکی از موفق‌ترین راهبردها در افزایش متابولیت‌های ثانویه محسوب می‌شوند، به‌صورت تنش‌های شیمیایی و فیزیکی در تولید متابولیت‌های ثانویه‌ای که در حالت معمولی تولید نمی‌شوند و یا در غلظت پایینی تولید می‌شوند، مورد استفاده قرار می‌گیرند (Neumann *et al*., 2009).

سالیسیلیک اسید یکی از مولکول‌های محرک مهم است که سیستم دفاعی گیاه را از طریق فعال‌سازی گروه مشخصی از ژن‌های مرتبط با دفاع و توسعه مقاومت سیستمیک تحریک می‌کند. متیل‌جاسمونات یا جاسمونیک اسید به‌عنوان تنظیم‌کننده رشد وابسته به تنش در گیاهان نقش کلیدی دارد. جاسمونات‌ها به‌عنوان ترکیب‌های پیام‌رسان کلیدی در فرایند القاء که منجر به تجمع متابولیت‌های ثانویه می‌شود، معرفی شده‌اند (Mehrabani *et al*., 2012). جاسمونیک اسید تولید تری‌ترپنوئیدها را در کشت سوسپانسیون سلولی گیاهان مختلف مانند *Perilla frutescens* (Wang *et al*., 2004) و *Scutellaria baicalensis* (Yoon *et al*., 2000) افزایش داده‌اند. سالیسیلیک اسید و متیل‌جاسمونات میزان تاکسول را در گونه‌های مختلف سرخدار (*T. chinensis*، *T. cuspidate* و *T. media*) افزایش داده‌اند (Mirjalili & Linden, 1995؛ Yu *et al*., 2001).

طی چند سال اخیر، کشت درون شیشه‌ای سلول‌های توس گونه *B. platyphylla*، با هدف تولید تری‌ترپنوئیدها به‌ویژه بتولین و بتولینیک اسید توسط Fan و همکاران (۲۰۱۰، ۲۰۱۳) انجام شده‌است. براساس بررسی‌های انجام شده، گزارشی مبنی بر تولید بتولین و بتولینیک اسید در کشت سوسپانسیون سلولی با استفاده از پوست ساقه گونه *B. pendula* و امکان افزایش آن با استفاده از محرک‌ها ارائه نشده‌است. از این‌رو نیاز به تحقیقات بیشتر با هدف کاربرد دارویی و تجاری مشتقات حاصل کاملاً احساس می‌شود. بنابراین این پژوهش با محوریت تولید بتولین و بتولینیک اسید با استفاده از تکنیک کشت سوسپانسیون سلولی و افزایش میزان این دو ماده مؤثره با محرک‌های غیرزیستی، در نهایت ارائه راهکاری بهینه برای تولید حداکثر این ماده مؤثره انجام شد. در این تحقیق فاکتورهای مؤثر در تحریک کشت سوسپانسیون سلولی شامل غلظت عامل محرک، طول زمان تحریک و سن کشت مورد بررسی قرار گرفتند.

مواد و روشها

نمونه‌های ساقه به قطر ۷ تا ۱۰ میلی‌متر از پایه‌های مادری *B. pendula* در منطقه سیاه مرزکوه علی‌آباد کتول واقع در استان گلستان از دامنه ارتفاعی ۲۰۰۰ تا ۲۵۰۰ متر تهیه شدند. تیمارهای پیش‌سترون‌سازی به‌صورت شستشو با آب جاری، قرار دادن در مایع ظرفشویی به مدت سه دقیقه و بعد ضدعفونی با چهار گرم در لیتر قارچ‌کش بنومیل به‌مدت ۴۵ دقیقه انجام شد و تیمارهای سترون‌سازی شامل

www.SID.ir

Archive of SID

سه مرتبه شستشو با آب مقطر، قرار دادن در کلرید جیوه ۰/۱٪ به مدت ۷ دقیقه و سه مرتبه شستشوی مجدد با آب مقطر اعمال شد (Nazari, 2012). القاء کالوس، با استفاده از ریزنمونه پوست ساقه در محیط کشت پایه بهینه‌سازی شده NT (Nagata-Takebe) با ۳٪ ساکارز، ۰/۸٪ آگار، pH برابر ۵/۷ و ترکیب هورمونی ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2-4,D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP (6-benzylaminopurine) انجام شد. نمونه‌ها در شرایط دمایی ۲۴ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۸:۱۶ ساعت روشنایی: تاریکی در اتاقک رشد قرار گرفتند و هر چهار هفته یک‌بار بازکشت شدند. تولید توده کالوس یکنواخت با رشد مناسب در محیط کشت جامد پس از ۹ ماه انجام شد.

از محیط کشت و ترکیب هورمونی آزمایش کالوس‌زایی، بدون آگار و از قطعات کالوس تولید شده برای تهیه سوسپانسیون سلولی با انتقال به محیط کشت مایع استفاده شد. آزمایش سوسپانسیون در ارلن‌های حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت روی شیکر با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه و دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد انجام شد و بازکشت سلول‌ها هر ۱۲ روز یک‌بار انجام شد. پس از ۵ بار بازکشت متوالی، به‌منظور بررسی منحنی رشد سلولی، کشت نیم گرم از سلول‌ها در ارلن‌های حاوی ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت انجام شد. برداشت سلول‌ها به‌ترتیب در زمان‌های ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲، ۱۴ و ۱۶ روز پس از کشت به تعداد سه نمونه برای هر یک از تیمارها انجام گردید و وزن تر و خشک و درصد زنده‌مانی سلول‌ها بررسی شدند. دو محرک، سالیسیلیک اسید (Salicylic acid) در غلظت‌های صفر، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میکرومولار (Mehri Rad, 2014) و متیل‌جاسمونات (Methyl Jasmonate) در غلظت‌های صفر،۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرومولار (Yin *et al.*, 2014) تهیه شد. با بدست آمدن منحنی رشد سلولی، یک گرم سلول به ارلن‌های حاوی ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت انتقال داده شد. برای هر غلظت و زمان برداشت سه تکرار در نظر گرفته شد. در زمان مناسب القاء (با توجه به منحنی رشد سلولی در روز هشتم کشت)، محرک‌ها با غلظت مشخص به سلول‌ها اضافه شدند و پس از ۱، ۲، ۳، ۵ و ۷ روز برداشت شدند. صفات درصد زنده‌مانی سلول‌ها و وزن تر و خشک توده سلولی، برای هر تیمار سوسپانسیونی اندازه‌گیری شدند. به‌منظور بررسی زنده‌مانی سلول‌ها، پس از برداشت ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی و قرار دادن آن بر روی لام و بعد رنگ‌آمیزی با متیل‌بلو، مشاهده سلول‌ها و شمارش آنها توسط میکروسکوپ با بزرگ‌نمایی ۴۰ انجام شد. سلول‌های مرده کاملاً آبی شدند و در سلول‌های زنده فقط دیواره سلولی مشخص شد. جداسازی سلول‌ها از محیط کشت توسط نایلون مش ۴۲ میکرومتری با استفاده از قیف بوخنر در شرایط مکش انجام شد و پس از توزین، در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد خشک شدند.

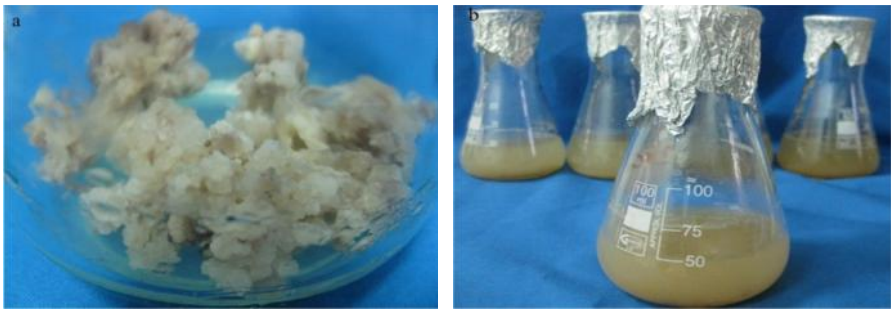
برای تخمین میزان بتولین و بتولینیک اسید، سلول‌های خشک حاصل از هر تیمار با متانول HPLC عصاره‌گیری شد و برای تزریق به دستگاه HPLC (هیتاچی آلمان-ژاپن) از فیلتر ۰/۲ میکرومتر عبور داده شد. ستون مورد استفاده، C18 (۲۵۰ در ۴/۶ میلی‌متر) با ۵ میکرومتر منافذ ستون بود. طول موج دستگاه روی ۲۱۰ نانومتر تنظیم شد. سرعت جریان حلال یک میلی‌لیتر بر دقیقه در نظر گرفته شد و از فاز متحرک به‌صورت ایزوکراتیک با حلال‌های استونیتریل و آب، به‌نسبت ۸۶:۱۴ استفاده شد. میزان بتولین و بتولینیک اسید در نمونه‌های مورد بررسی براساس سطح زیر منحنی بدست آمده با استفاده از منحنی استاندارد آنها محاسبه شد (Zhao *et al.*, 2007). نتایج به‌صورت آزمایش فاکتوریل با سه عامل نوع محرک، غلظت محرک و زمان برداشت در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16.0 مورد آنالیز آماری قرار گرفت و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال ۵٪ انجام شد.

www.SID.ir

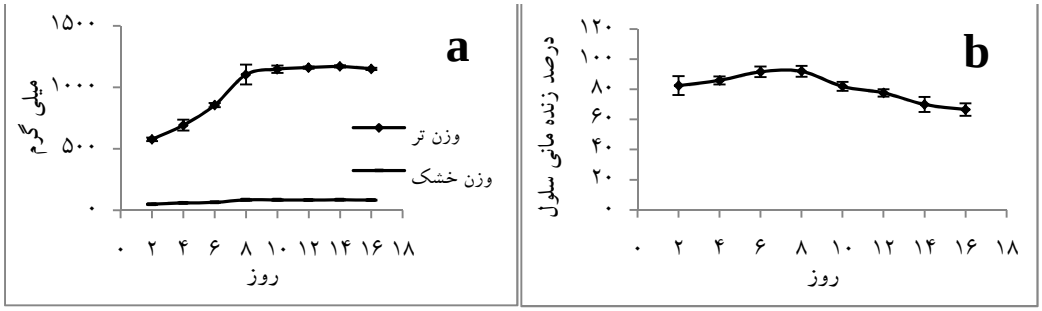
Archive of SID

نتایج

در شکل ۱، کالوس تشکیل شده از کشت ریزنمونه‌های قطعات پوست ساقه توس و همچنین کشت سوسپانسیون سلولی توس در محیط کشت NT حاوی ترکیب هورمونی ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2-4,D و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP مشاهده می‌شود. برای بررسی میزان رشد سلول، وزن تر، وزن خشک و درصد زنده‌مانی سلول‌ها در زمان‌های برداشت متفاوت بررسی شد. با توجه به شکل ۲، تا روز هشتم وزن تر و درصد زنده‌مانی سلول‌ها روند صعودی داشت و حداکثر وزن تر (۱۱۰۳ میلی‌گرم) و میزان زنده‌مانی سلول‌ها (۹۲٪) در همین روز بود، ولی از روز هشتم به بعد، رشد سلول‌ها کندتر شد و درصد زنده‌مانی سلول‌ها کاهش یافت.



شکل ۱- کالوس‌زایی (a) و کشت سوسپانسیون سلولی (b) گونه *B. pendula* در محیط کشت NT



شکل ۲- منحنی رشد، وزن تر و خشک (a) و درصد زنده‌مانی (b) سلول‌ها در کشت سوسپانسیون سلولی *B. pendula*

تغییرات فاکتورهای وزن تر، وزن خشک و درصد زنده‌مانی سلول‌ها تحت تأثیر دو محرک سالیسیلیک اسید و متیل‌جاسمونات با غلظت‌های مختلف و زمان برداشت‌های متفاوت مورد بررسی قرار گرفت. براساس نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱)، تمام فاکتورهای مورد بررسی تحت تأثیر نوع محرک، غلظت محرک و زمان برداشت سلول‌ها در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بودند. در مورد اثرات متقابل فاکتورهای مورد بررسی، وزن تر و وزن خشک سلول‌ها تحت تأثیر اثر متقابل نوع محرک و زمان برداشت سلولی و همچنین وزن خشک سلول‌ها تحت تأثیر اثر متقابل سه‌گانه نوع محرک، غلظت محرک و زمان برداشت سلولی اختلاف معنی‌داری نشان ندادند. به‌طوری که وزن تر سلول‌ها تحت تأثیر اثر متقابل سه‌گانه نوع محرک، غلظت محرک و زمان برداشت سلولی در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار بود و سایر اثرات متقابل فاکتورهای مورد بررسی در سطح احتمال ۱٪ دارای اختلاف آماری معنی‌دار بودند (جدول ۱).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- میانگین مربعات حاصل از تجزیه واریانس وزن تر، وزن خشک و درصد زنده‌مانی سلول‌های *B. pendula* تحت تأثیر نوع محرک، غلظت محرک و زمان برداشت‌های متفاوت سلول‌ها

منبع تغییرات	درجه آزادی	زنده‌مانی سلول	وزن تر	وزن خشک
نوع محرک (**A**)	۱	۱۳۱۴/۲۴ **	۱۹۵۶۲۵/۹۲ **	۳۱۹۲/۴۳ **
غلظت محرک (**B**)	۴	۱۶۲۳/۷۷ **	۱۲۳۱۸۵۵/۱۶ **	۱۶۴۵۶/۴۸ **
زمان برداشت سلولی (**C**)	۴	۱۷۴۴/۹۷ **	۱۱۵۹۳۱/۱۶ **	۱۴۷۸/۴۳ **
B×A	۴	۱۹۹/۰۳ **	۳۴۳۲۳/۰۹ **	۴۵۵/۳۴ **
C×A	۴	۲۴۱/۸۶ **	۴۶۱۰/۷ ns	۰/۶۹۳ ns
C×B	۱۶	۴۸/۶۶ **	۴۲۰۵۵/۹۱ **	۵۵۹/۷۷ **
C×B×A	۱۶	۵۰/۵۴**	۷۲۳۲/۰۹ *	۷۸/۱۹ ns
خطا	۱۰۰	۹/۸۶	۱۹۳۸/۰۳	۳۸/۹

**: معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪، *: معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪، ns: عدم وجود تفاوت معنی‌دار

با توجه به نتایج مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف تیمارهای سالیسیلیک اسید و متیل‌جاسمونات و زمان برداشت‌های متفاوت بر درصد زنده‌مانی سلول‌های *B. pendula* (جدول ۲)، حداکثر درصد زنده‌مانی سلول‌ها (۸۵٪) در غلظت ۱۰۰ میکرومولار سالیسلیک اسید در روزهای اول و دوم برداشت سلول‌ها بود. البته حداکثر درصد زندمانی سلول‌ها تحت تأثیر محرک متیل‌جاسمونات (۸۳٪) در غلظت ۵۰ میکرومولار در روزهای اول و دوم برداشت مشاهده شد. تفاوت حداکثر مقادیر درصد زنده‌مانی در دو محرک مورد بررسی معنی‌دار نبود و از این نظر در یک گروه قرار گرفتند. البته با افزایش غلظت محرک و افزایش مدت زمان القاء، درصد زنده‌مانی سلول‌ها نیز کاهش یافت. محرک سالیسیلیک اسید در غلظت ۴۰۰ میکرومولار از روز سوم تا روز هفتم حداقل درصد زندمانی سلول‌ها (۴۹/۷-۴۵٪) را نسبت به محرک متیل‌جاسمونات و سایر تیمارها نشان داد (جدول ۲).

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف تیمارهای سالیسیلیک اسید و متیل‌جاسمونات و زمان برداشت‌های متفاوت بر درصد زنده‌مانی سلول‌های *B. pendula*

تیمار (میکرومولار)	درصد زنده‌مانی سلول‌ها				
	روز اول	روز دوم	روز سوم	روز پنجم	روز هفتم
شاهد (صفر)	۸۴±۳ ab	۸۲±۳ ab	۸۰±۲ b	۷۹±۲/۵ bc	۶۹±۱ e
سالیسیلیک اسید (۱۰۰)	۸۵/۳±۱/۵ a	۸۵±۱ a	۷۵±۳/۶ cd	۵۷/۳±۵ gh	۵۶/۳±۶ gh
سالیسیلیک اسید (۲۰۰)	۸۵/۳±۲/۵ ab	۸۲/۳±۵/۵ abc	۷۵/۷±۳ cd	۷۲/۶±۳ de	۶۳/۷±۵ fg
سالیسیلیک اسید (۳۰۰)	۸۲/۶±۲ ab	۷۷/۶±۲/۵ c	۶۵/۳±۶ ef	۵۲/۶±۲/۵ h	۵۱/۷±۲/۱ hi
سالیسیلیک اسید (۴۰۰)	۷۲/۶±۲ de	۵۷/۶±۲/۵ g	۴۹/۷±۰/۵۷ i	۴۷/۶±۲/۵ ij	۴۵±۲ j
متیل‌جاسمونات (۵۰)	۸۳±۲/۶ ab	۸۳±۳ ab	۸۰±۲ b	۷۸±۲ bc	۷۶±۲ cd
متیل‌جاسمونات (۱۰۰)	۸۰±۲/۵ b	۸۰/۶±۳/۲ bc	۷۹±۱/۵ bc	۷۷±۲/۶ c	۷۰±۱/۵ e
متیل‌جاسمونات (۱۵۰)	۷۷/۶±۱/۵ c	۷۵±۲ cd	۷۵±۴ cd	۷۳/۶±۳/۲ de	۶۱/۶±۳/۷ fj
متیل‌جاسمونات (۲۰۰)	۷۷±۲/۶ cd	۷۵±۱ d	۶۵±۳ f	۶۲±۲ fj	۵۷/۶±۷ jh

www.SID.ir

Archive of SID

براساس نتایج مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف تیمارهای سالیسیلیک اسید و متیل‌جاسمونات بر وزن تر (جدول ۳) و وزن خشک (جدول ۴) سلول‌های توس در زمان برداشت‌های متفاوت، محرک سالیسیلیک اسید در غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار باعث افزایش وزن تر و خشک سلول‌ها نسبت به شاهد در تمام زمان‌های برداشت سلولی مورد بررسی شد. غلظت ۴۰۰ میکرومولار از این محرک باعث کاهش معنی‌دار وزن تر و خشک نسبت به شاهد شد. در دو غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار از محرک متیل‌جاسمونات، افزایش معنی‌دار میانگین وزن تر و وزن خشک در تمام ۵ زمان برداشت سلولی نسبت به شاهد مشاهده شد. غلظت ۲۰۰ میکرومولار از این محرک نیز دارای حداقل میانگین وزن تر و وزن خشک نسبت به سایر غلظت‌های محرک متیل‌جاسمونات بود (جدول‌های ۳ و ۴).

جدول ۳- مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف تیمارهای سالیسیلیک اسید و متیل‌جاسمونات بر وزن تر سلول‌های *B. pendula* در زمان برداشت‌های متفاوت

تیمار (میکرومولار)	وزن تر				
	روز اول (میلی‌گرم)	روز دوم (میلی‌گرم)	روز سوم (میلی‌گرم)	روز پنجم (میلی‌گرم)	روز هفتم (میلی‌گرم)
شاهد (صفر)	۲۱۹۰±۱۱ hi	۲۲۳۰±۶۱ gh	۲۲۴۶±۳۱ g	۲۲۹۳±۱۵ f	۲۲۸۰±۱۶ fg
سالیسیلیک اسید (۱۰۰)	۲۲۵۰±۵۰ fgh	۲۵۲۷±۵۵ bcd	۲۵۶۳±۳۵ b	۲۵۷۶±۳۵ b	۲۶۲۳±۲۵ ab
سالیسیلیک اسید (۲۰۰)	۲۲۲۳±۳۲ g	۲۳۰۰±۵۰ ef	۲۴۷۶±۲۵ cd	۲۵۳۳±۴۵ c	۲۵۶۳±۴۷ b
سالیسیلیک اسید (۳۰۰)	۲۰۶۰±۷۰ ij	۲۱۹۳±۴۵ hi	۲۳۲۰±۶۱ ef	۲۲۹۸±۴۵ f	۲۱۰۰±۸۰ ij
سالیسیلیک اسید (۴۰۰)	۲۰۵۳±۲۵ j	۲۰۵۰±۳۶ j	۲۰۲۶±۵۹ j	۱۹۰۰±۸۱ k	۱۸۵۳±۴۸ kl
متیل‌جاسمونات (۵۰)	۲۳۵۰±۷۹ de	۲۵۱۰±۸۷ bc	۲۵۵۰±۲۰ c	۲۵۶۰±۲۰ bc	۲۵۹۰±۲۶ b
متیل‌جاسمونات (۱۰۰)	۲۴۱۰±۶۰ d	۲۵۹۰±۴۳ b	۲۶۴۳±۳۱ a	۲۶۱۶±۳۰ ab	۲۵۶۰±۲۵ bc
متیل‌جاسمونات (۱۵۰)	۲۲۰۴±۲۱ h	۲۳۱۳±۳۵ e	۲۳۶۷±۲۱ de	۲۳۹۳±۷۰ def	۲۳۳۰±۳۶ ef
متیل‌جاسمونات (۲۰۰)	۲۰۷۶±۶۱ ij	۲۱۸۰±۲۶ hi	۲۱۵۳±۵۶ i	۲۰۰۳±۵۱ jk	۱۸۹۳±۹۰ kl

جدول ۴- مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف تیمارهای سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات بر وزن خشک سلول‌های *B. pendula* در زمان برداشت‌های متفاوت

تیمار (میکرومولار)	وزن خشک				
	روز اول (میلی‌گرم)	روز دوم (میلی‌گرم)	روز سوم (میلی‌گرم)	روز پنجم (میلی‌گرم)	روز هفتم (میلی‌گرم)
شاهد (صفر)	۲۰۹±۶ ef	۲۱۴±۴ e	۲۱۳±۶ e	۲۱۱±۶ e	۲۰۰±۱۰ f
سالیسیلیک اسید (۱۰۰)	۲۱۶±۵ e	۲۴۳±۶ c	۲۴۹±۶ bc	۲۵۰±۷ bc	۲۴۲±۱۵ bcde
سالیسیلیک اسید (۲۰۰)	۲۰۸±۸ ef	۲۲۰±۵ de	۲۳۸±۸ cd	۲۴۳±۶ c	۲۴۵±۸ bc
سالیسیلیک اسید (۳۰۰)	۱۹۹±۹ f	۲۱۳±۴ e	۲۱۳±۵ e	۲۰۸±۱۱ ef	۱۹۸±۱۰ fg
سالیسیلیک اسید (۴۰۰)	۱۸۷±۱۵ gh	۱۹۶±۵ fg	۱۸۳±۱۵ gh	۱۷۰±۱۰ h	۱۶۷±۶ hi
متیل‌جاسمونات (۵۰)	۲۲۴±۱۳ cde	۲۴۵±۹ bc	۲۵۰±۳ bc	۲۵۱±۰/۵ bc	۲۵۶±۳/۵ b
متیل‌جاسمونات (۱۰۰)	۲۳۲±۷ cd	۲۵۲±۵ b	۲۵۸±۵ ab	۲۵۵±۶ b	۲۶۷±۵ a
متیل‌جاسمونات (۱۵۰)	۲۰۷±۹ ef	۲۲۱±۳ de	۲۲۹±۳ d	۲۲۹±۶ d	۲۲۶±۴ de
متیل‌جاسمونات (۲۰۰)	۱۹۱±۷ fg	۲۰۳±۶ f	۲۰۱± ۵ f	۱۸۶±۱۰ g	۱۸۰±۱۰ g

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج تجزیه واریانس تغییرات سطح بتولین و بتولینیک اسید در سلول‌های حاصل از کشت سوسپانسون توس تحت تأثیر نوع محرک، غلظت محرک و زمان برداشت‌های متفاوت سلول‌ها (جدول ۵) نشان داد که بجز تغییرات سطح بتولین که تحت تأثیر نوع محرک در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار بود، تمامی تغییرات بتولین و بتولینیک اسید تحت تأثیر نوع محرک، غلظت محرک، زمان برداشت سلول‌ها و تمام اثرات متقابل این سه فاکتور در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بودند.

جدول ۵- میانگین مربعات حاصل از تجزیه واریانس بتولین و بتولینیک اسید در سلول‌های *B. pendula* تحت تأثیر نوع محرک، غلظت محرک و زمان برداشت‌های متفاوت سلول‌ها

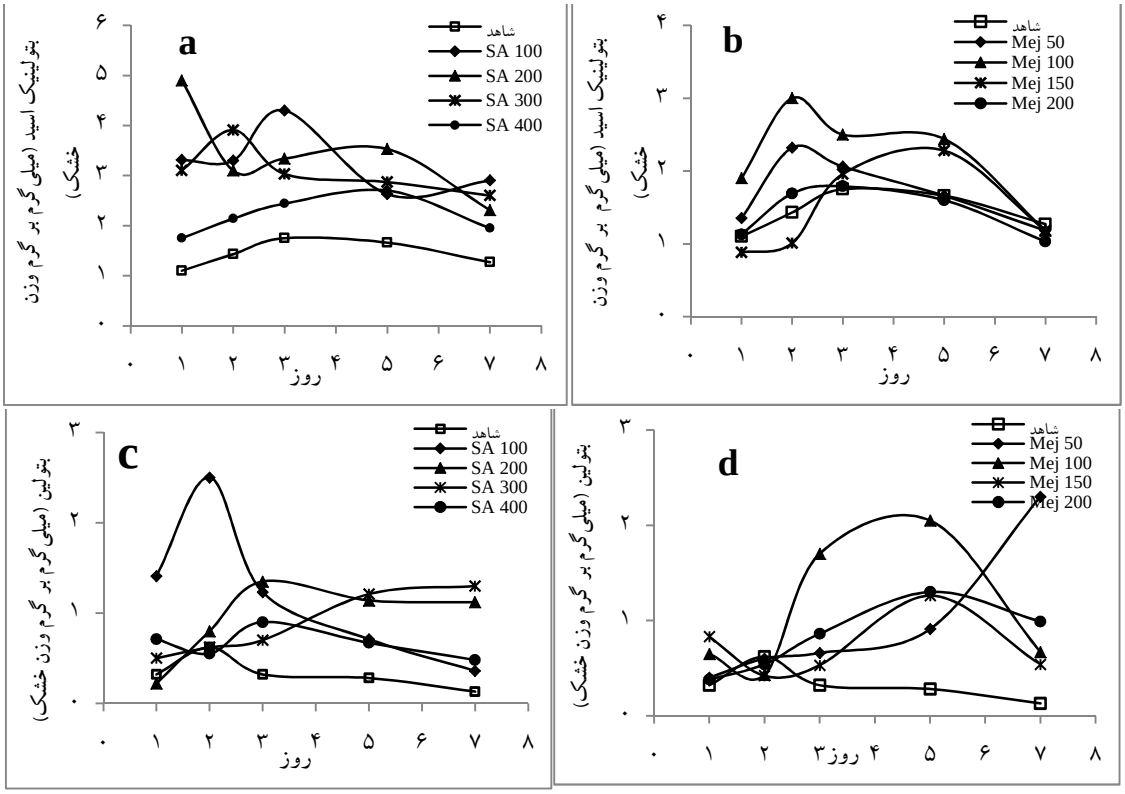
منبع تغییرات	درجه آزادی	بتولین	بتولینیک اسید
نوع محرک (A)	۱	۰/۰۱۲ *	۳۹/۹۵ **
غلظت محرک (B)	۴	۲/۷۱ **	۸/۷۴ **
زمان برداشت سلولی (C)	۴	۰/۶۶ **	۲/۹۹ **
B×A	۴	۰/۲۷ **	۳/۳۹ **
C×A	۴	۰/۸۵ **	۰/۵۱۴ **
C×B	۱۶	۰/۶۳ **	۰/۶۶ **
C×B×A	۱۶	۰/۸۲ **	۰/۷۱ **
خطا	۱۰۰	۰/۰۰۲	۰/۰۱۲

**: معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪، *: معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪

نتایج مقایسه میانگین تغییرات سطوح بتولین و بتولینیک اسید تحت تأثیر غلظت‌های مختلف دو محرک سالیسیلیک اسید و متیل‌جاسمونات و زمان برداشت‌های مختلف در شکل ۳ نشان داده شده‌است. همان طور که در شکل ۳a ملاحظه می‌شود، تیمار غلظت ۲۰۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید، در روز اول برداشت سلولی با ۴/۹ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک، توانست حداکثر میزان بتولینیک اسید را القاء کند. همین محرک در غلظت ۱۰۰ میکرومولار در روز سوم برداشت با ۴/۳ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک و غلظت ۳۰۰ میکرومولار در روز دوم برداشت با ۳/۹۲ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک نیز میزان بالایی از بتولینیک اسید را نشان داد. محرک متیل‌جاسمونات با غلظت ۱۰۰ میکرومولار نیز در روز دوم برداشت با ۳ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک، حداکثر میزان بتولینیک اسید را نشان داد (شکل 3b). با بررسی میزان بتولین تحت تأثیر دو محرک مشاهده می‌شود که تیمار سالیسیلیک اسید با غلظت ۱۰۰ میکرومولار در روز دوم برداشت (شکل 3c) با ۲/۵ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک، حداکثر میزان بتولین را نشان داد و پس از آن محرک متیل‌جاسمونات با غلظت ۵۰ میکرومولار در روز هفتم برداشت (شکل 3d) با ۲/۳ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک قرار گرفت.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳- تغییرات سطح بتولینیک اسید (a, b) و بتولین (c, d) تحت تأثیر غلظت‌های مختلف محرک سالسیلیک اسید و محرک متیل‌جاسمونات در زمان برداشت‌های متفاوت سلول‌های *B. pendula*

بحث

این مطالعه نتیجه کشت سوسپانسیون سلولی ریزنمونه پوست می‌باشد. تاکنون مطالعاتی در مورد تأثیر محرک‌ها بر تولید تری‌ترپنوئیدهای *B. pendula* انجام نشده است و این پژوهش نخستین گزارش از تأثیر دو محرک متیل‌جاسمونات و سالیسیلیک اسید بر تولید بتولین و بتولینیک اسید در این گونه از توس می‌باشد. در تحقیقات پیشین، کالوس‌زایی برگ گونه *B. litwinowii* توسط Nazari (۲۰۱۲) انجام شد و میزان بتولین و بتولینیک اسید را به‌ترتیب ۰/۱ و ۰/۳ میلی‌گرم در گرم وزن خشک گزارش کرد. طی پژوهش Payamnoor و همکاران (۲۰۱۵)، در کالوس‌های پوست *B. pendula* و *B. litwinowi* در محیط کشت WPM به‌ترتیب ۰/۲۲۶ و ۰/۱۶ میلی‌گرم در گرم وزن خشک بتولین و ۰/۵۲۵ و ۰/۵۷ میلی‌گرم در گرم وزن خشک بتولینیک اسید گزارش شد. در این پژوهش، میزان میانگین دو ماده مؤثره بتولین و بتولینیک اسید در تیمار شاهد بدون اعمال محرک به‌ترتیب ۰/۳ و ۱/۴۴ میلی‌گرم در گرم وزن خشک بود که حکایت از افزایش میزان این دو ماده مؤثره با استفاده از تکنیک کشت سوسپانسیون سلولی دارد.

بنابراین به نظر می‌رسد که دو محرک متیل‌جاسمونات و سالیسیلیک اسید در این پژوهش در شرایط تنش با مهار رشد سلولی سبب تولید متابولیت‌های ثانویه و مهار آثار مخرب تنش شده‌اند. مطالعات نشان داده‌است که غلظت محرک نقش مهمی در فرایند تحریک داشته و عامل مؤثری بر شدت پاسخ بر حسب گونه گیاهی متفاوت می‌باشد. در این تحقیق محرک سالیسیلیک اسید با دو غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار و متیل‌جاسمونات با دو غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار عملکرد بهتری در تولید بتولین و بتولینیک اسید، درصد زنده‌مانی سلول، وزن تر و وزن خشک سلول

www.SID.ir

Archive of SID

داشتند که با نتایج تحقیقات مشابه همسو می‌باشد. Mehri Rad (۲۰۱۴) به این نتیجه رسید که استفاده از ۵۰ میلی‌گرم در لیتر سالیسیلیک اسید باعث افزایش بتولین در کالوس‌های گونه *B. litwinnowi* شده‌است ولی غلظت‌های بالاتر این محرک باعث کاهش میزان این ماده مؤثره شد. Yin و همکاران (۲۰۱۳) اثر محرک متیل‌جاسمونات را در دو غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار، روی تجمع بتولین و اولئانولیک اسید در برگ، پوست ساقه و پوست ریشه *B. platyphylla* مورد بررسی قرار دادند. نتایج آنان نشان داد که میزان این دو تری‌ترپنوئید در ماه‌های مختلف سال نسبت به شاهد افزایش یافت. Yin و همکاران (۲۰۱۴) اثر غلظت‌های ۰/۵ و یک میلی‌مولار متیل‌جاسمونات و ۵ و ۵۰ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید را بر تجمع تری‌ترپنوئید نهال‌های سه‌ساله توس (*B. platyphylla*) مورد بررسی قرار دادند. نتایج آنان نشان داد که تجمع تری‌ترپنوئید در پوست ساقه پس از یک روز تحت تأثیر غلظت یک میکرومولار متیل‌جاسمونات قرار گرفت و پس از ۱۴ روز با تیمار ۵ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید افزایش معنی‌داری پیدا کرد.

دو محرک متیل‌جاسمونات و سالیسیلیک اسید در کشت سوسپانسیون سلولی میزان فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز را که در سنتز متابولیت‌های ثانویه نقش دارند، افزایش می‌دهند (Shabani & Ehsanpour, 2009؛ Ali *et al*., 2007). براساس نتایج Yin و همکاران (۲۰۱۴) این دو محرک می‌توانند بیان ژن‌های کلیدی که در مسیر سنتز ترپنوئیدهای برگ و پوست توس قرار دارند به‌طور معنی‌داری بالا ببرند. با مشاهده شکل ۳ و مقایسه تولید این دو ماده مؤثره تحت تأثیر دو محرک می‌توان بیان کرد که نخست تولید بتولین و بتولینیک اسید تحت تأثیر تیمار سالیسیلیک اسید بیشتر از متیل‌جاسمونات قرار گرفت و دوم اینکه حداکثر میزان بتولینیک اسید نسبت به بتولین در هر دو تیمار مورد بررسی بیشتر بود. این در حالیست که میزان تولید بتولین در زی‌توده کل یک درخت توس بسیار بالاتر از بتولینیک اسید می‌باشد (Zhao *et al*., 2007) ولی فعالیت بیولوژیکی بتولینیک اسید بالاتر است و تبدیل بتولین به بتولینیک اسید با روش‌های مختلف شیمیایی منجر به‌تولید بسیار کم در مقابل صرف هزینه بالاست (Liu *et al*., 2011). البته کشت سلول این گونه امکان تبدیل بتولین به بتولینیک اسید را که کاربردی‌تر می‌باشد، فراهم کرده است.

در این پژوهش، غلظت‌های بالاتر محرک‌ها باعث کاهش عملکرد شد. گزارش شده‌است که غلظت‌های بالای محرک‌ها واکنش فوق حساسیت را القاء می‌کند که منجر به مرگ سلول‌ها می‌گردد، در حالیکه غلظت‌های پایین سبب القاء واکنش‌های دفاعی می‌گردد (Namadeo, 2007). در غلظت‌های بالا به‌ویژه در مواقعی که سلول مدت زمان بیشتری در معرض محرک‌ها باشد، میزان قهوه‌ای شدن و در نتیجه قابلیت زیست‌پذیری سلول‌ها کم می‌شود و در نهایت باعث تولید کمتر ترکیب‌های ترپنوئید می‌شود. بر این اساس، افزایش تولید بتولین و بتولینیک اسید در کشت سوسپانسیون سلولی توس را می‌توان به‌پاسخ‌های دفاعی که توسط این محرک‌ها القاء می‌شود، نسبت داد. نتایج این پژوهش نشان داد در شرایط کشت کنترل شده‌ای که به‌عنوان یک منبع تولید و افزایش ترکیب‌های ثانویه استفاده می‌شود، می‌توان با استفاده از محرک‌ها تا اندازه‌ای میزان بتولین و بتولینیک اسید و حتی تری‌ترپنوئیدهای خاص را تغییر داد.

منابع مورد استفاده

- Ali, M.B., Hahn, E.J. and Paek, K.Y., 2007. Methyl jasmonate and salicylic acid induced oxidative stress and accumulation of phenolics in *Panax ginseng* bioreactor root suspension cultures. Molecules, 12: 607-621.
- Fan, G.Z., Li, X.C., Wang, X.D. and Zhan, Y.G., 2010. Chitosan activates defense responses and triterpenoid production in cell suspension cultures of *Betula platyphylla* Suk. African Journal of Biotechnology, 9(19): 2816-2820.
- Fan, G., Zhai, Q., Li, X. and Zhan, Y., 2013. Compound of *Betula platyphylla* cell suspension cultures in response to fungal elicitor. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 27(1): 3569-3572.
- I.U.C.N., 2001. IUCN Red List Categories and Criteria. IUCN, Gland, Switzerland.

www.SID.ir

Archive of SID

(*Glycyrrhiza glabra* L.) using methyl jasmonate and salicylic acid. Iranian Journal of Plant Biology, 21(3): 421-432.

- Smith, P.F., Oundele, A., Forrest, A., Wilton, J., Salzwedel, K., Doto, J., Allaway, G.P. and Martin, D.E., 2007. Phase I and II study of the safety, virologic effect, and pharmacokinetics/pharmacodynamics of single-dose 3-O-(3′,3′-dimethylsuccinyl) betulinic acid (bevirimat) against human immunodeficiency virus infection. Antimicrob Agents Chemother, 51: 3574-3581.
- Wang, J.W., Xia, Z.H., Chu, J.H. and Tan, R.X., 2004. Simultaneous production of anthocyanin and triterpenoids in suspension cultures of *Perilla frutescens*. Enzyme and Microbial Technology, 34: 651-656.
- Yin, J., Ma, H., Gong, Y., Xiao, J., Jiang, L., Zhan, Y., Li. C., Ren, C. and Yang, Y., 2013. Effect of MeJA and light on the accumulation of betulinand oleanolic acid in the saplings of white birch (*Betula platyphylla* Suk). American Journal of Plant Sciences, 4: 7-15.
- Yin, J., Li, C.X., Hong-Ran Sun, H.R.,Wang, Z.H., Xiao, J.L., Ya-Guang Zhan, Y.G. and Zhang, M.Y., 2014. The Physiological characteristics, expression of oxidosqualenecyclase genes and accumulation of triterpenoids in white birch (*Betula platyphylla* Suk) saplings by SA and MeJa treatment. Journal of Plant Biochemistry & Physiology, 2: 2-6.
- Yoon, H.J., Kim, H.K., Ma, C.J. and Huh, H., 2000. Induced accumulation of triterpenoids in *Scutellaria baicalensis* suspension cultures using a yeast elicitor. Biotechnology Letters, 22: 1071-1075.
- Yu, L.J., Lan, W.Z., Qin, W.M. and Xu, H.B., 2001. Effects of salicylic acid on fungal-elicitor induced membrane-lipid peroxidation and taxol production in cell suspension cultures of *Taxus chinensis*. Process Biochemistry, 37: 477-482.
- 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 Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 43: 959-962.
- Liu, J., Fu, M.L. and Chen, Q.H., 2011. Biotransformation optimization of betulin into betulinic acid production catalysed by cultured *Armillaria luteo*-virens Sacc ZJUQH100-6 cells. Journal of Applied Microbiology, 110:90-97.
- Mehrabani, B., Nazeri, S. and Piri, K., 2012. Evaluation of total produced phenol in ChaeiKoohi (*Stachys lavandulifolia* Vahi) callus culture and possibility of its enhancement using Elicitors. Journal of Agricultural Biotechnology, 4(2): 77-88.
- Mehri Rad, N., 2014. Possibility to Increase Betulin Extract of *betula litwinowii* Callus *in vitro* Condition. M.Sc Thesis, Faculty of Forest Sciences, Gorgan University of Agriculture Science and Natural Resources, Iran, 74p.
- Mirjalili, N. and Linden, J.C., 1995. Gas phase composition effects on suspension cultures of *Taxus cuspidate*. Biotechnology and Bioengineering, 48: 123-132.
- Namadeo, A.G., 2007. Plant cell Elicitation for production of secondary metabolites-A review. Pharmacogenocy Review, 1: 154-160.
- Nazari, J., 2012. Optimization of culture medium and sterilization treatments for *Betula litwinowii* micropropagatin. M.Sc Thesis, Faculty of Forest Sciences, Gorgan University of Agriculture Science and Natural Resources, Iran, 67p.
- Neumann, K.H., Kumar, A. and Imani, J., 2009. Plant Cell and Tissue Culture: A Tool in Biotechnology. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 333p.
- Payamnoor, V., Jafari Hajati, R. and Nazari, J., 2015. Callogenesis of two species of birch (*B. pendula* and *B. litwinowii*) using the bark explant and evaluation of inducted Betulin. Research Project of Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran, 21p.
- Sato, F., Hashimoto, T. and Hachiya, A., 2001. Metabolic engineering of plant alkaloid biosynthesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 98: 367-372.
- Shabani, L. and Ehsanpour, A.A., 2009. Induction of antioxidant enzymes, phenolic and flavonoid compounds in *in vitro* culture of licorice

www.SID.ir

Archive of SID

Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on production of betulin and betulinic acid in cell suspension of birch (*Betula pendula* Roth.)

R. Jafari Hajati[1*], V. Payamnoor[2], K. Ghasemi Bezdi[3] and N. Ahmadian Chashmi[4]

1*- Corresponding author, Ph.D. Student, Faculty of Forest Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran, E-mail: R.jafari.hajati@gmail.com
2- Faculty of Forest Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
3- Department of Agricultural Biotechnology, Cotton Research Institute of Iran, Education and Extension Organization (AREEO), Gorgan, Iran
4- Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran

Received: October 2015 Revised: March 2016 Accepted: April 2016

Abstract

This study aimed to enhance the production of betulin and betulinic acid using suspension cultures of birch (*Betula pendula* Roth) and elicitation of the cell cultures by methyl jasmonate (MeJA) and salicylic acid (SA). To do this, at the first step, the cell growth curve was investigated in a 16-day period. Then, two elicitors, namely, MeJA (at final concentration of 0, 50, 100, 150 and 200 µM) and SA (at final concentration of 0, 100, 200, 300 and 400 µM) were separately supplemented to 8-day-old cell cultures and the cells were harvested 1, 2, 3, 5 and 7 days after elicitations. Fresh weight (FW), dry weight (DW) and cell viability were measured. In addition, betulin and betulinic acid content were analyzed using HPLC. The results showed the significant effects of different concentrations of SA and MeJA on metabolites content and FW and DW. Maximum amount of betulin was observed about 4-fold (2.5 mg g^{-1} DW) higher than the control treatment by addition of 100 µM SA, two days after elicitation. Moreover, betulinic acid content was enhanced about 5 mg g^{-1} DW, 4.5-fold compared to control, one day after addition of 200 µM SA. Furthermore, the high accumulation of betulin (2.3 mg g^{-1} DW) was obtained in the elicited cell by 50 µM MeJA, seven days after elicitation. Also, the maximum amount of betulinic acid, about 3 mg g^{-1} DW, was observed in the cells elicited by 100 µM MeJA, two days after elicitation. Overall, the effect of SA on the production of betulin and betulinic acid was significantly more than the effect of MeJA.

Keywords: Betulin, betulinic acid, elicitor, HPLC.

www.SID.ir