دوماهنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijmapr.2018.120476.2245
جلد ۳۴، شماره ۴، صفحه ۶۱۶-۶۰۴ (۱۳۹۷)

استخراج تری‌ترپنوئیدهای ضدسرطانی (اسید بتولینیک و بتولین) از گلسنگ (*Ramalina sinensis*) پوست‌زی درخت توس (*Betula pendula* Roth.)

جمیله نظری[۱]، وحیده پیام‌نور[۲*]، محمدرضا کاوسی[۳] و جهانبخش اسدی[۴]

۱- دانشجوی دکترای جنگل‌شناسی و اکولوژی جنگل، دانشکده علوم جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

۲*- نویسنده مسئول، دانشیار، دانشکده علوم جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران پست الکترونیک: Mnoori56@gmail.com

۳- دانشیار، دانشکده علوم جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

۴- دانشیار، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۹۶ تاریخ اصلاح نهایی: اردیبهشت ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: خرداد ۱۳۹۷

چکیده

گلسنگ‌ها زیست‌بوم‌های کوچکی هستند که شامل دو موجود همزیست قارچی و جلبکی می‌باشند. آنها به‌عنوان یکی از منابع سرشار از ترکیب‌های طبیعی با خاصیت آنتی‌توموری، آنتی‌بیوتیکی و همچنین آنتی‌اکسیدانی شناخته شده‌اند که از برخی از آنها به‌عنوان دارو و برای درمان بیماری‌های خاص استفاده می‌شود. این پژوهش با هدف شناسایی و تعیین میزان بتولین، بتولینیک اسید و ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی گلسنگ پوست‌زی درخت توس (*Betula pendula* Roth.) و همچنین قارچ همراه آن انجام شد. مشخص گردید که گلسنگ جدا شده از پوست این درخت، گلسنگ‌های برگی دارای ترکیب‌های بیواکتیو، تحت عنوان *Ramalina sinensis* می‌باشد. قارچ همراه با گلسنگ حاوی ماده مؤثره با روش مولکولی *Arthrinium arundinis* شناسایی شد. این قارچ جزء قارچ‌های آسکومیست بوده و برای اولین بار با کد MG198621 در سایت NCBI ثبت گردید. از گلسنگ و قارچ همراه آن عصاره‌گیری شد و با استفاده از دستگاه HPLC میزان اسید بتولینیک و بتولین آن تعیین شد. اسید بتولینیک و بتولین جزء ترپن‌ها بوده و به‌عنوان عامل ضد سرطانی قوی شناخته شده است. در بافت گلسنگ *R. sinensis* (به‌ترتیب ۲/۱۷٪ و ۰/۰۷۵٪) و در قارچ همراه آن *A. arundinis* (به‌ترتیب ۱/۶٪ و ۰/۰۲۵٪) به میزان قابل توجهی اندازه‌گیری شد. به این ترتیب گلسنگ و قارچ همراه آن برای نخستین بار به‌عنوان منابع جدید حاوی این دو ماده مؤثره معرفی می‌شوند. اندازه‌گیری خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره گلسنک و قارچ همراه آن با استفاده از دو حلال متانول و اتانول آزمون شد. مشخص گردید که عصاره گلسنگ و قارچ همراه آن، علاوه‌بر داشتن متابولیت‌های ثانویه با ارزش دارای خاصیت آنتی‌اکسیدان بوده که توانایی حذف رادیکال‌های آزاد سمّی را دارند. این نتایج می‌تواند در عرصه پزشکی و صنعت اثرهای ارزنده‌ای داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: اسید بتولینیک، بتولین، آنتی‌اکسیدان، توس (*Betula pendula* Roth.)، گلسنگ.

www.SID.ir

مقدمه

گلسنگ‌ها ۸٪ پوشش گیاهی جهان را تشکیل داده، از تنوع زیستی و اکولوژیکی زیادی برخوردارند و از پایین‌تر از سطح جزر و مد سواحل صخره‌ای تا نزدیک قلل بلندترین کوه‌ها از قطب شمال تا جنوب پراکنده‌اند. آنها روی صخره‌ها، درختان، خاک، خزه‌ها و روی برگ یافت می‌شوند (Haji Moniri, 2009). به‌طور کلی گلسنگ از اجتماع حداقل یک جلبک یا سیانوباکتر و یک قارچ بوجود آمده است (Temina *et al.*, 2010) که مواد مصرفی خود را از محیط اطراف جذب می‌کند. گلسنگ‌های جنگلی اغلب بر روی درختان کهنسال مشاهده شده و تحت تأثیر شیب، نوع بافت، اسیدیته پوست درختان و رقابت با خزه‌ها رشد می‌کنند. میزبانی درختانی با خواص دارویی منحصر به فرد ارزش گلسنگ‌ها را از نظر متابولیت‌های ثانویه چند برابر می‌کند. بنابراین، گلسنگ‌های مناطق مختلف جغرافیایی متابولیت‌های ثانویه با خواص دارویی مختلفی تولید می‌کنند (Molnar & Farkas, 2008).

متابولیت‌های ثانویه گلسنگ‌ها اغلب در فواصل بین سلولی و یا به‌صورت کریستال بر روی دیواره سلولی هیف تشکیل می‌شوند. این ترکیب‌ها اغلب در آب حل می‌شوند و با حلال‌های آلی نیز می‌توانند جدا شوند. مقدار آنها بین ۱۰-۱٪ وزن خشک ریسه و در برخی اوقات به بیشتر از ۳۰٪ نیز می‌رسند (Mitrović *et al.*, 2011؛ Lüttge *et al.*, 2012؛ Devaraja & Swamy, 2012). این ترکیب‌ها اکثرا هتروژن می باشند و در گروه‌های شیمیایی متفاوتی قرار می‌گیرند، که شامل آمینواسیدها، اسیدهای آلیفاتیک، ترکیب‌های فنولیک، دی‌بنزوفوران‌ها، دپسیدها، دپسیدون‌ها، دپسون‌ها، ترکیب‌های آروماتیک تک‌حلقه‌ای، لاکتون‌ها، کرومون‌ها، تری‌ترپن‌ها و مشتقات پولوینیک اسید هستند و چندین فعالیت بیولوژیکی ازجمله ضد ویروسی، آنتی‌بیوتیکی و آنتی‌توموری دارند (Molnar & Farkas, 2008). متابولیت‌های ثانویه گلسنگ‌ها به‌طور معمول بیش از ترکیب‌های بیوشیمیایی سایر موجودات زنده کاربرد دارند، زیرا بسیاری از این ترکیب ها اختصاصی بوده و حاصل سنتز در شرایط همراه و همزیستی قارچ و جلبک یا سیانوباکتر می‌باشند (Kirmizigul *et al.*, 2003). همان‌طور که بیان شد سنتز مواد بیواکتیو در گلسنگ ها در همکاری بین دو بخش انجام می‌شود ولی طبیعت مواد تولید شده عموماً توسط قارچ تعیین می‌گردد. شریک قارچی گلسنگ برخلاف سرعت رشد کند گلسنگ ها از سرعت رشد بالایی برخوردار است و در محیط کشت مایع رشد می کند، ازاین‌رو به عنوان منبع تجاری تولید محصولات متابولیکی ارزیابی می‌شود (Haji Moniri, 2009). در زمینه خواص ضد میکروبی (Mitrović *et al.*, 2011)، اثرات ضد دیابتی و آنتی‌اکسیدانی (Thadhani & Karunaratne, 2017)، ضد سرطانی کولون (HT-29) و تخمدان (A2780) (Backorová *et al.*, 2012) عصاره انواع گلسنگ‌ها آزمون شده و وجود این خواص به اثبات رسیده است. آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیب‌هایی هستند که به‌طور مؤثر و به‌طرق مختلف اثر زیانبخش رادیکال‌های آزاد را در سامانه‌های زیستی و غذایی کم می‌کنند و موجب سمّیت‌زدایی می شوند (Sharififar *et al.*, 2007). آنتی‌اکسیدان‌ها به دو دسته سنتزی (شیمیایی) و طبیعی تقسیم‌بندی می‌شود. آنتی اکسیدان‌های شیمیایی بیشترین استفاده را در صنعت و غذا دارند. طبق پاره‌ای از بررسی‌های انجام شده، استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی در بعضی از کشورها به‌علت اثرات نامطلوب روی سلامتی افراد، دارای محدودیت می باشد. بنابراین امروزه استفاده از گروه وسیعی از گیاهان دارویی و ترکیب‌های آروماتیک آنها به‌عنوان منابع طبیعی که دارای خاصیت آنتی اکسیدانی هستند، مورد توجه محققان قرار گرفته است (Singh *et al.*, 2007).

Betula pendula Roth. یکی از گونه‌های درختی رو به انقراض کشور می‌باشد (I.U.C.N., 2001). پوست این گونه به لحاظ دارا بودن اسید بتولینیک (β-3 hydroxy-lup-20(29)-en-28-oic acid) با فرمول شیمیایی $C_{30}H_{50}O_3$ و بتولین (lup-20(29)-ene-3ß,28-diol) با فرمول شیمیایی $C_{30}H_{50}O_2$ از مشتقات لوپان (Lupan) دو نوع تری‌ترپنوئید ارزشمند مطرح می‌باشند (Sami *et al.*, 2006). این دو ماده

www.SID.ir

مؤثره خاصیت ضد توموری، ضد ویروسی، ضد قارچی و ضد باکتریایی بسیار قوی دارد. از خواص مفید دیگر این دو ماده می‌توان به درمان‌کننده بسیاری از بیماری‌های مزمن و خطرناک ازجمله مالاریا، HIV، هپاتیت، نوروبلاستوم و برخی سرطان‌ها ازجمله ریه، روده، تخمدان، پستان، پرستات و غیره اشاره کرد (Dzubak *et al.*, 2006؛ Zyryanova *et al.*, 2010). در حقیقت اسید بتولینیک نتیجه اکسیداسیون بتولین و غیر سمّی بوده و در برابر توده‌های سرطانی خاصیت سایتوتوکسیتوسیتی داشته، پیشگیری‌کننده و فعالیت تخریب‌گری را در شرایط In vivo و In vitro دارد (Drąg-Zalesińska *et al.*, 2017؛ Mishra *et al.*, 2016). به‌دلیل خواص منحصر به فرد این دو ماده مؤثره در برابر مشکلات پوستی، استفاده از آنها در صنایع آرایشی بهداشتی نیز معمول است (Başer & Demirci, 2007). این تحقیق با هدف یافتن منابع استخراجی احتمالی جدید برای استفاده از خواص منحصر بفرد اسید بتولینیک و بتولین انجام شد. بدین‌منظور گلسنگ و قارچ همراه آن (با میزبانی *B. pendula*) شناسایی مورفولوژیکی و مولکولی شده و میزان احتمالی بتولین و بتولینیک اسید و همچنین خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

نمونه گلسنگ پس از جنگل‌گردشی از رویشگاه‌های گونه *B. pendula* در منطقه سیامرزکوه شهرستان فاضل‌آباد استان گلستان واقع در فاصله ۱۸ کیلومتری جنوب‌شرق شهر گرگان جمع‌آوری به آزمایشگاه انتقال و با استفاده از کلیدهای شناسایی معتبر، براساس خصوصیات مورفولوژیکی شناسایی شد.

کشت قارچ گلسنگ

برای کشت و جداسازی قارچ همراه گلسنگ نمونه‌ها با استفاده از اتانول ۷۰٪ (به‌مدت ۱/۵ دقیقه) و هیپوکلریت سدیم ۱/۵٪ (به‌مدت ۱۰ دقیقه) برای از بین بردن قارچ‌های اپی‌فیت و ساپروفیت استریل و پس از ۳ بار شستشو با آب‌مقطر استریل، به قطعات کوچکتر تقسیم و بر روی محیط کشت PDA (Potato Dextrose Agar (Scharlau)) کشت و به‌مدت سه هفته در انکوباتور با دمای ۲۸ درجه نگهداری شدند (Seifi *et al.*, 2014).

شناسایی مولکولی قارچ همراه گلسنگ

برای استخراج DNA از کلاف میسلیومی رشدکرده در محیط کشت PDB (Potato Dextrose Broth (Scharlau)) استفاده گردید. به یک گرم از میسلیوم خشک شده ۲۰۰ میکرولیتر بافر CTAB افزوده، سپس نمونه‌ها به‌مدت ۳ دقیقه ورتکس شدند؛ در ادامه ۲۰۰ میکرولیتر دیگر بافر CTAB به ظرف نمونه‌ها افزوده و دوباره ورتکس گردید تا هموژنیزه شوند. نمونه‌ها به‌مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. به دنبال آن کلروفرم و ایزوآمیل الکل به نسبت ۲۴ به ۱ افزوده و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰rpm سانتریفیوژ گردید؛ فاز رویی آن جدا و برابر آن ایزوپروپانول افزوده و برای رسوب دادن اسید نوکلئیک سانتریفیوژ انجام شد. سپس DNA در اتانول ۷۰٪ شستشو و دوباره سانتریفیوژ گردید. رسوب حاصل در دمای محیط خشک و به آن آب‌مقطر دو بار تقطیر استریل به میزان ۴۰-۳۰ میکرولیتر اضافه گردید (Lian *et al.*, 2008).

PCR و تعیین توالی

واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد که شامل بافر PCR ۲/۵ میکرولیتر، پرایمرهای فوروارد و ریورس (ITS4, ITS5)، ۲۵ پیکومول، چهار نوع نوکلئوتید (dNTPs) ۲۰۰ میکرومولار، آنزیم Taq polymerase۱/۲۵ واحد، DNAی الگو یک میکرولیتر حدود ۱۰ نانوگرم و آب دیونیزه حجم لازم تا رسیدن به حجم کلی ۲۵ میکرولیتر بود. نحوه انجام PCR طبق برنامه واسرشت ابتدایی در ۹۴°C به‌مدت ۵ دقیقه، ۳۵ دور از واسرشت (۹۴°C، ۳۰ ثانیه)، اتصال (۵۸°C، ۲۰ ثانیه) و گسترش (۷۲°C، ۴۵ ثانیه) و در ادامه گسترش نهایی (۷۲°C، ۱۰ دقیقه) انجام

www.SID.ir

شد. در نهایت برای تعیین توالی محصول PCR بدست آمده از روی ژل استخراج و توسط شرکت ماکروژن ژاپن تعیین توالی شد. توالی‌های بدست آمده با استفاده از روش دستی در کنار رکوردهای ثبت شده در بانک ژن (NCBI) هم ردیف شدند و بعد Blast انجام شد.

عصاره‌گیری و اندازه‌گیری میزان اسید بتولینیک و بتولین عصاره گلسنگ و قارچ جدا شده از آن با دستگاه HPLC

از نمونه گلسنگ خشک شده ۱۰ گرم وزن نموده و با ۱۰۰ میلی‌لیتر حلال (اتانول ۹۵٪ مخصوص دستگاه HPLC ساخت کره) مخلوط و به‌مدت حداقل ۴۸ ساعت روی شیکر مغناطیسی بدون حرارت قرار داده شد. نمونه‌ها پس از آن به‌مدت ۱۲ دقیقه در حمام التراسونیک قرار گرفتند. سپس در محیط نسبتاً تاریک عصاره‌ها از صافی واتمن ۴۲ عبور و برای تزریق به دستگاه HPLC در آزمایشگاه نگهداری شدند. تزریق‌ها در دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) محصول مرک-هیتاجی آلمان-ژاپن با مشخصات و شرایط کروماتوگرافی ذیل انجام شد: پمپ ال- ۷۱۰۰ آشکارساز دیود اری (Diode Array Detector). هیتاچی (ژاپن)، ال- ۲۴۵۰، نرم‌افزار ای‌زد کروم، ستون C-18 با ابعاد ۴/۶×۲۵۰ میلی‌متر، فاز متحرک شامل ۸۴٪ استونیتریل و ۱۶٪ آب دیونیزه (یون‌زدایی شده) با سرعت جریان یک میلی‌متر در دقیقه و اشعه UV در طول موج ۲۱۰ نانومتر انجام شد. با استفاده از استاندارد اسید بتولینیک و بتولین خریداری شده از شرکت سیگما برای رسم منحنی استاندارد اسید بتولینیک و بتولین غلظت‌های متفاوت تهیه و به دستگاه HPLC تزریق و منحنی کالیبراسیون ترسیم گردید (Jafari Hajati *et al.*, 2016).

عصاره‌گیری از قارچ گلسنگ

نمونه قارچ در قطعاتی با ابعاد ۰/۵×۰/۵ سانتی‌متر جدا شده و در ظرف ۲۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت PDB کشت و در شیکر در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در شرایط تاریکی و دور ۱۲۰rpm برای مدت ۲۱ روز نگهداری شدند. برای عصاره‌گیری از محیط کشت ابتدا میسلیوم‌های قارچی به‌وسیله ۳ بار غربال از قسمت مایع جدا شد، سپس محلول حاصل با حجم برابر از مخلوط حلال کلروفرم/متانول (۱/۱۰) مخلوط و به خوبی تکان داده شد و به‌وسیله قیف دکانتور فاز آلی (فاز پایینی محلول) جدا گردید. فاز آلی بدست‌آمده در دمای ۵۱°C خشک گردید. ماده خشک حاصل در ۱ میلی‌لیتر متانول گرید HPLC حل شده و در تاریکی و دمای ۲۰°C- در فریزر نگهداری شد (Nasiri-Madiseh *et al.*, 2010).

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره گلسنک و قارچ همراه آن

برای انجام این مرحله ابتدا ۱۰ گرم از نمونه‌های پودر شده به همراه ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰٪ و اتانول ۸۰٪ مخلوط و به‌مدت ۲۴ ساعت بر روی شیکر قرار داده شد. سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۵۰۰rpm سانتریفیوژ شدند. برای سنجش خاصیت آنتی‌اکسیدانی از روش DPPH (2,2-Diphenyl-Picryl-Hydrazyl) استفاده شد. ابتدا محلول DPPH با غلظت ۰/۰۰۴٪ تهیه و از آن یک میلی‌لیتر برداشته و با یک میلی‌لیتر عصاره با غلظت ۰/۱٪ با حلال‌های مورد نظر (متانولی و اتانولی ۸۰٪) مخلوط و به‌شدت تکان داده شد. سپس محلول آماده شده به‌مدت ۳۳۰ دقیقه در تاریکی قرار گرفت. میزان جذب آن در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط دستگاه اسپکتوفتومتر قرائت شد. در نهایت با استفاده از رابطه زیر درصد دام‌اندازی رادیکال آزاد DPPH اندازه‌گیری گردید (Mashayekhi & Atashi, 2014).

$$\% \text{ inhibition} = \frac{(Ab - As)}{Ab} \times 100$$

A_{blank}: جذب DPPH در ۵۱۷ نانومتر (بدون عصاره قارچی)

A_{sample}: جذب نمونه‌ها در ۵۱۷ نانومتر

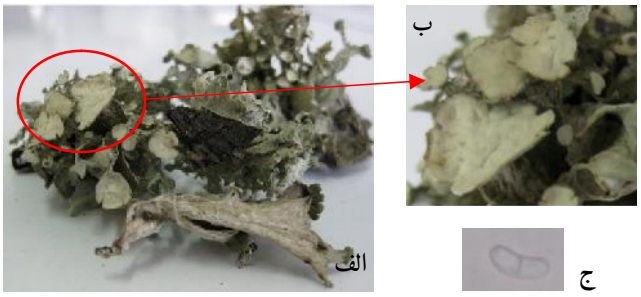
www.SID.ir

تجزیه‌وتحلیل آماری

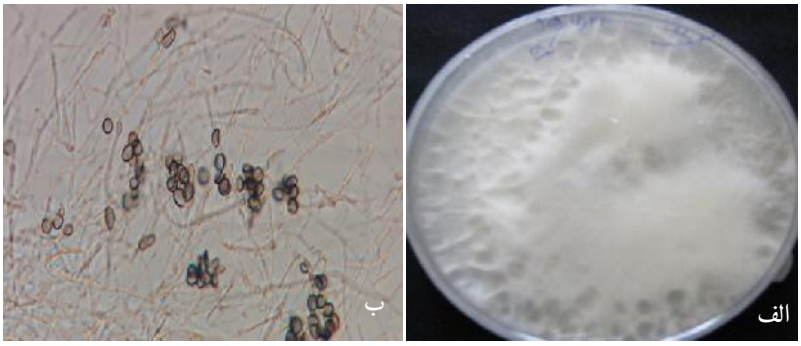
تجزیه‌وتحلیل داده ها براساس آزمون t (t مستقل) و آزمون فاکتوریل دو عامله با استفاده از نرم‌افزار SPSS16 انجام شد و مقایسه میانگین‌ها نیز با استفاده از آزمون دانکن انجام گردید. برای تجزیه‌وتحلیل و تعیین سطح زیر پیک منحنی بتولین و بتولینیک اسید، از نرم‌افزار IZCO (ای زد کروم) استفاده و منحنی کالیبراسیون ترسیم گردید.

نتایج

براساس بررسی‌های مورفولوژیکی گلسنگ گونه *Ramalina sinensis* شناسایی شد (Jatta, 1902). نمونه دارای تال بوته‌ای، پایه‌دار، افراشته و بادبزنی شکل، با رگه‌های طولی، مشبکی چین‌خورده، سطح تحتانی لوپ‌دار، با بافتی نرم بدون شکاف بوده و طول شاخه‌های اصلی نیز به ۵ سانتی‌متر می رسند. تال در سطح فوقانی سبز متمایل به زرد رنگ و در بخش تحتانی به رنگ سفید متمایل می‌باشد. آپوتسیوم تمایز یافته ۷-۲ میلی‌متری در سطح تال به شکل مخروطی، پارافیز حقیقی و آسک تک پوششی کشیده و چماقی شکل با دیواره ضخیم چند لایه ۸ اسپوری وجود دارند. آسکسپورهای شفاف تک دیواره، بیضی شکل با طول و عرض ۵ × ۲/۵ میکرومتر است. ریسه این نوع گلسنگ نواری مشابه ریسه برخی از گلسنگ‌های برگی می‌باشد (شکل ۱).



شکل ۱- گلسنگ ***R. sinensis*** جدا شده از ***B. pendula***. الف: ساختار و تال؛ ب: بخش آپوتسیوم؛ ج: اسپور (۱۰۰x)



شکل ۲- قارچ همراه گلسنگ (***A. arundinis***)؛
الف: پرگنه قارچ در محیط کشت **PDA**؛ ب: سلول‌های کنیدیوژنوس در حال القاء کندی‌ها (۱۰۰x)

www.SID.ir

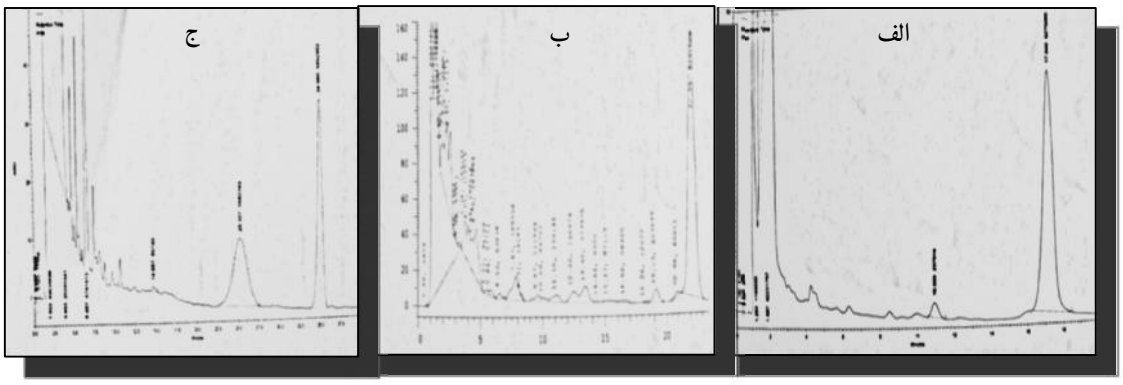
نتایج بخش مورفولوژیکی و مولکولی قارچ جدا شده از گلسنگ

طبق منابع معتبر این قارچ براساس صفات مورفولوژیکی *Arthrinium arundinis* (Corda) شناسایی شد (شکل ۲). دارای میسلیوم صاف، شفاف، منشعب، قطر هیف به اندازه ۳-۲ میکرومتر می‌باشد. تعداد کونیدیوفورها به سلول کونیدیوژنوس کاهش می‌یابد. سلول‌های کونیدیوژنوس به‌صورت مجتمع به شکل خوشه‌ای در هیف، با رنگ قهوه‌ای کم‌رنگ، صاف، با عرض و طول ۴-۳×۱۲-۶ میکرومتر، آپیکال گردن ۵-۳ میکرون، بخش پایه ۶-۴ میکرون می‌باشد. کنیدی به رنگ قهوه‌ای، صاف، گرد از نظر سطح، (۵-) ۷-۶ میکرومتر، در نمای جانبی، با قطر ۴/۳ میکرومتر دیده می‌شود (Crous & Groenewald, 2013).

نتایج الکتروفورز تک باند حدوداً ۶۰۰bp را در نتایج PCR نمونه‌های DNA قارچ جدا شده از گلسنگ نشان داد. وضوح باندها و عدم وجود اسمیر و چند باندی نشان‌دهنده شرایط تکثیر مناسب می‌باشد. پس از توالی‌یابی محصول PCR، قطعه‌ای از نوکلئوتید برای نمونه قارچی بدست آمد. نتایج بلاست کردن توالی نمونه‌های قارچی در پایگاه NCBI با ۱۰۰-۹۰ درصد شباهت به توالی نوکلئوتیدهای قارچ *A. arundinis* شناسایی و با شماره کد MG198621 ثبت شدند.

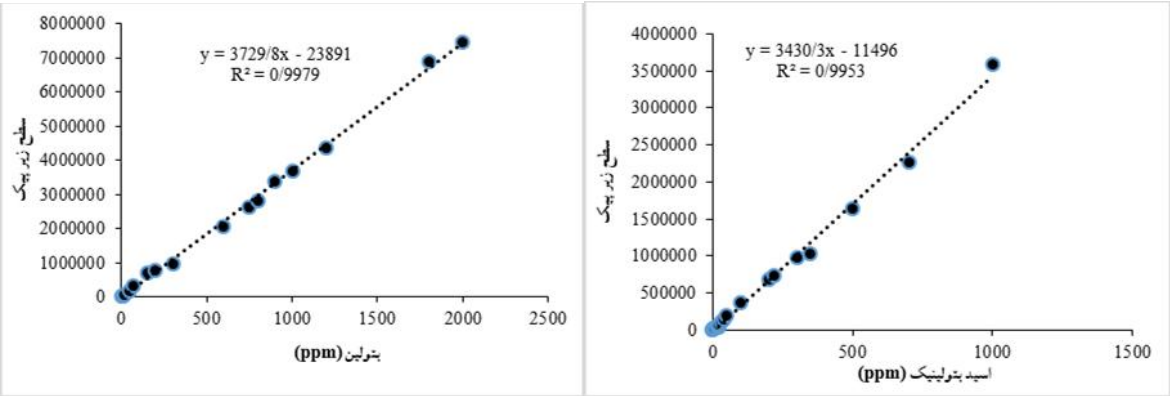
نتایج آنالیز ماده مؤثره (اسید بتولینیک و بتولین)

با تزریق استاندارد خالص اسید بتولینیک و بتولین به دستگاه HPLC پس از گذشت حداکثر ۳۰ دقیقه پیک مربوط به ماده مؤثره‌ها ظاهر شد. تشخیص پیک هر نمونه در کروماتوگرام حاصل با مقایسه زمان بازداری ظاهر شدن پیک اسید بتولینیک و بتولین خالص (استاندارد) تزریق شده و پیک‌های حاصل از عصاره‌های تزریقی انجام گردید. میزان ماده مؤثره هر یک از نمونه‌ها با اندازه‌گیری سطح زیر پیک نمونه‌ها در زمان مورد نظر تعیین و با قرار دادن این سطح در رابطه خط حاصل از تزریق غلظت‌های مختلف محاسبه شد (شکل ۳). به‌منظور تعیین میزان بتولین در بافت قارچ‌های ماکروسکوپی مختلف از رابطه y=3729.8x-23891 با ضریب همبستگی R^2=0.9979 و برای اسید بتولینیک از رابطه y=3430.3x-11496.7 با ضریب همبستگی R^2=0.9953 استفاده شد (شکل ۴). نتایج تجزیه‌وتحلیل داده‌های اسید بتولینیک و بتولین گلسنگ و قارچ جدا شده از آن (جدول ۱) در سطح ۱٪ اختلاف معنی‌داری دارد و ماده مؤثره موجود در بافت نمونه‌ها در دو گروه مجزا قرار می‌گیرند.



شکل ۳- منحنی کروماتوگرام، الف: استاندارد (اسید بتولینیک و بتولین)؛ ب: گلسنگ (*R. sinensis*) و قارچ جداشده از آن (*A. arundinis*)

www.SID.ir

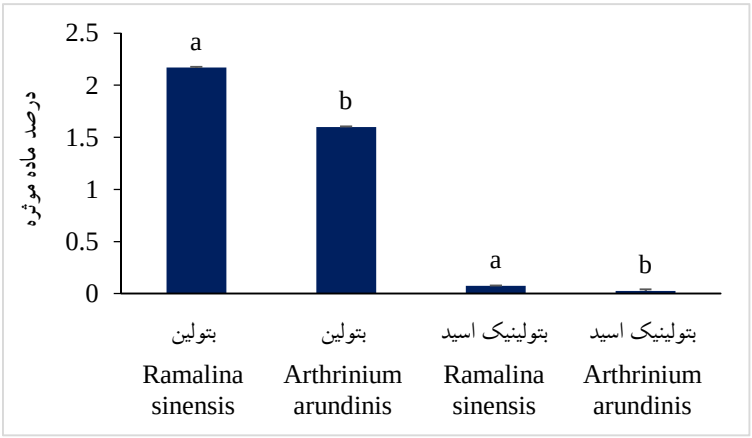


شکل ۴- منحنی کالیبراسیون اسید بتولینیک و بتولین

جدول ۱- تجزیه واریانس ماده مؤثره (اسید بتولینیک و بتولین) گلسنگ (***R. sinensis***) و قارچ جداشده از آن (***A. arundinis***)

Levene's Test for Equality of Variances			Levene's Test for Equality of Variances			Equal variances assumed
Mean Difference	Sig. (2-tailed)	df	T	Sig.	F	
۰/۵۷۰	۰/۰۰	۴	۶۹/۸۱۰	۱/۰۰۰	۰/۰۰	بتولین
۰/۰۵۰	۰/۰۰۰	۴	۱۴/۸۵۲	۰/۵۳۰	۰/۴۷۱	بتولینیک اسید

نتایج مقایسه میانگین میزان ماده مؤثره (بتولین و بتولینیک اسید) در بافت گلسنگ *R. sinensis* و قارچ جدا شده از آن (*A. arundinis*) در شکل ۵ ارائه شده است. میزان ماده مؤثره بتولین در بافت گلسنگ ۲/۱۷٪ و در قارچ ۱/۶٪ و میزان اسید بتولینیک نیز به‌ترتیب ۰/۰۷۵٪ و ۰/۰۲۵٪ می‌باشد.



شکل ۵- نمودار مقایسه میانگین میزان ماده مؤثره در بافت گلسنگ ***R. sinensis*** و قارچ جدا شده از آن (***A. arundinis***)

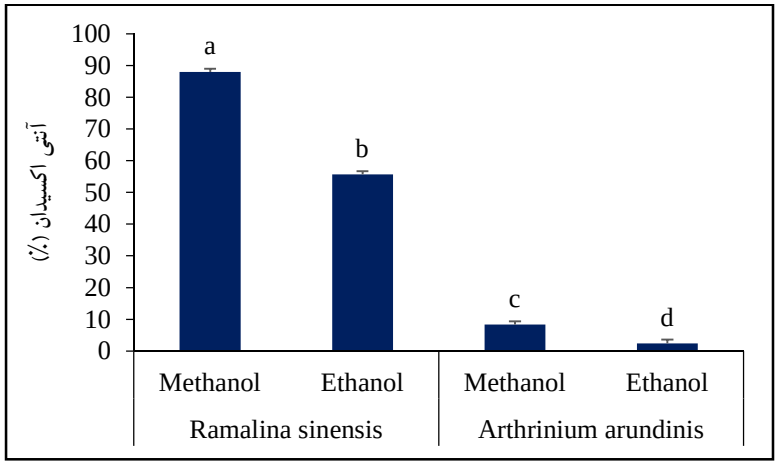
www.SID.ir

نتایج ارزیابی میزان خاصیت آنتی‌اکسیدان گلسنگ و قارچ جدا شده از آن در دو حلال اتانول و متانول ارزیابی شد؛ البته بین خاصیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها، حلال‌ها و همچنین اثر متقابل آنها و حلال اختلاف معنی‌داری در سطح ۹۹٪ وجود داشت (جدول ۲).

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس خاصیت آنتی‌اکسیدانی در گلسنگ (*R. sinensis*) و قارچ همراه آن (*A. arundinis*)

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	مقدار F	سطح معنی‌دار
نمونه	۱	۱۱۷۷۸/۹۵۷	۳۷۴۹/۵۵۱	۰/۰۰
حلال	۱	۹۷۵/۶۸۱	۳۱۰/۵۸۵	۰/۰۰
نمونه × حلال	۱	۴۶۴/۲۶۵	۱۴۷/۷۸۸	۰/۰۰۰
اشتباه	۷	۴۶۴/۲۶۵		
کل	۱۱			

نتایج نمودار مقایسه میانگین اثر متقابل خاصیت آنتی اکسیدانی در گونه‌های گلسنگ و قارچ جدا شده از آن در حلال‌های مختلف (متانولی و اتانولی) در شکل ۶ ارائه شده‌است. میزان خاصیت آنتی اکسیدانی گلسنگ *R. sinensis* به‌مراتب بیشتر از قارچ همراه آن است، به‌نحوی که در حلال متانولی این درصد به ۸۷/۹۸۹٪ و در حلال اتانولی ۵۵/۶۶٪ مشاهده می‌شود. مقادیر مربوط به خاصیت آنتی‌اکسیدانی قارچ همراه *A. arundinis* در حلال متانولی ۸/۳۳٪ و در حلال اتانولی ۲/۴٪ می باشد. به این ترتیب خاصیت آنتی‌اکسیدان بافت *R. sinensis* نسبت به عصاره قارچ جدا شده از آن *A. arundinis* ۱۴ برابر بیشتر بود.



شکل ۶- نمودار مقایسه میانگین اثر متقابل فعالیت آنتی‌اکسیدانی گلسنک با قارچ همراه گونه *B. pendula* در دو حلال

بحث

حدود ۸۰۰ ترکیب ثانویه از گلسنگ های قارچی کشف شده که در نوع خود منحصربه‌فرد می‌باشد (Miao *et al.*, 2001). این ترکیب ها علاوه‌بر مصارف دارویی در صنعت نیز کاربرد دارند. ترکیب‌های استخراج شده از گلسنگ ها در محصولات گوناگونی مانند انواع کرم، شامپو، ضدعرق،

www.SID.ir

شربت سرفه و خمیر بخور استفاده می‌شوند. در حال حاضر چندین شرکت تجاری در کانادا و بریتانیا جزء قارچی گلسنگ را جدا و از آن در تهیه محصولات دارویی استفاده می‌کنند (Nash *et al.*, 2004). این مطالعه اولین گزارش حضور دو ماده مؤثره اسید بتولینیک و بتولین در گلسنگ (بر روی گونه *B. pendula*) و میسلیوم قارچ آن می‌باشد. براساس نتایج این تحقیق، گلسنگ جدا شده از پوست گونه توس جزء گلسنگ‌های برگی تحت عنوان *Ramalina sinensis* از خانواده Ramalinaceae و راسته Lecanorales شناسایی شد (Jatta, 1902). این خانواده به‌صورت تقریبی دارای ۲۴۶ گونه است که در نواحی گرمسیری تا معتدل گسترش دارند و بیشتر قارچ های همراه این راسته آسکومیستی‌ها و دارای ریسه برگی، بوته‌ای و پوسته‌ای می‌باشند (Haji Moniri, 2009). این گونه گلسنگ در ارتفاعات ۱۸۰۰ تا ۴۳۰۰ متری کشورهای اروپایی، جزایر کوریل، ژاپن، آمریکای شمالی و جنوبی و چین (Oh *et al.*, 2014) گسترش دارد. وجود این گونه از گلسنگ در شمال ایران در ارتفاعات ۲۳۰۰ تا ۲۴۰۰ در توده درختان پهن‌برگ خزان‌کننده گزارش شده است (Haji Moniri, 2009؛ Sohrabi & Alstrup, 2007؛ Sohrabi & Ramezani, 2010). در طول چند دهه اخیر استرس اکسیداتیو در طیف گسترده‌ای از بیماری های انسان نقش حیاتی دارد که این استرس در حالت عدم تعادل و یا تولید بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و نیتروژن (RNS) ایجاد شده است و سبب آزادسازی رادیکال‌های آزاد می‌شود. برای جلوگیری از این اختلال در سلول نیازمند به فعال‌سازی سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی می باشد (Bahadori *et al.*, 2016). با توجه به اینکه در جوامع امروزی با شیوع بیمارهای مختلف، استفاده از خاصیت آنتی اکسیدان گیاهان دارویی به دلیل نداشتن عوارض سوء نسبت به آنتی اکسیدان‌های شیمیایی مطرح‌تر است و گونه‌های گلسنگ نیز در این زمینه از اهمیت بالایی برخوردارند. بر این اساس در این پژوهش نتایج ارزیابی خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره‌ها نشان داد که بافت عصاره گلسنگ *R. sinensis* در حلال متانولی با ۸۷/۹۸۹٪، قابلیت بالایی در حذف رادیکال آزاد دارد. طبق گزارش‌های مختلف خاصیت آنتی‌اکسیدانی گونه‌های مختلف جنس *Ramalina* با روش‌های مختلف DPPH، SOI (super oxide inhibitory)، NOS (nitric oxide-scavenging assay)، HORAC (hydroxyl radical antioxidant capacity) و غیره مورد ارزیابی قرار گرفته و نتایج حکایت از قابلیت حذف رادیکال آزاد توسط عصاره این گونه‌ها دارد (Thadhani & Karunaratne, 2017). در این بین، روش DPPH یک روش ساده و معمول است که به طور گسترده برای ارزیابی خاصیت آنتی‌اکسیدانی ترکیب‌های طبیعی استفاده می‌شود (Bahadori *et al.*, 2016). Tursun و همکاران (۲۰۰۹) بیان کردند که در گلسنگ *R. sinensis* پلی‌ساکاریدهای محلول در آب از خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالایی برخوردارند. Sisodia و همکاران (۲۰۱۳) فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره گلسنگ *R. roesleri* به روش DPPH را بین ۸۷/۹–۲۹/۴۲٪ گزارش نموده‌اند. Sahin و همکاران (۲۰۱۵) درصد حذف رادیکال‌های آزاد به روش ABTS (2,2'-azino-bis [3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) با استفاده از عصاره گیری از حلال‌های مختلف در سه گونه گلسنگ از جنس *Ramalina* را اندازه گیری نموده و بیان کردند که بیشترین مقدار در گونه‌های *R. fastigiata* و *R. fraxinea* در عصاره متانولی به میزان ۴۳/۹٪ و ۲۱/۲٪ و در گونه *R. farinacea* عصاره اتانولی به میزان ۱۳/۶٪ قادر به رادیکال‌زدایی بود. Ristić و همکاران (۲۰۱۶) نیز خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره دو گلسنگ *R. fraxinea* و *R. fastigiata* به روش DPPH را به‌ترتیب ۲۵/۵٪ تا ۴۲/۳٪ اعلام نموده‌اند. نتایج این تحقیق همانند نتایج دیگر محققان مؤید وجود ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی در بافت گلسنگ‌ها می‌باشد. به‌طوری که در روش استفاده (DPPH) در سنجش میزان خاصیت آنتی اکسیدانی با نتایج Sisodia و همکاران (۲۰۱۳) و Ristić و همکاران (۲۰۱۶)، در میزان درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی با نتایج Sisodia و همکاران (۲۰۱۳) و در استفاده از حلال (متانول) با Sahin و

www.SID.ir

همکاران (۲۰۱۵) در یک راستا می‌باشد. Evernic ،Lecanoric acid ،Fumarprotocetraric acid acid، Usnic acid ،Stictic acid و همچنین بسیاری از ترکیب‌هایی مانند انواع کربوهیدارت‌ها، دپسیدها (sekikaic acid، Ramalinolic acid ،divaricatic acid ،atranorin و ...)، اسید چرب (oleic، palmitic، stearic، linoleic و ...)، ترپن‌ها (iso-arborinol acetate ،ursolic acid، sandaracopimaric acid و ...) و سایر ترکیب‌های دیگر از متابولیت های ثانویه شناخته شده در خانواده گلسنگ *R. sinensis* می‌باشند که فعالیت‌های ضد میکروبی، ضد قارچی، ضد ویروسی و ضد سرطانی دارند (Sahin *et al.*, 2015؛ Moreira *et al.*, 2015). ماده مؤثره اسید بتولینیک و بتولین با خواص دارویی ویژه خود در زمینه لاین‌های سلول‌های سرطانی در بافت گلسنگ *R. sinensis* به میزان قابل توجهی به‌ترتیب ۲/۱۷٪ و ۰/۰۷۵٪ اندازه‌گیری شد. البته در زمینه حضور این دو ماده مؤثره در بافت گلسنگ های توس گزارشی نشده‌است. منشأ اصلی این دو ماده مؤثره پوست درخت توس می باشد که به‌میزان مناسبی سنتز می‌کند، اما گونه‌های درخت توس در ایران در حال انقراض بوده و امکان بهره‌برداری برای استخراج ماده مؤثره از آنها وجود ندارد؛ ازاین‌رو یافتن جایگزین مناسب برای بهره بردن از این دو ماده مؤثره مفید یکی از اهداف پژوهشگران می باشد. بر این اساس در چند سال اخیر در ایران از تکنیک‌های مختلف ازجمله کشت بافت با القاء الیسیتورها، کشت سوسپانسیون سلولی، کشت ریشه مویین و تکثیر و استخراج از قارچ‌ها (Jafari Hajati *et al.*, 2017؛ Nazari *et al.*, 2017) برای استخراج این ماده مؤثره ارزشمند استفاده شده‌است. طبق نتایج این پژوهش میزان بتولین در عصاره بافت گلسنگ استقرار یافته در پوست درخت توس، بدون اعمال الیسیتور نسبت به نتایج سایر محققان بیشتر است. به‌طوریکه دستیابی به چنین نتایجی در این زمینه بسیار حائز اهمیت است.

قارچ خالص‌سازی شده از گلسنگ با روش مولکولی *Arthinium arundinis* شناسایی شده که با ویژگی‌های مورفولوژیکی قارچ نیز همخوانی دارد. Li و همکاران (۲۰۰۷) بر روی قارچ‌های اندوفیت همراه با گلسنگ‌های کوهستان چین مطالعاتی انجام داده و به این نتیجه رسیدند که بیشتر قارچ‌های اندوفیت جداسازی شده از خانواده آسکومیست‌ها می‌باشند. این قارچ نیز جزء قارچ‌های آسکومیست بوده و برای اولین بار با کد MG198621 در سایت NCBI ثبت گردید. میزان درصد خاصیت آنتی‌اکسیدانی در عصاره میسلیوم این قارچ همراه با گلسنگ در حلال‌های مختلف اختلاف معنی‌داری نشان داد؛ به‌طوری که در حلال متانولی بیشترین میزان (۸/۳۳٪) را داشت.

براساس این تحقیق دو ماده مؤثره مورد نظر در عصاره میسلیوم‌های قارچ *A. arundinis* به‌ترتیب ۱/۶٪ و ۰/۰۲۵٪ می‌باشد. Zhou و همکاران (۲۰۱۴) نیز در راستای این پژوهش با استفاده از تکنیک HPLC و TLC توانستند ۱۰ ترکیب مؤثره از عصاره قارچ *Arthrinium* sp را شناسایی نمایند. میزان ماده مؤثره در عصاره قارچ *A. arundinis* نسبت به عصاره بافت گلسنگ کمتر است ولی سرعت رشد میسلیوم‌های قارچ در شرایط مناسب قابل مقایسه با رشد گلسنگ نمی‌باشد. علاوه‌بر این مشخص شد که تولید محصولات با ارزش از منبع میکروبی، آسان‌تر، با سرعت بالاتر و اقتصادی‌تر بوده و در کاهش قیمت فروش مؤثر است (Kartal *et al.*, 2004). براساس این نتایج ممکن است با تکثیر میسلیوم‌های قارچ *A. arundinis* به‌ویژه با تکنیک بیوراکتور در زمان و مکان کم به میزان قابل توجه از ماده مؤثره اسید بتولینیک و بتولین دست یابیم. در این تحقیق وجود ماده مؤثره اسید بتولینیک و بتولین در عصاره گلسنگ و میسلیوم قارچ همراه آن برای اولین بار به‌عنوان یکی از منابع جدید و امیدبخش در تحقیقات زیست‌فناوری در عرصه‌های صنعت، پزشکی و کشاورزی گزارش می‌شود. امید است این پژوهش با توجه به گسترش زیاد سرطان در کشور و خاصیت ضد سرطانی منحصربه‌فرد این ترپن‌ها که طیف وسیعی از سرطان‌ها را شامل می‌شوند در مورد تولید داروهای مربوطه مؤثر باشد.

www.SID.ir

منابع مورد استفاده

- Backorová, M., Jendz elovsky, R., Kello, M., Backor, M., Mikeš, J. and Fedorocko, P., 2012. Lichen secondary metabolites are responsible for induction of apoptosis in HT-29 and A2780 human cancer cell lines. Toxicology in Vitro, 26: 462-468.
- Bahadori, M.B., Valizadeh, H., Asghari, B., Dinparast, L., Bahadori, S. and Moridi Farimani, M., 2016. Biological activities of *Salvia santolinifolia* Boiss. a multifunctional medicinal plant. Current Bioactive Compounds, 12(4): 297-305.
- Başer, K.H. and Demirci, B., 2007. Studies on *Betula* essential oils. ARKIVOC, 2007(7): 335-348.
- Crous, P. and Groenewald, J., 2013. A phylogenetic re-evaluation of *Arthrinium*. Journal of International Mycological Association, 4(1): 133-154.
- Devaraja, G. and Swamy, C.T., 2012. Lichens: a novel and potential source as antimicrobials for human use. Journal of Phytology, 4(1): 38-43.
- Drąg-Zalesińska, M., Drąg, M., Poręba, M., Borska, S., Kulbacka, J. and Saczko, J., 2017. Anticancer properties of ester derivatives of betulin in human metastatic melanoma cells (Me-45). Cancer Cell International, 17(4): 1-7.
- Dzubak, P., Hajduch, M., Vydra, D., Hustova, A., Kvasnica, M., Biedermann, D., Markova, L., Urban, M. and Sarek, J., 2006. Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic Implications. Natural Product Research, 23(2): 394-411.
- Haji Moniri, M., 2009. History of lichenology in Iran, with some additional lichens from Golestan province, (N. Iran). Iranian Journal of Botanic, 15(2): 159-163.
- I.U.C.N., 2001. Red List Categories and Criteria. IUSN, Gland, Switzerland.
- Jafari Hajati, R., Payamnoor, V., Ghasemi Bezdi, K. and Ahmadian Chashmi, N., 2016. Optimization of callus induction and cell suspension culture of *Betula pendula* Roth. for improved production of betulin, betulinic acid, and antioxidant activity. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 52(4): 400-407.
- Jafari Hajati, R., Payamnoor, V., Ghasemi Bezdi, K. and Ahmadian Chashmi, N., 2017. Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on production of betulin and betulinic acid in cell suspension of birch (*Betula pendula* Roth.). Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 32(6): 1037-1047.
- Jatta, 1902. Nuovo Giornale Botanico Italiano. 9: 262.
- Kartal, M., Konuklugil, B., Indrayanto, G. and Alfermann, A.W., 2004. Comparison of different extraction methods for the determination of podophyllotoxinand 6-methoxypodophyllotoxin in *Linum* species. Journal of Pharmacology, 35: 441-447.
- Kirmizigul, S., Koz, O., Anil, H. and Icli, S., 2003. Isolation and structure elucidation of novel natural products from Turkish Lichen. Turkey Journal of Chemistry, 27(4): 493-500.
- Li, W.C., Zhou, J., Guo, S.Y. and Guo, L.D., 2007. Endophytic fungi associated with lichens in Baihua mountain of Beijing, China. Fungal Diversity, 25: 69-80.
- Lian, B., Zang, J.P., Hou, W.G., Yuan, Sh. and Smith, D.L., 2008. PCR-based sensitive detection of the edible fungus Boletus edulis from rDNA ITS sequences. Journal of Electro Biotechnology, 11: 1-8.
- Lüttge, U., Beyschlag, W., Büdel, B. and Francis, D., 2012. Progress in Botany (Vol. 72). New York, Springer, 396p.
- Mashayekhi, K. and Atashi, S., 2014. The Analyzing Methods in Plant Physiology. Sirang Press, Gorgan, 310p.
- Miao, V., Coeffet, M., Brown, D., Sinnemann, S., Donaldson, G. and Davies, J., 2001. Genetic approaches to harvesting lichen products. Trends Biotechnology, 19: 349-355.
- Mishra, T., Arya, R., Meena, S., Joshi, P., Pal, M., Meena, B., Upreti, D.K., Rana, T.S. and Datta, D., 2016. Isolation, characterization and anticancer potential of cytotoxic triterpenes from *Betula utilis* Bark. PLoS ONE, 11(7): 1-14.
- Mitrović, T., Stamenković, S., Cvetković, V., Tošić, S., Stanković, M. and Radojević, I., 2011. Antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activities of five lichen species. International Journal of Molecular Sciences, 12(8): 5428-5448.
- Molnar, K. and Farkas, E., 2008. Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: a review. Nat. Forsch. Zeitschrift für Naturforschung C, 65(3-4): 157-173.
- Moreira, A.S., Braz-Filho, R., Mussi-Dias, V. and Vieira, I.C., 2015. Chemistry and biological activity of ramalina lichenized fungi. Molecules, 20(5): 8952-8987.
- Nash, T.H., Ryan, B.D., Gries, C. and Bungartz, F., 2004. Lichen Flora of the Greater Sonoran Desert Region (Vol. 2). Arizona State University Lichen Herbarium, 742p.
- Nasiri-Madiseh, Z., Mofid, M.R., Ebrahimi, M., Khayyam-Nekoei, S.M. and Khosro-Shahli, M., 2010. Isolation of taxol-producing endophytes fungi from Iranian yew (*Taxus baccata* L.). Journal of Shahrekord University Medicinal Science, 11(4): 101-107.

www.SID.ir

antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents. Food and Chemical Toxicology, 45: 1650-1661.
- Sisodia, R., Geol, M., Verma, S., Rani, A. and Dureja, P., 2013. Antibacterial and antioxidante activity of lichen species *Ramalina roesleri*. Natural Product Research, 27: 2235-2239.
- Sohrabi, M. and Alstrup, V., 2007. Additions to the lichen mycota of Iran from east Azerbaijan province. Mycotoxin, 100: 145-148.
- Sohrabi, M. and Ramezani, E., 2010. Notes on some remarkable epiphytic lichens from Mazandaran province and a short history of lichenology in the Hyrcanian forest, N Iran. Rostaniha, 11(2): 121-131.
- Temina, M., Levitsky, D.O. and Dembitsky, V.M., 2010. Chemical constituents of the epiphytic and lithophilic lichens of the genus *Collema*. Recearch Natural Product, 4(1): 79-86.
- Thadhani, V. and Karunaratne, V., 2017. Potential of lichen compounds as antidiabetic agents with antioxidative properties: a review. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2017: 1-10.
- Tursun, T., Mamut, R. and Abbas, A., 2009. Study on the antioxidant activity of the polysaccharide in *Ramalina sinesis*. Food and Fermentation Industries, 11: 119-121.
- Zhou, Y.Y., Li, H.H., Tan, G.H., Guo, X.L. and Zhang, W.M. 2014. Study on secondary metabolites of endophytic fungus *Arthrinium* sp. A092 from *Uvaria microcarpa*. Journal of Chinese medicinal materials, 37(11): 2008-2011.
- Zyryanova, O.A., Terazawa, M., Koike, T. and Zyryanov, V.I., 2010. White birch trees as resource species of Russia: their distribution, ecophysiological features, multiple utilizations. Eurasian Journal for Research, 13(1): 25-40.
- Nazari, J., Payamnoor, V. and Kavosi, M.R., 2017. The evaluation absorption of some secondary metabolites (betulin, betulinic acid, phenol, flavonoids) and antioxidant activity of wood-inhabiting agaric fungi on medicinal birch tree (*Betula pendula* Roth.) in Golestan province. Eco-Phytochemical Journal of Medicenal Plant, 14(2): 44-55.
- Oh, S.O., Wang, Y., Wang, L., Liu, P. and Hur, J., 2014. A note on the lichen genus *Ramalina* (Ramalinaceae, Ascomycota) in the Hengduan Mountains in China. Mycobiology, 42(3): 229-240.
- Ristić, S., Ranković, B., Kosanić, M., Stamenković, S., Stanojković, T., Sovrlić, M. and Manojlović, N., 2016. Biopharmaceutical potential of two *Ramalina* lichens and their metabolites. Current Pharmaceutical Biotechnology, 17(7): 1-8.
- Sahin, S., Oran, S., Sahinturk, P., Demir, C. and Özturk, S., 2015. *Ramalina* lichens and their major metabolites as possible natural antioxidant and antimicrobial agents. Journal of Food Biochemistry, 39: 471-477.
- Sami, A., Tarua, M., Salmea, K. and Jari, Y.K., 2006. Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 29: 1-13.
- Seifi, M., Nazeri, S. and Soltani, J., 2014. Presence of the DBAT gene and in vitro production of Taxol in endophytic fungi isolated from Iranian yew (*Taxus baccata*). Journal of Kashan University Medicinal Science, 17(3): 255-260.
- Sharififar, F., Moshafi, M. and Mansouri, S., 2007. In vitro evalution of antibacterial and antioxidant of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss. Food Control, 18: 800-805.
- Singh, G., Maurya, S. and Delampasona, M., 2007. A comparison of chemical antioxidant and

www.SID.ir

Extraction of anti-cancer triterpenoids (betulinic acid and betulin) from the birch bark-inhabiting lichen (*Ramalina sinensis*)

J. Nazari[1], V. Payamnoor[2*], M.R. Kavosi[3] and J. Asadi[4]

1- Ph.D. student of Sylviculture and Forest Ecology, Faculty of Forestry, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Gorgan, Gorgan, Iran
2*-Corresponding author, Faculty of Forestry, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Gorgan, Gorgan, Iran E-mail: Mnoori56@gmail.com
3- Faculty of Forestry, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Gorgan, Gorgan, Iran
4- Department of Clinical Biochemistry, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran

Received: January 2018 Revised: May 2018 Accepted: May 2018

Abstract

Lichens are small environments containing two fungus and algae symbiosis. They are one of the richest sources of natural ingredients with anti-tumor, antibiotic, and antioxidant properties, some of which are used as drugs and for the treatment of certain diseases. This research was aimed to identify and determine the amount of betolin and betulinic acid as well as evaluation of the antioxidant activity of lichen *Betula pendula* Roth. Roth.and its symbiotic fungus. It was found that the lichen isolated from the bark of birch contained bioactive compounds entitled *Raminalina sinensis*. The symbiotic fungus (*Arthrinium arundinis*) was detected by the molecular method. This fungus belongs to the ascomycetes, registered for the first time in the NCBI website with MG198621 code. In the extract of lichen and its symbiotic fungus, the amount of betulinic acid and betulinic acid was determined using HPLC. Betulinic acid and betulin, belonging to the terpenes, are known as a strong anticancer agent. The mentioned ingredients were significantly found in the lichen tissue (2.17 and 0.075 percent, respectively) and in its symbiotic fungus *A. arundinis* (1.6 and 0.025 percent, respectively). In this way, the lichen and its symbiotic fungus are introduced for the first time as new sources containing these two active ingredients. Measurement of antioxidant properties of lichen extract and its symbiotic fungus was examined by methanol and ethanol solvents. It was found that the lichen extract and the symbiotic fungus, besides having alternative metabolites, have antioxidant properties, which are able to remove toxic free radicals. These results could have valuable effects in medicine and industry.

Keywords: Betulinic acid, betulin, antioxidant, birch (*Betula pendula* Roth.), lichen.

Archive of SID

www.SID.ir