Archive of SID

نشریه علمی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۵، شماره ۴، صفحه ۵۸۷-۵۷۷ (۱۳۹۸)

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijmapr.2019.124949.2478
شناسه دیجیتال (DOR): 98.1000/1735-0905.1398.35.577.96.4.1575.105

اثر نوع ریزنمونه بر مقدار ماده مؤثره تولید شده در شرایط In vitro در دو گونه *Betula pendula* Roth و *Betula litwinowii*

وحیده پیام‌نور[1*]، جمیله نظری[2] و راضیه جعفری حاجتی[3]

۱*- نویسنده مسئول، دانشیار، دانشکده علوم جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
پست الکترونیک: Mnoori56@gmail.com
۲- دانشجوی دکترا، دانشکده علوم جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
۳- دانش‌آموخته دکترا، مرکز تحقیقات کارآزمایی بالینی طب سنتی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

تاریخ دریافت: دی ۱۳۹۷ تاریخ اصلاح نهایی: فروردین ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۹۸

چکیده

بتولین و اسید بتولینیک یکی از مهمترین متابولیت‌های ضد سرطان (پوست، سینه، رحم، روده، پانکراس، مغز استخوان و غیره) و ضد ایدز می‌باشند که منبع اولیه تهیه آن درخت توس است. با توجه به در حال انقراض بودن این درختان در ایران، جایگزین نمودن روش‌های نوین کشت سلول و بافت بجای استخراج از پوست امری ضروری می‌باشد. هدف از انجام این مطالعه تعیین میزان تأثیر نوع ریزنمونه بر مقدار بتولین و بتولینیک اسید تولید شده در کالوس‌های دو گونه *Betula pendula* و *B. litwinowii* در مقایسه با نمونه‌های گرفته شده از طبیعت بوده است. ریزنمونه برگ و پوست گونه‌های مذکور با هدف کالزایی در محیط کشت پایه WPM حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D کشت شدند. میزان بتولین و اسید بتولینیک کالوس‌های سه ماهه با استفاده از تکنیک HPLC ارزیابی و با میزان موجود در ساقه‌های یک سانتی‌متری دو گونه (نمونه‌های گرفته شده از طبیعت) مقایسه شد. ریزنمونه پوست به‌مراتب موفق‌تر از ریزنمونه برگ در کالزایی عمل نمود و در عین حال میزان ماده مؤثره بیشتری نیز در آن القاء شد. میزان بتولین و اسید بتولینیک استخراجی از عصاره پوست طبیعی *B. pendula* به‌ترتیب ۵/۲۲۷ و ۲/۹۰۹ درصد و *B. litwinowii* به‌ترتیب ۵/۶۴۹ و ۲/۵۱۹ درصد بود. همچنین کالوس‌های حاصل از پوست *B. pendula* و *B. litwinowi* به‌ترتیب دارای ۰/۰۲۲۶ و ۰/۰۱۶ درصد بتولین و ۰/۰۵۲۵ و ۰/۰۵۷ درصد اسید بتولینیک بودند. به‌طور کلی ریزنمونه پوست در هر دو گونه توس، باعث القاء مقدار بیشتری ماده مؤثره نسبت به ریزنمونه برگی در شرایط In vitro شد.

واژه‌های کلیدی: بتولین، اسید بتولینیک، توس، ریزنمونه پوست، کالزایی.

مقدمه

جنس توس از خانواده Betulaceae ازجمله گیاهان دارویی ارزشمند محسوب می‌شود که در نیمکره شمالی و شرق اروپا تا قسمت شمالی آسیا پراکنده است (Demirci *et al.*, 2004). از قدیم پوست توس در برخی کشورها برای درمان بیماری‌های مختلف مانند ناراحتی‌های پوستی،

www.SID.ir

Archive of SID

روماتیسم و کاهش درد استفاده می‌شد (Raal *et al.*, 2010). پوست توس حاوی متابولیت‌های ثانویه متفاوت همانند ترپن‌ها، فلاونوئیدها، هیدروکربن‌ها، پلی‌فنول‌ها، تانن‌ها و استروئیدها بوده است (Abyshev *et al.*, 2007). در آزمایش‌های اولیه بتولین و بتولینیک اسید برای تومورهای خاصی مورد بررسی قرار گرفته بود (Pisha *et al.*, 1995) ولی تحقیقات اخیر نشان داده که این ترکیب‌ها فعالیت ضد سرطانی در برابر طیف وسیعی از سرطان‌ها دارند. اثر ضد تومور، ضدافسردگی (Aguirre *et al.*, 2006)، ضد HIV (Huang *et al.*, 2006)، ضد مالاریا، محافظت از کبد، کم‌کننده چربی و قند خون (Falamas *et al.*, 2011) از دیگر فعالیت‌های بیولوژیکی این دو ماده مؤثره می‌باشد. بتولین، بتولینیک اسید و اولئانولیک اسید به علت اینکه فرآورده طبیعی هستند می‌توانند به‌صورت انتخابی با کاهش سمّیت سلول‌های نرمال، از رشد سلول‌های تومور بکاهند. بنابراین این مواد می‌توانند به‌عنوان داروهای جدید با کاربردهای کلینیکی وسیع توسعه داده شوند. بتولین به‌طور معمول برای درمان در مرکز سرطان بین‌المللی (NCI) مورد استفاده قرار می‌گیرد (Yin *et al.*, 2013). به‌علاوه اینکه از بتولینیک اسید به‌صورت موفقیت‌آمیزی در فاز داروهای مرکز IIb (Infections and Immunoepidemiology Branch) برای درمان ایدز استفاده می‌گردد (Smith *et al.*, 2007). با وجود قابلیت بالای بتولینیک اسید میزان تولید آن در گیاهان طبیعی بسیار کم است که مانعی برای تجاری‌سازی آن می‌باشد، اگرچه پوست جنس توس منبع مهمی برای تولید بتولینیک اسید است ولی باز هم تولید به‌اندازه‌ای نیست که در سطح وسیع امکان عرضه به بازار وجود داشته باشد (Jäger *et al.*, 2009). بتولین به‌راحتی به بتولینیک اسید تبدیل می‌شود، ولی محصول بدست‌آمده از این فرایند بسیار کم، آلودگی زیاد و هزینه بالای تولید را به همراه خواهد داشت (Kim *et al.*, 1997). امکان تبدیل بتولین به بتولینیک اسید با روش‌های مختلف شیمیایی و زیستی بسیار کم است (Liu *et al.*, 2011). مهندسی متابولیت‌های ثانویه، کشت بافت و سلول، بررسی ژن‌های دخیل در تولید بتولین و بتولینیک اسید از راهکارهای افزایش تولید متابولیت‌های بسیار مهم و کارآمد می‌باشد. وجود این دو ماده با درصد کمتر در درختان دیگری مانند خانواده Ebenaceae (*Diospyros* ssp.) و Rhamnaceae (*Ziziphus* ssp.) نیز تأیید شده است اما گونه‌های مختلف جنس توس از لحاظ دارا بودن بتولین نسبت به سایر گیاهان بسیار غنی‌تر هستند. اگرچه ترکیب‌های شیمیایی گونه‌های توس مشابه می‌باشد، اما تفاوت‌های بسیاری در گونه‌های مختلف آن وجود دارد که می‌تواند متأثر از سن درخت و عوامل محیطی همانند اقلیم و خاک باشد (Laitinen *et al.*, 2004)، به این ترتیب احتمالاً میزان این متابولیت‌ها در گونه‌های موجود توس در ایران متفاوت از گونه‌های مشابه در سایر کشورها می‌باشد. دو گونه *B. litwinowii* و *B. pendula* در ایران زیستگاه بسیار محدود و زادآوری کمی دارند و در معرض خطر انقراض می‌باشند؛ به همین دلیل برداشت و قطع و به‌تبع آن استخراج ماده مؤثره آنها ممکن نیست. خواص دارویی منحصربه‌فرد موجود در آن باعث شده است محققان به سمت تولید این متابولیت‌ها در شرایط درون شیشه‌ای گرایش پیدا کنند. کشت سلول‌های جنس توس در شرایط درون شیشه‌ای، با هدف تولید تری‌ترپنوئیدها به‌ویژه بتولین و بتولینیک اسید در یک دهه اخیر توسط محققان مختلفی انجام و به زوایای مختلف آن پرداخته شده است (Fan *et al.*, 2010؛ Fan *et al.*, 2013؛ Jafari hajati *et al.*, 2016a؛ Jafari hajati *et al.*, 2016b). در این پژوهش علاوه بر ریزنمونه برگ، از ریزنمونه پوست که در طبیعت سرشار از بتولین است برای کالوس‌زایی استفاده شده است. استفاده از این ریزنمونه در کشت بافت بسیار بندرت انجام می‌شود؛ زیرا بافت خارجی پوست مرده بوده و جدا کردن بخش‌های زنده زیرین نیز به‌سختی امکان‌پذیر است، در عین حال عموماً کالوس‌دهی به‌راحتی سایر بافت‌ها انجام نمی‌شود، بنابراین منابع کمی قابل‌دسترس هستند. از این ریزنمونه برای جنین‌زایی سوماتیکی و تولید کالوس در *Aesculus hippocastanum* L. استفاده و وجود دو ماده مؤثره اسکیولین (esculin) و

www.SID.ir

Archive of SID

اسکیولیتین (esculetin) در کالوس‌های آن گزارش شده‌است (Gastaldo *et al*., 1996). استفاده از ریزنمونه پوست در گونه *Manihot esculenta* Crantz نیز با هدف کالزایی گزارش شده است که موفقیت کمتری نسبت به ریزنمونه برگ داشت (Fletcher *et al*., 2011). Zeping و همکاران (۲۰۱۵) از ریزنمونه پوست در کنار دو ریزنمونه برگ و ساقه که به‌طور معمول استفاده می‌شود در القاء کالوس *Populus euphratica* استفاده نمودند. نتایج آنان نشان‌دهنده موفقیت ۱۰۰٪ ریزنمونه ساقه در مقابل ۵۰٪ در ریزنمونه پوست بود. ضمناً زمان شروع کالوس‌دهی در ریزنمونه پوست نسبت به ریزنمونه‌های دیگر، دیرتر و میزان رشد آن نیز کمتر بود (Zeping *et al*., 2015).

هدف از انجام این تحقیق ایجاد کالوس (کالوس‌زایی) در محیط کشت WPM با ریزنمونه‌های برگ و پوست ساقه دو گونه *B. pendula* و *B. litwinowii* و مقایسه میزان بتولین و بتولینیک اسید موجود در پوست دو گونه در عرصه‌های طبیعی با میزان تولید شده در کالوس‌ها در شرایط درون شیشه‌ای بوده است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

ریزنمونه‌های پوست و برگ به‌صورت تصادفی از دو گونه *B. pendula* و *B. litwinowii* به‌ترتیب از دو رویشگاه سیاه‌مرز کوه استان گلستان و سنگده استان مازندران تهیه شدند. در این دو رویشگاه *B. pendula* به‌صورت پراکنده به همراه گونه غالب کچف و گونه *B. litwinowii* همراه گونه‌های درختی همانند کرمازو (*Quercus petraea* L)، اوری (*Quercus macranthera* Fisch.)، کرکف (*Acer platanoides* L.)، تل (*Acer hyrcanum* Fisch.) و تیس (*Sorbus aucuparia* Poir.) مشاهده می‌شود (Kordalivand, 2012). در پیش‌آزمون‌های مربوط به کالزایی پوست تنه و ساقه‌های مسن موفق نبودند و به‌همین دلیل از ساقه‌های جوان با قطر یک سانتی‌متر استفاده گردید.

مراحل سترون‌سازی نمونه‌ها

مراحل استریل پس از شستشو با مایع شوینده، خیس کردن یک‌ساعته در $4gr/l^{-1}$ قارچ‌کش بنومیل و بعد کلرید جیوه ۰/۱٪ به مدت ۷ دقیقه بوده است. نمونه‌ها سه بار با آب‌مقطر استریل (هر مرتبه ۵ دقیقه) آبکشی شدند.

کشت نمونه‌ها

قطعات پوست به طول یک سانتی‌متر برش و پوست بیرونی جدا و فقط از بخش سبز پوست درونی (vascular cambium) به همراه ریزنمونه برگ برای کشت کالوس استفاده شد. ریزنمونه‌ها در محیط کشت WPM حاوی هورمون BAP (غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر) و 2,4-D (غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر) در ۳ تکرار با حداقل ۱۰ ریزنمونه کشت داده شدند. نمونه‌ها در شرایط دمایی ۲۴ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۸-۱۶ ساعت (روشنایی و تاریکی) در اتاقک رشد قرار گرفتند و هر چهار هفته یک‌بار بازکشت گردیدند. نمونه‌ها بعد از دو هفته شروع به کالزایی نمودند. کالوس‌های سه ماهه از نظر میزان ماده مؤثره مورد ارزیابی قرار گرفتند.

ارزیابی ماده مؤثره نمونه‌های پوست طبیعی و کالوس‌های تولید شده

قطعات برگ و پوست ساقه طبیعی با قطر یک سانتی‌متر و همینطور کالوس‌های سه‌ماهه در آون با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد خشک و به‌ترتیب با اتانول ۹۵٪ مخصوص HPLC و متانول مخصوص HPLC (۱۰۰ میلی‌لیتر) مخلوط شدند. عصاره‌های غلیظ و یکنواخت حاصل ۶ دقیقه در دستگاه اولتراسوند و بعد ۲۴ ساعت بر روی شیکر و بعد با دور ۳۵۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. برای جداسازی فاز مایع، نمونه‌ها از صافی عبور داده شدند. برای تبخیر حلال اتانول، نمونه‌ها در دستگاه روتاری قرار گرفت. ۲۰ میکرولیتر از فاز سوپرناتانت پس از فیلتر (۰/۲ میکرومتر) به دستگاه

www.SID.ir

Archive of SID

HPLC (هیتاچی سری L-2450، ژاپن) تزریق شد. در آنالیز HPLC از ستون C-18 (۴/۶ × ۲۵۰ میلی‌متر)، فاز متحرک استونیتریل–آب دیونایز (۸۴:۱۶) طول‌موج ۲۱۰ نانومتر اشعه UV استفاده‌شده است. سرعت جریان یک میلی‌متر در دقیقه بوده و مقایسات با پیک‌های حاصل از محلول پایه استاندارد خالص بتولین و بتولینیک اسید (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) حل‌شده با متانول در دوزهای مختلف بوده است. پیک‌های مربوط به بتولین و بتولینیک اسید پس از گذشت ۲۵–۲۰ دقیقه ظاهر شدند. تشخیص پیک مربوط به هر نمونه در کروماتوگرام حاصل، با مقایسه زمان بازداری ظاهر شدن پیک بتولین و اسید بتولینیک خالص (استاندارد) تزریق‌شده با غلظت‌های مختلف و پیک‌های حاصل از عصاره‌های تزریقی انجام شد. میزان ماده مؤثره هر یک از نمونه‌ها، با اندازه‌گیری سطح زیر پیک مربوطه در زمان مورد نظر تعیین شد و با قرار دادن این سطح در رابطه بدست‌آمده از منحنی کالیبراسیون، میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بتولین و اسید بتولینیک در عصاره‌ها تخمین زده شد.

روش آماری و تجزیه‌وتحلیل داده‌ها

در تجزیه‌وتحلیل کالزایی از آزمایش t-test independent با ۳ تکرار و ۱۰ ریزنمونه در هر تکرار با استفاده از نرم‌افزار SPSS استفاده شد. برای آنالیز و تعیین سطح زیر پیک منحنی بتولین و بتولینیک اسید، از نرم‌افزار IZCO (ای زد کروم) استفاده شد و منحنی کالیبراسیون ترسیم گردید.

جدول ۱– تجزیه واریانس حاصل از فراوانی القاء کالوس، وزن تر و وزن خشک کالوس‌های ریزنمونه برگ و پوست گونه‌های *B. pendula* و *B. litwinowii*

منبع تغییرات	متغیرهای وابسته	درجه آزادی	میانگین اختلافات	اشتباه اختلافات	سطح معنی‌داری
گونه‌ها	فراوانی القاء کالوس	۱	۶۵/۳۳۳	۲/۳۵۶	۰/۱۶۳
	وزن تر کالوس	۱	۶۱۴/۲۸۵	۰/۲۸۶	۰/۶۰۷
	وزن خشک کالوس	۱	۱۷/۸۳۶	۱/۴۰۲	۰/۲۷۰
اکسپلنت	فراوانی القاء کالوس	۱	۳۸۸۸/۰۰	۱۴۰/۲۱۳	۰/۰۰۰
	وزن تر کالوس	۱	۲۷۸۵/۳۵۴	۱/۲۹۸	۰/۲۸۸
	وزن خشک کالوس	۱	۳۸۰/۲۵۰	۲۹/۸۹۶	۰/۰۰۱
گونه × اکسپلنت	فراوانی القاء کالوس	۱	۶/۷۵۰	۰/۲۴۳	۰/۶۳۵
	وزن تر کالوس	۱	۲۵۶۵۲/۳۸۰	۱۱/۹۵۶	۰/۰۰۹
	وزن خشک کالوس	۱	۱۷/۴۰۰	۱/۳۶۸	۰/۲۷۶
خطا	فراوانی القاء کالوس	۸	۲۷/۷۲۹		
	وزن تر کالوس	۸	۲۱۴۵/۶۳۴		
	وزن خشک کالوس	۸	۱۲/۷۱۹		
کل	فراوانی القاء کالوس	۱۲			
	وزن تر کالوس	۱۲			
	وزن خشک کالوس	۱۲			

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج

نتایج تجزیه واریانس فراوانی القاء کالوس، وزن تر و وزن خشک ریزنمونه‌های برگ و پوست دو گونه مختلف *B. pendula* و *B. litwinowii* در محیط کشت WPM در جدول ۱ ارائه شده است. بین دو گونه توس از نظر فراوانی القاء کالوس، وزن تر و خشک کالوس‌ها اختلاف معنی‌دار وجود نداشت. اما بین ریزنمونه‌های مورد بررسی در میزان کالزایی و همین طور وزن خشک کالوس اختلاف معنی‌دار در سطح ۱٪ دیده شد. به این ترتیب ریزنمونه پوستی با ۸۳/۴۱۷٪ فراوانی القاء کالوس و ۳۸/۵۷۷ میلی‌گرم وزن خشک ریزنمونه برتری نسبت به ریزنمونه برگ به‌ترتیب با ۴۷/۴۱۰٪ و ۱۳/۷۸۸ میلی‌گرم بود (جدول ۲). علاوه‌بر این، درصد آلودگی و قهوه‌ای شدن کشت‌های مربوط به این ریزنمونه، در هر دو گونه *B. pendula* و *B. litwinowii* بسیار کم بود (شکل ۱).

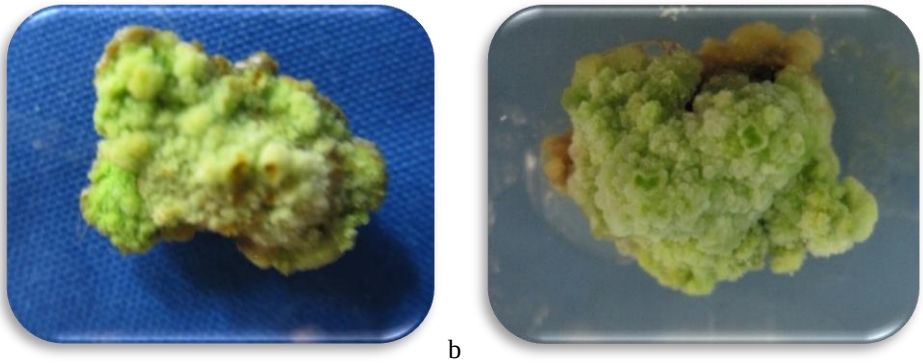
در ارزیابی اثر متقابل بین گونه‌های مختلف توس (*B. pendula* و *B. litwinowii*) با ریزنمونه‌های مختلف (برگ و پوست) فقط در وزن تر کالوس‌ها رابطه معنی‌داری وجود داشت که نتایج مقایسات مربوطه در جدول ۳ آورده شده است.

جدول ۲- نتایج مقایسه میانگین فراوانی القاء کالوس و وزن خشک آن تحت تأثیر ریزنمونه‌های برگ و پوست

اکسپلنت	فراوانی القاء کالوس (٪)	وزن خشک کالوس (گرم در میلی‌لیتر)
پوست	۸۳/۴۱۷	۳۸/۵۷۷
برگ	۴۷/۴۱۰	۱۳/۷۸۸

جدول ۳- اثر متقابل وزن تر کالوس ریزنمونه‌های برگ و پوست گونه‌های مورد مطالعه

گونه	اکسپلنت	وزن تر (گرم در میلی‌لیتر)
B. pendula	برگ	۲۳۵/۲۲ c
B. pendula	پوست	۳۵۸/۱۶۱ a
B. litwinowii	برگ	۳۴۲ a
B. litwinowii	پوست	۲۸۰ b



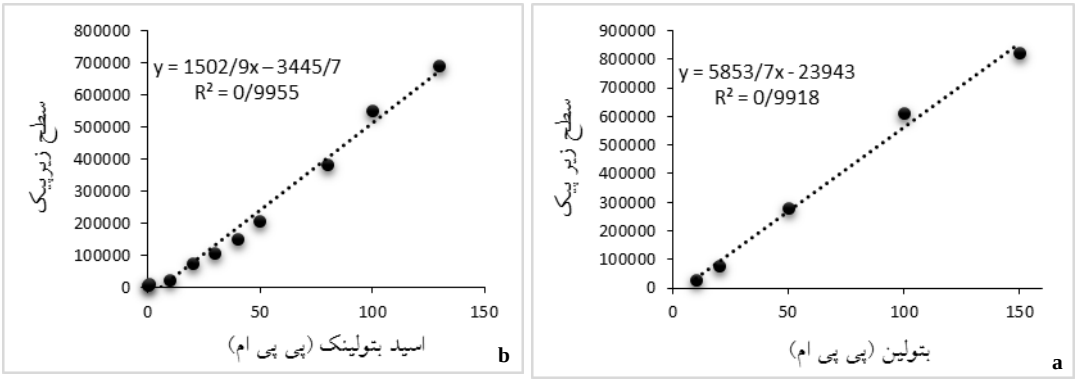
a b

شکل ۱- a: کالوس‌زایی ریزنمونه‌های پوست گونه ***B. litwinowii***، **b**: کالوس‌زایی ریزنمونه‌های پوست گونه ***B. pendula***

www.SID.ir

Archive of SID

براساس آنالیز، فرمول y=5853.7-23946 از منحنی کالیبراسیون بتولین و فرمول y=1502.9+3445.7 از منحنی کالیبراسیون اسید بتولینیک حاصل شد (شکل ۲).



شکل ۲- منحنی کالیبراسیون؛ a: بتولین، b: اسید بتولینیک

جدول ۴- نتایج تجزیه واریانس میزان بتولین و اسید بتولینیک گونه‌های *B. pendula* و *B. litwinowii* در in vitro و طبیعی

منبع تغییرات	متغیر وابسته	نوع سوم مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین اختلافات	خطای معیار اختلافات	سطح معنی‌داری
گونه‌ها	B	۰/۰۸۲	۱	۰/۰۸۲	۰/۹۶۰	۰/۳۴۲
	A.B	۰/۰۴۸	۱	۰/۰۴۸	۰/۴۷۵	۰/۵۰۱
اکسپلنت	B	۱۳۱/۵۷۸	۳	۴۳/۸۵۹	۵۱۴/۳۴۶	۰/۰۰۰
	A.B	۳۲/۵۸۰	۳	۱۰/۸۶۰	۱۰۶/۷۳۶	۰/۰۰۰
گونه × اکسپلنت	B	۰/۲۲۳	۳	۰/۰۷۴	۰/۸۷۱	۰/۴۷۶
	A.B	۰/۱۵۷	۳	۰/۰۵۲	۰/۵۱۵	۰/۶۷۸
اشتباه	B	۱/۳۶۴	۱۶	۰/۰۸۵		
	A.B	۱/۶۲۸	۱۶	۰/۱۰۲		
کل	B	۱۷۸/۲۵۹	۲۴			
	A.B	۴۶/۰۸۰	۲۴			

B: نشانگر بتولین و A.B: نشانگر اسید بتولینیک می‌باشد.

نتایج تجزیه واریانس میزان بتولین و اسید بتولینیک گونه‌های *B. pendula* و *B. litwinowii* در شرایط درون شیشه‌ای و محیط طبیعی در جدول ۴ نشان داده‌شده است. همانطور که مشخص است اثر اندام‌ها در میزان بتولین و اسید بتولینیک تولید شده معنی‌دار بوده و سایر عوامل مورد بررسی باعث اختلاف معنی‌دار نشده‌اند، ازاین‌رو در جدول

www.SID.ir

Archive of SID

۵، مقادیر مربوط به بتولین و اسید بتولینیک اندام‌های مختلف در شرایط درون شیشه‌ای و محیط طبیعی فارغ از گونه آورده شده است.

جدول ۵- مقایسه میانگین میزان بتولین و اسید بتولینیک حاصل‌شده از کالوس‌های سه‌ماهه رشد یافته در محیط WPM حاوی هورمون BAP (1mlg.l^{-1}) و 2,4-D (0.1 mlg.l^{-1}) و همین‌طور بافت پوست طبیعی

متابولیت ثانویه	اکسپلنت	درصد
B	کالوس حاصل از ریزنمونه برگ	۰/۰۱۰۵
B	کالوس حاصل از ریزنمونه پوست	۰/۰۱۹
B	برگ طبیعی	۰/۰۱
B	پوست طبیعی	۵/۴۲۵
B.A	کالوس حاصل از ریزنمونه برگ	۰/۰۲۱
B.A	کالوس حاصل از ریزنمونه پوست	۰/۰۵۲
B.A	برگ طبیعی	۰/۰۰۰۷
B.A	پوست طبیعی	۲/۷۱۵

B: نشانگر بتولین و BA: نشانگر اسید بتولینیک می‌باشد.

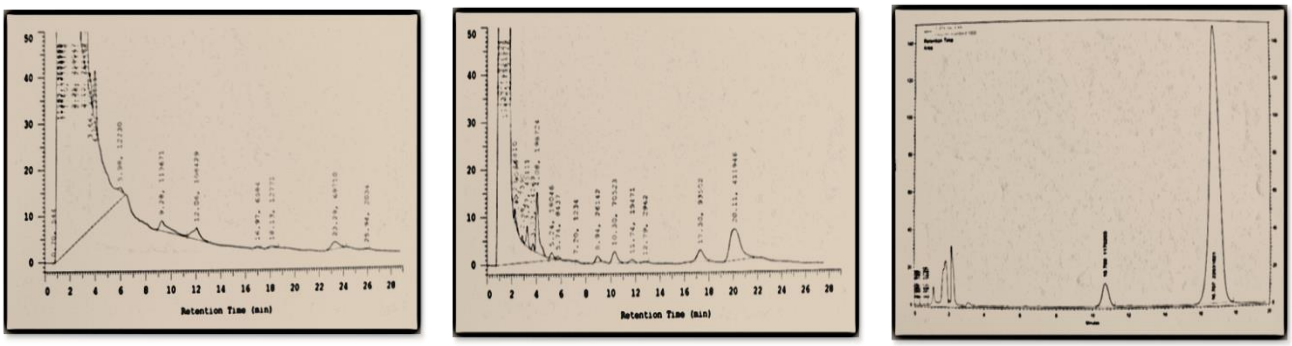
میزان بتولین و اسید بتولینیک در پوست طبیعی *B. pendula*، به‌ترتیب ۵/۲۲۷ و ۲/۹۰۹ درصد و در *B. litwinowii* به‌ترتیب ۵/۶۴۹ و ۲/۵۱۹ درصد می‌باشد. در کالوس حاصل از پوست *B. pendula* به‌ترتیب ۰/۰۲۲۶ و ۰/۰۵۲۵ درصد و در کالوس حاصل از پوست *B. litwinowii* به‌ترتیب ۰/۰۱۶۰ و ۰/۰۵۷ درصد می‌باشد. در هر ۱۰ گرم ماده خشک کالوس حاصل از پوست *B. pendula* که مقدار بالاتری را نشان داده است به‌ترتیب ۲/۲۵۹ و ۵/۲۵ میلی‌گرم بتولین و اسید بتولینیک وجود دارد. در شکل ۳ منحنی کروماتوگرام حاصل از تزریق استاندارد بتولین و اسید بتولینیک، پوست طبیعی *B. pendula* و عصاره کالوس حاصل از پوست *B. pendula* برای نمونه آورده شده است. در منحنی کروماتوگرام کالوس حاصل از محیط کشت WPM علاوه‌بر ظاهر شدن پیک بتولین و اسید بتولینیک، پیک‌های دیگری هم ظاهر شده است و این نشان‌دهنده وجود ترکیب‌های دیگری در کالوس‌ها می‌باشد که احتمالاً سایر ترپن‌ها هستند.

بحث

استخراج بتولین در کشورهای مختلف تولیدکننده از پوست درختان بالغ انجام می‌شود. قطع این درختان در ایران ممنوع است. ازاین‌رو استفاده از تکنیک کشت بافت گیاهی ابزاری مناسب برای تولید متابولیت‌های ثانویه و تکثیر در شرایط کنترل شده و مستقل از محیط و تولید انبوه در زمان کوتاه است. کشت سلول‌های جنس توس در شرایط in vitro، با هدف تولید تری‌ترپنوئیدهای ویژه بتولین و بتولینیک اسید در چند سال اخیر آغاز شده است. استفاده از ریزنمونه‌های جوانه و برگ جنس توس در کشت‌های سلولی معمول می‌باشد (Zaki *et al*., 2011؛ Fan *et al*., 2010) اما بر روی کالزایی ریزنمونه پوست ساقه تحقیقات محدودی انجام شده است.

www.SID.ir

Archive of SID



c b a

شکل ۳- کروماتوگرام حاصل از a: تزریق استاندارد (پیک بلندتر بتولین و پیک کوتاه‌تر اسید بتولینیک)، b: پوست طبیعی *B. pendula* و c: عصاره کالوس حاصل از پوست *B. pendula*

از آنجا که منبع اصلی تولید بتولین و بتولینیک اسید در پوست می‌باشد، استفاده از ریزنمونه پوست به‌منظور تولید این متابولیت‌ها نسبت به سایر ریزنمونه‌ها منطقی به نظر می‌رسد. کالوس‌زایی از ریزنمونه پوست دو گونه *B. pendula* و *B. litwinowii* به‌ترتیب ۸۱ و ۸۵ درصد بوده که در مقایسه با درصد کالوس‌زایی برگ این دو گونه به‌ترتیب ۴۴ و ۵۰ درصد به میزان قابل‌توجهی بالاتر است. وزن تر و خشک کالوس‌های حاصل از ریزنمونه پوست همچنین به‌طور معنی‌داری بالاتر از ریزنمونه برگ می‌باشد. در تحقیقات مربوط به کشت سلول و بافت استفاده از ریزنمونه پوست بندرت اتفاق می‌افتد، ولی در تحقیقی کالزایی از ریزنمونه پوست گردو (*Carya illinoensis*) گزارش شده است (Haroon, 2011). مقدار ماده مؤثره تولیدشده در کالوس‌های حاصل از پوست ساقه دو گونه مورد مطالعه کمتر از میزان آن در نمونه‌های طبیعی بود ولی نسبت به نمونه برگ و کالوس‌های حاصل از آن بیشتر بود. کالوس‌های حاصل از برگ، بتولین و بتولینیک اسید بیشتری نسبت به نمونه‌های طبیعی (برگ) داشتند. در کشت‌های درون شیشه‌ای میزان بتولینیک اسید نسبت به بتولین بالاتر بود. این ماده به علت حلالیت بیشتر نسبت به بتولین فعالیت بیولوژیکی بسیار بالاتری داشته (Pai & Joshi, 2014؛ Jäger *et al.*, 2009) و پرکاربردتر است. نتایج این تحقیق نشان داد در رویشگاه طبیعی میزان بتولین و بتولینیک اسید پوست ساقه یک سانتی‌متری در گونه *B. pendula* به‌ترتیب ۵/۲۲۷ و ۲/۹۰۹ درصد و در گونه *B. litwinowii* این مقادیر به‌ترتیب ۵/۶۴۹ و ۲/۵۱۹ درصد می‌باشد. بر این اساس میزان تولید ماده مؤثره قطرهای کم (یک سانتی‌متری) در عرصه طبیعی در هر دو گونه توس ایرانی در یک دامنه قرار گرفت و مقادیر تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند. Qi-he و همکاران (۲۰۰۹) میزان بتولین و بتولینیک اسید در پوست درختان بالای ۳۰ سال را به‌ترتیب ۲۳/۷ و ۳ درصد گزارش نمودند. به‌طور مشخص میزان این دو ماده مؤثره در قطرهای پایین و ساقه‌های جوان کمتر بوده و با افزایش سن و قطر درختان میزان این متابولیت‌ها افزایش می‌یابد. از سوی دیگر شرایط رویشگاهی بر میزان تولید بتولین و بتولینیک اسید تأثیر بسزایی دارد، به‌طوری که Holonce و همکاران (۲۰۱۲) درصد بتولین و بتولینیک اسید پوست گونه *B. pendula* را در رویشگاه خالص به‌ترتیب ۱۲/۶ و ۱/۲ درصد و در توده آمیخته به‌ترتیب ۸/۹ و ۱ درصد گزارش نمودند. احتمالاً آمیخته بودن هر دو رویشگاه سیاه مرزکوه و سنگده در مقدار ماده مؤثره اثرگذار است. القاء کالوس و تولید بتولین و بتولینیک اسید در ریزنمونه‌های پوست در دو گونه *B. pendula* و *B. litwinowii* پژوهشی بنیادی برای مطالعات آینده می‌باشد. بنابراین پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده به‌منظور افزایش میزان این دو تری‌ترپنوئید ارزشمند سن کالوس‌ها افزایش داده شود و از

www.SID.ir

Archive of SID

محرک‌های زیستی و غیر زیستی کارآمد به‌منظور افزایش این دو ماده مؤثره استفاده گردد.

منابع مورد استفاده

- Abyshev, A.Z., Agaev, E.M. and Guseinov, A.B., 2007. Studies of the chemical composition of birch bark extract (*Cortex betula*) from the Betulaceae family. Pharmaceutical Chemistry Journal, 41: 942-949.
- Aguirre, M.C., Delporteand, C. and Backhouse, N., 2006. Topical anti-inflammatory activity of 2 alpha-hydroxy pentacyclic triterpene acids from the leaves of *Ugni molinae*. Medicinal Chemistry, 14(16): 5673-5677.
- Demirci, B., Paper, D.H., Demirci, F., Hüsnü Can Baser, K. and Franz, G., 2004. Essential oil of *Betula pendula* Roth buds. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 1(3): 301-303.
- Falamas, A., Cınta, S. and Pınzaru, C.A., 2011. Betulin and its natural resource as potential anticancer drug candidate seen by FT-raman and FT-IR spectroscopy. Journal of Raman Spectroscopy, 42(1): 97-107.
- 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.
- 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.
- Fletcher, E.K.A., Amoako, T.N.E. and Peter Twumasi, P., 2011. Effect of 2,4-D, explants type and cultivar on the callogenesis expression of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) in Ghana. African Journal of Biotechnology, 10(46): 9396-9401.
- Gastaldo, P., Caviglia, M,A., Carli, S. and Profumo, P., 1996. Somatic embryogenesis and esculin formation in calli and embryoids from bark explants of *Aesculus hippocastanum* L. Plant Sciences, 119: 157-162.
- Haroon, A., 2011. Propagation of pecan (*Carya Illinoensis*) using in vitro techniques. Ph.D thesis, University of the Punjab, Lahore.
- Holonce, L., Ranga, F., Crainic, D., Truta, A. and Socaciu, C., 2012. Evaluation of betulin and betulinic acid content in birch bark from different forestry areas of western carpathians. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 40(2): 99-105.
- Huang, L., Lee, K.H. and Chen, C.H., 2006. Synthesis and anti-HIV activity of Bi-functional BA derivatives. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 14(7): 2279-2289.
- Jafari Hajati, R., Payamnoor, V., Ghasemi Bezdi, K. and Ahmadian Chashmi, N., 2016a. Production of pharmaceutical active ingredients via hairy root induction of Birch (*Betula pendula*). Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 24(2): 165-176.
- Jafari hajati, R., Payamnoor, V., Ghasemi Bezdi, K. and Ahmadian Chashmi, N., 2016b. 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 and developmental Biology-Plant 52(4), 400-407.
- Jäger, S., Trojan, H., Kopp, T., Laszczyk, M.N. 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.
- Kim, D., Chen, Z.D., Nguyen, V.T., Pezzuto, J.M., Qiu, S.X. and Lu, Z.Z., 1997. A concise semi-synthetic approach to betulinic acid from betulin. Synthetic Communications, 27: 1607-1612.
- Kordalivand, A., 2012. Genetic diversity of Birch based on morphology of leaf and fruit. Thesis submitted in partial fulfillment of a degree of M.Sc. in silviculture and forest ecology, Gorgan University of agricultural sciences and natural resources, 137p.
- Laitinen, M.L., Julkunen-Tiitto, R., Yamaji, K., Heinonen, J. and Rousi, M., 2004. Variation in birch bark secondary chemistry between and within clones: implications for herbivory by hares. OIKOS, 104(2): 316-326.
- 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.
- Pai, S.R. and Joshi, R.K., 2014. Distribution of betulinic acid in plant kingdom. Plant Science Today, 1(3): 103-107.
- Pisha, E., Chai, H., Lee, I.S., Chagwedera, T.E., Farnsworth, N.R., Cordell, A.C., Beecher, C.W.W., Fong, H.H.S., Kinghorn, A.D., Brown, D.M., Wani, M.C., Wall, M.E., Hieken, T.J., Das Gupta, T.K. and Pezzuto, J.M., 1995. Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that

www.SID.ir

Archive of SID

infection. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 51: 3574-3581.
- 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 betulin and oleanolic acid in the saplings of white birch (*Betula platyphylla* Suk). American Journal of Plant Sciences, 4: 7-15.
- Zaki, M., Sofi, M.S. and Kaloo, Z.A., 2011. A reproducible protocol for raising clonal plants from leaf segments excised from mature trees of *Betula utilis* a threatened tree species of Kashmir Himalayas. International Multidisciplinary Research Journal, 1(5): 7-13.
- Zeping, C., Xiao, J., Xianghong, T., Jinglong, J., Fang, L. and Wang, X., 2015. Direct and indirect in vitro plant regeneration and the effect of brassinolide on callus differentiation of *Populus euphratica* Oliv. South African Journal of Botany, 97: 143-148.

functions by induction of apoptosis. Nature Medicine, 1: 1046-1051.
- 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.
- Raal, A., Kanut, M. and Orav, A., 2010. Annual variation of yield and composition of the essential oil of common juniper (*Juniperus communis* L.) braches from Estonia. Baltic Forestry, 16: 50-56.
- 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

www.SID.ir

Archive of SID

Effects of explant type on callogenesis and the amount of betulin and betulinic acid produced under *in vitro* conditions in two birch species (*Betula* spp.)

V. Payamnoor[1*], J. Nazari[2] and R. Jafari Hajati[3]

1*- Corresponding author, Faculty of Forest Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran, E-mail: mnoori56@gmail.com
2- Ph.D. student, Faculty of Forest Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
3- Research Center for Clinical Trials of Traditional Medicine, Shahed University, Tehran, Iran

Received: January 2019 Revised: April 2019 Accepted: April 2019

Abstract

Betulin and betulinic acid are from the most important anticancer and anti-HIV metabolites, and the birch species (*Betula* spp.) bark is considered as the primary source of these metabolites. Due to the extinction of these tree species in Iran, it is necessary to replace the metabolites extraction from the birch bark with modern methods such as cell and tissue culture to produce the metabolites. The aim of this study was to determine the effect of explant type on the amount of betulin and betulinic acid produced in calli of two birch species *B. pendula* and *B. litwinowii* under *in vitro* conditions compared to the amount of metabolites extracted from the tree bark. Bark and leaf explants of two mentioned species were cultured in WPM medium containing 1 mg/L BAP and 0.1 mg/L 2,4-D for callogenesis. The amount of betulin and betulinic acid in three-month calli was measured using the HPLC technique and compared with the amount of these metabolites in one-centimeter stem bark samples taken from nature. The bark explant was more successful in callogenesis, and calli derived from this explant had more active ingredients. The amount of betulin and betulinic acid from the extract of bark sample taken from nature was respectively obtained to be 5.23 and 2.91 percent for *B. pendula*, and 5.65 and 2.52 percent for *B. litwinowii*. Moreover, calli derived from the bark explant of *B. pendula* and *B. litwinowii* contained 0.023 and 0.016 percent of betulin and 0.053 and 0.057 percent of betulinic acid, respectively. Generally, the results indicated that the bark explant was more capable of callogenesis and secondary metabolite induction than the leaf explant in both birch species under *in vitro* conditions.

Keywords: Betulin, betulinic acid, birch, bark explant, callogenesis.

www.SID.ir