

الیسیتورها و پیش ماده‌ها، یک استراتژی مؤثر در افزایش ماده ضدسرطانی بتولین در کشت کالوس‌های *Betula litwinowii*

نسترن مهری‌راد^۱، وحیده پیام‌نور^{۲*}، جمیله نظری^۳

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشکده علوم جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

۲- دانشیار دانشکده علوم جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

۳- دانش آموخته دکترا، دانشکده علوم جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

* صندوق پستی ۴۳۴۶۴-۴۹۱۸۹، گرگان، ایران

Payamnoor@gau.ac.ir

پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۰۲

دریافت: ۱۳۹۹/۰۷/۰۱

چکیده

بتولین تری تربینی از نوع لوپان پنج حلقه‌ای است که عمدتاً از گیاهان گونه *Betula* با اثرات بیولوژیکی متنوعی مانند خواص ضد HIV و ضد سرطانی به دست می‌آید. مطالعه حاضر با هدف افزایش تولید بتولین در کشت‌های کالوس *Betula litwinowii* تحت تأثیر غلظت‌ها و مدت زمان اعمال الیسیتورها و پیش ماده‌ها انجام شد. برگ‌های جمع‌آوری شده در فصل تابستان از رویشگاه سنگده، در محیط کشت WPM حاوی هورمون‌های 2,4-D و BAP کشت شدند. کالوس‌های چهارماهه در محیطی حاوی الیسیتورهایی چون اسید سالیسیلیک، کلروکولین کلراید و کلرید کبالت و پیش ماده‌هایی چون ساکارز، ویتامین و گلوکز بازکشت شدند. کالوس‌ها در محیط کشت‌های جدید پس از ۲، ۳ و ۴ هفته برداشت و وزن تر و خشک آن‌ها محاسبه شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها براساس آزمایش فاکتوریل دو عاملی (فاکتور اول الیسیتورها و پیش ماده‌ها هر کدام در ۴ سطح و فاکتور دوم زمان با ۳ سطح) در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی و ۳ تکرار با نرم‌افزار SPSS و مقایسه میانگین‌ها نیز با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۹۹ درصد انجام شد. نتایج نشان داد از بین الیسیتورها، استفاده از کلروکولین کلراید به مدت دو هفته و در غلظت ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر با افزایش بیش از ۳ برابری بتولین القایی نسبت به تیمار شاهد (۰/۰۶۸ میلی‌گرم بر گرم) بهترین بوده است. استفاده از پیش ماده ویتامین (ده برابر معمول WPM) در زمان سه هفته، باعث افزایش بیشترین بتولین القایی نسبت به شاهد (۰/۱ میلی‌گرم بر گرم) می‌شود. به‌طور کلی در پژوهش حاضر این تیمار به عنوان بهترین معرفی می‌شود.

کلید واژگان: بتولین، توس، کلروکولین کلراید، متابولیت‌های ثانویه، ویتامین‌ها

۱- مقدمه

بتولین با ترکیب (Lup-20(29)-ene-3 β ,28-diol) و فرمول شیمیایی $C_{30}H_{50}O_2$ از مشتقات لوپان و یک تری ترپنئید ارزشمند است و به میزان مناسبی در پوست درخت توس *B. Litwinowii* وجود دارد. خاصیت ضد توموری، ضد ویروسی و ضد باکتریایی از مهم ترین خواص بتولین می باشند [۱]. *B. litwinowii* برای اولین بار در ایران در منطقه سنگده استان مازندران حدود ده سال پیش گزارش شد [۲]. گونه های توس در ایران رو به انقراض بوده و امکان قطع و بهره برداری از آنها وجود ندارد [۳]؛ کاشت و پرورش این گونه نیز به دلیل مشکلات قارچ های همراه بذر [۴]، پوکی و عدم جوانه زنی بذور، به راحتی انجام نمی شود. همچنین، عدم موفقیت در ازدیاد رویشی این درخت از طریق قلمه ها به دلیل سخت ریشه زای بودن آنها [۵]. نیز مزید بر علت شده و اهمیت استفاده از روش های کشت سلولی را برای تولید ترکیبات ارزشمند این گیاه مشخص می کند. به طور کلی یکی از مزیت های کشت های درون شیشه ای، امکان افزایش میزان متابولیت های ثانویه توسط الیستورها و پیش ماده ها می باشد. الیستورها ترکیباتی با منشأ زیستی و یا غیر زیستی هستند که از طریق القای پاسخ های دفاعی باعث بیوستزی و انباشت متابولیت های ثانویه می شوند [۶] و بیشتر آنزیم های تجزیه کننده دیواره سلولی (پکتیناز و سلولاز) یا بخش هایی از دیواره سلولی میکروارگانیزم ها (کتین، گلوکان و گلیکوپروتئین) را شامل می باشند. همچنین، از برخی مواد شیمیایی غیر زیستی (اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات) می توان به عنوان الیستور استفاده کرد [۷ و ۸]. عوامل مختلفی مانند غلظت الیستور، سن محیط کشت، زمان افزودن الیستور به محیط کشت و مدت زمان در معرض قرارگیری محیط کشت با الیستور، بر افزایش تولید متابولیت های ثانویه در این شرایط تأثیر می گذارند [۹ و ۱۰]. گزارش هایی از اثرات مثبت برخی

الیستورها در تغییر میزان متابولیت های ثانویه کشت های درون شیشه ای وجود دارد. کلروکولین کلراید در *Taxus globosa* [۱۱] متیل جاسمونات و اسید سالیسیلیک در در کشت ریشه *Panax ginseng* [۱۲]، اسید سالیسیلیک در *T. baccata* [۱۳]، اسید سالیسیلیک، اسید جاسمونیک در گونه *Elaeagnus angustifolia L.* [۱۴] و کلرید کبالت در *Corylus Avellana L.* [۱۵] از جمله این موارد هستند. افزایش سنتز بتولین در کشت سوسپانسیون *B. pendula* بوسیله الیستورهای متیل جاسمونات و اسید سالیسیلیک [۱۶ و ۱۷] و همچنین در کشت ریشه موئین این گونه بوسیله کلروکولین کلراید و کیتوزان [۱۸] گزارش شده است. اعمال الیستور بر میزان ترکیبات مشتق شده از بتولین نیز باعث افزایش شده است. اولئانولیک اسید و اورسولیک اسید که از مشتقات بتولین هستند در کشت سوسپانسیون سلولی *Uncaria tomentosa* تحت تیمار جاسمونیک اسید [۱۹] و بتولینیک اسید در کشت سلولی *Glycyrrhiza glabra L.* به وسیله عصاره مخمر [۲۰] از جمله این موارد هستند. اضافه کردن پیش ماده ها نیز برای افزایش متابولیت های ثانویه در کشت سلول های گیاهی به طور غالب استفاده می شود و هر ترکیبی (ترکیب حد واسط) که در آغاز یک مسیر بیوستزی متابولیت های ثانویه قرار دارد می تواند برای افزایش عملکرد متابولیت به کار رود [۲۱]. استفاده از گلوکز و ساکارز میزان تولید برخی متابولیت های ثانویه را افزایش می دهد به عنوان مثال می توان از افزایش تولید تاکسول به وسیله ساکارز [۲۲] و اسید زمارینیک به وسیله گلوکز [۲۳] نام برد. در آزمایش دیگری با افزودن پیش ماده های مولونات و ان-بنزوییل گلاسیسین به کشت سوسپانسیون سلولی گیاه سرخدار میزان تولید تاکسول تا حدود ۳ برابر افزایش یافت [۲۴] به نقل از [۲۱]. هدف از انجام این پژوهش، بررسی امکان افزایش میزان بتولین در کالوس های *B. litwinowii* با استفاده از

۱۰ و ۱۵ برابر معمول موجود در محیط‌کشت WPM که شامل گلاسیسین، مایوانوزیتول، تیمین-HCl، پیریدوکسین-HCl، نیکوتینیک اسید است)، بازکشت شدند. کالوس‌ها در محیط‌کشت جدید حاوی الیستور و پیش ماده پس از ۲، ۳ و ۴ هفته برداشت شدند.

۴-۲- عصاره‌گیری از کالوس‌ها

برای عصاره‌گیری از کالوس‌ها، یک گرم وزن خشک در هاون چینی با ۱۰ سی‌سی متانول مخصوص HPLC مخلوط و کوبیده شد. سپس، نمونه‌ها به مدت ۶ دقیقه در داخل لوله فالتکون فویل پیچی شده در دستگاه التراسوند قرار داده شدند. نمونه‌ها روی شیکر مغناطیسی بدون حرارت به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند و با ۳۵۰۰ دور بر دقیقه به مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ شدند. محلول رویی (سوپرناتانت) در داخل ظروف تیره ریخته شد و سپس فیلتر شد. این محلول برای تزریق به دستگاه HPLC در مراحل بعدی، داخل لوله‌های کوچک (میکروتیوپ) در یخچال قرار گرفت.



شکل ۱ کالوس *B. litwinowii* بدون اعمال تیمار (شاهد)

الیستورهایی شامل اسید سالیسیلیک، کلروکولین کلراید و کلرید کبالت و پیش ماده‌ها شامل ساکارز، گلوکز و ویتامین است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱ منطقه نمونه‌برداری

نمونه‌برداری از برگ درختان بالغ بالای ۲۵ سال *B. litwinowii* واقع در منطقه سنگده استان مازندران، ایران، و در تابستان (تیر ماه) انجام شد.

۲-۲ مراحل سترون‌سازی و تولید کالوس

برگ‌ها با آب معمولی حاوی چند قطره مایع ظرف‌شویی به مدت سه تا چهار دقیقه شستشوی اولیه شدند و سپس ۴۵ دقیقه در ۴ میلی‌گرم بر لیتر قارچ‌کش بنومیل قرار گرفتند. پس از شستشو، برگ‌ها با کلرید جیوه یک دهم درصد به مدت پنج دقیقه ضدعفونی شدند و سپس سه بار با آب مقطر آبکشی شدند. ریزنمونه‌های گیاهی از برگ یک سانتی‌متری دارای رگبرگ بوده و در محیط‌کشت WPM^۱ به همراه ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و هورمون‌های 2,4-D و BAP به ترتیب در غلظت‌های یک‌دهم و یک میلی‌گرم بر لیتر [۲۵] کشت شدند. شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در نظر گرفته شد [۲۶]. عدد pH محلول در محدوده ۵/۷-۵/۸ تنظیم شد و برای ژله‌ای شدن محیط از ۸ گرم در لیتر آگار استفاده شد. در شکل ۱ کالوس بدون اعمال تیمار قابل مشاهده است.

۲-۳ اعمال الیستورها و پیش ماده‌ها

پس از گذشت ۴ ماه از کالزایی، کالوس‌ها در محیط‌کشت WPM به همراه الیستورهایی چون اسید سالیسیلیک (غلظت‌های ۵۰،۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر)، کلرید کبالت (۵۰،۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) و کلروکولین کلراید (۰،۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر) و پیش ماده‌هایی چون ساکارز (۰،۳۰، ۶۰ و ۹۰ گرم در لیتر)، گلوکز (۰،۰۶، ۸۰ و ۱۰۰ گرم در لیتر) و ویتامین (۰،۵،

¹ Woody plant medium

۲-۵ ارزیابی میزان بتولین

برای ارزیابی کمی بتولین، ابتدا محلول پایه استاندارد خالص بتولین تهیه شده از شرکت سیگما (با خلوص ۹۹ درصد) در متانول ۹۰ درصد مخصوص HPLC حل شد و از آن، محلول پایه غلظت‌های استاندارد در دوزهای مختلف تهیه و به دستگاه تزریق شد. منحنی کالیبراسیون خطی استاندارد با استفاده از سطوح زیر پیک به دست آمده رسم شد. سپس، عصاره تهیه شده از کالوس‌ها به دستگاه تزریق شد و با استفاده از سطح زیر پیک، منحنی کالیبراسیون مربوطه رسم شد [۱۶]. میزان بتولین هر یک از نمونه‌ها، با اندازه‌گیری سطح زیر پیک مربوطه در زمان موردنظر تعیین شد. با قرار دادن این سطح در معادله به دست آمده از منحنی کالیبراسیون، وزن بتولین در عصاره‌ها تخمین زده شد. پس از محاسبه میزان بتولین در بیست میکرولیتر عصاره تزریق شده به دستگاه، بتولین در گرم وزن خشک نمونه تهیه شده، تعیین شد.

۲-۶ تحلیل آماری

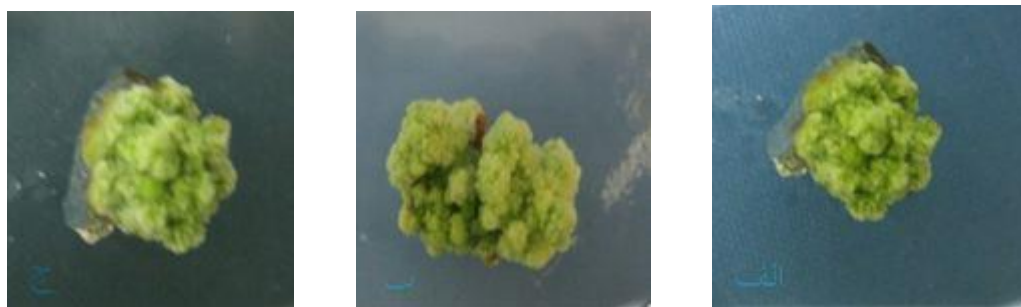
تجزیه و تحلیل داده‌ها بر اساس آزمایش فاکتوریل دو عاملی در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی و ۳ تکرار با نرم‌افزار SPSS انجام شد. در این مرحله، مقایسه میانگین‌ها نیز با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۹۹ درصد انجام شد. در این مطالعه، فاکتور اول ایستورها شامل اسید سالیسیلیک، کلروکولین کلراید و کلرید کبالت و پیش‌ماده‌ها شامل ساکارز، ویتامین و گلوکز هر کدام در ۴ سطح و فاکتور دوم زمان با سه سطح است.

۳- نتایج

نوع بافت و رنگ کالوس‌ها در اثر تیمارهای اعمال شده با هم تفاوت چندانی نداشتند. علیرغم یکنواختی نسبی بافت کالوس‌ها، سرعت رشد کالوس‌های تحت تأثیر گلوکز و ویتامین بیش از شاهد بود (شکل ۲ و ۳). بافت کالوس‌های رشد یافته با اعمال تیمار پیش ماده گلوکز، تردتر بوده و رنگ سبز تیره‌تری پیدا کردند.



شکل ۲ بافت و رنگ کالوس‌ها تحت تأثیر پیش ماده گلوکز با غلظت الف: ۱-۶۰ g، ب: ۱-۸۰ g، ج: ۱-۱۰۰ g



شکل ۳ بافت و رنگ کالوس‌ها تحت تأثیر پیش ماده ویتامین در غلظت‌های الف: ۵ برابر، ب: ۱۰ برابر، ج: ۱۵ برابر

کالوس‌ها در زمان‌های مختلف به روش آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد در شکل ۴ ارائه شده است. داده‌ها در سه گروه متفاوت قرار گرفتند. طبق نتایج حاصل شده، زمان دو هفته بهترین زمان برای اعمال تیمار می‌باشد.

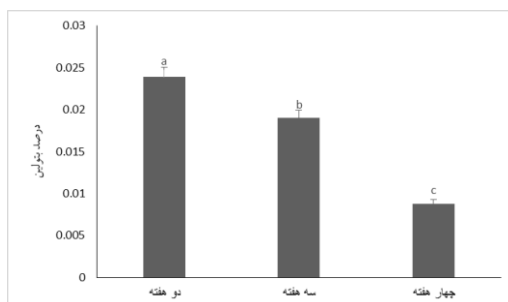
نتایج تجزیه واریانس حاصل از بررسی تأثیر الیستورها و پیش ماده‌ها در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف قرار گرفتن کالوس‌های *B. litwinowii* در جدول ۱ ارائه شده است که این نتایج اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد دارند. نتایج حاصل از مقایسه میانگین بتولین‌ها در

جدول ۱ تجزیه واریانس حاصل از بررسی تأثیر تیمارها (الیستورها و پیش ماده‌ها)، غلظت‌ها و زمان‌های اعمال شده بر میزان بتولین در

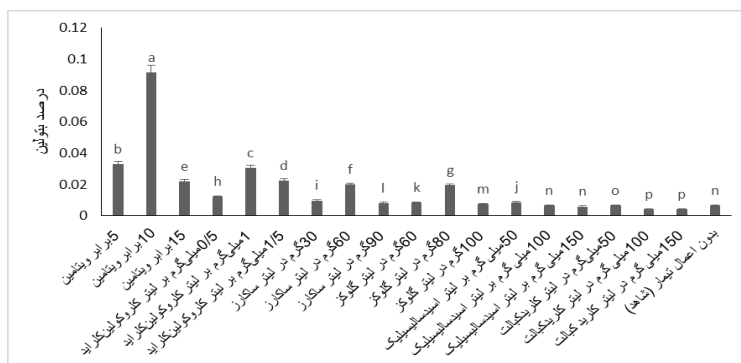
کالوس *B. litwinowii*

منبع تغییرات (S.O.V)	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات (MS)	مقدار F	سطح معنی‌داری
تیمارها و غلظت‌ها	۱۸	۰/۰۰۴	۵۸۵۶۵/۰۶	۰/۰۰۰***
زمان	۲	۰/۰۰۳	۵۵۰۳۷/۰۹	۰/۰۰۰***
تیمارها و غلظت‌ها × زمان‌ها	۳۶	۰/۰۰۱	۹۱۳۳/۳۳	۰/۰۰۰***
اشتباه	۱۱۴	۶/۱۷۸	-	-
کل	۱۷۰	-	-	-

* * اختلاف معنی‌دار در سطح خطای یک درصد



شکل ۴ مقایسه میانگین زمان اعمال تیمار بر میزان بتولین‌ها در کالوس‌های *B. litwinowii*



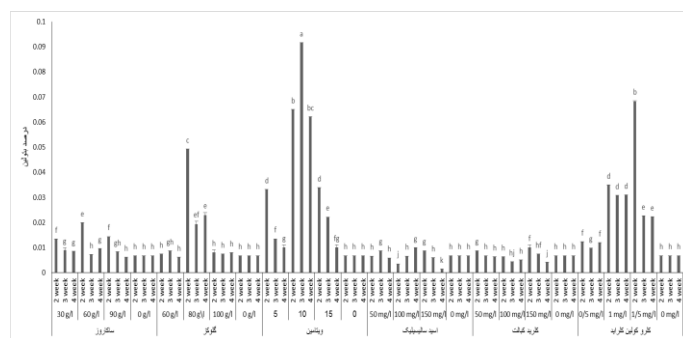
شکل ۵ مقایسه میانگین بتولین‌ها در تیمارها و غلظت‌های مختلف در کالوس‌های *B. litwinowii*

و ۳ زمان برداشت باعث افزایش سنتز بتولین در بافت کالوس نسبت به شاهد شده است. با این حال، میزان بتولین در زمان دوم (سه هفته) و با تیمار ویتامین ۱۰ برابر، بیشترین میزان را داشت. میزان بتولین القا شده با محرک شیمیایی اسید سالیسیلیک در غلظت و زمان‌های مختلف تیمار شده یکسان بوده و در برخی از غلظت‌ها نسبت به شاهد القاء بتولین بیشتری داشت. الیستور کلرید کبالت نتوانست میزان سنتز بتولین بافت کالوس را افزایش دهد. اعمال دو هفته‌ای کلروکولین کلراید در غلظت ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر بیشترین میزان بتولین را در این تیمار القاء کرد. در این تیمار الیستوری میزان ماده مؤثره هم‌ه‌ی غلظت‌های اعمال‌شده بیشتر از تیمار شاهد بود.

۴- بحث و نتیجه‌گیری

گیاهان به‌عنوان منبع مهمی برای تولید داروها، نقش کلیدی در سلامت مردم جهان دارند و بسیاری از مواد دارویی با ارزش جزو متابولیت‌های ثانویه گیاهان هستند. در مواردی که تکثیر گیاه با مشکل مواجه است و از سویی دیگر سنتز ماده مؤثره نیز به‌آسانی انجام نمی‌شود و یا به لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه نیست کشت‌های سلولی به‌عنوان یک راه‌حل جایگزین معرفی می‌شود.

مقایسه میانگین میزان بتولین القایی پس از اعمال الیستورها و پیش ماده‌ها در غلظت‌های مختلف به روش آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد در شکل ۵ ارائه شده است. طبق نتایج، اعمال ۱۰ برابر ویتامین به‌عنوان پیش ماده، باعث بیشترین میزان بتولین القایی (بیش از ۱۳ برابر نسبت به تیمار شاهد) شده است. به‌طور کلی، به جز کلرید کبالت و سالیسیلیک اسید، سایر تیمارهای اعمال شده نسبت به شاهد باعث افزایش میزان بتولین شدند. مقایسه میانگین میزان بتولین القایی پس از اعمال الیستورها و پیش ماده‌ها در غلظت و زمان‌های مختلف به روش آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد در شکل ۶ ارائه شده است. بر اساس نتایج بالاترین میزان بتولین القا شده بعد از استفاده از ساکارز به عنوان پیش ماده دو هفته پس از اعمال تیمار و در غلظت ۶۰ گرم در لیتر حاصل شد. کارایی این پیش ماده در اکثر غلظت‌های اعمال‌شده و در هر سه زمان برداشت، بیشتر از تیمار شاهد بود. در همه‌ی کشت‌های تحت تأثیر پیش ماده گلوکز، مقدار بتولین القایی بیشتر از شاهد بود. بیشترین میزان بتولین زمانی حاصل شد که نمونه‌ها به مدت ۲ هفته در غلظت ۸۰ گرم در لیتر این تیمار قرار داشتند. تیمار ویتامین اعمال‌شده در هر ۳ غلظت



شکل ۶ مقایسه میانگین اثر متقابل تیمارها، غلظت‌ها و زمان‌های مختلف بر بتولین القاء شده در کالوس‌های *B. litwinowii*

مؤثره به دلیل عدم تأثیرپذیری از شرایط محیطی و همین‌طور هزینه مناسب در تولید انبوه از دیگر مزایای این

تولید در محیطی کنترل‌شده و عاری از انواع آلاینده‌ها، قارچ‌ها و میکروب‌ها و همین‌طور یکنواختی میزان ماده

نوع کشت می‌باشد. مضاف بر اینکه امکان بهینه‌سازی و افزایش میزان ماده مؤثره با استفاده از انواع الیستورها، پیش ماده‌ها و نانومواد فراهم است. پژوهش حاضر نیز با هدف افزایش مقدار ماده مؤثره بتولین با خاصیت ضد توموری انجام شد. اکثر الیستورها و پیش ماده‌های آزمون شده در این پژوهش نسبت به شاهد، بتولین بیشتری القا کردند. اضافه کردن پیش ماده‌ها برای افزایش متابولیت‌های ثانویه در کشت سلول‌های گیاهی به‌طور غالب استفاده می‌شود [۲۱]، با افزایش منبع کربن پتانسیل نفوذی غشای سلولی کم شده و سبب تولید متابولیت ثانویه می‌شود [۲۷]. طبق نتایج پژوهش حاضر از بین غلظت‌های مختلف ساکارز، غلظت ۶۰ گرم در لیتر به‌عنوان بهترین غلظت شناخته شد. ساکارز در تحقیقات دیگری نیز مؤثر اعلام شده است [۲۲ و ۲۳]، اما غلظت بهینه متفاوت بوده است. از بین غلظت‌های مختلف گلوکز، غلظت ۸۰ گرم در لیتر به‌عنوان غلظت برتر شناخته شد. این نتایج را می‌توان با اثر مثبت فشار اسمزی ایجادشده توسط ساکارز و یا ارزش غذایی آن مرتبط دانست. گزارش شده است که کربوهیدرات‌های محیط کشت، می‌تواند بیان تعداد قابل توجهی ژن، به‌ویژه ژن‌های مرتبط با آنزیم‌های بیوسنتز کننده و استفاده از ذخایر غذایی را تنظیم و از این طریق، بر تولید متابولیت‌های ثانویه اثرگذار باشند. همچنین، پتانسیل اسمزی ایجادشده به‌وسیله کربوهیدرات به تنهایی یا همراه سایر عوامل اسموتیک، می‌تواند تولید ترکیبات ثانویه را تا غلظت و مدت‌زمان خاصی تحت تأثیر قرار دهد [۲۸]. هر سه غلظت ویتامین موجب افزایش میزان بتولین نسبت به تیمار شاهد شد، اما غلظت ۱۰ برابری ویتامین، بیشترین اثر را داشت؛ به‌نحوی که باعث القای ۰/۱ میلی‌گرم بر گرم بتولین در زمان برداشت دو هفته شد. این تیمار حتی در زمان برداشت‌های بعدی (دوم و سوم) نیز نسبت به شاهد اختلاف چشمگیری دارد. استفاده از محرک‌های زیستی گاهی شرایط تنش را برای گیاه فراهم

می‌آورند. پیش ماده‌های بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه، از متابولیت‌های اولیه منشأ می‌گیرند، لذا تحت شرایط تنش شدید، متابولیسم اولیه به سمت متابولیسم ثانویه تغییر می‌یابد؛ منابع ضروری رشد به سمت دفاع تغییر مسیر داده و تا حد زنده‌مانی سلول، متابولیت ثانویه تولید می‌نمایند [۲۹]، لذا غلظت الیستور و مدت‌زمانی که سلول‌ها در معرض الیستور قرار می‌گیرند نقش مهمی در فرایند تحریک داشته و عامل مؤثری بر شدت پاسخ و میزان تولید متابولیت‌های ثانویه هستند [۳۰]. مجاورت الیستور در محیط کشت برای القای ماده مؤثره در محدوده زمانی خاصی تأثیرگذاری ویژه دارد به‌طوری که بالاترین افزایش ماده مؤثره بتولین نسبت به شاهد پس از استفاده از پیش ماده‌های گلوکز و ساکارز دو هفته و برای ویتامین پس از سه هفته قرارگیری در معرض پیش ماده حاصل شده است. در میان الیستورهای مورد استفاده، افزایش بتولین القایی نسبتاً خوبی توسط کلروکولین کلراید دیده شد؛ محققین دیگری نیز بهبود میزان ماده مؤثره توسط این الیستور را گزارش کرده‌اند [۱۱، ۱۷، ۱۸]. در این پژوهش از بین غلظت‌های مختلف اسیدسالیسیلیک، غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر بیشترین میزان بتولین تولیدی را به همراه داشت و غلظت‌های بالاتر آن موجب کاهش تولید بتولین نسبت به تیمار شاهد شدند. اسید سالیسیلیک در غلظت‌های بالاتر وضعیت اکسایشی گیاه را بیش‌ازحد توان گیاه تحت تأثیر قرار می‌دهد و درنهایت منجر به مرگ گیاه می‌شود این الیستور رشد سلولی و زنده‌مانی سلول‌های گیاهی تحت تیمار را نسبت به شاهد کاهش داده و با فعال‌سازی سیستم دفاعی گیاهان تولید متابولیت ثانویه را افزایش می‌دهد [۳۱]. غلظت بهینه این الیستور برای گونه‌های مختلف، متفاوت گزارش شده است [۱۴ و ۳۲]؛ اما غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر به‌عنوان بهینه‌ترین تیمار در گزارش‌های دیگری نیز [۱۳ و ۳۳] معرفی شده است. ترکیباتی مانند سالیسیلیک اسید از جمله

[4] Nazari, J., Payamnoor, V. and Kavousi, M.R., 2013. Seed born fungi associated with birch trees in Northern forests of Iran. *Iranian Journal of Range and protection research*, 10 (2):165-168.

[5] Häggman H., Sutela S., Welander M., (2007) Micropropagation of *Betula Pendula* Roth including Genetically modified Material. In: Jain S.M., Häggman H. (eds) *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits*. Springer, Dordrecht. Pp: 153-162.

[6] Zhao, J., Davis, LC and Verpoorte, R., 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 23(4): 283-333.

[7] Andrea, V. and Ricardo, B., 2007. Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. *Plant Science*, 172:861-875.

[8] Asghari, GH., Mostajeran, A., sadeghi aliabadi, H., and Nakhaei, A., 2011. Effect of salicylic Acid and Silver Nitrate on Taxol production of *Taxus baccata*. *Journal of Medicinal Plants*, 11(8): 74-82.

[9] Vasconsuelo, A., and Boland, R., 2007. Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. *Plant Science*, 172: 861-875.

[10] Esmaeil zadeh Bahabadi, S. and Sharifi, M., 2013. Increase secondary metabolite production plants using biological Elicitors. *Journal of cells and tissues*, 4 (2): 119-128.

[11] Barrios, H., Zhang, Y.L., Sandoval, C., and Xiao, Z.A., 2009. Increase of Taxol Production in *Taxus globosa* Shoot Callus by Chlorocholine Chloride. *Natural Products Journal*, 2: 33-37.

[12] Ali, M.B., Yu, K.W., Hahn, E.J. and Paek, K.Y. 2006. Methyl jasmonate and salicylic acid elicitation induces ginsenosides accumulation, enzymatic and non-enzymatic antioxidantin suspension culture *Panax ginseng* roots in bioreactors. *Plant Cell Report*, 25:613-620.

[13] Rezaei, A., Ghanati, F., and Amini Dehaghi, M., 2013. Salicylic acid-Induced physiological effects and Taxol production in cell culture of *Taxus baccata* L. National Congress on Medicinal Plants, Kish Island, Iran.

[14] Badrhadad, A., Piri, K.H., and Ghiasvand, T., 2013. Increasing of alpha-tocopherol in cell suspension cultures (*Elaeagnus angustifolia* L.). *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 5(12): 1328-1331.

[15] Rezaei, A., Ghanati, F., and Jamshidi, M., 2013. Cobalt induced Taxol production and release by cell culture of Hazel (*Corylus avellana* L.). National Congress on Medicinal Plants, Kish Island, Iran.

[16] Jafari hajati, R., Payamnoor, V., Ghasemi bezdi, k. and Ahmadian Chashmi, N., 2016. Effects

مولکول‌های مؤثر در مسیر علامت‌رسانی تنش‌ها هستند و به‌طور گسترده‌ای مطالعه شده‌اند. نقش سالیسیلیک اسید در مقاومت گیاه نسبت به پاتوژن‌ها و سایر عوامل تنش‌زا به خوبی شناخته شده است. اخیراً نقش سالیسیلیک اسید به‌عنوان یک ترکیب پیام‌رسان در فعال کردن پاسخ‌های دفاعی گیاهان پررنگ‌تر شده و همچنین گزارش شده است که باعث افزایش تولید آلکالوئیدها در کشت‌های تعلیقی ریشه‌های تراریخته می‌شود [۳۴]. غلظت مؤثر الیسیتور برحسب گونه گیاهی متفاوت است، به‌طوری که ممکن است غلظتی از الیسیتور در یک گیاه اثر داشته باشد اما در گیاه دیگر اثری نداشته باشد [۳۰]. کلرید کبالت تأثیری برافزایش میزان سنتز بتولین بافت کالوس نداشت. اگرچه نقش مثبت این الیسیتور در سایر مطالعات گزارش شده بود [۱۵ و ۳۵]. به‌این‌ترتیب از بین الیسیتورهای مورد استفاده، اعمال دو هفته‌ای کلروکولین کلراید با غلظت ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر نیز باعث ۳/۳ برابری بتولین القایی نسبت به شاهد (۰/۰۶۸ میلی‌گرم بر گرم) می‌شود. برای افزایش مقدار بتولین القایی در کالوس‌های حاصل از ریزنمونه برگ گونه *Betula litwinowii* استفاده از میزان ده برابری ویتامین محیط‌کشت WPM به مدت سه هفته، باعث افزایش ده برابری بتولین القایی (۰/۱ میلی‌گرم بر گرم) نسبت به شاهد می‌شود. به‌طور کلی این پیش‌ماده به‌عنوان بهترین تیمار مورد بررسی، معرفی می‌شود.

۵- منابع

[1] Krasutsky, P.A., 2006. Birch bark research and development. *Natural Product Research*, 23:919-942.

[2] Zare, H., Akarinia, M., Hosseini, SM., Ejtahadi, H and Amini Eshkevari, T., 2010. A new Record of *Betula Litwinowii* (Betulaceae) and a review of the geographical distribution of genus *Betula* in Iran. *Iranian journal of botany*, 16:237-241.

[3] Jalili, A., and Arzani, H., 1999. A preliminary survey of endemic, rare and endangered plant species in Iran (red data book of Iran). Research institute of forests and rangelands, Tehran, Iran, 764p.

Wood Products, 70 (2): 199-207.

[26] Mehrirad, N., Payamnoor, V. and Naari, J. 2015. Effect of trees age and light on *Betula litwinowii* callogenesis and botulin induced in vitro conditions. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 23 (1): 93-102.

[27] Van Ket, N., Thi Lan Anh, T., and Hoang Uyen Dung, N., 2012. Effecting of Sucrose Concentrations and Inoculum density on adventitious root growth in cell suspension culture of *Panax vietnamensis* and initially growth in a Bioreactor. Southeast-Asian Journal of Sciences: 1 (2): 215-222.

[28] Prakrash, G. and Srivastava, AK. 2005. Statistical media optimization for cell growth and azadirachtin production in *Azadirachta indica* suspension cultures. Process Biotech, 40: 3795.

[29] Iriti M, and Faoro F., 2009. Chemical diversity and defence metabolism: How Plants cope with pathogens and ozone pollution. International Journal of Molecular Sciences, 10: 3371-3399.

[30] Khosroushahi, A., Valizadeh, M., Ghasempour, M., Naghdibadi, H., 2005. Improved Taxol production by combination of inducing factors in suspension cell culture of *Taxus baccata*. Cell Biology International, 30: 262-269.

[31] Kovacik, J., Backor, M., Strnad, M., and Repcak, M., 2009. Salicylic acid-induced changes to growth and phenolic metabolism in *Matricaria chamomilla* plants. Plant Cell Report, 28:135-143.

[32] Hashim, K., Al-oubaidi, M., and Aseel salih, M.A., 2014. Increasing secondary metabolites of *Calendula officinalis* L. using salicylic acid in vitro. World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 3(5): 1146-1155.

[33] Mehrabani, B., Nazeri, S., and Piri, K., 2012. Evaluation of total produced phenol in Chaei Koochi (*Stachys lavandulifolia* Vahi) callus culture and possibility of its enhancement using Elicitors, Journal Biotechnology Agriculture, 2(4): 77-88.

[34] Alvarez, P.S., Spollansky, T.C. and Giulietti A.M. 2000. The influence of different biotic and abiotic elisitors on the production and profile of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmensia candida*. Enzyme and Microbial Technology, 26:254-258.

[35] Cai, ZH. Kastel, A., Speiser, C., and Smetanska, I., 2013. Enhanced Resveratrol Production in *Vitis vinifera* Cell Suspension Cultures by Heavy Metals without Loss of Cell Viability. Applied Biochemistry and Biotechnology, 11p.

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.

[17] Jafari hajati, R., Payamnoor, V., Ahmadian Chashmi, N. and Ghasemi bezdi, k., 2018. Improved accumulation of betulin and betulinic acid in cell suspension culture of *Betula pendula* roth by abiotic and biotic elicitors, Preparative Biochemistry and Biotechnology, DOI: 10.1080/10826068.2018.1514514.

[18] Jafari hajati, R., Payamnoor, V., Ahmadian Chashmi, N., 2019. Effect of biotic and abiotic elicitors on production of betulin and betulinic acid in the hairy root culture of *Betula pendula* Roth, Preparative Biochemistry and Biotechnology, DOI: 10.1080/10826068.2019.1650372

[19] Feria Romero, I., Lazo, E., Ponce Noyola, T., Cerda Garcia Rojas C.M. and Ramos Valdivia, A.C. 2005. Induced accumulation of oleanolic acid and ursolic acid in cell suspension cultures of *Uncaria tomentosa*. Biotechnolgy Letters, 27:839-43.

[20] Hayashi, H., Hiraoka, N. and Ikeshiro, Y. 2005. Differential regulation of soyasaponin and betulinic acid production by yeast extract in cultured licorice cells. Plant Biotechnology, 22(3):241-244.

[21] Habibi Khaniani B, Moieni A, Abdollahi M. 2005. Production of secondary metabolites and pharmaceutical constituents through tissue and cell culture. J. Med. Plants.; 4 (14) :1-6. URL: <http://jmp.ir/article-1-703-fa.html>

[22] Ghorbanly, M., and Delavar, K., 2001. Effect of the Type and Concentration of sugars on Taxol Content in Callus Culture of *Taxus Baccata* L. Iranian Journal of Agriculture Science, 32(3): 575-583.

[23] Hasan poor, H., Bernard, F., and Shaker, H., 2007. Optimizing callus culture in *Zataria multiflora* Boiss for rosmarinic acid production. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 15: 1-9.

[24] Cusido R M, Palazon J, Bonfill M, Naviaosorio A, Morales C, Pinol M T. 2002. Improved paclitaxel and baccatin III production in suspension cultures of *Taxus media*. Biotechnol. Prog, 18: 418-423.

[25] Nazari, J. Payamnoor, V. Aliadeh, M. GHaseemi edi, K. 2017. Micropropagation of birch (*Betula litwinowii*) from leaf callus. Forest and

Elicitors and precursors, an effective strategy for increasing betulin an anticancer agent in *Betula litwinowii* callus cultures

Nastaran Mehrirad¹, Vahide Payamnoor^{2*}, Jamile Nazari³

1. Msc. Graduated, Faculty of Forest Sciences, Gorgan University of Agriculture Sciences and Natural Resources
2. *Assoc. Prof., Faculty of Forest Sciences, Gorgan University of Agriculture Sciences and Natural Resources
3. Phd. Graduated, Faculty of Forest Sciences, Gorgan University of Agriculture Sciences and Natural Resources

Payamnoor@gau.ac.ir

Receipt: 2020/09/22

Accepted: 2022/01/22

Abstract

Betulin is a pentacyclic lupane-type triterpene, mainly obtained from *Betula* species plants with a variety of biological actions such as anti-HIV and anticancer properties. This study aimed to enhance the production of betulin in cultures of *Betula litwinowii* calli under the influence of concentrations and duration time of elicitors and precursors. Collected leaves from Sangdeh habitat in summer, were cultured in WPM medium containing 2, 4-D and BAP hormones. Four months calli were sub-cultured in medium containing elicitors such as salicylic acid, chlorocholine chloride and cobalt chloride and precursors such as sucrose, vitamin and glucose. Calli were harvested from new culture media after two, three and four weeks and their wet and dry weights were calculated. Data analysis was performed based on two-factor factorial experiment (the first factor, elicitors and precursors each in four levels and the second factor, time with three levels) in a completely randomized design with three replications with SPSS software. Duncan's multiple range test was performed to compare the mean ($p \leq 0.01$). The results showed that two-week elicitation with chlorocholine chloride (1.5 mg/l for one week) was the best with a more than 3-fold increases in betulin induction compared to the control treatment (0.068 mg/g). The use of vitamin precursor (tenfold the normal amount in WPM culture medium) for three weeks causes the highest increase in betulin induction compared to the control (0.1 mg/g, respectively). In general, in the present study, this treatment is introduced as the best.

Keywords: betulin, birch, chloro-choline chloride, vitamins