زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس

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 ٤٣٤٦٤-٤٩١٨٩، گرگان، ایران

Payamnoor@gau.ac.ir

دریافت: ۱۳۹۹/۰۷/۰۱ پذیرش: ۱٤۰۰/۱۱/۰۲

چکیده

بتولین تری ترپنی از نوع لوپان پنج حلقه‌ای است که عمدتاً از گیاهان گونه Betula با اثرات بیولوژیکی متنوعی مانند خواص ضد HIV و ضد سرطانی به‌دست 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 محیط‌کشت 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 محیط‌کشت‌های جدید پس از ۲، ۳ و ٤ هفته برداشت و وزن تر و خشک آن‌ها محاسبه شد. تجزیه‌وتحلیل داده‌ها براساس آزمایش فاکتوریل دوعاملی (فاکتور اول الیسیتورها و پیش ماده‌ها هرکدام در ٤ 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 (۰/۰٦۸ 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. به‌طورکلی در پژوهش حاضر این تیمار به عنوان بهترین معرفی می‌شود.

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

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-08-25]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.13.3.1.8]

۱- مقدمه

بتولین با ترکیب (Lup -20(29)-ene-3ß,28-diol) و فرمول شیمیایی $C_{30}H_{50}O_2$ از مشتقات لوپان و یک تری‌ترپنوئید ارزشمند است و به میزان مناسبی در پوست درخت توس *B. Litwinowii* وجود دارد. خاصیت ضد توموری، ضد ویروسی و ضد باکتریایی از مهم‌ترین خواص بتولین می‌باشند[۱]. *B. litwinowii* برای اولین بار درایران در منطقه سنگده استان مازندران حدود ده سال پیش گزارش شد [۲]. گونه‌های توس در ایران رو به انقراض بوده و امکان قطع و بهره‌برداری از آنها وجود ندارد [۳]؛ کاشت و پرورش این‌گونه نیز به دلیل مشکلات قارچ‌های همراه بذر[٤]، پوکی و عدم جوانه‌زنی بذور، به‌راحتی انجام نمی‌شود. همچنین، عدم موفقیت در ازدیاد رویشی این درخت از طریق قلمه‌ها به‌دلیل سخت ریشه‌زا بودن آن‌ها [٥]. نیز مزید بر علت شده و اهمیت استفاده از روش‌های کشت سلولی را برای تولید ترکیبات ارزشمند این گیاه مشخص می‌کند. به‌طورکلی یکی از مزیت‌های کشت‌های درون شیشه‌ای، امکان افزایش میزان متابولیت‌های ثانویه توسط الیسیتورها و پیش ماده‌ها می‌باشد. الیسیتورها ترکیباتی با منشأ زیستی و یا غیر زیستی هستند که از طریق القای پاسخ‌های دفاعی باعث بیوسنتز و انباشت متابولیت‌های ثانویه می‌شوند [٦] و بیشتر آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی (پکتیناز و سلولاز) یا بخش‌هایی از دیواره سلولی میکروارگانیزم‌ها (کیتین، گلوکان و گلیکوپروتئین) را شامل می‌باشند. همچنین، از برخی مواد شیمیایی غیر زیستی (اسید سالیسیلیک و متیل‌جاسمونات) می‌توان به‌عنوان الیسیتور استفاده کرد [۷ و۸]. عوامل مختلفی مانند غلظت الیسیتور، سن محیط‌کشت، زمان افزودن الیسیتور به محیط‌کشت و مدت زمان در معرض قرارگیری محیط‌کشت با الیستور، بر افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در این شرایط تأثیر می‌گذارند [۹و۱۰]. گزارش‌هایی از اثرات مثبت برخی الیسیتورها در تغییر میزان متابولیت‌های ثانویه کشت‌های درون شیشه‌ای وجود دارد. کلروکولین کلراید در *Taxus globosa* [۱۱] متیل‌جاسمونات و اسید سالیسیلیک در در کشت ریشه *Panax genseng* [۱۲] ، اسید سالیسیلیک در *T. baccata* [۱۳]، اسید سالیسیلیک، اسید جاسمونیک در گونه *Elaeagnus angustifolia* L. [١٤] و کلرید کبالت در *Corylus Avellana* L. [١٥] از جمله این موارد هستند. افزایش سنتز بتولین در کشت سوسپانسیون *B. pendula* بوسیله الیسیتورهای متیل‌جاسمونات و اسید سالیسیلیک [١٦و١٧] و همچنین در کشت ریشه موئین این گونه بوسیله کلروکولین کلراید و کیتوزان [١٨] گزارش شده است. اعمال الیسیتور بر میزان ترکیبات مشتق شده از بتولین نیز باعث افزایش شده است . اولئانولیک اسید و اورسولیک اسید که از مشتقات یتولین هستند در کشت سوسپانسیون سلولی *Uncaria tomentosa* تحت تیمار جاسمونیک اسید [۱۹] و بتولینیک اسید در کشت *سلولی*.*Glycyrrhiza glabra* L بەوسیله عصاره مخمر [۲۰] از جمله این موارد هستند. اضافه کردن پیش ماده‌ها نیز برای افزایش متابولیت‌های ثانویه در کشت سلول‌های گیاهی به‌طور غالب استفاده می‌شود و هر ترکیبی (ترکیب حد واسط) که در آغاز یک مسیر بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه قرار دارد می‌تواند برای افزایش عملکرد متابولیت به کار رود [۲۱]. استفاده از گلوکز و ساکارز میزان تولید برخی متابولیت‌های ثانویه را افزایش می‌دهد به‌عنوان‌مثال می‌توان از افزایش تولید تاکسول به‌وسیله ساکارز [۲۲] و اسید رزمارینیک به‌وسیله گلوکز [۲۳] نام برد. در آزمایش دیگری با افزودن پیش ماده های موالونات و ان-بنزوییل گلایسین به کشت سوسپانسیون سلولی گیاه سرخدار میزان تولید تاکسول تا حدود 3 برابر افزایش یافت [٢٤] به نقل از[۲۱].

هدف از انجام این پژوهش، بررسی امکان افزایش میزان بتولین در کالوس‌های *B. litwinowii* با استفاده از

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-08-25]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.13.3.1.8]

الیسیتورهایی 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

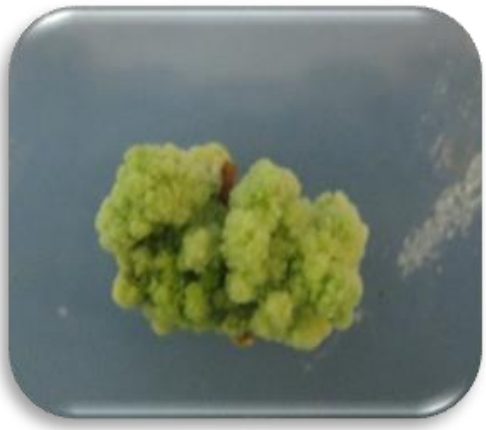
برگ‌ها با آب معمولی حاوی چند قطره مایع ظرف‌شویی به‌مدت سه تا چهار دقیقه شستشوی اولیه شدند و سپس ٤٥ دقیقه در ٤ میلی‌گرم بر لیتر قارچ‌کش بنومیل قرار گرفتند. پس از شستشو، برگ‌ها با کلرید جیوه یک دهم درصد به‌مدت پنج دقیقه ضدعفونی شدند و سپس سه بار با آب مقطر آبکشی شدند. ریزنمونه‌های گیاهی از برگ یک سانتی‌متری دارای رگبرگ بوده و در محیط‌کشت WPM[1] به‌همراه 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 ١٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در نظر گرفته شد [٢٦]. عدد pH محلول در محدوده ۵/۸-۵/۷ تنظیم شد و برای ژله‌ای شدن محیط از ۸ گرم در لیتر آگار استفاده شد. در شکل ۱ کالوس بدون اعمال تیما قابل مشاهده است.

۲-۳ اعمال الیسیتورها و پیش ماده‌ها

پس از گذشت ٤ ماه از کالزایی، کالوس‌ها در محیط‌کشت WPM به‌همراه الیسیتورهایی چون اسید سالیسیلیک (غلظت‌های ۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر)، کلرید کبالت (۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) و کلروکولین کلراید (۰، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر) و پیش ماده‌هایی چون ساکارز (۰، ۳۰، ٦٠ و ۹۰ گرم در لیتر)، گلوکز (۰، ۰٦، ۸۰ و ۱۰۰ گرم در لیتر) و ویتامین (۰، ۵، ۱۰ و ۱۵ برابر معمول موجود در محیط‌کشت WPM که شامل گلایسین، مایواینوزیتول، تیامین-HCl، پیریدوکسین-HCl، نیکوتینیک اسید است)، بازکشت شدند. کالوس‌ها در محیط‌کشت جدید حاوی الیسیتور و پیش ماده پس از ۲، ۳ و ٤ هفته برداشت شدند.

۲-٤ 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 به‌مدت ٦ دقیقه در داخل لوله فالکون فویل پیچی شده در دستگاه التراسوند قرار داده شدند. نمونه‌ها روی شیکر مغناطیسی بدون حرارت به‌مدت ٢٤ ساعت قرار گرفتند و با ۳۵۰۰ دور بر دقیقه به‌مدت 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)

1 Woody plant medium

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-08-25]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.13.3.1.8]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.13.3.1.8] [Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-08-25]

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 به‌دست 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 به‌دست آمده از منحنی کالیبراسیون، وزن بتولین در عصاره‌ها تخمین زده شد. پس از محاسبه میزان بتولین در بیست میکرولیتر عصاره تزریق‌شده به دستگاه، بتولین در گرم وزن خشک نمونه تهیه شده، تعیین شد.

۲-۶ تحلیل آماری

تجزیه‌وتحلیل 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 الیسیتورها شامل اسید سالیسیلیک، کلروکولین کلراید و کلرید کبالت و پیش‌ماده‌ها شامل ساکارز، ویتامین و گلوکز هر کدام در ٤ سطح و فاکتور دوم زمان با سه سطح است.

۳- نتایج

نوع بافت و رنگ کالوس‌ها در اثر تیمارهای اعمال‌شده 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: 1-g.l 60، ب: 1-g.l 80، ج: 1-g.l 100

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

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-08-25]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.13.3.1.8]

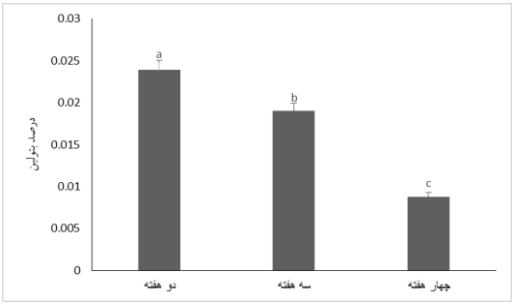
[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.13.3.1.8] [Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-08-25]

نتایج تجزیه واریانس حاصل از بررسی تأثیر الیسیتورها 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 بتولین القاء شده در کالوس‌ها در زمان‌های مختلف به روش آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد در شکل ٤ ارائه شده است. داده‌ها در سه گروه متفاوت قرار گرفتند. طبق نتایج حاصل شده، زمان دو هفته بهترین زمان برای اعمال تیمار می‌باشد.

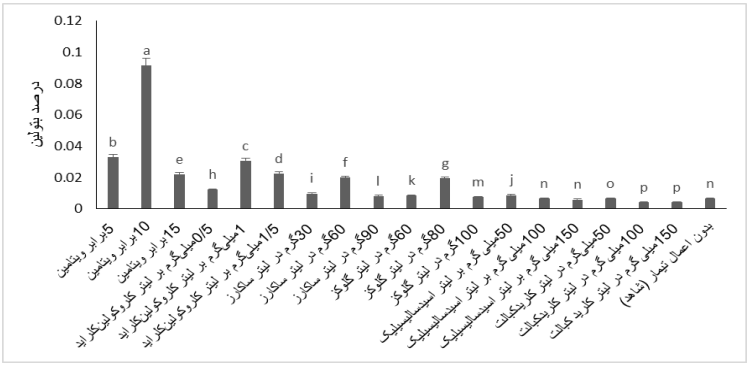
جدول ۱ تجزیه واریانس حاصل از بررسی تاثیر تیمارها (الیسیتورها و پیش ماده‌ها)، غلظت‌ها و زمان‌های اعمال شده بر میزان بتولین در کالوس *B. litwinowii*

منبع تغییرات (S.O.V)	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات (MS)	مقدار F	سطح معنی‌داری
تیمارها و غلظت‌ها	۱۸	۰/۰۰٤	۵۸۵٦۵/۰٦	۰/۰۰۰**
زمان	۲	۰/۰۰۳	۵۵۰۳۷/۰۹	۰/۰۰۰**
تیمارها و غلظت‌ها × زمان‌ها	۳٦	۰/۰۰۱	۹۱۳۳/۳۳	۰/۰۰۰**
اشتباه	۱۱٤	٦/۱۷۸	–	–
کل	۱۷۰	–	–	–

** اختلاف معنی‌دار در سطح خطای یک درصد



شکل ٤ مقایسه میانگین زمان اعمال تیمار بر میزان بتولین القاء شده در کالوس‌های *B. litwinowii*



شکل ۵ مقایسه میانگین بتولین القاء شده در تیمارها و غلظت‌های مختلف در کالوس‌های *B. litwinowii*

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-08-25]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.13.3.1.8]

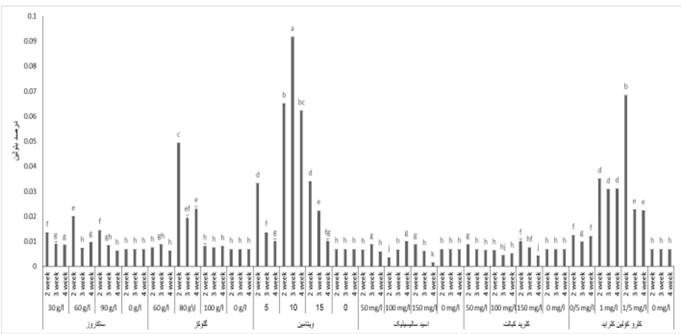
[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.13.3.1.8] [Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-08-25]

مقایسـه میـانگین میـزان بتـولین القـایی پـس از اعمـال الیسیتورها و پیش ماده‌ها در غلظت‌های مختلف بـه روش آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد در شکل ۵ ارائه شده است. طبق نتایج، اعمال ۱۰ برابـر ویتـامین بـه‌عنـوان پیش ماده، باعث بیشترین میزان بتولین القایی (بـیش از ۱۳ برابر نسبت به تیمار شاهد) شده است. به‌طورکلی، به جـز کلرید کبالت و سالیسیلیک اسید، سـایر تیمارهـای اعمـال شده نسبت به شاهد باعث افزایش میزان بتولین شدند.

مقایسـه میـانگین میـزان بتـولین القـایی پـس از اعمـال الیسیتورها و پیش ماده‌ها در غلظت و زمان‌های مختلف به روش آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد در شـکل ٦ ارائه شده است. بر اساس نتایج بالاترین میزان بتولین القـا شده بعد از استفاده از ساکارز به عنوان پیش مـاده دو هفتـه پس از اعمال تیمار و در غلظت ٦۰ گرم در لیتر حاصل شد. کارایی این پیش ماده در اکثر غلظت‌هـای اعمـال‌شـده و در هر سه زمان برداشت، بیشتر از تیمار شاهد بـود. در همـه‌ی کشت‌های تحت تأثیر پیش ماده گلوکز، مقدار بتولین القـایی بیشتر از شاهد بود. بیشترین میزان بتولین زمانی حاصل شـد که نمونه‌ها به مدت ۲ هفته در غلظت ۸۰ گرم در لیتـر ایـن تیمار قرار داشتند. تیمار ویتامین اعمال‌شده در هر ۳ غلظـت و ۳ زمان برداشـت باعـث افـزایش سـنتز بتـولین در بافـت کالوس نسبت به شاهد شده است. با این‌حال، میزان بتـولین در زمـان دوم (سـه هفتـه) و بـا تیمـار ویتـامین ۱۰ برابـر ، بیشترین میزان را داشت. میزان بتولین القـا شـده بـا محـرک شیمیایی اسید سالیسیلیک در غلظت و زمـان‌هـای مختلـف تیمار شده یکسان بوده و و در برخی از غلظت‌ها نسبت بـه شاهد القاء بتولین بیشتری داشـت. الیسـیتور کلریـد کبالـت نتوانست میزان سنتز بتولین بافت کـالوس را افـزایش دهـد. اعمــال دو هفتــه‌ایــی کلروکــولین کلرایــد در غلظــت ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر بیشترین میزان بتولین را در این تیمـار القـاء کرد. در ایـن تیمـار الیسـیتوری میـزان مـاده مـؤثره همـه‌ی غلظت‌های اعمال‌شده بیشتر از تیمار شاهد بود.

٤- بحث و نتیجه‌گیری

گیاهان به‌عنوان منبـع مهمـی بـرای تولید داروهـا، نقــش کلیدی در سلامت مردم جهان دارند و بســیاری از مــواد دارویی با ارزش جزو متابولیت‌های ثانویه گیاهان هسـتند. در مواردی که تکثیـر گیـاه بـا مشـکل مواجـه اسـت و از سویی دیگر سنتز ماده مؤثره نیز به‌آسانی انجام نمی‌شـود و یا به لحاظ اقتصادی مقرون به صـرفه نیسـت کشـت‌هـای سلولی به‌عنوان یک راه‌حل جایگزین معرفی می‌شود.



شکل ٦ مقایسه میانگین اثر متقابل تیمارها، غلظت‌ها و زمان‌های مختلف بر بتولین القاء شده در کالوس‌های *B. litwinowii*

تولید در محیطی کنترل‌شده و عـاری از انـواع آلاینـده‌هـا، قارچ‌ها و میکروب‌ها و همین‌طور یکنـواختی میـزان مـاده مـؤثره بـه دلیـل عـدم تأثیرپـذیری از شـرایط محیطـی و همین‌طور هزینه مناسب در تولید انبوه از دیگر مزایای این

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.13.3.1.8]
[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-08-25]

نوع کشت می‌باشد. مضاف بر اینکه امکان بهینه‌سازی و افزایش میزان ماده مؤثره با استفاده از انواع الیسیتورها، پیش ماده‌ها و نانومواد فراهم است. پژوهش حاضر نیز با هدف افزایش مقدار ماده مؤثره بتولین با خاصیت ضد توموری انجام شد. اکثر الیسیتورها 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 ٦٠ گرم در لیتر به‌عنوان بهترین غلظت شناخته شد. ساکارز در تحقیقات دیگری نیز مؤثر اعلام‌شده است [۲۲و۲۳]، 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 قابل‌توجهی 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 متابولیت های 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 الیسیتور و مدت‌زمانی که سلول‌ها در معرض الیسیتور قرار می‌گیرند نقش مهمی در فرایند تحریک داشته و عامل مؤثری برشدت پاسخ و میزان تولید متابولیت‌های ثانویه هستند [۳۰]. مجاورت الیسیتور در محیط‌کشت برای القای ماده مؤثره در محدوده زمانی خاصی تأثیرگذاری ویژه دارد به‌طوری که بالاترین افزایش ماده موثره بتولین نسبت به شاهد پس از استفاده از پیش ماده های گلوکز و ساکارز دو هفته و برای ویتامین پس از سه هفته قرارگیری در معرض پیش ماده حاصل شده است. در میان الیسیتورهای مورد استفاده، افزایش بتولین القایی نسبتا خوبی توسط کلروکولین کلراید دیده شد؛ محققین دیگری نیز بهبود میزان ماده مؤثره توسط این الیسیتور 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 الیسیتور 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 الیسیتور برای گونه‌های مختلف، متفاوت گزارش شده است [۱٤و۳۲]؛ اما غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر به‌عنوان بهینه‌ترین تیمار در گزارش‌های دیگری نیز [۱۳و۳۳] معرفی شده است. ترکیباتی مانند سالیسیلیک اسید ازجمله

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-08-25]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.13.3.1.8]

مولکول‌های مؤثر در مسیر علامت رسانی تنش‌ها هستند و به‌طور گسترده‌ای مطالعه شده‌اند. نقش سالیسیلک اسید در مقاومت گیاه نسبت به پاتوژن‌ها و سایر عوامل تنش‌زا به خوبی شناخته شده است. اخیراً نقش سالیسیلک 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 تاثیری برافزایش میزان سنتز بتولین بافت کالوس نداشت. اگرچه نقش مثبت این الیسیتور در سایر مطالعات گزارش‌شده بود [۱۵و۳۵]. 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 میلی گرم بر گرم) نسبت به شاهد می‌شود. به‌طور کلی این پیش ماده 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., Ejtehadi, 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.

[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 ginsenosidesaccumulation, 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

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-08-25]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.13.3.1.8]

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 Koohi (*Stachys lavandulifolia* Vahi) callus culture and possibility of its enhancement using Elicitors, Journal Biotecnology 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. GHasemi edi, K. 2017. Micropropagation of birch (*Betula litwinowii*) from leaf callus. Forest and

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-08-25]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.13.3.1.8]

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

Nastaran Mehrirad[1], Vahide Payamnoor[2]*, Jamile Nazari[3]

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 ($p\leq0.01$). 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

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-08-25]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.13.3.1.8]