

## تولید ماده مؤثره دارویی با القاء ریشه موئین در توس (*Betula pendula*)

راضیه جعفری حاجتی<sup>۱\*</sup>، وحیده پیام نور<sup>۲</sup>، کمال قاسمی بزدی<sup>۳</sup> و نجمه احمدیان چاشمی<sup>۴</sup>

\*۱- نویسنده مسئول مکاتبات، دانشجوی دکترای جنگل‌شناسی و اکولوژی جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

پست الکترونیک: R.jafari.hajati@gmail.com

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

۳- دانشیار، مؤسسه تحقیقات پنبه، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، گرگان

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

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۸/۰۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۱/۱۹

### چکیده

گیاه توس (*Betula pendula* Roth) سرشار از ترینوئیدهای فعال زیستی از جمله بتولین و اسید بتولینیک می‌باشد. از این ترکیبات به دلیل سمیت سلولی بالا استفاده‌های وسیعی در تهیه داروهای مهم می‌شود. ریشه‌های موئین تولید شده به وسیله آگروباکتریوم با رشد سریع و ثبات ژنتیکی بالا، می‌توانند محل تولید بیشتر این متابولیت‌ها باشند. در این پژوهش، القاء ریشه موئین در گیاه توس با استفاده از ریزنمونه‌های مختلف، محیط کشت و سویه‌های مختلف آگروباکتریوم بررسی شد. منحنی رشد ریشه‌های موئین تولید شده در محیط WPM مایع در مدت ۲۰ روز و میزان اسید بتولینیک و بتولین در آنها به وسیله HPLC بررسی شد. ریشه‌های تراریخته تنها با استفاده از سویه آگروباکتریوم تومفاسینس *C58C1* و آگروباکتریوم رایزوزنز *LB9402*، بیست روز پس از تلقیح، در قطعات پوست ساقه و همچنین در محیط کشت WPM تولید شد. دو لاین از سویه *C58C1* (D و E) و یک لاین از سویه *LB9402* (LB1) رشد بالاتری نسبت به سایر لاین‌ها نشان دادند. بالاترین میزان بتولین در این ریشه‌ها حدود ۰/۴۷ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک در روز هشتم و بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی (۷۵ درصد) در ریشه‌های لاین E در روز بیستم کشت به دست آمد. حداکثر میزان اسید بتولینیک ۰/۶ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک در لاین LB1 مشاهده شد. در مجموع، نتایج این تحقیق نشان داد که ریشه‌های موئین لاین E به علت عملکرد نسبی بالاتر نسبت به سایر لاین‌ها، می‌توانند به منظور بررسی ترینوئیدها و سایر متابولیت‌های دارویی در مطالعات آینده استفاده شوند.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، اسید بتولینیک، بتولین، توس، ریشه موئین.

### مقدمه

کند و ثابت شده است که از نظر تولید تجاری اقتصادی هستند (Hassanloo et al., 2008). سیستم کشت ریشه در گیاهان معمولاً سرعت رشد کمتری نشان داده و نیاز به هورمون‌های گیاهی خارجی دارد (Hassanloo et al.,

ریشه‌های موئین منبع ارزشمندی برای ترکیبات شیمیایی گیاهی با استفاده دارویی، آرایشی و افزودنی غذایی می‌باشند. این ریشه‌ها همچنین می‌توانند بیش از یک متابولیت تولید

فعالیت‌های بیولوژیکی و دارویی برای تحقیقات جامعه علمی دارای ارزش بسیاری است (Pisha *et al.*, 1995). خاصیت ضد توموری، ضد ویروسی و ضدباکتریایی از مهمترین خواص بتولین می‌باشند (Krasutsky, 2006). اسید بتولینیک که از اکسیداسیون بتولین به دست می‌آید، ضد ویروس HIV می‌باشد و فعالیت سمیت سلولی بسیار بالایی در مقابل لاین‌های مختلف سلول‌های سرطانی نشان داده است (Cichewicz & Kouzi, 2004). نبود زادآوری و تخریب رویشگاه‌های توس در ایران باعث محدود شدن رویشگاه این گونه شده است. همچنین بر اساس گزارش IUCN (۲۰۰۱) توس در معرض خطر انقراض است. بنابراین استخراج این دو ماده از طریق برداشت درختان از طبیعت امکان‌پذیر نیست. از این رو با توجه به اهمیت زیاد دارویی و صنعتی این گیاه بومی و در حال انقراض بودن آن، به‌عنوان یک مقوله صادراتی ارزشمند و ارزآور برای کشور، استفاده از روش‌های کشت بافت، مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی، از جمله القاء ریشه‌های موین، با هدف اصلاح این گیاه و افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه آن، ضروری به نظر می‌رسد. مطالعات متعددی در زمینه کشت بافت گونه‌های مختلف توس انجام شده است (Srivastava & Steinhauer, 1981; Srivastava *et al.*, 1985; Simola, 1985; Fan *et al.*, 2013; Mehri Rad, 2014) اما تاکنون مطالعه‌ای در زمینه کشت ریشه موین توس و تولید و بررسی متابولیت‌های ثانویه آن انجام نشده است.

از آنجایی که ماهیت برهم‌کنش میان آگروباکتریوم و سلول‌های گیاهی هنوز به‌طور کامل درک نشده است، بنابراین به‌منظور یافتن ترکیب مطلوب سویه باکتری و ژنوتیپ گیاهی، مجموعه‌ای از سویه‌های باکتریایی باید بر روی ژنوتیپ مورد نظر آزمون شود. علاوه بر ژنوتیپ، عوامل دیگری مانند سن، نوع و وضعیت فیزیولوژیکی گیاه نیز می‌توانند در تعیین سازگاری ژنوتیپ و سویه باکتری حائز اهمیت باشند (Hu & Du, 2006). در این پژوهش امکان القاء ریشه موین در گیاه توس با استفاده از سویه‌های متفاوت آگروباکتریوم بر روی قطعات مختلف گیاه و در سه

روش جایگزین برای تولید مواد دارویی با منشأ ریشه، استفاده از ریشه موین است که توسط گونه‌های مختلف آگروباکتریوم تولید می‌شود (Guillen *et al.*, 2006; Valko *et al.*, 2004). سویه‌های بیماری‌زای این باکتری با انتقال قسمتی از پلاسمید (Ri) خود، به نام T-DNA به ژنوم گیاه میزبان، باعث ایجاد ریشه موین می‌شوند (Christey & Braun, 2005). سرعت رشد بالا، انشعابات فراوان، نگهداری آسان در محیط عاری از هورمون‌های گیاهی، پایداری ژنتیکی و بیوسنتزی از مزایای کشت ریشه‌های موین می‌باشد (Hu & Du, 2006; Kokate, 2006; Stephanie *et al.*, 2006). ریشه‌های موین قادر به سنتز و تجمع بسیاری از متابولیت‌های ثانوی با ارزش می‌باشند که در شرایط طبیعی در ریشه تمایز یافته تولید می‌شوند، علاوه بر این تراریختی ممکن است مسیر متابولیکی را تحت تأثیر قرار داده و ترکیبات جدیدی را در ریشه‌های تراریخته تولید کند که به‌طور طبیعی در ریشه‌های سنتز نمی‌شوند (Hassanloo *et al.*, 2008).

توس نقره‌ای (*Betula pendula* Roth) از خانواده Betulaceae با نام انگلیسی Silver Birch یکی از گیاهان دارویی با ارزش می‌باشد که در اروپا، جنوب آسیا و شمال آفریقا پراکنش دارد (Martin *et al.*, 2008). توس درختی است پهن برگ، خزان‌کننده، تک‌پایه، بادگرده‌افشان، با ۲۰ تا ۲۵ متر ارتفاع و به‌قطری برابر ۸۰ سانتی‌متر و یا بیشتر می‌رسد و با بذر تکثیر می‌شود. دیرزیستی این درخت در جنگل‌های اروپا از ۶۰ تا ۱۰۰ سال متغیر است (Zare, 2002). منطقه سیاه‌مرزکوه علی‌آباد کنول در استان گلستان یکی از رویشگاه‌های محدود این گونه می‌باشد. خواص فیتوشیمیایی پوست توس همیشه برای محققان جالب بوده است. به‌طوری‌که پوست توس به‌علت خواص آنتی‌اکسیدانی بسیار بالا شناخته شده می‌باشد (Hiltunen *et al.*, 2006; Burda & Oleszek, 2001; Kahkonen *et al.*, 1999). این گیاه دارای ترکیب‌هایی به نام‌های بتولین و اسید بتولینیک در پوست خود می‌باشد. این دو تری‌ترینوئید موجود در توس به‌ویژه در پوست آن به‌علت دامنه وسیع

۱- قطعات یک سانتی متری از برگ، ساقه و پوست ساقه پس از ایجاد خراش سطحی توسط اسکالپل به مدت ۱۰ دقیقه در سوسپانسیون تلقیح غوطه‌ور شدند و پس از آگیری با کاغذ صافی استریل روی محیط کشت قرار گرفتند.

۲ - سوسپانسون تلقیح باکتری به مدت ۵ دقیقه با ۱۲۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و از پلت باکتری برای القاء سوزنی استفاده شد. پس از آلوده کردن سوزن سرنگ به باکتری روی نمونه‌های برگ، ساقه و پوست، خراش سطحی ایجاد شد و روی محیط کشت قرار گرفت.

قطعاتی از برگ، ساقه و پوست آلوده نشده به سوبیه‌های فوق نیز به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. هریک از لاین‌ها با بیش از ۱۰ تکرار، به سه محیط کشت  $B_5$  (Gamborg et al., 1968)، WPM (McCown & Sellmer, 1982) و NT (Nagata & Takebe, 1971) بدون هورمون وارد شدند و در شرایط تاریکی کشت شدند. پس از گذشت دو روز، قطعات گیاهی به محیط کشت‌های جامد حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم محصول ایران برای حذف باکتری سطحی منتقل شدند. عمل انتقال، چند مرتبه تا حذف کامل باکتری از اطراف قطعات گیاهی تکرار شد. با ظهور ریشه موئین و پس از انتخاب یک محیط کشت مناسب، بر اساس مقایسه حداکثر درصد ریشه‌زایی، به تمامی محیط‌های کشت منتخب ۰/۳ درصد زغال فعال اضافه شد. فوتوتیپ رشد لاین‌هایی که رشد بالاتری داشتند، بررسی شد. قطر ریشه، وزن تر و خشک و همچنین میزان بتولین، اسید بتولینیک و فعالیت آنتی‌اکسیدان اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل مولکولی ریشه‌ها از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

استخراج DNA با استفاده از ۰/۵ گرم وزن تر ریشه و بافر CTAB (سیگما آلدریج) به روش Doyle و Doyle (۱۹۹۰) با کمی تغییر انجام شد. سپس ماهیت تراریختی ریشه‌های موئین تولید شده توسط PCR تأیید شد. به منظور تأیید حضور قطعه T-DNA پلاسمید Ri در ریشه‌ها، از آغازگرهای *rolC*، با

محیط کشت متنوع مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت میزان بتولین و اسید بتولینیک و فعالیت آنتی‌اکسیدانی لاین ریشه‌های موئین به دست آمده، دارای سرعت رشد بالاتر در زمان برداشت‌های متفاوت ارزیابی شد.

## مواد و روش‌ها

### تهیه نمونه گیاهی

قطعات برگ، ساقه و پوست ساقه گیاه توس، به قطر ۷ تا ۱۰ میلی‌متر در ماه اردیبهشت از دامنه ارتفاعی ۲۰۰۰ تا ۲۵۰۰ متر از پایه‌های مادری در منطقه سیاه‌مرزکوه علی‌آباد کتول واقع در ۱۸ کیلومتری جنوب شرق شهر گرگان در استان گلستان جمع‌آوری شد. تیمارهای پیش‌سترون سازی به صورت شستشو با آب جاری، غوطه‌ور کردن در مایع ظرف‌شویی رقیق شده به مدت ۳ دقیقه و بعد ضد عفونی با ۴ گرم در لیتر قارچ‌کش بنومیل به مدت ۴۵ دقیقه انجام شد و تیمارهای سترون‌سازی شامل سه مرتبه شستشو با آب مقطر، غوطه‌ور کردن در کلرید جیوه ۰/۱ درصد به مدت ۷ دقیقه و سه مرتبه شستشوی دوباره با آب مقطر روی کلیه نمونه‌ها اعمال شد.

### القاء ریشه موئین

به منظور القاء ریشه‌های موئین در توس از قطعات برگ، ساقه و پوست ساقه و ۴ سوبیه *LB9402*، *ATCC15834*، *A4* و *R100* باکتری آگروباکتریوم رایزوزنز و یک سوبیه *C58C1* آگروباکتریوم تومفاسینس استفاده شد. سوبیه‌های باکتری در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد و محیط کشت مایع *LB* حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک ریفامپین محصول ایران به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی کشت داده شدند. برای تهیه سوسپانسیون تلقیح حدود ۱ میلی‌لیتر از کشت شبانه باکتری به ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع تازه *LB* حاوی ۲۰ میکرومولار استوسرینگون (سیگما آلدریج) اضافه شد و به مدت ۴ ساعت در شیکر انکوباتور با چرخش ۹۰ دور در دقیقه قرار گرفتند. القاء به دو صورت انجام شد.

اضافه شد (Zhao *et al.*, 2007). برای سنجش بتولین و اسید بتولینیک از دستگاه HPLC استفاده شد. دستگاه مورد استفاده هیتاچی آلمان-ژاپن و ستون مورد استفاده، C18 (۲۵۰ در ۴/۶ میلی متر) با ۵ میکرومتر منافذ ستون بوده است. طول موج دستگاه روی ۲۱۰ نانومتر تنظیم شد، سرعت جریان حلال یک میلی لیتر بر دقیقه در نظر گرفته شد و از فاز متحرک به صورت ایزوکراتیک با حلال‌های استونیتریل و آب، به نسبت ۸۶:۱۴ استفاده شد. میزان بتولین و اسید بتولینیک در نمونه‌های مورد بررسی بر اساس سطح زیر منحنی به دست آمده با استفاده از منحنی استاندارد آنها محاسبه شد (Zhao *et al.*, 2007). برای تهیه منحنی استاندارد غلظت‌های مختلف دو استاندارد بتولین و بتولینیک اسید برحسب پی‌پی‌ام تهیه و به دستگاه HPLC تزریق شد.

### ارزیابی DPPH

عصاره متانولی با غلظت ۰/۱ درصد تهیه شد. سپس یک میلی لیتر عصاره با یک میلی لیتر محلول متانولی ۰/۰۰۴ درصد DPPH (زیگما آلدریج) مخلوط شد. محلول کنترل شامل یک میلی لیتر DPPH و یک میلی لیتر متانول بود. نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و دمای اتاق نگهداری شدند، سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر نسبت به کنترل اندازه‌گیری شد و با استفاده از فرمول زیر درصد مهار رادیکال‌های آزاد (I%) هر عصاره تعیین شد.

$$I\% = 100 * \frac{A - \text{کنترل}}{A} = \text{کنترل}$$

### تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS 16.0 انجام شد. تجزیه واریانس داده‌ها به صورت آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

توالی‌های '5' (آغـزگر رفاقت) و '3'- ATGGCTGAAGACGACCTGTGTT-3' (آغـزگر برگشت) و به منظور اطمینان از عدم وجود آگروباکتریوم رایزوزنز سطحی بر ریشه‌ها از آغازگرهای *virD*، توالی‌های '5'- ATCATTGTAGCGACT-3' و '3'- AGCTCAAACCTGCTTC-5' استفاده شد. دمای اتصال برای آغازگرهای *RolC* ۶۳ درجه سانتی‌گراد و *VirD* ۴۸ درجه سانتی‌گراد بود. قطعات حاصل از تکثیر پرایمرها بر روی ژل آگاروز ۱ درصد با ولتاژ ۱۰۰ تفکیک شد، رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید انجام و بعد توسط دستگاه ژل‌داک عکس برداری شد.

بررسی دوره رشد ریشه در محیط کشت مایع

پس از تأیید ماهیت تراریختی ریشه‌های مویین تولید شده، بازکشت در محیط کشت جامد هر چهار هفته یکبار در شرایط تاریکی انجام شد. میزان رشد، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، بتولین و اسید بتولینیک ریشه‌هایی با سرعت رشد بالا در محیط کشت جامد ارزیابی شد. در نهایت، سه لاین ریشه مویین با درصد رشد بالاتر نسبت به سایر لاین‌ها به محیط کشت مایع WPM منتقل شدند و بازکشت آنها در محیط کشت هر سه هفته انجام شد. به منظور بررسی رشد این ریشه‌ها و رسم منحنی رشد طی دوره ۳ هفته، نیم گرم از هر یک از لاین‌ها به طور جداگانه با سه تکرار مستقل، به ارلن‌های حاوی ۳۰ میلی لیتر محیط کشت منتقل شدند. سپس در بازه زمانی ۴، ۸، ۱۲، ۱۶ و ۲۰ روز پس از کشت برداشت شدند. ریشه‌ها در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد خشک شده و وزن خشک آنها نیز اندازه‌گیری شد.

استخراج بتولین و اسید بتولینیک و سنجش آنها توسط

### HPLC

ریشه‌های مویین با اتانول ۹۵٪ عصاره‌گیری شدند. پس از حذف حلال، به عصاره خشک باقیمانده متانول

## نتایج

## القاء ریشه مویین

با وجود استفاده از دو روش مختلف (سوزنی و غوطه‌وری) برای تلقیح آگروباکتریوم رایزوزنز سویه‌های *AR15834*، *A4*، *LB9402*، *R100* و آگروباکتریوم تومفاسینس سویه *C58C1* (حاوی پلاسمید Ri)، تنها به روش سوزنی توانایی تراریخته کردن گیاه توس را نشان داد. در روش غوطه‌ورسازی قطعات گیاهی در سوسپانسیون باکتری، پس از انتقال قطعات به محیط کشت‌های جامد، قهوه‌ای شدن و مرگ سلول‌های قطعات مورد استفاده مشاهده شد. همچنین القاء ریشه مویین در قطعات مختلف گیاه؛ برگ، ساقه و پوست و سه محیط کشت *WPM*، *B5* و *NT* تنها در محیط کشت *WPM* و قطعات مربوط به پوست ساقه، آلوده شده با دو سویه *C58C1* و *LB9402* مشاهده شد. مورفولوژی رشد تعداد محدودی از این ریشه‌ها منطبق بر خصوصیات مورد

انتظار، شامل رشد سریع با تولید انشعابات فراوان در زمان کم بود.

## تجزیه و تحلیل مولکولی ریشه‌ها

به منظور اثبات انتقال قطعه T-DNA آگروباکتریوم به ریشه‌های مویین، آزمون PCR با آغازگرهای *RolC* انجام شد و همچنین از آغازگرهای *VirD* نیز برای اطمینان از آلوده نبودن ریشه‌های مویین به آگروباکتریوم استفاده شد. نتایج حاصل از الکتروفورز محصول PCR نمونه‌ها، حضور ژن T-DNA را در لاین‌های مورد نظر تأیید کرد. محصول تکثیر شده برای آغازگرهای *RolC*، ۵۴۳ bp بود که حضور قطعه T-DNA را در ریشه‌های مویین تأیید کرد. همچنین قطعه تکثیر شده با آغازگرهای *VirD*، ۵۶۲ bp بود که در نمونه شاهد مثبت (DNA باکتری) مشاهده شد و عدم حضور آن در ریشه‌های مویین تأیید کرد که این ریشه‌ها عاری از باکتری بود (شکل ۱).



شکل ۱- نتایج PCR به منظور بررسی تراریخته بودن ریشه (سمت چپ) و عدم آلودگی ریشه به آگروباکتریوم رایزوزنز (سمت راست).

۱: ریشه نرمال؛ ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶: ریشه مویین و ۷: پلاسمید Ri

۱ حکایت از اختلاف معنی‌دار در قطر ریشه، وزن تر و خشک، بتولین، اسید بتولینیک و فعالیت آنتی‌اکسیدانی بین لاین‌های مختلف ریشه مویین در سطح احتمال یک درصد داشت. بر مبنای قطر ریشه، وزن تر و خشک ریشه تولیدی در لاین‌های مختلف، فنوتیپ رشدی ریشه‌های مویین حاصل از هر تیمار باکتری، مورد بررسی قرار گرفت.

## تعیین فنوتیپ رشد و میزان متابولیت‌های لاین‌های مختلف ریشه مویین در محیط کشت جامد

از بین لاین‌های ریشه تولید شده توسط دو سویه باکتری *C58C1* (لاین‌های B, D, E, F) و *LB9402* (لاین LB1) پنج لاین که رشد بالاتری نسبت به سایر لاین‌ها در محیط کشت جامد *WPM* داشتند، انتخاب شدند. نتایج تجزیه و تحلیل واریانس ارائه شده در جدول

جدول ۱- میانگین مربعات حاصل از تجزیه و تحلیل واریانس وزن تر و خشک، بتولین، بتولینیک اسید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی لاین‌های ریشه مویین توس حاصل از دو سویه مختلف آگروباکتریوم رایزوزنز در محیط کشت جامد WPM

منابع تغییر	درجه آزادی	قطر ریشه	وزن تر	وزن خشک	اسید بتولینیک	بتولین	آنتی‌اکسیدان
بین گروهی	۴	۰/۳۳**	۴۵۷۴۹۳**	۱۸۶۵**	۰/۰۵۸**	۰/۱۴**	۲۸۴**
درون گروهی	۱۰	۰/۰۱۱	۹۸۴۰	۹۶	۰	۰	۹

\*\* : معنی‌دار با سطح احتمال یک درصد

میزان آن در لاین D (۰/۴۷mg/g) و حداقل میزان بتولین در لاین B (۰/۰۰۵mg/g) مشاهده شد. حداکثر فعالیت آنتی‌اکسیدانی در لاین E (۷۱ درصد) و F (۷۵ درصد) مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری در میزان آن با هم نداشتند. لاین D بعد LB1 و B به ترتیب در رتبه‌های بعدی از نظر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی قرار گرفتند. از آنجا که سه لاین LB1, D و E رشد بسیار بیشتری نسبت به دو لاین F و B نشان دادند، از این رو برای ورود به مرحله کشت مایع رشد انتخاب شدند.

با توجه به نتایج جدول ۲ میزان مویینگی لاین E نسبت به سایر لاین‌ها بیشتر بود، به صورتی که قطر متوسط ریشه‌های این لاین به صورت معنی‌داری کمتر از سایر لاین‌ها بود. لاین E و D وزن تر و خشک بالاتری نسبت به لاین B, F و LB1 داشتند که این اختلاف در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود. همان‌طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، لاین F (۰/۳۲mg/g) با اختلاف معنی‌داری نسبت به سایر لاین‌ها بالاترین میزان اسید بتولینیک را تولید کرد. اسید بتولینیک در لاین B تولید نشد. بتولین در کلیه لاین‌ها تولید شد، اما بالاترین

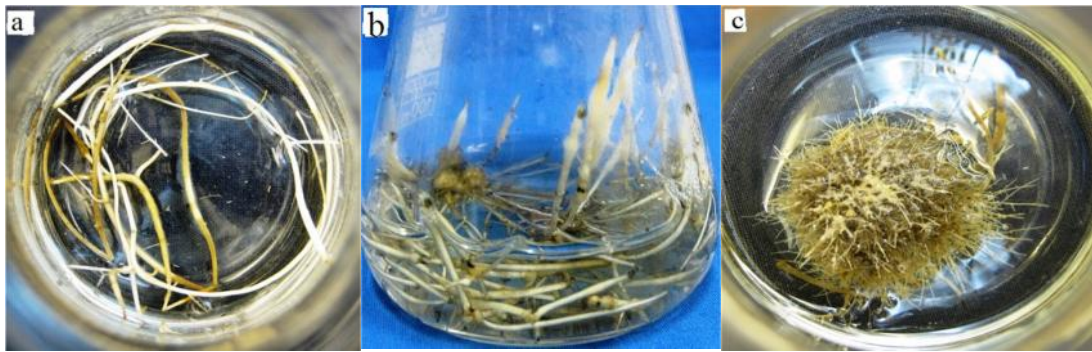
جدول ۲- مقایسه میانگین وزن تر و خشک، بتولین، اسید بتولینیک و فعالیت آنتی‌اکسیدانی لاین‌های ریشه مویین توس حاصل از دو

سویه مختلف آگروباکتریوم رایزوزنز در محیط کشت جامد WPM

لاین ریشه	قطر ریشه (mm)	وزن تر (mg)	وزن خشک (mg)	اسید بتولینیک (mg/g)	بتولین (mg/g)	آنتی‌اکسیدان (درصد)
LB1	۱/۹۷ ± ۰/۱ <sup>a</sup>	۱۲۲۷ ± ۶۴ <sup>c</sup>	۹۴ ± ۳ <sup>bc</sup>	۰/۰۰۳ ± ۰/۰۰۰۲ <sup>d</sup>	۰/۱۲ ± ۰/۰۰۵ <sup>c</sup>	۵۹ ± ۴ <sup>d</sup>
B	۱/۵ ± ۰/۰۶ <sup>c</sup>	۸۵۳ ± ۱۱۰ <sup>d</sup>	۶۰ ± ۸ <sup>de</sup>	-	۰/۰۰۵ ± ۰/۰۰۰۳ <sup>d</sup>	۵۷ ± ۵ <sup>de</sup>
D	۱/۶ ± ۰/۰۱ <sup>b</sup>	۱۶۰۰ ± ۱۰۰ <sup>ab</sup>	۱۰۶ ± ۱۲ <sup>ab</sup>	۰/۲۱ ± ۰/۰۱ <sup>b</sup>	۰/۴۷ ± ۰/۰۱۵ <sup>a</sup>	۶۸ ± ۳ <sup>bc</sup>
E	۱/۱ ± ۰/۱۵ <sup>d</sup>	۱۷۰۰ ± ۱۰۰ <sup>a</sup>	۱۱۷ ± ۱۱ <sup>a</sup>	۰/۱۷ ± ۰/۰۰۶ <sup>c</sup>	۰/۱۶ ± ۰/۰۰۹ <sup>b</sup>	۷۱ ± ۲ <sup>ab</sup>
F	۱/۵ ± ۰/۰۶ <sup>c</sup>	۸۹۳ ± ۱۱۴ <sup>e</sup>	۶۶ ± ۱۱ <sup>d</sup>	۰/۳۲ ± ۰/۰۲۵ <sup>a</sup>	۰/۱۷ ± ۰/۰۱ <sup>b</sup>	۷۵ ± ۲ <sup>a</sup>

لاین LB1، D و E به ازاء ۵۰۰ میلی‌گرم ریشه پس از سه هفته رشد ریشه می‌باشد. همانطور که در شکل‌ها ملاحظه می‌شود ریشه‌ها از نظر مورفولوژی و میزان رشد با هم تفاوت دارند.

بررسی چرخه رشد و میزان متابولیت‌های لاین‌های مختلف ریشه موئین در محیط کشت مایع  
کشت مایع ریشه موئین نیز در محیط کشت WPM بدون آگار انجام گردید. تصاویر شکل ۲ مربوط به کشت مایع سه



شکل ۲- کشت مایع ریشه موئین حاصل از لاین‌های مختلف: (a) LB1، (b) D و (c) E

زمان برداشت هم برای همه صفات در سطح یک درصد معنی‌دار شد. البته بین وزن خشک لاین‌های مختلف تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد مشاهده شد.

بر اساس نتایج تجزیه واریانس (جدول ۳)، میزان وزن تر و خشک، تولید بتولین، اسید بتولینیک و آنتی‌اکسیدان بین لاین‌های متفاوت در زمان برداشت تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد وجود داشت. اثر متقابل لاین و

جدول ۳- میانگین مربعات حاصل از تجزیه واریانس صفات مختلف در ریشه‌های موئین توس

حاصل از لاین‌های E، D و LB1 در زمان‌های متفاوت برداشت در کشت مایع

منابع تغییر	درجه آزادی	وزن تر	وزن خشک	بتولین	اسید بتولینیک	آنتی‌اکسیدان
لاین (A)	۲	۱۷۹۳۲۶۷ **	۳۴۵ *	۰/۰۸۵ **	۰/۱ **	۶۶۹ **
زمان برداشت (B)	۵	۹۶۵۳۲۰ **	۴۶۳۵ **	۰/۰۷۲ **	۰/۰۵ **	۸۵ **
A * B	۱۰	۲۳۶۸۲۰ **	۸۶۰ **	۰/۰۲ **	۰/۰۷ **	۴۰ **
خطا	۳۶	۱۳۱۸۳	۱۴۵	۰	۰	۳

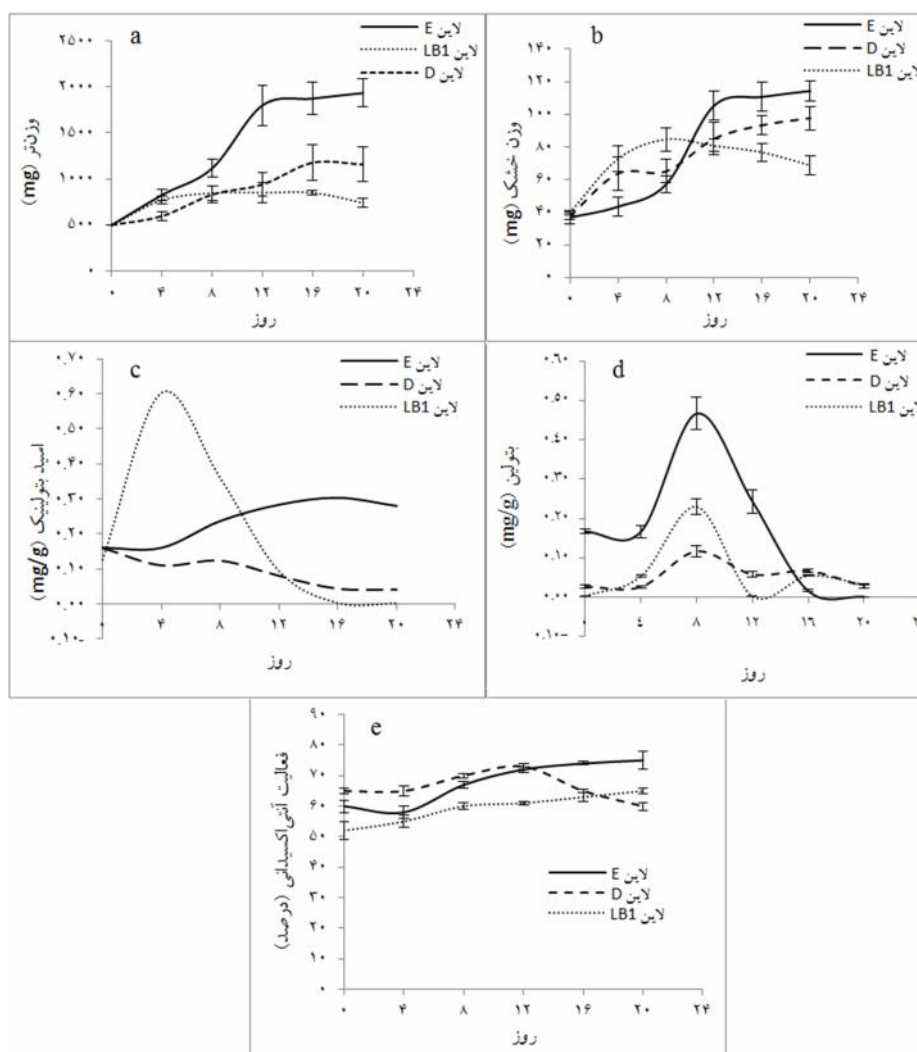
\*\* معنی‌دار با سطح احتمال یک درصد، \* معنی‌دار با سطح احتمال پنج درصد

خشک رسید که پس از آن تا روز بیستم کاهش وزن به‌کندی مشاهده شد. میانگین وزن تر و خشک در لاین E به‌طور معنی‌داری بالاتر از دو لاین دیگر بود. حداکثر تولید اسید بتولینیک در لاین LB1 در روز چهارم (۰/۶ mg/g)، پس از آن لاین E در روز شانزدهم (۰/۳ mg/g) و در

نتایج مقایسه میانگین وزن تر و خشک ریشه، بتولین، بتولینیک اسید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در شکل ۳ ارائه شده است. وزن تر و خشک در لاین E تا روز دوازدهم و در لاین D تا روز شانزدهم به‌سرعت افزایش یافت. لاین LB1 در هشتمین روز برداشت به حداکثر میزان بایومس تر و

(۷۵ درصد) بیشتر از سایر لاین‌ها بود. لاین D نیز در روز دوازدهم (۷۳ درصد) فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی را نشان داد. دو لاین E و D در مجموع فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری را نسبت به لاین LB1 نشان دادند.

نهایت لاین D در روز اول ( $0/16\text{mg/g}$ ) بود. بیشترین تولید بتولین به ترتیب در لاین E ( $0/47\text{mg/g}$ )، LB1 ( $0/23\text{mg/g}$ ) و D ( $0/12\text{mg/g}$ ) در روز هشتم مشاهده شد، که در زمان برداشت‌های پس از آن کاهش میزان بتولین مشاهده شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی لاین E در روز بیستم



شکل ۳- نمودار مقایسه میانگین صفات مختلف در طول زمان در ریشه مویین توس در لاین‌های E, D و LB1 در شرایط کشت مایع: وزن تر (a)، وزن خشک (b)، اسید بتولینیک (c)، بتولین (d) و فعالیت آنتی‌اکسیدان (e)

## بحث

محیط فاقد هورمون از خود بروز دادند و به راحتی از ریشه‌های معمولی قابل تشخیص بودند. نتایج نشان داد که وقتی قطعات نمونه در محیط سوسپانسیون تلقیح باکتری

ریشه‌های مویین تولید شده از نظر مورفولوژی خصوصیتی از قبیل رشد سریع، انشعابات فرعی زیاد در



T-DNA ناحیه توانایی الحاق را در ژنوم میزبان ندارد (Bandeali *et al.*, 2013).

با توجه به نتایج کشت مایع ریشه (شکل ۳) زمانی که لاین‌های مختلف ریشه در حال رشد صعودی بودند میزان ماده مؤثره نیز در حداکثر میزان خود بود. با ثابت شدن رشد، میزان ماده مؤثر نیز ثابت و عموماً روند نزولی داشت. در این تحقیق یکی از دلایل کند شدن یا ثابت شدن رشد ریشه‌ها را می‌توان به کاهش کربن و مواد مغذی ریشه در محیط کشت نسبت داد. البته عوامل متعددی مانند محیط کشت، نوع ریزنمونه، شرایط القاء، اکسیژن، اسیدیته و ... در تولید متابولیت ثانویه مؤثرند، عمده اجزای محیط کشت سلول‌های گیاهی از قبیل قندها، فسفات، نیترات و تنظیم‌کننده‌های رشد، شاخص‌های مهمی در رشد و تجمع متابولیت‌های ثانویه می‌باشند (Omidi & Farzin, 2012). استفاده از پیش‌ماده در محیط کشت باعث افزایش تاکسول در کشت سلولی سرخدار شده است (Fett-Neto *et al.*, 1994). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که در دسترس بودن مواد مغذی برای ریشه می‌تواند یکی از دلایل افزایش میزان بتولین و اسید بتولینیک در ریشه باشد.

مشخص شده است که ریشه‌های موپین از نظر ژنتیکی پایدار بوده و واگشت آنها آسان می‌باشد. با وجود این، ریشه‌های موپین هم دارای غیریکنواختی ژنتیکی می‌باشند و به‌نظر می‌رسد که به‌منظور دستیابی به لاین‌هایی از ریشه‌های موپین که دارای تولید بالایی باشند لازم است که عمل انتخاب چند بار انجام شود (Hu & Du, 2006). با توجه به نتایج به‌دست آمده، لاین‌های مورد مطالعه از نظر تولید ماده مؤثره و بیوماس نیز متفاوت بودند. به‌طوری‌که بالاترین میزان بتولین در لاین D (۰/۴۷ mg/g) در محیط کشت جامد و لاین E (۰/۴۷mg/g) در محیط کشت مایع حاصل شد. حداکثر میزان اسید بتولینیک در لاین LB1 (mg/g) ۰/۶ در کشت مایع، و بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی به‌میزان مشابه ۷۵٪ در لاین E در محیط کشت مایع و لاین F در محیط کشت جامد مشاهده شد. در این زمینه Payamnoor و همکاران (۲۰۱۵) در کالوس‌های

قرار گرفتند به تدریج قهوه‌ای و نکروزه شدند. در صورتی که در القاء سوزنی چنین پدیده‌ای رخ نداد. قهوه‌ای شدن نمونه‌ها احتمالاً به دلیل آسیب به سلول‌ها در ناحیه برش و آزاد شدن بیش از حد ترکیبات فنولی از محل زخم انجام می‌شود. البته القاء ریشه موپین تنها در محیط کشت WPM امکان‌پذیر شد. محققان نیز از سه سویه آگروباکتریوم رایزوتنز (*R1000, A4* و *ATCC15384*) و چهار محیط کشت (SH, WPM, B5, MS) برای تولید تاکسول در ریشه موپین گونه درختی تاکسوس *Taxus cuspidata* استفاده کردند، که سویه *ATCC15384* و محیط کشت WPM بالاترین درصد تولید ریشه موپین را داشتند (Kim *et al.*, 2009).

نتایج این پژوهش نشان داد که القاء ریشه موپین به‌عواملی مانند منبع تهیه قطعات نمونه و نژاد آگروباکتریوم و محیط کشت وابسته است. در این آزمایش از بین قطعات نمونه برگ، ساقه و پوست تحت القاء سویه‌های باکتری متفاوت و محیط کشت متفاوت تنها نمونه پوست برای القاء ریشه موپین مناسب بود که این امر به دلیل توانایی رشد و تقسیم سلول‌های این ناحیه می‌باشد. مطالعات قبلی نشان دادند که توانایی رشد و تقسیم سلولی یکی از عواملی است که به انتقال ژن به سلول‌های میزبان و تراریختی آنها توسط باکتری آگروباکتریوم کمک می‌کند. از طرف دیگر هورمون اکسین با تأثیر بر سلول‌های پوست می‌تواند رشد و تقسیم سلولی را در این نواحی تحریک کند (Rajasekaran *et al.*, 2000). با انتقال ناحیه T-DNA به ژنوم میزبان، سنتز این هورمون در سلول‌های میزبان افزایش می‌یابد. در این پژوهش تنها دو سویه *C58C1* و *LB9402* قادر به القاء ریشه در ریزنمونه پوست بودند که نشان می‌دهد نژاد آگروباکتریوم نیز یکی از عوامل مهم در القاء ریشه است. طول ناحیه T-DNA پلاسمید القاء‌کننده ریشه و توالی ژن‌های آن در سویه‌های مختلف آگروباکتریوم متفاوت می‌باشد. مطالعات نشان می‌دهد که دو فاکتور اندازه و توالی ژنی این ناحیه از پلاسمید در الحاق و بیان ژن‌های T-DNA در ژنوم میزبان اهمیت دارند و در برخی موارد

- cancer and HIV infection. *Medicinal Research Reviews*, 24:90-114.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 5-13.
- Fan, G., Zhai, Q., Li, X. and Zhan, Y., 2013. Compound of *Betula platyphylla* cell suspension cultures in response to fungal elicitor. *Biotechnol & Biotechnol*, 27: 3569-3572.
- Gamborg, O.L., Miller, R.A. and Ojima, K., 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*. 50: 151-158.
- Fett-Neto, A.G., Stewart, J.M., Nicholson, S.A., Pennington, J.J. and Di-Cosmo, F., 1994. Improved taxol yield by aromatic carboxylic acid and amino acid feeding to cell cultures of *T. cuspidata*. *Biotechnology and Bioengineering*, 44: 967-971.
- Guillen, S., Tremouillaux-Guillen, J., Pati, P.K., Rideau, M. and Gantet, P., 2006. Harnessing the potential of hairy roots. *Trends in Biotechnology*, 24: 403-409.
- Hassanloo, T., Rezazade, Sh. and Rahnama, H., 2008. Hairy roots as a source of compounds with medicinal value. *Journal of Medicinal Plants*. 29: 1-17.
- Hiltunen, E., Pakkanen, T.T. and Alvila, L., 2006. Phenolic compounds in silver birch (*Betula pendula* Roth) wood. *Holzforschung*, 60: 519-527.
- Hu, Z.B. and Du, M., 2006. Hairy root and its application in plant genetic engineering. *Journal of Integrative Plant Biology*, 48: 121-127.
- I.U.C.N., 2001. IUCN Red list categories and criteria. IUCN, Gland, Switzerland.
- Kahkonen, M.P., Hopia, A. I., Vuorela, H.J., Rauha, J.P., Pihlaja, K., Kujala, T.S. and Heinonen, M., 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 3954-3962.
- Kim, J.A., Baek, K.H., Son, Y.M., Son, S.H. and Shin, H., 2009. Hairy Root Cultures of *Taxus cuspidata* for Enhanced Production of Paclitaxel. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 52:144-150.
- Kokate, C.K., 2006. *Medicinal Plant Biotechnology*. CBS Publisher and Distributors, 506 pp.
- Krasutsky, P.A., 2006. Birch bark research and development. *Natural Product Reports*, 23:919-942.
- McCown, B.H. and Sellmer, J.C., 1982. Media and physical environment. In: Bonga, J.M. and Durzan, D.J (Eds.), *Cell and Tissue Culture in Forestry*, Vol 1, General Principles and Biotechnology. Martinus Nijhoff Publishers, Pordrecht. 422.
- پوست ساقه دو گونه *B. litwinowii* و *B. pendula* در محیط کشت WPM به ترتیب میزان بتولین ۰/۲ mg/g و ۰/۱۶ mg/g و میزان اسید بتولینیک ۰/۵۳ mg/g و ۰/۵۷ mg/g اعلام کردند که با توجه به نتایج این تحقیق میزان بتولین تولیدی در ریشه مویین بیشتر بود. در تحقیق دیگری که توسط Payamnoor و Jafari (۲۰۱۵) انجام شد میزان بتولین و اسید بتولینیک کالوس‌های ریزنمونه برگ و ساقه گونه *B. pendula* را گزارش کردند که کمتر از حداکثر میزان بتولین و اسید بتولینیک تولید شده در لاین‌های ریشه این تحقیق می‌باشد. یکی از دلایل بالاتر بودن میزان ماده مؤثره در ریشه به علت تمایز یافته بودن بافت آن می‌باشد. در برخی از روش‌های بیوتکنولوژی مانند کشت سلولی به علت عدم تمایز بافت مقدار تولید متابولیت‌های ثانویه کاهش می‌یابد (Asghari, 2006).
- از آنجا که لاین E در محیط کشت مایع بالاترین وزن تر و خشک را با اختلاف معنی‌داری نسبت به سایر لاین‌ها نشان داد و میزان تولید بتولین و فعالیت آنتی‌اکسیدانی لاین E نیز نسبت به سایر لاین‌ها بیشتر بود. در تحقیقات آینده با هدف افزایش میزان متابولیت‌های ثانویه می‌توان بر روی این لاین مطالعات لازم را انجام داد. البته استفاده از بیوراکتور و محرک‌های مختلف برای افزایش متابولت‌های ریشه مویین توس نیز پیشنهاد می‌شود.

### منابع مورد استفاده

- Asghari, Gh., 2006. *Biotechnological Production of Medicinal Plants and Herbal Medicines*. Publications of Esfahan SID, 287p. Persian.
- Bandeali, A., Keyhanfar, M. and Asghari, Gh., 2013. Improve the production of artemisinin in *Artemisia annua* Hairy roots using *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medicinal Plants*, 4: 82-92. Persian.
- Christey, M.C. and Braun, R.H., 2005. Production of hairy root cultures and transgenic plants by *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation. *Methods in Molecular Biology*, 286: 47 -60.
- Cichewicz, R.H. and Kouzi, S.A., 2004. Chemistry, biological activity, and chemotherapeutic potential of betulinic acid for the prevention and treatment of

- selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis: *Natural Medicines*, 1: 1046-1051.
- Rajasekaran, K., Hudspeth, R.L., Cary, J.W., Anderson, D.M. and Cleveland, T.F., 2000. High-frequency transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by particle bombardment of embryonic cell suspension cultures. *Plant Cell Report*, 19: 539 - 45.
- Simola, L.K., 1985. Propagation of plantlets from leaf callus of *Betula pendula f. purpurea*. *Scientia Horti*, 26: 77-85.
- Srivastava, P.S. and Steinhauer, A., 1981. Isozymes in differentiating shoot bud cultures of *Betula pendula* Roth. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 103: 341-346.
- Srivastava, P.S., Steinhauer, A. and Glock, H., 1985. Plantlet differentiation in leaf and root cultures of birch (*Betula Pendula* Roth). *Plant Science*, 42:209-214.
- Stephanie, G., Jocelyne, T.G., Pratap, K.P., Marc, R. and Pascal, G., 2006. Hairy root research: recent scenario and prospects. *Current Opinion in Plant Biology*, 9: 341-346.
- Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C.J. and Telser, J., 2004. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular Cell Biochemistry*, (1-2): 37-56.
- Zare, H., 2002. Ecologia study of *Betula pendula* stands in Sangde and Lar vally. Tarbiat Modares University. Iran, M.Sc. thesis, 140p. Persian.
- Zhao, G., Yan, W.D. and Cao, D., 2007. Simultaneous determination of betulin and betulinic acid in white birch bark using RP-HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical*, 43: 959-962.
- Martin, C., Parra, T., Clemente-Muñoz, M. and Hernandez-Bermejo, J.E., 2008. Genetic diversity and structure of the endangered *Betula pendula* subsp. *fontqueri* populations in the south of Spain. *Silva Fennica*, 42: 487-498.
- Mehri Rad, N., 2014. Possibility to increase betulin extract of *betula litwinowii* callus *In Vitro* condition. MS thesis. Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources. Iran, MS thesis, 74p. Persian.
- Nagata, I. and Takebe, I., 1971. Plating of isolated tobacco mesophyll protoplasts on agar medium. *Planta* 99:12-20.
- Omidi, M. and Farzin, N., 2012. Biotechnology applications to increase the effectiveness of medicinal plants. *Modern Genetic*, 7: 209-220.
- Payamnoor, V. and Jafari Hajati, R., 2015. To assess changes of major secondary metabolites produced in the calli of *Betula pendula* by affecting explant type and medium culture. Research project of Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran, No, 21-314-92, 31p. Persian.
- Payamnoor, V., Jafari Hajati, R. and Nazari, J., 2015. Callogenesis of two species of birch (*B pendula* and *B litwinowii*) using the bark explant and evaluation of induced betulin. Research project of Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran, No, 20-314-92, 21p. Persian.
- 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

## Production of pharmaceutical active ingredients via hairy root induction of Birch (*Betula pendula*)

R. Jafari Hajati<sup>1\*</sup>, V. Payamnoor<sup>2</sup>, K. Ghasemi Bezdi<sup>3</sup> and N. Ahmadian Chashmi<sup>4</sup>

1-\*Corresponding author, Ph.D student, Faculty of forest sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, I.R.Iran. E-mail: R.jafari.hajati@gmail.com

2- Assis. Prof., Faculty of Forest Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, I.R.Iran

3-Asso. Prof., Cotton Research Institute of Iran, Gorgan, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), I.R.Iran

4- Assis. Prof., Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, I.R.Iran

Received: 26.12.2015

Accepted: 08.02.2016

### Abstract

*Betula pendula* Roth produces a range of biologically active terpenoids such as betulin and betulinic acid. The compounds with cytotoxic effects which have been used for their medicinal properties. Agrobacterium-infected hairy roots are characterized by high growth rate and genetic stability that can be provided noticeable amounts of the biological material. In this study, production of hairy roots by *B. pendula* was investigated on different explants, media and *A. rhizogenes* strains. Growth rate of hairy roots were studied during 20 days and the terpenoids content (betulin & betulinic acid) were assayed by HPLC. Hairy root cultures were established 20 days after infection by infecting bark segments of *B. pendula* by *Agrobacterium* strains of *C58C1* and *LB9402* in WPM medium. Growth of hairy root by lines of *C58C1* strain (D and E lines) and one line from *LB9402* strain (LB1) were significantly better than others. The most betulin content was observed in the hairy roots, 8 days after culture, which was about 0.47 mg g<sup>-1</sup> dry weight (DW). Furthermore, the most amount of antioxidant activity (75%) was assessed on E line roots, 20 days after cultures. Although the highest content of betulinic acid (0.6 mg g<sup>-1</sup> DW) was obtained by LB1 lines but betulin content and antioxidant activity were considerably less than other hairy root lines. Results indicated that due to higher relative performance, E line of hairy roots could be used for analysis of terpenoids and pharmaceutically important metabolites in future studies.

**Keywords:** Antioxidant, *Betula pendula*, betulin, betulinic acid, hairy root.