جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۲۳، شماره ۱، صفحه ۱۰۲-۹۳ (۱۳۹۴)

اثر سن پایه و نور بر کالزایی توس (*Betula litwinowii*) و بتولین القاءشده در شرایط درون‌شیشه‌ای

نسترن مهری راد*[۱]، وحیده پیام نور[۲] و جمیله نظری[۳]

۱-* نویسنده مسئول مکاتبات، کارشناس ارشد، جنگل‌شناسی و اکولوژی جنگل، دانشکده علوم جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، گرگان،
پست الکترونیک: nastaranmehrirad91@yahoo.com
۲- استادیار، دانشکده علوم جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، گرگان
۳- دانشجوی دکترا، دانشکده علوم جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، گرگان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۴/۰۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۲/۰۹

چکیده

گیاهان به‌علت داشتن متابولیت‌های ثانویه، اهمیت جهانی و کاربرد وسیعی در زمینه‌های گوناگون دارند. جنس توس (*Betula*) حاوی متابولیت‌های ثانویه به‌ویژه ترپن‌ها است که خاصیت پیش‌گیری‌کننده سرطان پوست و درمان‌کنندگی بیماریHIV، هپاتیت و مالاریا را دارد. یافتن جایگزین مناسب برای داروهای مصنوعی با گیاهان دارویی با توجه به محدود بودن تعداد پایه‌ها و در معرض خطر انقراض قرار گرفتن گونه‌های گیاهی مورد نظر امری ضروریست. با مدنظر قراردادن مشکلات مربوط به تکثیر و تولید گیاهان دارویی، زراعی و جنگلی، از روش‌های دیگری نظیر کشت‌های درون شیشه‌ای با اعمال محرک‌های تولیدی، برای به‌دست آوردن این مواد مؤثره گیاهی می‌توان استفاده کرد. هدف از انجام پژوهش حاضر، ارزیابی تأثیر تیمار نور و تاریکی بر میزان تولید ماده مؤثره بتولین در کالوس‌های القا شده چهار ماهه پس از کشت ریزنمونه‌های برگ گونه *B. litwinowii* در شرایط درون شیشه‌ای بود. ریزنمونه‌ها از برگ‌های جوان پایه‌های مادری بالغ (بالای ۲۵ سال) و نهال‌های پنج ساله از رویشگاه سنگده فریم در فصل تابستان تهیه و در محیط کشت WPM در شرایط نور و تاریکی کشت داده شدند. به‌منظور تجزیه و تحلیل کالوس‌زایی از آزمون t مستقل غیر-جفتی با پنج تکرار و برای تجزیه میزان بتولین، از منحنی کالیبراسیون حاصل از تزریق محلول استاندارد با استفاده از دستگاه HPLC استفاده شد. نتایج نشان داد شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با نور سفید و شدت ۱۰۰۰ تا ۱۵۰۰ لوکس برای کالوس‌دهی ریزنمونه‌ها بسیار ضروری بوده و زمانی که ریزنمونه از پایه مادری مسن‌تر تهیه شد، میزان بتولین القاء شده بیشتری (سه برابر) حاصل شد.

واژه‌های کلیدی: توس، شرایط نوری، کشت بافت، متابولیت‌های ثانویه، محیط کشت WPM.

مقدمه

استفاده از گیاهان به‌دلیل داشتن متابولیت‌های ثانویه برای درمان بیماری‌ها از گذشته‌های دور به‌صورت سنتی مرسوم بوده و امروزه با گسترش عوارض و اثرات سوء داروهای شیمیایی استفاده از این مواد طبیعی برای درمان بیماری‌ها کاربرد بیشتری پیدا کرده است (Omidbaigi, 2005). با توجه به اهمیت جهانی و کاربرد وسیع متابولیت-های ثانویه در زمینه‌های گوناگون و با مدنظر قراردادن

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مشکلات مربوط به تولید گیاهان زراعی و جنگلی، استفاده از روش‌هایی نظیر کشت بافت و سلول با اعمال محرک‌های تولیدی، برای به‌دست‌آوردن این مواد مؤثره گیاهی بیش از پیش اهمیت یافته‌اند (Tripathi & Tripathi, 2003). متابولیت‌های ثانویه طی تمایزیابی سلول ایجاد می‌گردند و در سه گروه مجزا شامل ترپن‌ها، فنول‌ها و آلکالوئیدها (ترکیبات نیتروژن‌دار) قرار می‌گیرند. ترپن‌ها بزرگ‌ترین گروه متابولیت‌های ثانویه و اساسا لیپید هستند، که از پنج واحد کربن تشکیل و به‌صورت منوترپن، دی‌ترپن و پلی‌ترپن تقسیم‌بندی می‌شوند (Alizadeh, 2012). در جوامع جنگلی، اندام‌های رویشی و زایشی درختان حاوی مواد مؤثره مختلفی هستند، که در درمان بسیاری از بیمارهای خطرناک، نقش دارند. یکی از این درختان جنگلی نادر در ایران، که در اندام رویشی خود ماده ضد سرطانی دارد، درخت توس می‌باشد (Barzekar, 2005). توس (*Betula*) درختی یک‌پایه و نورپسند از تیره *Betulaceae* و از گیاهان چوبی نیمکره شمالی است. در ایران سه گونه از آن با نام‌های علمی *B. pendula* (Kordalivand *et al*., 2012؛Sabeti, 2005)، *B. litwinowii* (Zare *et al*., 2010؛ Kordalivand *et al*., 2012) و *B. pubescens* (Kordalivand *et al*., 2012) شناسایی شده‌اند و به گونه‌هایی مانند *B. alba* نیز در برخی منابع اشاره‌هایی شده است (Sabeti, 2005). بیشتر به‌صورت درختی و در بخش‌هایی به‌صورت درختچه‌های کوتاه بوده و جزو گونه‌های در حال انقراض می‌باشد (Barzekar, 2005). پوست گونه‌های مختلف توس منبع خام و طبیعی مهمی برای استخراج نوعی متابولیت ثانویه از گروه ترپن‌ها به‌نام بتولین می‌باشد که به‌مقدار قابل ملاحظه‌ای در حدود ۱۲ تا ۱۴ درصد و گاهی تا ۲۰ درصد بوده و می‌تواند در درمان بیماری‌های مزمن ازجمله انواع سرطان‌های پوست، رحم، سینه و همچنین بیماری‌های مالاریا و اگزما (Dzubak *et al*., 2006 ؛ Prince *et al*., 2010) و همین‌طور درمان روماتیسم و التهاب (Li, 2002) استفاده شود.

خواص دارویی این متابولیت ثانویه که در گونه‌های مختلف توس دارای بیشترین مقدار است، در سال‌های اخیر کشف شده است. استخراج این ترپن به‌طور مستقیم با عصاره‌گیری از پوست جدا شده درختان توس پس از قطع یکسره انجام می‌گیرد (Zhao *et al*., 2007) ولی در چند سال اخیر تلاش‌هایی برای بهره‌گیری از روش‌های بیوتکنولوژی، کشت بافت و سوسپانسیون سلولی در این خصوص آغاز شده است که در زمینه سوسپانسیون سلولی می‌توان به Fan و همکاران (۲۰۱۰ و ۲۰۱۳) و در زمینه کشت بافت می‌توان به Payam Noor و همکاران (۲۰۱۲) اشاره کرد. با توجه به محدودیت فراوان تجدید حیات در رویشگاه‌های توس در ایران و رو به انقراض بودن این گونه‌ها، استفاده از روش‌های کشت بافت می‌تواند راه‌حل مناسبی برای استفاده از قابلیت‌های دارویی این درخت باشد (Payam Noor *et al*., 2012). در کشورهای مختلف جهان تحقیقات زیادی در زمینه کالوس‌زایی گونه‌های مختلف توس ازجمله دو گونه *B. papyrifera* Varen و *B. platyphylla* VerDale (Magnusson *et al*., 2009)، گونه‌های *B. pubescens* و *B. pendula* var. Carelica (Kontseva, 2009)، گونه *B. microphylla* var. paludosa (Qun, 2012) و گونه *B. luminifera* (Xiaomin *et al*., 2012) انجام شده است. در ایران کشت بافت روی یکی از گونه‌های توس (*B. litwinowii*) برای اولین بار توسط Nazari و همکاران (۲۰۱۲) انجام شد؛ آنها محیط کشت پایه WPM و هورمون‌های 2,4-D (غلظت یک دهم میلی‌گرم بر لیتر) و BAP (غلظت یک میلی‌گرم بر لیتر) را به‌عنوان بهترین محیط کشت و ترکیب هورمونی برای کالوس‌زایی معرفی کردند. القای بتولین در کالوس‌ها با استفاده از محیط کشت WPM توسط Payam Noor و همکاران (۲۰۱۲) انجام شد. از آنجا که القای بتولین با استفاده از کشت کالوس‌ها در جهان، محدود به‌همین تحقیق است، تحقیقی در خصوص نحوه تأثیر نور و تاریکی بر میزان بتولین القایی انجام نشده است.

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

کالوس‌دهی برخی گونه‌ها در شرایط نوری و برخی در شرایط تاریکی انجام شده است. از آنجایی‌که نور و میزان آن در تولید متابولیت‌های ثانویه نقش بسزایی دارند (Omidbaigi, 2005)، این امکان وجود دارد که بتولین نیز به‌عنوان یک متابولیت ثانویه تحت تأثیر شرایط نوری قرار گیرد. بنابراین تحقیق حاضر با هدف ارزیابی تأثیر تیمار نور و تاریکی بر میزان تولید ماده مؤثره بتولین کالوس‌های چهار ماهه گونه *B. litwinowii* در شرایط درون شیشه‌ای انجام شد.

مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر در آزمایشگاه کشت بافت دانشکده علوم جنگل دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. نمونه‌برداری از برگ‌های *B. litwinowii* واقع در منطقه سنگده استان مازندران، در جنوبی‌ترین بخش از شهرستان ساری و در محدوده مختصات جغرافیایی ۱۰َ ۵۳ْ تا ۲۷َ ۵۳ْ طول شرقی و ۱۰َ ۳۵ْ تا ۳َ ۳۶ْ عرض شمالی و در تابستان به دو صورت انجام شد: ۱) درختان بالغ جنگلی بالای ۲۵ سال ۲) از نهال‌های چهار-پنج ساله نهالستان شرکت فریم. شستشوی اولیه ریزنمونه‌ها با آب معمولی حاوی چند قطره مایع ظرفشویی به‌مدت سه تا چهار دقیقه انجام شد. نمونه‌ها با آب معمولی به‌مدت ۱۰ دقیقه آبکشی و بعد در محلول قارچ‌کش بنومیل به غلظت چهار گرم در لیتر به‌مدت ۴۵ دقیقه قرار داده شدند. ریزنمونه‌ها پس از سه بار آبکشی با آب مقطر سترون با استفاده از کلرید جیوه یک دهم درصد به‌مدت هفت دقیقه ضدعفونی سطحی شده و بعد سه بار با آب مقطر آبکشی شدند. ریزنمونه‌ها از برگ ۱ سانتی‌متری بخش حاوی رگبرگ بوده و در محیط کشت WPM (Woody Plant Medium) به‌همراه ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و هورمون‌های 2,4-D و BAP به‌ترتیب در غلظت‌های یک‌دهم و یک میلی‌گرم بر لیتر (Nazari *et al.*, 2012) در دو تیمار نوری (۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) با شدت نور ۱۰۰۰ تا ۱۵۰۰ لوکس و تاریکی (انکوباتور) به‌تعداد ۱۵ شیشه‌مربایی حاوی هفت ریزنمونه برای هرکدام از تیمارها کشت شدند. همچنین pH محلول در محدوده ۵/۸-۵/۷ تنظیم شد و برای ژله‌ای شدن محیط از هشت گرم در لیتر آگار استفاده شد. شروع کالوس‌دهی دو ماه پس از کشت و زمان برداشت کالوس‌ها برای عصاره‌گیری چهار ماه پس از کشت بود. به‌منظور عصاره‌گیری از کالوس‌ها، نیم‌گرم وزن خشک در هاون چینی با ۱۰ میلی‌لیتر متانول مخصوص HPLC (High Performance Liquid Coromatography) مخلوط و کوبیده شد، سپس لوله فالکن در داخل فویل پیچیده شده (برای ایجاد تاریکی) به‌مدت ۶ دقیقه در دستگاه التراسوند قرار داده شد. سپس نمونه‌ها روی شیکر مغناطیسی بدون حرارت به‌مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند و به‌مدت پنج‌دقیقه با ۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. محلول رویی (سوپرناتانت) در داخل ظروف تیره ریخته شد و پس از فیلترکردن در داخل لوله‌ها (میکروتیوپ) در یخچال قرار گرفت تا برای تزریق به دستگاه HPLC، در مراحل بعدی استفاده شود. 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 و از آن محلول پایه غلظت-های استاندارد در دُزهای مختلف تهیه و به دستگاه تزریق و با استفاده از سطوح زیر پیک به‌دست آمده منحنی کالیبراسیون خطی استاندارد رسم شد. سپس عصاره‌های کالوس‌ها به دستگاه تزریق و با استفاده از سطح زیر پیک منحنی کالیبراسیون مربوطه رسم شد. میزان بتولین هر یک از نمونه‌ها، با اندازه‌گیری سطح زیر پیک مربوطه در زمان مورد نظر تعیین و با قرار دادن این سطح در معادله به‌دست‌آمده 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 تهیه‌شده، تعیین‌شد. تجزیه و تحلیل داده‌های کالوس‌زایی با استفاده از آزمون t مستقل غیرجفتی با پنج تکرار و هفت ریزنمونه در هر تکرار و با کمک نرم‌افزار SPSS انجام گردید.

نتایج

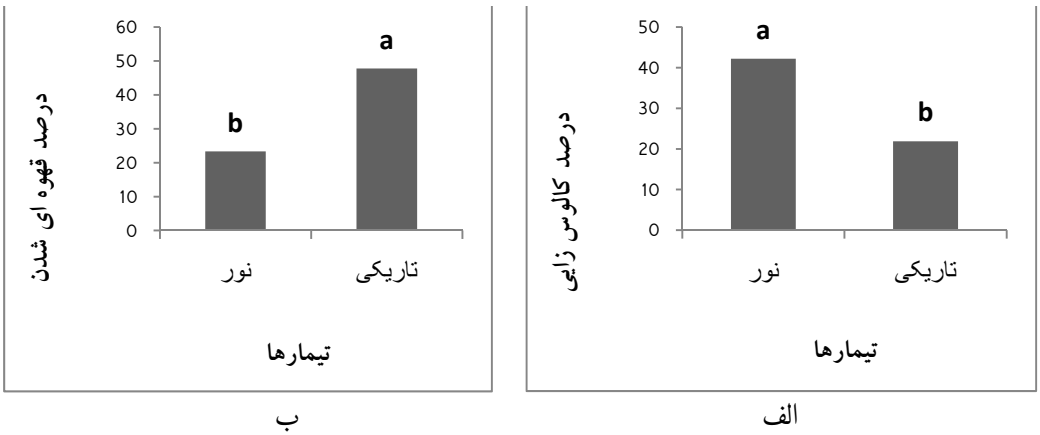
نتایج آزمون t مستقل غیرجفتی حاصل از بررسی تأثیر تیمارهای نور و تاریکی در میزان کالوس‌زایی، آلودگی و قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های برگ *B. litwinowii* در جدول (۱) ارائه شده است. بر اساس نتایج آزمون t مستقل غیرجفتی ، میزان کالوس‌زایی تحت تأثیر تیمارهای نور و تاریکی در سطح خطای پنج درصد معنی‌دار بود. میزان قهوه‌ای شدن کالوس‌ها نیز در دو تیمار اعمال شده در سطح خطای پنج درصد معنی‌دار بود، ولی درصد آلودگی ریزنمونه‌ها در سطح خطای پنج درصد معنی‌دار نبود.

جدول ۱- آزمون t مستقل غیرجفتی تأثیر تیمار نور و تاریکی روی کالوس‌زایی، آلودگی و قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های برگ *B. litwinowii*

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین اختلافات	خطای معیار اختلافات	سطح معنی‌داری
کالزایی	۲۳/۰۶	-۱۶/۶۶	۵/۳۳	۰/۰۰۵*
آلودگی	۲۸	-۷/۷۸	۵/۴۶	۰/۱۶۵n.s
قهوه‌ای شدن	۲۸	۲۴/۴۴	۴/۵۰	۰/۰۰۰*

*: اختلاف معنی‌دار در سطح خطای ۵ درصد n.s: عدم اختلاف معنی‌دار

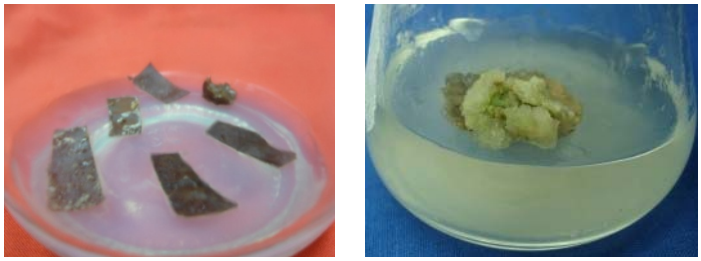
از مقایسه میانگین تأثیر شرایط نوری مشخص شد که نور فاکتور مؤثری در کالوس‌زایی از ریزنمونه برگ *B. litwinowii* می‌باشد، به‌طوری‌که باعث ۴۲/۲۲ درصد کالوس‌دهی در مقابل ۲۱/۸۸ درصد کالوس‌دهی در شرایط تاریکی شد (شکل ۱-الف).



الف ب

شکل ۱- مقایسه میانگین تأثیر تیمار نور و تاریکی بر کالوس‌زایی (الف) و قهوه‌ای شدن (ب) ریزنمونه‌های برگ *B. litwinowii*

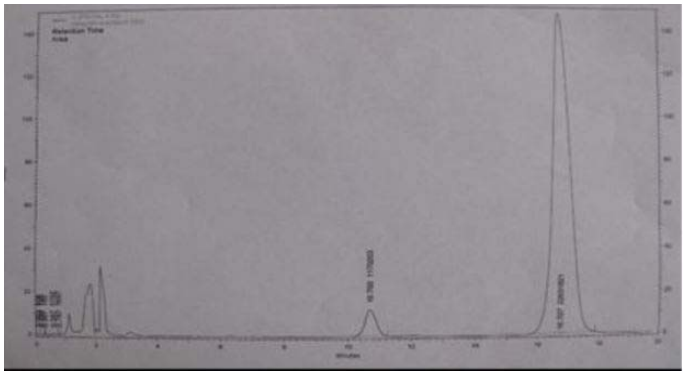
شرایط نوری بر میزان قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها نیز مؤثر بود، به‌طوری‌که تیمار تاریکی درصد بالای قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها را باعث شد (شکل۱- ب). چهار ماه پس از کشت، نمونه‌های تحت تأثیر نور کالوس‌زایی مناسب داشتند (شکل ۲- الف) اما ریزنمونه‌های قرارگرفته در تاریکی اکثرا قهوه‌ای شده و کالوس‌زایی مناسبی نداشتند (شکل ۲- ب).



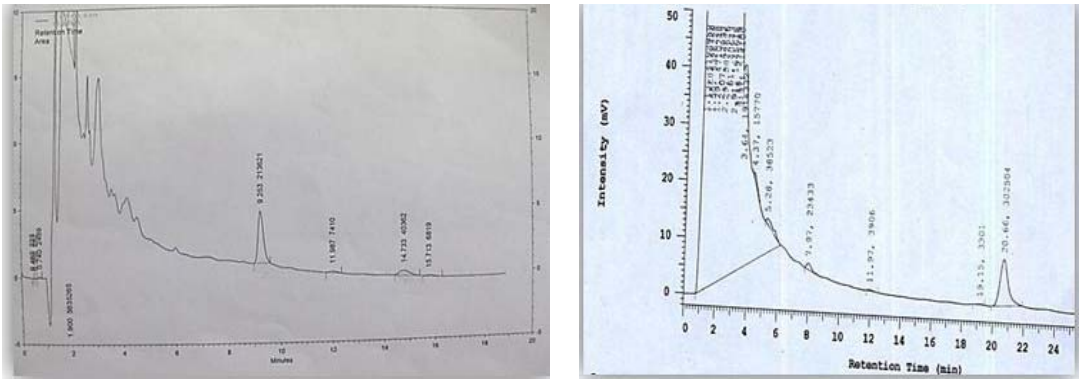
ب الف

شکل ۲- ادامه رشد کالوس از نمونه‌های قرار گرفته در تیمار نوری (الف) و عدم رشد و قهوه‌ای شدن کالوس در تیمار تاریکی (ب)

در ارزیابی میزان بتولین ۲۰ تا ۲۲ دقیقه پس از تزریق محلول استاندارد و نمونه‌های عصاره‌گیری شده به دستگاه HPLC پیک‌هایی ظاهر شدند (شکل ۳). تشخیص پیک مربوط به هر نمونه در کروماتوگرام حاصل، با مقایسه زمان بازداری (۲۰ تا ۲۲ دقیقه) ظاهر شدن پیک بتولین خالص (استاندارد) تزریق شده با غلظت‌های مختلف و پیک‌های حاصل از عصاره‌های تزریقی انجام شد که در شکل (۴- الف و ب) ارائه شده است. منحنی کالیبراسیون خطی نمونه‌ها در دو تیمار سنی مربوط به پایه‌های مادری در شکل (۵- الف و ب) دیده می‌شود.

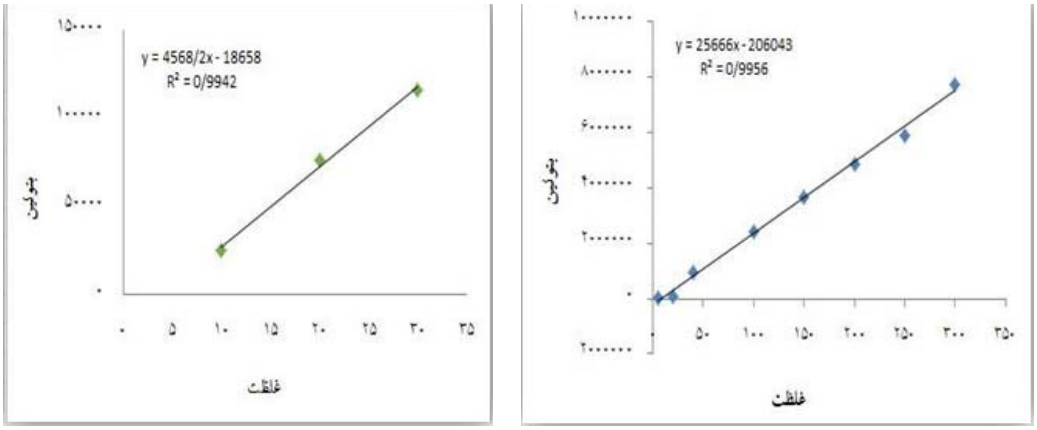


شکل ۳- پیک حاصل از تزریق استاندارد بتولین



ب الف

شکل ۴- پیک حاصل از تزریق عصاره کالوس تولید شده از پایه مادری بالغ (الف) و پایه مادری جوان (ب)



الف ب

شکل ۵- منحنی کالیبراسیون نمونه کالوس حاصل از ریزنمونه‌های برگ تهیه شده از پایه مادری بالغ (الف) و پایه مادری جوان (ب)

بر اساس تجزیه انجام شده، در یک گرم بافت کالوس خشک حاصل از محیط کشت WPM در شرایط نوری سه‌دهم میلی‌گرم در گرم (سه‌صدم درصد) بتولین وجود دارد. عدم کالوس‌دهی ریزنمونه‌ها در شرایط تاریکی باعث شد ارزیابی میزان بتولین با استفاده از دستگاه HPLC میسر نباشد. در شرایط تاریکی مشخص شد که نمونه‌ها در محیط کشت WPM قادر به تولید کالوس نیستند و یا کالوس بسیار کمی تولید می‌کنند که قابل اندازه‌گیری با دستگاه HPLC نمی‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

توسعه روش‌های بیوتکنولوژی مانند ریزازدیادی، کشت بافت، کشت سلول و ریشه‌های مویین یکی از مهمترین شیوه‌های حل مشکلات مربوط به اثرات مخرب قطع گیاهان و درختان با خصوصیات غذایی، صنعتی و دارویی است. در این راستا توسعه سیستم‌های سریع کشت و تکثیر درون شیشه‌ای فرصتی بی‌نظیر برای تولید محصولات مختلف متابولیت ثانویه در آزمایشگاه و بدون نیاز به محدودیت زمانی و زمین‌های قابل کشت و عرصه‌های جنگلکاری خواهد بود (Nandagopal & Ranjitha Kumari, 2007). عوامل متعددی نظیر ترکیبات محیط کشت، ریزنمونه، شرایط فیزیکی، نفوذپذیری و غیره در کشت‌های درون‌شیشه‌ای و تولید متابولیت ثانویه مؤثرند (Mulabagal, 2004؛ Rao, 2002). در تحقیق حاضر بر اساس نتایج اعلام شده توسط Nazari و همکاران (۲۰۱۲) از هورمون‌های BAP (یک میلی‌گرم در لیتر) و 2, 4-D (یک دهم میلی‌گرم در لیتر) استفاده و کالوس تهیه شد. از آنجا که بین خصوصیات روشنایی و تولید کالوس و متابولیت‌های ثانویه گیاهان دارویی ارتباط تنگاتنگی وجود داشته و نقش اکوفیزیولوژیک روشنایی در تولید فراورده‌های مذکور عمده و اساسی می‌باشد (Omidbaigi, 2005)، بنابراین تأثیر این عامل بر کالوس‌زایی و میزان بتولین القایی در شرایط درون شیشه‌ای مورد بررسی قرار گرفت. مقدار روشنایی که در دسترس گیاهان قرارمی‌گیرد، اثر مستقیمی بر میزان تولید ماده مؤثره در آنها دارد. گیاهان از نظر شرایط فیزیکی مثل نور و درجه حرارت، برای القای کالوس یا تولید شاخساره با یکدیگر متفاوت هستند. بعضی از گیاهان در نور و برخی در تاریکی کالوس بیشتری تولید می‌کنند (Omidbaigi, 2005). در این بررسی مشخص شد که کالوس‌زایی *B. litwinowii* فقط در مجاورت نور به‌طور مناسب اتفاق می‌افتد و ریزنمونه‌ها در شرایط تاریکی قادر به تولید کالوس نیستند و یا اینکه به میزان بسیار کمی کالوس خواهند داشت که آن هم زنده‌مانی نداشته و به‌سرعت قهوه‌ای می‌شوند که با تحقیق بسیاری از محققان تطابق دارد (Ghadiri

Arbabian & Moghanlo., ؛Sardrood *et al*., 2012 2009؛ Toolit *et al*., 2008؛ Niimi, 1995؛ Jeong, 1996 و Memar Moshrefi *et al*., 2002). در نتایج تحقیق حاضر عدم حصول نتیجه مناسب از تیمار تاریکی، ممکن است به‌دلیل نورپسند بودن گونه *B. litwinowii*، (Sabeti, 2005) باشد. محققان دیگری ازجمله Yong-Qin و همکاران (۲۰۰۳) بر روی گونه *Taxus yunnanensis*؛ Rezaei و همکاران (۲۰۱۳) بر روی گونه *Corylus avellana*؛ Abbasi Kajani و همکاران (۲۰۱۲) بر روی گونه *Taxus baccata* L. و نیز Abdirad و همکاران (۲۰۱۲) بر روی دو گونه *Rosa damascena Mill*. و *Rosa miniature* آزمایش‌هایی را انجام داده و تیمار تاریکی را بهترین تیمار برای کالوس‌زایی اعلام کردند، که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت ندارد. نتایج تحقیق حاضر تأییدکننده نتایج Kwan-Long و Chin-Ri (۱۹۷۵) است که نور را برای تنظیم فرایند نمو گیاهی، فعالیت آنزیم‌های بیوسنتزی در مسیر تولید ترکیبات ثانویه و پارامترهای مورفولوژیکی درختان نورپسند ضروری می‌دانند. در شرایط تاریکی و با وجود فراهم بودن موادغذایی و دمای مناسب برای رشد، فعالیت متابولیسمی در بافت برگ *B. litwinowii* وجود نداشت، به‌همین دلیل کالوس‌زایی و دیگر فعالیت‌های بیوسنتزی برای تولید مواد مؤثره انجام نشد. نتایج این تحقیق با مطالعات Hasanpoor و همکاران (۲۰۰۷) که بر روی القای تولید ماده مؤثره رزمارینیک اسید در کالوس‌های گره ساقه‌ای *Zataria multiflora* Bioss، Abdirad و همکاران (۲۰۱۲) در تولید رنگدانه‌ها و آنتوسیانین کالوس‌های دو گونه *Rosa amascena Mill*. و *Rosa miniature* و نیز Rezanejad و Tarrahi (۲۰۱۳) در القای آنتوسیانین کالوس‌های *Rosa gallica* L. در شرایط نور و تاریکی همخوانی دارد که وجود نور را برای تولید مواد مؤثره فوق مؤثر دانستند. میزان بتولین عصاره متانولی کالوس‌های برگی حاصل از تزریق دستگاه HPLC حاصل از درختان بالغ سه صدم درصد بود، که به‌مراتب بیشتر (۳ برابر) از میزان بتولین القایی کالوس‌های حاصل از نهال‌های این گونه یعنی یک صدم درصد بود. به‌طور کلی هرچه سن درخت بیشتر باشد میزان ماده مؤثره موجود در آن بیشتر خواهد بود. با توجه به اینکه عوامل متعددی از تیمارهای نور و تاریکی، تغییرات هورمونی، افزایش محرک‌های زیستی و غیرزیستی و غیره سبب تغییراتی در میزان متابولیت ثانویه در درختان و گیاهان می‌شود، مناسب است تحقیقات تکمیلی دیگری در جهت افزایش این مواد مؤثره انجام گیرد تا بتوان از این منابع با ارزش طبیعی و دارویی کشورمان به‌صورت بهینه با استفاده از تکنولوژی روز بدون قطع آنها در جنگل بهره‌مند شد.

منابع مورد استفاده

- Abbasi Kajani, A., Mophid, M.R. and Otroshy, M., 2012. Investigation of the effects of basal medium type on the production of anti-cancer drug Taxol from cell culture of *Taxus baccataL*. Journal of Plant Biology, 4:83-88.
- Abdirad, S., Rezanejad, F.K., and Kalantari, K.F., 2012. The effect of different light intensities on callogenesis and calli pigments content of shoot and floral explants of *Rosa damascena* Mill and *Rosa miniature*, Agricultural Biotechnology, 3: 43-65.
- Arbabian, S., and Moghanlo, M., 2009. Evaluation of the type and concentration of some of hormone treatments on tissue culture of endangered species *Astragalus fridae* Rech. F. Journal of Developmental Biology, 1: 25-34.
- Alizadeh, M., 2012. A User Manual Plant Tissue Culture and Micropropagation. Norouzi Pob. Iran, 322pp.
- Barzekar, G.H.A., 2005. Parks and Forest Recreation. (Positioning and Projection). Publicist Council of Agriculture and Natural Resources, 231 p.
- Dzubak, P., Hajduch, M., Vydra, D., Hustova, A., Kvasnica, M., Biedermann, D., Markova, L., Urban, M. and Sarek, J., 2006. Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic Implications. National Production Report, 23- 394.
- Fan, GZ. Li, XC. Wang, XD., and Zhan, YG., 2010. Chitosan activates defense responses and triterpenoid production in cell suspension cultures of *Betula platyphylla* suk. Afr. Journal Biotechnol., 9:2816-2820.

– Nandagopal, S., and Ranjitha Kumari, B.D., 2007. Effectiveness of auxin induced *in vitro* root culture in chicory. Journal Central European Agriculture, 73-80.
– Nazari, J., Payam Noor,V., Alizadeh, M. and Ghaseme Bezdi, K., 2012. Optimization of culture medium for *Betula callogenesis* by leaf explants. 3th International Conference on Invironmental Challenges and Dendrochronology. Iran, Sari, 9p.
– Niimi, Y., 1995. *In vitro* propagation and *post-in vitro* establishment of bulblets of *Lillium japonicum* Thunb. Journal of Japan Soc. Horticulturae Science, 63: 843-852.
– Omidbaige, R., 2000. Production and Processing of Medicinal Plants. Publication of Astan Quds Razavi, Vol 1. 283p.
– Omidbaige, R., 2005. Processing of Medicinal Plants. Publication of Astan Quds Razavi, Vol 1. 347p.
– Payam Noor, V., Nazari, J. and Alizadeh, M., 2012. Callogenesis of Birch and evaluation of Betulin compared to other vegetative organs of the tree using HPLC techniques. Vice Presidency for Research and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, 22p.
– Prince, P., Sharma, R.K., Roy, B. and Anurag, D.G., 2010. Pentacyclic Triterpinoids from *Betula utilis* and *Hyptis suaveolens*. International Journal Pharmaceutical Technology Research, 2: 1558-1532.
– Qun, Zh., 2012. Tissue culture of endangered plant *Betula microphylla* var. *paludosa* and its pilotscale in shanghai area. Journal of Shanghai Jiaotong University-Agricultural Science, 30:50-54.
– Rao, S.R., and Ravishankar, G.A., 2002. Plant cell culture: chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology Advances, 20:101-153.
– Rezaei, A., Ghanati, F., Behmanesh, M., Safari, M. and Sharafi, Y., 2013. Synergistic Accumulative effect of salicylic acid and dibutyl phthalate on paclitaxel production in *Corylus avellana* cell culture. Journal of Stress Physiology & Biochemistry, 9: 157-168.
– Rezanejad, F. and Tarrahi, R., 2013. The effect of light and plant growth regulators on callogenesis and *Anthocyanin accumulation* in calli of different explants in *Rosa gallica*. Journal of Plant Research, 26: 12 p.
– Fan, GZ., 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.
– Sardrood, S., Ghamari Zare, A., Assareh, M.H., Shahrzad, Sh., and Bakhshi Kkhaniki, Gh., 2012. Effects of TDZ and 2,4-D growth regulators on callus production and organogenesis in *Eucalyptus rubida*. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 20: 313-304.
– Hasanpoor, 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.
– Jeong, J. H., 1996. *In vitro* propagation of bulb scale section of several Korean native lilies. Acta Horticulturae, 414:269-276.
– Kontseva, I.I., 2009. Long-term storage of birch micro-plants in tissue culture. Journal of Lesovedenie, 5:50-56.
– 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, 137 p.
– Kwan-Long, L., and Chin-Ri, H., 1975. Effects of light on the cultured rice roots. Bot. Bull. Academia Sinica, 16 : 45-54.
– Li, T.S.C., 2002. Chinese and related North American herbs: Phytopharmacology and Therapeutic Values. Boca Raton: CRC Press, 616p.
– Magnusson, V.A., Castillo, C.M. and Dai, W., 2009. Micropropagation of two elite birch species through shoot proliferation and regeneration. Paper Acta Horticulturae, 812:223-230.
– Memar Moshrefi, M., Moieni, A. and Tavasolian, I., 2002. Effects of plant growth regulators NAA, BAP different explants scale photoperiod on tissue culture of *Lilium ledebourii* Boiss. Journal of Agricultural Sciences Iranian, 4: 253-261.
– Mulabagal, V. and Tsey, H., 2004. Plant cell cultures-an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. International Journal of Applied Science and Engineering, 2:29-48.

– Zhao, G.L., Yan, W.D. and Cao, D., 2007. Simultaneous determination of betulin and betulinic acid in white birch bark using RP–HPLC. Journal Pharm. Biomed. Anal, 43: 959–962.
– Zare, H., Akarinia, M., Hosseini, S.M., 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 Botany, 16: 237-241.
– Magnusson, V.A., Castillo, C.M. and Dai, W., 2009. Micropropagation of two elite birch species through shoot proliferation and regeneration. Paper Acta Horticulturae (ISHS), 812: 223-230.
– Kordalivand, A., 2012. Genetic diversity of Birch based on morphology of leat and fruit. Thesis submitted in partial fulfillment of the requirements. For the degree of M.Sc. in. Silviculture and Forest Ecology, 137p.
– Sabeti, H., 2005. Trees and Shrubs of Iran. Yazd University, 164-163.
– Toolit, S.M., Abdoli, M., Ghorbani Meshkin, M., Khalighi Sikarodi, F. and Omidi, M., 2008. Investigation of in vitro culture of *Ginkgo biloba* L by tissue culture of different explants. Journal of Medicinal Plants, 8:29: 156-163.
– Tripathi, L. and Tripathi, J.N., 2003. Role of biotechnology in medicinal plants. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2: 243 – 253.
– Xiaomin, S., Zheng, Ch., Jing, W., Zaikang, T., Meifei, Li. and Min, Zh., 2012. Establishment of leaf-explants regeneration system of *Betula luminifera* H. Winkl. Journal of Northwest A & F University-Natural Science Edition, 40: 61-67.
– Yong-Qin, Ch., Fei, Y., Min, C. and Jian-Xio, L., 2003. Effects of amino acids, nitrate, and ammonium on the growth and taxol production in cell cultures of *Taxus yunnanensis.* Plant Growth Regulation, 41:265-268.

Effect of trees age and light on *Betula litwinowii* callogenesis and betulin induced *in vitro* conditions

N. Mehrirad[1], V. Payam Noor[2] and J. Nazari[3]

1 – M.Sc. Student, Forestry Faculty, Agricultural Sciences and Natural Resources, University of Gorgan, I.R.Iran,
Email: nastaranmehrirad91@yahoo.com
2 – Assis. Prof., Forestry Faculty, Agricultural Sciences and Natural Resources, University of Gorgan, I.R.Iran.
3 – Ph.D. Student, Forestry Faculty of Agricultural Sciences and Natural Resources University of Gorgan, I.R.Iran.

Received: 30.06.2014 Accepted: 29.04.2015

Abstract

Plants due to their secondary metabolites have world value and wide applications in various fields of technology. Birch genus (*Betula*) contains secondary metabolites, especially terpenes which have preventive properties for skin cancer, HIV virus, hepatitis, and malaria. Finding a suitable alternative for pharmaceutical industry is essential due to the limited mother trees and danger of extinction of the mentioned species. Considering the problems associated with crop production and forestry, other methods such as *in vitro* plantation by applying triggers to obtain the herbal ingredients can be used. The purpose of this research was to evaluate the effects of light and dark on Betulin production in four month calli of *in vitro* produced *B. litwinowii*. Explants were prepared by leaves of 25 years old mother plants and 5 years old seedlings during summer from Sangdeh site. They were cultured on WPM plantation medium at light and dark conditions. For analysis of callus production a t- independent test with 5 replicates was used, Analysis of Betulin rate was used using a calibration curve that was obtained by injection of standard solutions using HPLC system. Results showed that light conditions (16 hours light and 8 hours dark) with white light intensity of 1000-1500 lux were essential for callogenesis explants and Betulin quantity was higher in explants prepared from older mother plants.

Keywords: *Betula*, light conditions, secondary metabolites, tissue culture, WPM medium