نشریه پژوهش‌های علوم و فناوری چوب و جنگل
جلد بیست و پنجم، شماره سوم، ۱۳۹۷
http://jwfst.gau.ac.ir
DOI: 10.22069/jwfst.2018. 14432.1723

اثر میزبان‌های مختلف بر تغییرات متابولیت‌های ثانویه داروواش اروپایی (*Viscum album* L.)

***وحیده پیام‌نور[۱]، حلیمه امیریان[۲] و فرزانه رزمجو[۲]**

[۱]دانشیار دانشکده علوم جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران،

[۲]دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد، دانشکده علوم جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹٦/۰۹/۲٦؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰٦/۰٤

چکیده

سابقه و هدف: داروواش‌ها گروهی قابل توجه و متنوع از نهاندانگان‌اند که انگل شاخه‌ها محسوب شده و دارای طیف گسترده‌ای از میزبان‌ها بوده و محدوده پراکنش بسیار وسیعی در دنیا داشته و ترکیبات مؤثره زیادی در خود دارند. با توجه به اینکه مقدار و نوع این ترکیبات در گیاهان به عوامل بسیار زیاد محیطی و ژنتیکی وابسته است، در تحقیق حاضر اثر میزبان‌های مختلف شامل انجیلی، ممرز، توسکای قشلاقی و صنوبر بر تغییرات متابولیت‌های ثانویه فنل، فلاونوئید، خواص‌آنتی‌اکسیدانی، بتولین و بتولینیک اسید در داروواش اروپایی بررسی شده است.

مواد و روش‌ها: نمونه‌برداری برای این مطالعه آزمایشگاهی در اواخر شهریور ماه ۹٤ از داروواش‌های میزبانی شده توسط گونه‌های انجیلی، صنوبر، ممرز و توسکا قشلاقی در ۳ تکرار در نقاط پایین‌بند تا میان‌بند طرح جنگلداری دکتر بهرام‌نیا واقع در محدوده جنگل شصت کلاته گرگان انجام و سپس نمونه‌ها خشک، آسیاب و عصاره‌گیری با سه حلال اتانول، متانول و استون صورت گرفت. پس از عصاره‌گیری، فرایند آزمایشات موردنیاز طی شد و داده‌های به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد میزبان‌های مختلف بر ترکیبات مؤثره داروواش اروپایی اثرات معناداری دارند. مطابق نتایج به دست آمده بیشترین میزان آنتی‌اکسیدان (۹۳/۰۳ درصد رادیکال آزاد) و فنل کل (٤/٤٥ میلی‌گرم برگرم وزن خشک) به ترتیب مربوط به عصاره اتانولی ساقه و برگ داروواش میزبانی شده توسط گونه انجیلی، و بیشترین میزان فلاونوئید (۲/۰۷ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) مربوط به عصاره اتانولی ساقه داروواشی با میزبانی گونه صنوبر می‌باشد. بیشترین میزان بتولین (۱٤۸/۳ میلی‌گرم بر گرم) در برگ داروش موجود بر میزبان گونه ممرز اندازه‌گیری شد. بیشترین مقدار بتولینیک‌اسید ۲۸٦/۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود که در اندام ساقه داروواش با میزبانی گونه صنوبر به‌دست آمد.

نتیجه‌گیری: نتایج حاکی از آن است که درخت میزبان می‌تواند نقش کلیدی بر میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی و خواص آنتی‌اکسیدانی برگ و ساقه گیاه نیمه انگل داروواش بگذارد. از طرفی وجود این متابولیت‌های ثانویه با ارزش دارویی و حتی صنعتی در این گیاه لزوم توجه ویژه را بر این‌گونه باارزش مورد تأکید قرار می‌دهد. با توجه به این‌که

*مسئول مکاتبه: Mnoori56@gmail.com

دو ماده مؤثره ضد سرطانی بتولین و بتولینیک‌اسید به لحاظ دارویی ارزش زیاد و در عین حال قیمت بالایی دارند می‌توان برای این منظور، از داروش‌های میزبانی شده با ممرز و صنوبر بهره برد.

واژه‌های کلیدی: بتولین، بتولینیک اسید، متابولیت‌های ثانویه، میزبان‌های مختلف، ***Viscum album***

مقدمه

داروش اروپایی با نام علمی *Viscum album* L. یک گونه از گروه متنوع خانواده داروش‌ها (Viscaceae) می‌باشد. داروش‌ها (Mistletoes) از گونه‌های بسیار جذاب در بین گیاهان گل‌دار نهاندانه محسوب شده و در زمره گیاهان نیمه انگل تا تمام انگل طبقه‌بندی شده و بر روی شاخه‌های میزبان‌های درختی و درختچه‌ای زیست می‌کنند (۱۲). همیشه سبز و فاقد ریشه حقیقی‌اند و از طریق اندام نفوذی و ریشه مانندی (مکینه یا هاستریوم[1]) به شاخه‌ها و تاج زنده درختان و درختچه‌ها در جنگل‌ها و درخت‌زارها چسبیده و مدت زیادی از زندگی خود را با میزبان سپری و آب و مواد معدنی (در گونه‌های نیمه انگل) ومواد قندی (در گونه‌های تمام انگل) موردنیاز خود را جهت انجام فرایندهای سنتزی خود از این طریق جذب می‌کنند (۱٤ و ۳۷). هاستریوم با ترکیبی از نیروهای مکانیکی و تجزیه آنزیمی به داخل اپیدرم و پوست میزبان نفوذ نموده و رویش خود را تا جایی ادامه می‌دهد که به آب و مواد غیر آلی در آوندهای چوبی میزبان دست یابد (۳۷). پس از اینکه داروش‌ها آب و املاح خود را با توسعه مکینه از آوندهای میزبان جذب نمودند طی فرایند فتوسنتز به تولید قندهای خود می‌پردازند (۱۹).

داروش‌ها دارای طیف گسترده‌ای از میزبان‌ها بوده و محدوده پراکنش بسیار وسیعی در دنیا دارد. این‌گونه از داروش‌ها در مناطق مختلف اروپا، آسیا و از جمله ایران یافت می‌شوند (۱۵، ۱۱). داروش اروپایی در ایران بیشتر بر روی درختان ممرز، انجیلی، ملج، اوجا، نمدار، پلت، آلوچه، توسکا، سفید پلت، جل و گاهی هم بید و صنوبر و گردو می‌روید (۱٦، ۱۲، ۳۲). این‌گونه بر روی شاخه گیاه میزبان به‌صورت کلنی‌های ۵۰-٦۰ سانتی‌متری دیده می‌شود، دوپایه است و برگ‌های کامل و چرمی دارد. دیده شده حضور داروش‌ها باعث افزایش پتاسیم و کاهش نیتروژن به ترتیب در شاخه و برگ میزبان می‌شود (۱٤). علاوه‌بر آن میزان فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، کاتالاز و آسکوربات پراکسید از میزبان افزایش می‌یابد (۸). در بسیاری از مواقع طول شاخه، طول ریشه، قطر یقه، زی‌توده، تعداد برگ و کارایی رویش نهال‌های آلوده به داروش نیز کاهش می‌یابد (۱۷).

متابولیت‌های ثانویه در سلول‌های مختلف گیاه ذخیره شده و به‌عنوان اسانس و عصاره با به کارگیری روش‌های مختلف قابل استخراج هستند و در عین حال مقدار و حتی نوع این متابولیت‌ها در گیاهان با توجه به نوع گونه، شرایط محیطی و جغرافیائی محل رویش متفاوت است. به‌نظر می‌رسد بسیاری از ترکیبات ثانویه گیاه میزبان توسط داروش‌ها جذب می‌شود، مضاف بر این‌که گونه‌های مختلف به‌طور اختصاصی نیز ترکیبات ویژه‌ایی در خود دارند. عصاره ***V. album*** به‌طور گسترده‌ای حاوی تری ترپن‌های پنتاکسیل مانند بتولین و بتولینیک اسید می‌باشد که اثرات ضد سرطانی دارند (۱۳).

ماشیتو و همکاران، ۲۰۱۱ اظهار داشتند بتولینیک اسید و مشتقات آن خاصیت سیتوتوکسیسیتی در برابر انواع تومور و خطوط سلول‌های سرطانی از خود

1- *Haustorium*

نشان داده‌اند. یافته‌های آن‌ها نشان می‌دهد که بتولینیک اسید به‌عنوان یک عامل ایمنی است که در بالا بردن سیستم ایمنی بدن مفید عمل می‌کند (۲۳). مشخص شده عصاره داروش می‌تواند رادیکال‌های آزاد اکسیژن تولید شده در طی رادیوتراپی و شیمی درمانی را سرکوب کند. جاگر و همکاران، ۲۰۰۹ میزان بتولینیک اسید را در شاخه سبز داروش حدود ۰/۰۵ گرم در صدگرم ماده خشک گزارش کردند (۱۳). در شاخه سبز و برگ داروش، ماده ضد سرطانی بتولین نیز دیده شده است (۹). طبق تحقیقی که ویکاس و همکاران، ۲۰۱۱ بر روی میزان بتولینیک اسید در داروش‌هایی با میزبان‌های مختلف انجام دادند در داروش‌هایی با میزبان‌های کرکو[1]، شالک[2]، اقاقیا[3] بتولینیک اسید یافت نشد، اما عصاره برگ زبان گنجشک[4]، (۰/۰۳ ± ۲/۳۵ میکروگرم بر گرم ماده خشک) بتولینیک اسید دارد. ساقه و برگ سیب[5]، به‌ترتیب (۰/۰۵±۲/۰۵ و ۰/۰۲±۱/۸۷ میکروگرم در گرم ماده خشک) بتولینیک اسید دارند. در پژوهشی دیگر فعالیت آنتی‌اکسیدانی داروش تحت تأثیر فصول و میزبان‌های مختلف زبان گنجشک، شالک، اقاقیا، کرکو و سیب تحقیقاتی انجام دادند، نتایج نشان داد که داروش میزبانی شده با اقاقیا دارای بالاترین سطح از فعالیت آنتی‌اکسیدانی بود، این محققین اذعان داشتند فعالیت آنتی‌اکسیدانی بین برگ و ساقه داروش برداشت شده از درختان مختلف را می‌توان به عوامل محیطی مانند آب و هوا و درجه حرارت نسبت داد که به‌طور قابل توجهی می‌توانند باعث تجمع اجزای آنتی‌اکسیدانی متفاوت در بافت‌های گیاهی شود (۳۱). همین محققین در بررسی دیگری در مورد بررسی فعالیت زیستی و خواص آنتی‌اکسیدانی داروش با میزبان‌های مختلف به این نتیجه رسیدند که داروش‌های موجود بر میزبان زبان گنجشک دارای بالاترین سطح اسیدهای فنلی کل (۱۰۸/۶۸ میکرو گرم در ماده خشک) و داروش موجود بر میزبان سیب پایین‌ترین سطح از پلی فنل (۳۹/۳۷ میکرو گرم) را دارا می‌باشد. همچنین عصاره ساقه داروش سطوح فنلی پایین‌تری نسبت به عصاره برگ آن دارد (۳۱). تحقیق حاضر جهت بررسی اثر میزبان‌های مختلف (انجیلی، صنوبر، ممرز و توسکا ییلاقی) بر تغییرات برخی ترکیبات ثانویه (فنل، فلاونوئید، خواص آنتی‌اکسیدان، بتولین و بتولینیک اسید) گونه *V. album* انجام شده است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری برای این مطالعه آزمایشگاهی، در اواخر شهریور ماه سال ۱۳۹٤ از بافت‌های رویشی داروش‌های موجود بر روی پایه‌های بالغ میزبان‌های انجیلی، صنوبر، ممرز و توسکای قشلاقی در ۳ تکرار در نقاط پایین‌بند تا میان‌بند جنگل شصت کلاته (طرح دکتر بهرام‌نیا- گرگان) انجام شد. نمونه‌ها پس از انتقال به محیط آزمایشگاه به‌مدت ۱ ماه در دمای اتاق خشک و سپس برگ و ساقه به‌صورت مجزا آسیاب شد. جهت عصاره‌گیری، مقدار ۱ گرم از هر نمونه در ۱۰ میلی‌لیتر از حلال‌های اتانول، متانول و استون مخلوط و به‌مدت ۲٤ ساعت بر روی شیکر قرار گرفت. سپس به‌مدت ۵ دقیقه در ۳۵۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد تا فاز عصاره از مواد جامد جدا شود. سپس عصاره‌های حاصل در ظروف مخصوص در دمای ۱۸- درجه نگهداری شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH: با استفاده از روش به دام‌اندازی رایکال‌های آزاد، ابتدا دو میلی‌لیتر DPPH (دی فنیل پیکریل

1- *Acer campester*
2- *Populus nigra*
3- *Robinia pseudocacica*
4- *Fraxinus excelsior*
5- *Malus domestica*

هیدرازیل) در ظرف تهیه محلول قرار گرفت و به آن دو میلی‌لیتر عصاره حلال‌های اتانولی، متانولی و استونی اضافه و به شدت تکان داده شد. محلول آماده شده به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار گرفت و میزان جذب آن در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت و در نهایت با استفاده از رابطه زیر درصد به دام‌اندازی رادیکال‌های آزاد DPPH اندازه‌گیری شد و از رابطه ۱ محاسبه گردید (۲٤).

Equation 1: $I\% = [(A_{blank}-A_{sample})/A_{blank}] \times 100$

A_{blank}: جذب نمونه شاهد (بدون عصاره گیاهی)

A_{sample}: جذب نمونه

اندازه‌گیری میزان فنل کل: مقدار ترکیبات فنل‌های کل با معرف فولین- سیکالتو تعیین شد. ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین به ۲۰ میکرولیتر از عصاره‌های گیاهی، اضافه شد. پس از اضافه کردن ۱/۱٦ میلی‌لیتر آب مقطر به محلول آماده شده، نمونه‌ها ۵ دقیقه در تاریکی قرار گرفتند. پس از آن ۳۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم ۲۰ درصد اضافه و به‌مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و حمام بخار توام (بن‌ماری) ٤۰ درجه قرار گرفتند. جذب نمونه‌ها در طول موج ۷٦۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت و منحنی استاندارد توسط غلظت‌های مختلفی از گالیک اسید تهیه گردید (۲۲).

اندازه‌گیری میزان فلاونوئید کل: جهت اندازه‌گیری میزان فلاونوئید کل، ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره با حلال‌های مختلف، ۱/۵ میلی‌لیتر حلال ۸۰ درصدی، ۰/۱ میلی‌لیتر آلومینیوم کلرید، ۰/۱ میلی‌لیتر استات پتاسیم ۱ مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر ترکیب شده و محلول‌های آماده شده ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار گرفتند. جذب هر ترکیب واکنشی در ٤۱۵ نانومتر با دستگاه اسپکتوفتومتر اندازه‌گیری و منحنی استاندارد با محلول کوئرستین در غلظت‌های مختلف تهیه گردید.

تعیین مقدار بتولین و بتولینیک اسید: ۱۰ گرم از هر نمونه گیاه درواش توزین و با ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد مخصوص دستگاه HPLC مخلوط و به‌مدت ٤۸ ساعت بر روی شیکر مغناطیسی بدون حرارت قرار داده شد. پس از این مرحله به‌مدت ۱۲ دقیقه نمونه‌ها در حمام اولتراسونیک قرار گرفتند. عصاره‌ها از صافی عبور و جهت تزریق به دستگاه HPLC در آزمایشگاه نگهداری شدند. استاندارد بتولین و بتولینیک اسید از شرکت سیگما خریداری شد. غلظت‌های متفاوت از استاندارد بتولین و بتولینیک‌اسید جهت رسم منحنی استادارد آن، تهیه و به دستگاه HPLC تزریق و منحنی کالیبراسیون ترسیم گردید. با استفاده از معادله خط با ضریب همبستگی بالا حاصل از منحنی کالیبراسیون، غلظت بتولین و بتولینیک اسید در هر یک از نمونه‌ها با استفاده از مساحت سطح زیر پیک آن‌ها محاسبه گردید (۳۵).

تجزیه و تحلیل آماری: تجزیه و تحلیل داده‌ها بر اساس آزمایش فاکتوریل سه عاملی در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی انجام گرفت. جهت آنالیز داده‌های فنل و فلاونوئید و خواص آنتی‌اکسیدان با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ و مقایسه میانگین‌ها از آزمون Tukey HSD استفاده شد. جهت آنالیز و تعیین سطح زیر پیک منحنی بتولین و بتولینیک اسید، از نرم‌افزار IZCO استفاده شد و منحنی کالیبراسیون ترسیم گردید.

نتایج

در جدول ۱ تجزیه واریانس اثر گونه میزبان، اندام و حلال‌های مختلف بر مقادیر فنل، فلاونوئید و خواص آنتی‌اکسیدان درواش ارائه شده است. مطابق جدول، اثر گونه میزبان بر این مقادیر در سطح احتمال ۱ درصد اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد. در بین اندام‌های مورد بررسی در میزان فنل و فلاونوئید اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد و برای مقادیر

آنتی‌اکسیدان این اختلاف در سطح ۱ درصد اندازه‌گیری شد. تجزیه واریانس اثر حلال بر میزان فنل، غیر معنی‌دار، برای مقادیر فلاونوئید اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد و برای خواص آنتی‌اکسیدان این اختلاف در سطح ۱ درصد اندازه‌گیری شد. اثرات متقابل میزبان، اندام و حلال در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دار برای فنل و خواص آنتی‌اکسیدان نشان می‌دهد ولی در مقادیر فلاونوئید اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.

جدول ۱- تجزیه واریانس مقادیر فنل، فلاونوئید و خواص آنتی‌اکسیدانی داروواش در گونه، اندام و حلال‌های مختلف.

Table 1. Analysis of variance related of phenols, flavonoids and antioxidant properties of mistletoe in different species, organs and solvents

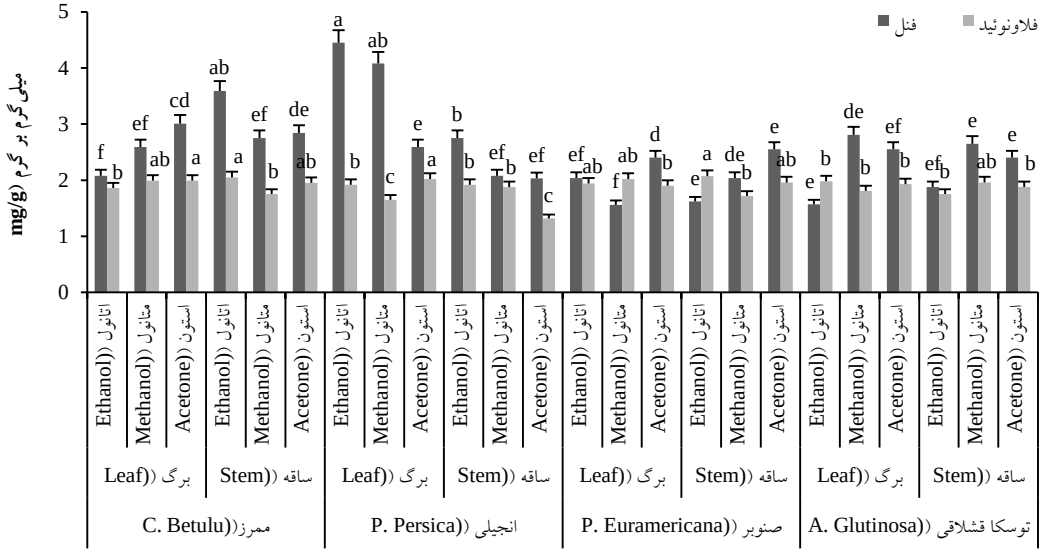
فعالیت آنتی‌اکسیدانی Antioxidant activity	فلاونوئیدکل Total flavonoids	فنل کل † Total phenol	درجه آزادی df	منبع تغییرات Source of variance
169.005**	0.0876**	347.64**	3	میزبان Host tree
1181.79**	0.08*	87.052*	1	اندام Organ
2848.169**	0.052*	0.02593^{ns}	2	حلال Solvent
170.761**	0.016^{ns}	3.289**	3	میزبان × اندام Organ × Host tree
658.858**	0.031^{ns}	179.911**	6	میزبان×حلال Solvent ×Host tree
9.853^{ns}	0.068**	13.144^{ns}	2	اندام×حلال Solvent ×Organ
600.240**	0.162**	72.911**	6	میزبان×اندام×حلال Solvent ×Organ ×Host tree
11.32	0.016	16.91	46	خطا Error
-	-	-	71	کل Total

** معنی‌داری در سطح یک درصد، * معنی‌داری در سطح پنج درصد و ns عدم وجود رابطه معنی‌دار آماری.

† کلیه مقادیر ارائه شده در جدول برای متغییرها، میانگین مربعات می‌باشد.

† Presented values in the table are related to mean square.

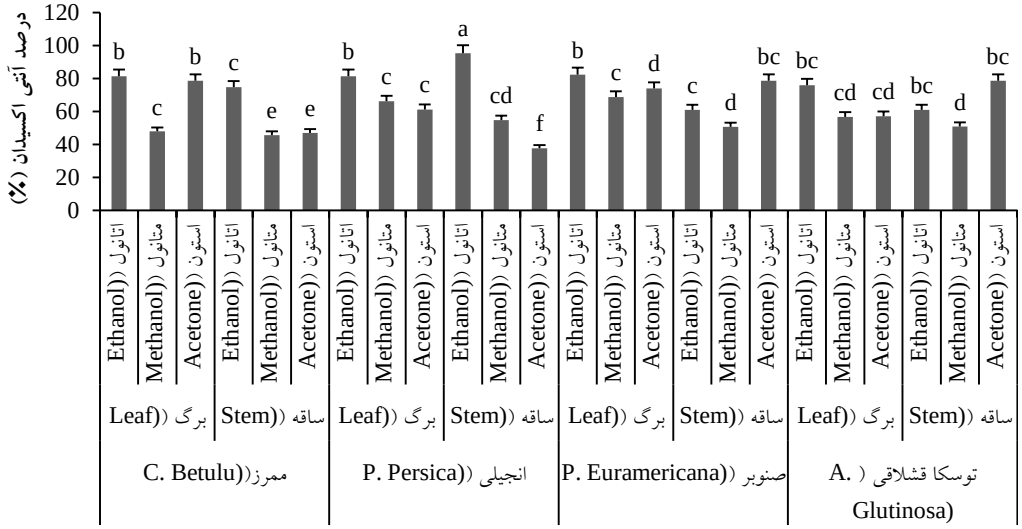
در شکل ۱ مقایسه میانگین اثرات متقابل گونه میزبان، اندام و حلال بر میزان فنل و فلاونوئید داروواش اروپایی بر میزبان‌های مختلف ارائه شده است. بر همین اساس بیشترین میزان فنل اندازه‌گیری شده (٤/٤٥ میلی‌گرم بر گرم) مربوط به عصاره اتانولی برگ داروواش موجود بر میزبان انجیلی می‌باشد که از لحاظ آماری با میزان فنل عصاره متانولی برگ داروواش موجود بر میزبان انجیلی تفاوت معنی‌دار ندارد. مطابق همین جدول بیشترین میزان فلاونویید ۲/۰۷ میلی‌گرم بر گرم مربوط به عصاره اتانولی ساقه داروواش موجود بر میزبان صنوبر می‌باشد که از لحاظ آماری با سایر تیمارهای ارائه شده در جدول اختلاف معنی‌داری نشان نداد.



شکل ۱- مقایسه میانگین اثر میزبان، اندام و حلال بر میزان فنل، فلاونوئید درواش اروپایی.

Figure 1. Mean Comparison of host, Organ and solvent effects of the average of phenol, flavonoids properties of *Viscum album* L.

بیشترین میزان خواص آنتی‌اکسیدانی (۹۵/۰۳ درصد) مربوط به عصاره اتانولی ساقه درواش موجود بر میزبان انجیلی می‌باشد. مقادیر آنتی‌اکسیدان در گروه‌های مختلفی قرار گرفته‌اند که در شکل ۲ مشاهده می‌شود.



شکل ۱- مقایسه میانگین اثر میزبان، اندام و حلال بر خواص آنتی‌اکسیدانی درواش اروپایی.

Figure1. Mean comparison of host, Organ and solvent effects on the values of antioxidant properties of *Viscum album* L

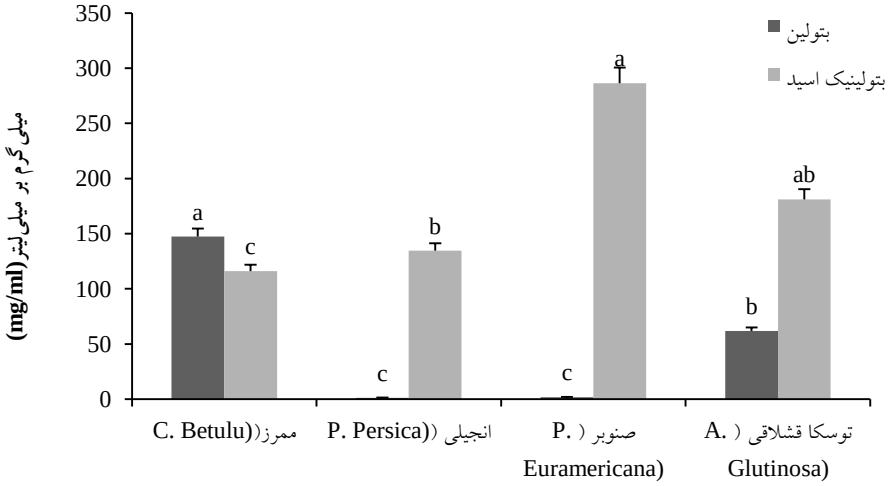
همان‌طور که جدول ۲ نشان می‌دهد، تجزیه واریانس همه تیمارهای اعمال شده بر میزان بتولین و بتولینیک اسید درواش، اختلاف معنی‌داری را در سطح احتمال ۱ درصد نشان می‌دهد.

جدول ۲- تجزیه واریانس مقادیر بتولین و بتولینیک اسید داروش در میزبان‌ها و اندام‌های مختلف.

Table 1. Analysis of variance related of Betulin and Betulonic acid of mistletoe in different species and organs

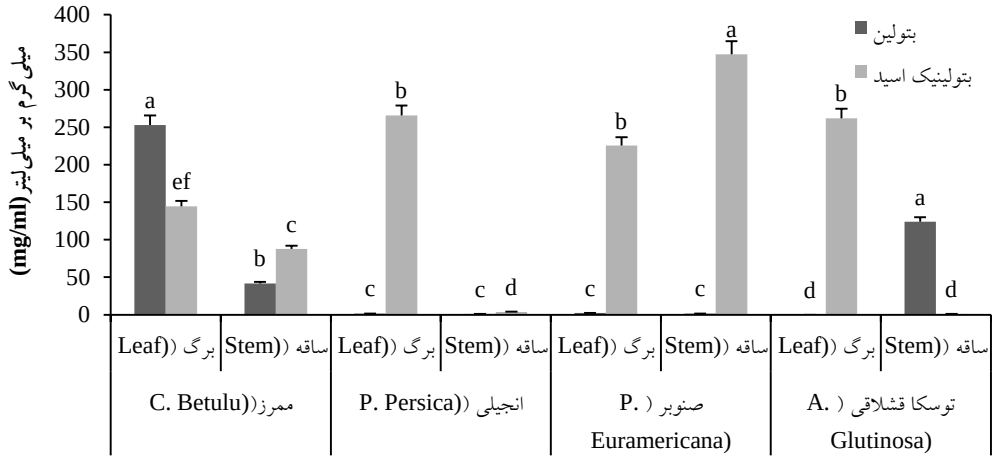
منبع تغییرات Source of Change	درجه آزادی DF	میانگین مربعات Mean Square	
		بتولین Betulin	بتولینیک اسید Betulinic Acid
میزبان Host tree	3	5263252**	393310**
اندام Organ	1	6600993**	444083**
میزبان × اندام Host tree*Organ	3	219674**	287747**
خطا Error	14	1826	8125
کل Total	23	-	-

همان‌طور که شکل ۳ مشاهده می‌شود بیشترین میزان بتولین با ۱۴۷/۴ میلی‌گرم بر گرم و بتولینیک اسید با ۲۸۶/۳ میلی‌گرم بر گرم به‌ترتیب در داروش موجود بر میزبان ممرز و صنوبر اندازه‌گیری شد.



شکل ۳- مقایسه اثر میزبان‌های مختلف بر میزان بتولین و بتولینیک اسید.

نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل گونه میزبان و اندام بر میزان بتولین و بتولینیک اسید داروش در شکل ٤ ارائه شده است. بر همین اساس بیشترین میزان بتولین (۲۵۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) در برگ داروش موجود بر میزبان ممرز و کمترین مقدار آن که صفر بود در اندام برگ و به میزبانی گونه توسکا قشلاقی یافت شد. همچنین مقادیر میزان بتولینیک اسید اندازه‌گیری شده در کلاسه‌های مختلفی جای گرفت که بیشترین مقدار آن ۳٤۷ میلی‌گرم در میلی‌لیتر که در اندام ساقه داروش موجود بر میزبان صنوبر به‌دست آمد.



شکل ٤- مقایسه میانگین اثر میزبان و اندام بر مقادیر بتولین و بتولینیک اسید داروواش (میلی بر میلی‌لیتر)

Figure 4. Mean comparison of host and Organ effects on Betulin and Betulonic acid of mistletoe (mg/ml) of *Viscum album* L.

بحث

فنل و فلاونوئیدها دسته‌ای از ترکیبات فیتوشیمیایی هستند که طی فرایند تمایز یابی سلول‌ها ایجاد می‌گردد. فعالیت بیولوژیکی متنوع این ترکیبات از جمله خواص ضد آلرژی، ضد باکتریال، ضد ویروس، ضد التهاب و گشاد کنندگی عروق آن‌ها در بسیاری از بررسی‌ها گزارش شده که بیشتر مربوط به حذف رادیکال‌های آزاد و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها می‌باشد (۹، ٦). در این تحقیق اثر میزبان‌های مختلف (ممرز، انجیلی، توسکای قشلاقی و صنوبر) بر تغییرات متابولیت‌های ثانویه داروواش اروپایی (*V. album*) در اندام‌های برگ و ساقه با سه حلال استون، اتانول و متانول مورد بررسی قرار گرفت. برای افزایش کارایی عمل استخراج، باید عوامل مؤثر در این مسیر شناسایی شود. ویژگی حلال‌ها بسته به غلظت و قطبیت آن‌ها، کمیت ترکیبات شیمیایی موجود در عصاره‌های گیاهی را تحت تأثیر قرار خواهد داد. مقادیر مربوط به متابولیت‌های زیست فعال ثانویه نمونه‌های عصاره‌گیری شده، ممکن است بسته به حلال‌های عصاره‌گیری استفاده شده، متفاوت باشند (۳٤). رایج‌ترین حلال‌های استفاده شده جهت استخراج متابولیت‌های ثانویه گیاهان، متانول، اتانول و آب هستند. برخی محققان از ترکیب حلال‌های مختلف برای کسب نتایج بهتر استفاده می‌کنند (۳۳). بر اساس نتایج به دست آمده بیشترین میزان فنل اندازه‌گیری شده (٤/٤٥ میلی‌گرم بر گرم) مربوط به عصاره اتانولی برگ داروواش موجود بر میزبان انجیلی می‌باشد که با میزان فنل عصاره متانولی آن اختلاف معنی‌دار ندارد. محققان در تحقیقی خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی داروواش موجود بر میزبان کاکائو و درختان بادام را در نیجریه مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد توانایی مهار رادیکال‌های آزاد داروواش با میزبان کاکائو بیشتر از داروواش موجود بر میزبان بادام است. در حقیقت میزان ترکیبات فنلی که خواص آنتی‌اکسیدانی را سبب می‌شوند به‌ترتیب ۱۸۲ میلی‌گرم در صد گرم و ۱٦۰ میلی‌گرم در صد گرم بود (۲٦). لوزکوویس و همکاران (۲۰۰۱) در بررسی ترکیبات فنلی موجود در عصاره داروواش موجود بر ٦ میزبان مختلف به این نتایج رسیدند که داروواش موجود بر میزبان *Malus domestica* دارای بیشترین میزان فنل (۱۷ میلی‌گرم در صد گرم) و ترکیب اصلی آن رزمارینیک اسید بود

و کمترین مقدار آن (۱۲/۳٤ میلی‌گرم در صد گرم) در داروا‌ش موجود بر میزبان *Populus nigra* ترکیب اصلی آن اسید کلروژنیک بود. با این حال ترشح این مواد وابستگی کامل به ژنتیک گونه‌ها دارد. برخی گونه‌ها متابولیت‌های ویژه و منحصر به فرد خود را دارند و برخی نیز مقادیر بالاتری از این متابولیت‌ها را نسبت به سایرین تولید می‌کنند (۲۰). بیشترین میزان فلاونویید اندازه‌گیری شده در این تحقیق (۲/۰۷ میلی‌گرم بر گرم) مربوط به عصاره اتانولی ساقه داروا‌ش موجود بر میزبان صنوبر می‌باشد. در بررسی که کاندرات، ۲۰۰۹ برروی محتوای فلاونوئید ۹ گیاه دارویی شامل داروا‌ش اروپایی انجام دادند غلظت کوئرستین و کامفرول در عصاره داروا‌ش بسیار کم و به‌ترتیب ۰/۲ و ۰/۱٦ میکرومول در وزن خشک برآورد شد (۳). عوامل بسیار زیادی از جمله اقلیم، خاک و ارتفاع، اختلاف در گونه‌های گیاهی، روش‌ها و حلال‌های استخراج و روش‌های مختلف اندازه‌گیری در میزان متابولیت‌های ثانویه از جمله فنل، فلاونوئید و خواص آنتی‌اکسیدانی دخالت دارند (۲۵). در این پژوهش بیشترین میزان آنتی‌اکسیدان (۹۵/۰۳ درصد) مربوط به عصاره اتانولی ساقه داروا‌ش موجود بر میزبان انجیلی می‌باشد. چوئی و همکاران، ۲۰۰۸ میزان خاصیت آنتی‌اکسیدانی در برگ‌های ممرز را ۳۳ درصد گزارش کردند. داهیجا و همکاران نیز در سال ۲۰۱٤ بیان کردند در برگ توسکا قشلاقی فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری نسبت به پوست آن وجود دارد (٤). در اغلب گیاهان، برگ‌ها منبع مهم تولید متابولیت‌های ثانویه با ارزش هستند (۲۹). سیمونا و همکاران، ۲۰۱۱ تفاوت در مقادیر آنتی‌اکسیدانی بین برگ وساقه داروا‌ش برداشت شده از میزبان‌های مختلف در فصول مختلف را به عوامل محیطی مانند آب و هوا و درجه حرارت مربوط دانستند (۳۱). بتولین نوعی تری‌ترپن و یکی از اولین محصولات طبیعی است که از گیاهان جداسازی شده است. این ماده در طب سنتی چینی برای درمان رماتیسم و دردهای عصبی از گیاهان جدا می‌شده است (۲۰۰۸). بتولینیک اسید نیز یک تری ترپن لوپئولی است که در نتیجه اکسیداسیون بتولین وجود آمده و در برابر توده‌های سرطانی نقش پیشگیری کننده (۱۸) و تخریب‌گری (۲۷) دارد. بیشترین میزان بتولین (۱٤۷/۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) در برگ داروا‌ش موجود بر میزبان ممرز و کمترین مقدار آن که صفر بود در اندام برگ و به میزبانی گونه توسکا قشلاقی اندازه‌گیری شد در حالی‌که میزان بتولینیک اسید در این گونه بسیار بالا (۲٦۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) بود. بیشترین مقدار بتولینیک‌اسید (۳٤۷ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) در ساقه داروا‌ش موجود بر میزبان صنوبر به‌دست آمد. رزمجو و همکاران، ۱۳۹۳ خواص آنتی‌اکسیدانی میزان فنول و فلاونوئید کل و همچنین دو ترپنوئید بتولین و بتولینیک‌اسید را در سه اندام برگ، شاخه و پوست گونه‌های توسکا ییلاقی، توسکا قشلاقی، ممرز، داغداغان، گردو، چنار، خرمندی و گلابی وحشی بررسی نمود. بیشترین خواص آنتی‌اکسیدانی در گونه ممرز و فنول و فلاونوئید کل در گلابی وحشی و بالاترین میزان بتولین و بتولینیک اسید به‌ترتیب در ساقه درختان توسکا قشلاقی و چنار مشاهده شد (۲۸). در نتایج تحقیق حاضر نیز بتولین استخراج شده از داروا‌ش موجود بر میزبان توسکای قشلاقی بالاتر از سایر موارد بوده است. بالا بودن میزان بتولین در توسکای قشلاقی توسط فلفولدی- گاوا و همکاران در سال ۲۰۱۲ نیز تأیید شده است تا جایی که این محققین آن‌را جایگزینی مناسب برای گونه توس به‌عنوان منبع بتولین معرفی می‌نمایند (۷). داروا‌ش (*V. album*) یک گیاه انگل فاقد ریشه حقیقی است که قادر به زیستن در خاک نیست و جهت تأمین بخشی از عناصر غذایی خود، برای انجام فرآیند

فتوسنتز نیازمند گیاه دیگری به نام میزبان بوده تا آب و عناصر غذایی موردنیاز خود را از آن به‌دست آورد (۱٤، ۳۷). درخت میزبان می‌تواند نقش کلیدی بر میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی و خواص آنتی‌اکسیدانی برگ و ساقه گیاه نیمه انگل درواش بگذارد. گسترش درواش‌ها در سال‌های اخیر در مناطق دارای درختان صنعتی و آسیب به پایه‌های مرغوب باعث شد در بسیاری موارد حکم حذف آن‌ها از جنگل‌ها صادر و حتی سوزانده شوند. اما به‌نظر می‌رسد با توجه به این‌که از درواش‌ها به‌عنوان محرک سیستم ایمنی، گیاهی با خواص ضد سرطانی (۲۱ و ۳٦) آنتی میکروبی و آنتی‌باکتریایی (۵) و همین‌طور آنتی‌ویروسی القا کنندگی آپوپتوز (۲) نام می‌برند و نتایج تحقیق حاضر نیز موید وجود متابولیت‌های ثانویه با ارزش است، لازم است با لحاظ تمهیداتی از لحاظ دارویی و حتی صنعتی مورد توجه ویژه قرار بگیرند. این مساله توسط محققین دیگری از جمله کرتولی‌نژاد و همکاران، ۲۰۰۷ نیز تأکید شده است (۱٤). امید است جامعه علمی کشور به‌این مهم دست یابد.

نتیجه‌گیری نهایی

نتایج حاکی از آن است که درخت میزبان می‌تواند نقش کلیدی بر میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی و خواص آنتی‌اکسیدانی برگ و ساقه گیاه نیمه انگل درواش (*Viscum album*) بگذارد. بیشترین میزان فنل و خواص‌آنتی‌اکسیدانی در داروش‌های با میزبان انجیلی، بیشترین مقدار فلاونوئید و بتولینیک اسید در درواش‌های با میزبان صنوبر و بیشترین بتولین در درواش با میزبان ممرز یافت شد. با توجه به این‌که این‌گونه در جنگل‌های شمال ایران به فراوانی یافت می‌شود، به‌نظر می‌رسد می‌تواند به‌عنوان یک گیاه دارویی با خواص متعدد برداشت و بهره‌برداری گردد (علی‌الخصوص در مورد دو ماده مؤثره ضد سرطانی بتولین و بتولینیک‌اسید که قیمت بالایی دارند) ضمن این‌که آسیب وارده از طریق درواش به جنگل‌های شمال که جنگل‌های تجاری ایران به‌شمار می‌روند، کمتر خواهد شد.

منابع

1- Aderbauera, B., Clausenb, P., Kershawc, O., and Melziga, M. 2008. In vitro and in vivo trypanocidal effect of lipophilic extracts of medicinal plants from Mali and Burkina Faso. Journal of Ethnopharmacology, 119: 225-231.

2- Büssing, A., and Schietzel, M. 1999. Apoptosisinducing properties of *Viscum album* L. extracts from different host trees, correlate with their content of toxic mistletoe lectins. Anticancer Research, 19: 23-28.

3- Condrat, D., Szabo M.R., Crisan, F., and Lupea, A.X. 2009. Antioxidant activity of some phanerogam plant extracts. Food Science and Technology Research, 15(1): 95-98.

4- Dahija, S., Čakar, J., Vidic, D., Maksimović, M., and Parić, A. 2014. Total phenolic and flavonoid contents, antioxidant and antimicrobial activities of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn., *Alnus incana* (L.) Moench and *Alnus viridis* (Chaix) DC. Extracts. Natural product research, 28(24): 2317-2320.

5- Deliorman, D., Ergun, F., Şener, B., and Palittapongarnpim, P. 2001. Evaluation of antimycobacterial activity of *Viscum album* subspecies. Pharmaceutical biology, 39: 381-383.

6- Durmaz, G., and Alpaslan, M. 2007. Antioxidant properties of roasted apricot (*Prunus armeniaca* L.) kernel. Food Chemistry, 100(2): 1177-1181.

7- Felfoldi-Gava, A., Szarka, S., Simandi, B., Blazics, B., Simon, B., and Kery, A.

2012. Supercritical fluid extraction of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. The Journal of supercritical fluids, 61: 55-61.

8- Ghorbanli, M., Sateyi, A., and Kaboli Qarehtapeh, H. 2012. Effect of two species of mistletoe (*Viscum album* L. and *Arceuthobium oxycedri* (D.C.) M. Bieb.) on activity of antioxidant enzyme of infected host species in Gorgan forests. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 28(2): 372-383. (In Persian)

9- Hayek, E., Jordis, U., Moche, W., and Sauter, F. 1989. A bicentennial of botulin Dhytochemistry, 28: 2229-2242.

10- Hoseini, A. 2013. Effect of *Viscum album* on some morphological characteristics and nutritional elements of *Quercus percica* leaves in Zagros forests. Journal of Natural Ecosystems of Iran, 4(2): 1-11. (In Persian)

11- Hosseini, S.M., Kartoolinejad, D., Mirnia, S.K., Tabibzadeh, Z., Akbarinia, M., and Shayanmehr, F. 2007. The effects of Viscum album L. on foliar weight and nutrients content of host trees in Caspian forests (Iran). Polish Journal of Ecology, 55(3): 579-583.

12- Hosseini, S.M., Kartoolinejad, D., Mirnia, S.K., Tabibzadeh, Z., Akbarinia, M., and Shayanmehr, F. 2008. The European mistletoe effects on leaves and nutritional elements of two host species in Hyrcanian forests. Silva Lusitana, 16(2): 229-237.

13- Jager, S., Trojan, H., Kopp, T., Laszczyk, M., and Scheffler, A. 2009. Pentacyclic Triterpene Distribution in Various Plants – Rich Sources for a New Group of Multi-Potent Plant Extracts. Molecules. 14: 2016-2031.

14- Kartoolinejad, D., Hosseini, S.M., Mirnia, S.K., Tabib Zadeh, G.Z., and Akbarinia, M. 2007. Effect of Mistletoe (*Viscum album*) on Macronutrients N, P, K and Ca of Hornbeam and Ironwood tree in Hyrcanian Forests. Iranian Journal of Biology, 20(1): 72-79.

15- Kartoolinejad, D., Hosseini, S.M., Mirnia, S.K., Akbarinia, M., and Shayanmehr, F. 2007. The relationship among infection intensity of *Viscum album* with some ecological parameters of host trees. International Journal of Environmental Research, 1(2): 143-149.

16- Kartoolinejad, D., Hosseini, S.M., Mirnia, S.K., Akbarinia, M., and Shayanmehr, F. 2008. Investigation of the Relationship between Infection Intensity to mistletoe (*Viscum album* L.) with Some Host Species Features in Nour Forest Park. Iranian Journal of Natural Resources, 61(1): 111-122. (In Persian)

17- Karunaichamy, K.S.T.K., and Paliwal, k., Arp, P.A. 1999. Biomass and nutrient dynamics of mistletoe (*Dendrophthoe falcate*) and Neem (*Azadirachta indica*) Seedlings. Rubber Research Institute of India, Kottayam. 8p.

18- Kvasnica, M., Sarek, J., Klinotova Dzubakb, P., and Hajduch, M. 2005. Synthesis of phthalates of betulinic acid and betulin with cytotoxic activity. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 13: 3447-3454.

19- Lopez, D.B.L., Ornelas, F.J., and Garcia-Franco, G. 2001. Mistletoe Infection of Trees Located at Fragmented Forest Edges in the Cloud Forests of Central Veracruz، Mexico. Journal of Forest Ecology and Management, 164: 293-302.

20- Luczkiewicz, M., Cisowski, W., Kaiser, P., Ochocka, R., and Piotrowski, A. 2001. Comparative analysis of phenolic acids in mistletoe plants from various hosts. Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research, 58: 373-379.

21- Maier, G., and Fiebig, H.H. 2002. Absence of tumor growth stimulation in a panel of 16 human tumor cell lines by mistletoe extracts in vitro. Anticancer Drugs, 13: 4. 373-379.

22- Mashayekhi, K., and Atashi, S. 2014. The analyzing methods in plant physiology. Sirang press. Gorgan, 310p. (In Persian)

23- Mashitoh, A., Yeap, S., Ali, A., Faujan, A., Suhaimi, M., Ng, M., Lam, H., and Alitheen, N. 2012. Immunomodulatory Effects of Betulinic Acid Isolation from the Bark of Melaleuca cajuputi. Pertanika Journal of Tropical

Agricultural Science, 35: 293-305.
24- Miliauskas, G., Venskutonis, P.R., and Van Beek, T.A. 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. Food chemistry. 85: 2 .231-237.
25- Mirzaei, A., Mohammadi, J., Mirzaei, N., and Mirzaei, M. 2011. The antioxidant Capacities and total phenolic contents of some medicinal plants in Iran. Journal of Fasa University of Medicinal Sciences, 1: 3. 160-166.
26- Oluwaseun, A.A., and Ganiyu, O. 2008. Antioxidant properties of methanolic extracts of mistletoes (*Viscum album*) from cocoa and cashew trees in Nigeria. African J Biotech 7: 17.3138-3142.
27- Qi-he, Ch., Ming-liang, F., Jin, L., Hai-feng, Z., Guo-qing, H., and Hui, R. 2009. Optimizations of ultrasonic-assisted extraction (UAE) of betulin from white birch bark using response surface methodology. Ultrasonics sonochemistry. 16: 599-604.
28- Razmju, F., Payamnoor, V., and Ebrahimi, P. 2015. Assesment of amount of betulin and betulinic acid and total phenolic and flavonoid contents and investigation on antioxidant properties of some species of Hyrcanian forest, Sirang press. 89p.
29- Roesenzweig, M.L., and Abransky, Z. 1993. How is diversity and productivity related In: Ricklefs RE, Schluter D (Eds) Species diversity in ecological communities, University of Chicago Press, Pp: 52–65.
30- Vicas, S.I., Rugina, D., Leopold, L., Pintea, A., and Socaciu, C. 2011. HPLC fingerprint of bioactive compounds and antioxidant activities of *Viscum album* from different host trees. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 39: 1. p.48.
31- Vicas, S., Rugină, D., and Socaciu, C. 2011. Comparative study about antioxidant activities of *Viscum album* from different host trees, harvested in different seasons- Journal of Medicinal Plants Research., 5: 11. 2237-2244.
32- Sabeti, H. 1994. Forest trees and Shrubs of Iran. University of Yazd Press. 527p. (In Persian)
33- Slinkard, K., and Singleton, V.L. 1977. Total phenol analysis; automation and comparison with manual methods. American Journal of Enology and Viticulture, 28: 49-55.
34- Tabari, S.H., Ghorbanli, M., Safaian, S.H., and Moosazade, S. 2013. Comparison of antioxidant and phytochemical properties of *Trametes gibbosa*. Journal of Cellular-Molecular biotechnology. 10: 3. 73-78.
35- 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 Pharmacology Biomedical Anal., 43: 959–962.
36- Zarkovic, K., Vukovic, T., Loncaric, I., Miletic, M., Zarkovic, K., Borovic, S., Cipak, A., Sabolovic, S., Konitzer, S., and Mang, S. 2001. An overview on anticancer activities of the *Viscum album* extract isorel. Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals. 16: 55-62.
37- Zuber, D. 2004. Biological flora of central Europe *Viscum album* L. Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants, 199(3): 181-203.

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
J. of Wood & Forest Science and Technology, Vol. 25 (3), 2018
http://jwfst.gau.ac.ir
DOI: 10.22069/jwfst.2018. 14432.1723

The effect of different hosts on secondary metabolites of European mistletoe (*Viscum album* L.)

***V. Payame noor[1], H. Amirian[2] and F. Razmjoo[2]**
[1]Associate Prof., Faculty of Forest Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran, [2]M.Sc., Graduated, Faculty of Forest Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran
Received: 12/17/2017; Accepted: 08/26/2018

Abstract

Background and Aim: The mmistletoes are a significant and diverse group of nasogastric species, which are parasite and have a wide range of hosts and a very wide range of distribution areas in the world. They have high levels of effective compounds. Considering the fact that the amount and type of these compounds in plants are highly dependent on environmental and genetic factors, the present study aims at the investigation of the effect of different hosts e.g Persian ironwood (*Parrotia persica*), hornbeam (*Carpinus betulus)*, alder (*Alnus glutinosa*) and poplar (*Populus euramericana*) on the mistletoe secondary metabolites (phenol, flavonoids, antioxidants, Betulin and Betulinic acid) changes.

Materials and Methods: Sampling for this laboratory study was carried out in late September in mistletoe hosted by Persian ironwood, Poplar, Hornbeam and alder, this species in 3 replications in lower points to the middle of the forest of Dr. Bahramnia forestry plantation located in Shast Kalateh forest of Gorgan. Then, Samples were dried, milled and extracted with three ethanol, methanol and acetone solvents. After the extraction, the required test process was performed and the obtained data were analyzed using SAS software.

Results: The results showed that different hosts had significant effects on effective compounds of mistletoe. According to the results, the highest levels of antioxidant (95.03% free radical) and phenol (4.45 mg/g dry weight) were related to the stem acetonic extract and leaves ethanolic extract of mistletoes hosted by Persian ironwood, respectively and the highest amount of flavonoids 2.07 mg/g is related to the mistletoe stem ethanolic extract hosted by alder species. The highest amount of betulin (147.3 mg/ml) was measured in the mistletoe leaf hosted by hornbeam species. The highest amount of betulonic acid was found to be 347 mg/ml, which was obtained from the mistletoe stems hosted by the poplar species.

Conclusion: The results indicate that the host trees can play a key role in the amount of secondary metabolites and the antioxidant properties of leaf and stem of the mistletoe half-parasite. The presence of these secondary metabolites with medicinal and even industrial value in this plant emphasizes the need for special attention on this valuable species. Due to the fact that two effective anti-cancer agents of betulin and betulinic acid are important and highly costly drugs, the mistletoes hosted with hornbeam and poplar can be used.

Keywords: Betulin, Betulonic acid, Various hosts, Secondary metabolites, *Viscum album*

*Corresponding author: Mnoori56@gmail.com