مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد ٤، شماره ٣، پاییز ١٣٩٢، ٢٥٠-٢٤٣

بررسی تولید آرتیمزینین در گیاه، کشت کالوس و کشت سوسپانسیون سلولی درمنه کوهی *Artemisia aucheri* Boiss

غلامرضا اصغری .Ph.D [1*]، سعید دوازده امامی .Ph.D [2]، محدثه حجتی .Pharm.D [1]، عاطفه شکوری . Pharm.D [1]،
زهرا ولیان .Ph.D [1]، متین اصغری .M.Sc [3]

١- مرکز تحقیقات علوم دارویی اصفهان، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان
٢- مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان، اصفهان
٣- گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
* پست الکترونیک نویسنده مسئول: asghari@pharm.mui.ac.ir

تاریخ دریافت: ١٣٩١/٥/٢١ تاریخ پذیرش: ١٣٩٢/٥/١

چکیده

هدف: آرتمیزینین مهمترین متابولیت جنس *Artemisia* می باشد. به‌دلیل اهمیت آرتمیزینین در درمان مالاریا، تولید آرتمیزینین در درمنه کوهی، کشت کالوس و کشت سوسپانسیون سلولی گیاه بررسی شد. همچنین توانایی تبدیلات بیوشیمیایی در جهت تولید آرتمیزینین در کشت سوسپانسیون گیاه ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها: با جمع آوری اندام هوایی گیاه و انتقال دانه رست‌ها به محیط کشت جامد موراشیگ و اسکوگ (MS) کالوس به‌دست آمد. کالوس های به محیط کشت مایع منتقل و سوسپانسیون سلولی حاصل شد. بررسی وجود آرتمیزینین در عصاره دی کلرومتانی اندام هوایی گیاه، کالوس و سوسپانسیون سلولی گیاه با روش TLC و GC انجام گرفت. کلسترول، بیزابولول و آرتمیزیاکتون به‌عنوان پیش‌ساز آرتمیزینین به سوسپانسیون افزوده و تولید آرتمیزینین با GC بررسی شد.

نتایج: محیط حاوی Kinetin($0/5\frac{mg}{l}$)، ٢-٤-D, ($0/5\frac{mg}{l}$)NAA($1\frac{mg}{l}$) و محیط حاوی BA($0/25\frac{mg}{l}$) و NAA($0/05\frac{mg}{l}$) برای رشد کالوس مناسب بود. نور تاثیر مثبت بر رشد کالوس داشت. بر اساس نتایج TLCو GC تولید آرتیمزینین در گیاه اثبات نشد ولی کالوس و سوسپانسیون سلولی، گیاه آرتمیزینین تولید کردند اما افزودن کلسترول، بیزابولول و آرتمیزیاکتون به سوسپانسیون سلولی درمنه کوهی بر تولید بیشتر آرتمیزینین تاثیر نداشت. به‌نظر می‌رسد این ترکیبات پیش‌ساز مناسبی برای تولید آرتمیزینین در گیاه درمنه کوهی نیست.

نتیجه گیری: این مطالعه نشان داد که می‌توان با به‌کارگیری روش‌های نوین ترکیب ارزشمند آرتیمیزنین را در درمنه کوهی علی‌رغم عدم تولید آن در گیاه تهیه نمود.

واژگان کلیدی : آرتمیزینین، *Artemisia aucheri* Boiss ، کشت سلولی، تبدیلات بیوشیمیایی

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

امروز، در قرن بیست و یکم، مالاریا به‌عنوان یک بیماری قدیمی، همچنان سلامت مردم را در بسیاری از کشورهای جهان تهدید می‌کند. سالانه بیش از چند صد میلیون مورد ابتلا به مالاریا در جهان گزارش می‌شود که حدود یک میلیون نفر از آن‌ها جان خود را از دست می‌دهند (۱).

آرتمیزینین و مشتقات حاصل از آن از پرکاربردترین داروهای ضد مالاریا در بازار دارویی جهان محسوب می‌شوند که اثر دهی سریع، ایمن و مناسب در برابرگونه‌های حساس و مقاوم به دارو دارند (۲). آرتمیزینین، یک سزکوئی ترپن لاکتونی است که به‌طور طبیعی در گونه‌های مختلف جنس آرتمیزیا از جمله *Artemisia annua* L یافت می شود (۳). با این‌حال راندمان تولید این ترکیب به‌طور طبیعی پائین است (۰/۰۱ تا ۰/۵ درصد وزن خشک گیاه) و تولید این ماده در صنعت از لحاظ اقتصادی با نوع طبیعی آن رقابت ندارد (۴). از این رو افزایش بازده تولید در گیاه و کشت سلولی حاصل از آن مورد توجه قرار گرفته است.

کشت بافت گیاهی که در محیط‌های کشت مصنوعی و استریل شده صورت می‌گیرد سرشار از آنزیم‌های اختصاصی برای تولید متابولیت‌های گیاهی می‌باشد. همچنین امکان شناسایی مسیرهای بیوسنتز و ترکیبات واسطه آن در این محیط‌ها وجود دارد که زمینه تولید بیشتر متابولیت‌های گیاهی را فراهم می‌کند (۵).

تولید آرتمیزینین، در کشت بافت گیاهی بارها مورد مطالعه قرار گرفته است و نتایج آن ارائه شده است. ایجاد شرایط مناسب در این کشت‌ها، زمینه تبدیل پیش‌سازهای طبیعی نظیر آرتمیزینیک اسید و دی هیدروآرتمیزینیک اسید را فراهم کرده است. اثر عوامل متعدد، از قبیل تنظیم کننده‌های رشد، القاگرها و پیش سازها بر میزان آرتمیزینین تولیدی بررسی شده است. همچنین تلاش‌هایی در جهت بهتر کردن شرایط فیزیکی و شیمیایی نظیر نور، دما، pH ، غلظت نیترات و قند صورت گرفته است (۶-۱۲).

Artemisia aucheri Boiss (درمنه کوهی) گونه‌ای از جنس *Artemisia* است که به فراوانی در نقاط مختلف ایران پراکنده است (۱۳). بر اساس مطالعات انجام گرفته، گیاه درمنه کوهی آرتمیزینین را تولید نمی‌کند اما ژن اصلی مسیر بیوسنتزآن درگیاه وجود دارد و احتمال فعال شدن آن در محیط کشت سلولی وجود دارد (۱۴). این جنس بالغ بر ۴۵۰ گونه دارد که عدم تولید آرتمیزینین در اغلب گونه‌های گیاه نیز گزارش شده است (۱۵ و ۱۶). یکی از علل عدم تولید آرتمیزینین می‌تواند تولید نشدن ترکیبات واسطه در گیاه به‌علت عدم بیان آنزیم خاص درگیر در ایجاد حلقه سزکوئی ترپن و یا فعال نشدن آن باشد (۱۷). کاهش تولید آرتمیزینین به‌علت عوامل فنوتیپی و ژنوتیپی حتی در خود گونه درمنه خزری گزارش شده است (۱۸). با توجه به جایگاه درمانی آرتمیزینین در درمان مالاریا و فراوانی گیاه درمنه کوهی در ایران، در این مطالعه کشت کالوس و سوسپانسیون سلولی گیاه انجام شد. علاوه بر این تولید آرتمیزینین و توانایی تبدیلات بیوشیمیایی در آن مدنظر قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه گیاهی مورد تحقیق: گیاه درمنه کوهی (*Artemisia aucheri* Boiss) در تاریخ ۱۳۸۹/۳/۱۷ ازکیلومتر ۶۰ جاده اصفهان- زفره در ارتفاع ۱۶۵۰ متر از سطح دریا توسط کارشناسان مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان تهیه شد. نمونه هرباریومی آن به شماره ۱۳۸۴ در هرباریوم گروه فارماکوگنوزی دانشکده داروسازی دانشگاه اصفهان نگه‌داری می شود.

کشت کالوس: بذر گیاه تحت شرایط آسپتیک در زیر کابین لامینار ایرفلو، ابتدا با اتانول ۹۶ درجه به مدت ۳ دقیقه و بعد با هیپوکلریت سدیم ۱ درصد به مدت ۹ دقیقه استریل شد. پس از ۳ بار شستشو با آب مقطر استریل و به پتری دیش‌های استریل منتقل شد. پتری دیش‌های حاوی دانه‌های استریل در اتاق کشت در تاریکی و دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد نگه داری شدند. برای تولید کالوس، محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) جامد با ترکیبی از اکسین و سیتوکینین به‌عنوان تنظیم کننده‌های رشد گیاهی به کار رفت. جدول ۱ هفت تیمار مختلف به‌کار رفته در محیط‌های کشت را نشان می‌دهد که در ۵ تکرار انجام گرفت. کالوس گیاه با انتقال دانه رست‌های رشد یافته به ظروف کشت جامد ایجاد شد. سپس نیمی از محیط‌های کشت در تاریکی ۲۴ ساعت و بقیه در شرایط ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی در اتاق کشت نگه داری شد. واکشت کالوس با انتقال قطعه شاداب و تازه کالوس به محیط کشت تازه صورت گرفت (۱۹). مطالعه آنالیز آرتیمزینین برروی کالوس تیمار شماره ۱ که بهترین رشد را داشت تا ۷ نسل ادامه یافت و تولید آرتیمزینین در سایر تیمارها مورد مطالعه قرار نگرفت.

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۱: تیمارهای مختلف تنظیم کننده های رشد مورد استفاده در کشت کالوس درمنه کوهی

شماره تیمار محیط کشت	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷
2-4-D (mg/l)	۰/۵	۰	۰	۰	۰	۱	۰
α-NAA (mg/l)	۰/۱	۰/۵	۰/۰۵	۰/۰۵	۰	۰	۰
Kinetin (mg/l)	۰/۵	۰/۵	۰	۰	۰	۰/۲	۰
BAP (mg/l)	۰	۰	۰/۵	۰/۲۵	۰/۵	۰	۰

2,4-D: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, NAA: Naphtaleneacetic acid,
BAP: Benzylaminopurine

کشت سوسپانسیون: کشت سوسپانسیون با انتقال قطعات شاداب کالوس تیمار شماره ۱ به محیط کشت مایع مشابه محیط کشت کالوس ولی فاقد آگار انجام شد. این محیط‌ها در طول زمان کشت برروی تکان دهنده دوار۱۰۰ دور در دقیقه، در اتاق کشت قرار داشت. واکشت سوسپانسیون با عبور سوسپانسیون حاصل از یک صافی استریل تحت شرایط استریل به محیط کشت تازه صورت گرفت.

بررسی حضور آرتمیزینین در کالوس و سوسپانسیون سلولی گیاه درمنه کوهی به روش TLC: برای انجام TLC از عصاره دی کلرومتانی اندام هوایی گیاه، کالوس‌های نسل هفتم و سوسپانسیون‌های نسل سوم به‌روش ماسراسیون با خیساندن پودر عصاره خشک کالوس و یا سلول‌های فیلتر شده سوسپانسیون که به نسبت ۵ به ۱ در حلال آلی به‌مدت ۲۴ ساعت قرار گرفته بودند انجام شد. سلیکاژل $6OGF_{254}$ به‌عنوان فاز ثابت و سیستم حلال اتیل استات- پترولیوم اتر (۶:۴) به‌عنوان فاز متحرک انتخاب گردید (۲۰). جهت آشکارسازی مواد مورد نظر، از معرف وانیلین- اسید سولفوریک استفاده که برروی صفحه TLC اسپری شد(۲۱). استاندارد آرتمیزینین به‌عنوان شاهد مورد استفاده قرار گرفت.

بررسی وجود آرتمیزینین در اندام هوایی گیاه، کالوس و سوسپانسیون سلولی با دستگاه گاز کروماتوگرافی: گاز کروماتوگرافی با دستگاهPerkin-Elmer ، دارای دتکتور FID و ستون HP-5MS به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۰/۳ میلی متر انجام شد. برنامه حرارتی ستون از دمای۱۰۰ درجه سانتی‌گراد شروع و تا دمای ۲۷۰ درجه سانتی‌گراد ادامه یافت و دما در هر دقیقه ۲۰ درجه افزایش یافت. دمای اتاقک تزریق و دمای ردیاب ۲۷۰ درجه سانتی‌گراد بود. فراکسیون جدا شده از صفحه TLC به‌عنوان نمونه انتخاب و ۰/۲ میکرولیتر آن به دستگاه تزریق شد. زمان بین تزریق و ظهور پیک یعنی زمان بازداری (Rt) بررسی و با زمان بازداری نمونه استاندارد آرتمیزینین و با استفاده از بیزابولن به‌عنوان استاندارد داخلی مقایسه شد (۲۲).

بررسی توانایی تبدیلات بیوشیمیایی سوسپانسیون گیاه درمنه کوهی: به‌منظور بهبود تولید آرتمیزینین، کلسترول، بیزابولول و آرتمیزیاکتون که ساختار مشابه آرتمیزینین دارند به‌عنوان سوبسترای پیش‌ساز استفاده شدند. محلول استوک این مواد در اتانول ۹۹ درصد آماده شد. کلسترول به میزان $۱۰۰\frac{mg}{l}$، بیزابولول $۵۰\frac{mg}{l}$ و آرتمیزیاکتون $۱۲۰\frac{mg}{l}$ به کار گرفته شد. با توجه به‌سرعت رشد سوسپانسیون، سوبسترا به سوسپانسیون‌های هفته سوم افزوده و به ازای هر سوبسترا سه ظرف سوسپانسیون در نظرگرفته شد. ۶ روز بعد از افزودن سوبسترا، سوسپانسیون‌ها جمع آوری و خشک شدند و عصاره دی‌کلرومتانونی ۰/۲۵گرم آن بدست آمد. آنالیز تولید آرتمیزینین با تزریق ۰/۵ میکرولیتر از هر نمونه به دستگاه گازکروماتوگرافی صورت گرفت و سطح زیر پیک حاصل بررسی گردید. به‌منظور مقایسه تغییرات احتمالی با نمونه شاهد سلولی، به سه ظرف از سوسپانسیون هر کدام ۰/۵ میلی‌لیتر آب مقطر افزوده شد و ۶ روز روی شیکر قرار گرفت. همچنین تست شاهد محیط کشت با افزودن هر یک از استانداردهای سوبسترا به طور مجزا به محیط‌های کشت فاقد سلول انجام شد (۲۳).

نتایج

ایجاد کشت کالوس و کشت سوسپانسیون:

کشت کالوس در محیط‌های حاوی غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد نتایج متفاوتی داشت. نتایج به‌دست آمده در جدول ۲ نمایش داده شده است. همچنین مشاهده شد که کالوس رشد یافته در شرایط ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی سبز رنگ و شاداب بوده و رشد بهتری نسبت به کالوس نگه‌داری شده در تاریکی داشت. کالوس رشد یافته در شرایط ۲۴ ساعت

Archive of SID

www.SID.ir

تاریکی، کرم رنگ بود. کشت سوسپانسیون یکنواخت و کرمی رنگ تهیه شد.

جدول ۲: رشد و شادابی کالوس درمنه کوهی در تیمارهای مختلف تنظیم کننده‌های رشد

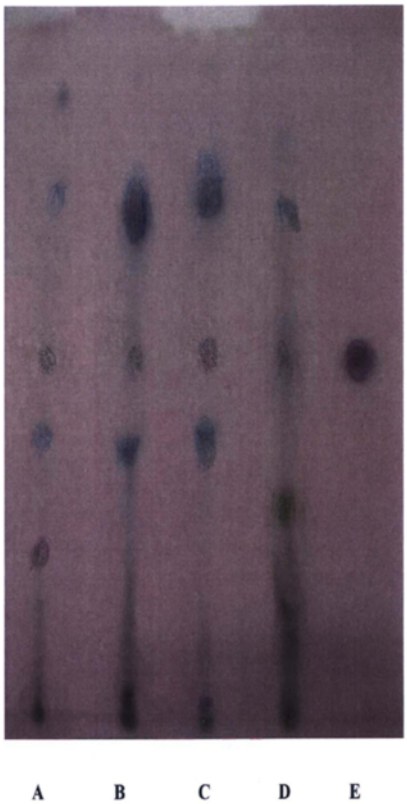
شماره تیمار محیط کشت	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷
میزان رشد	++	+++	++++	++++	+	+	-
میزان شادابی	بسیار شاداب	نکروزه	شاداب	شاداب	کمی شاداب	نکروزه	-

+ رشد بسیار کند، ++++ رشد تند، ++ رشد کند، - عدم رشد

+++ رشد متوسط به طور تقریب هر مثبت بیانگر مساحتی معادل ۲ سانتی‌متر مکعب است.

آنالیز عصاره اندام هوایی گیاه، کالوس و سوسپانسیون سلولی با TLC:

همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده شده است در بررسی عصاره کالوس کشت شده در دو شرایط نوری متفاوت به روش TLC، ۴ فراکسیون با R_f (۰/۲، ۰/۴، ۰/۵۲، ۰/۷۶) مشاهده شد. سوسپانسیون سلولی نیز ۴ فراکسیون با R_f (۰/۲۳، ۰/۴، ۰/۵۲، ۰/۷۶) را نشان داد. استاندارد آرتمیزینین باندی با R_f =۰/۵۲ و رنگ بنفش ایجاد کرد که از لحاظ R_f و رنگ با یکی از فراکسیون‌های ایجاد شده از نمونه کالوس و سوسپانسیون مطابقت داشت ولی این باند در عصاره اندام هوایی گیاه حضور نداشت.

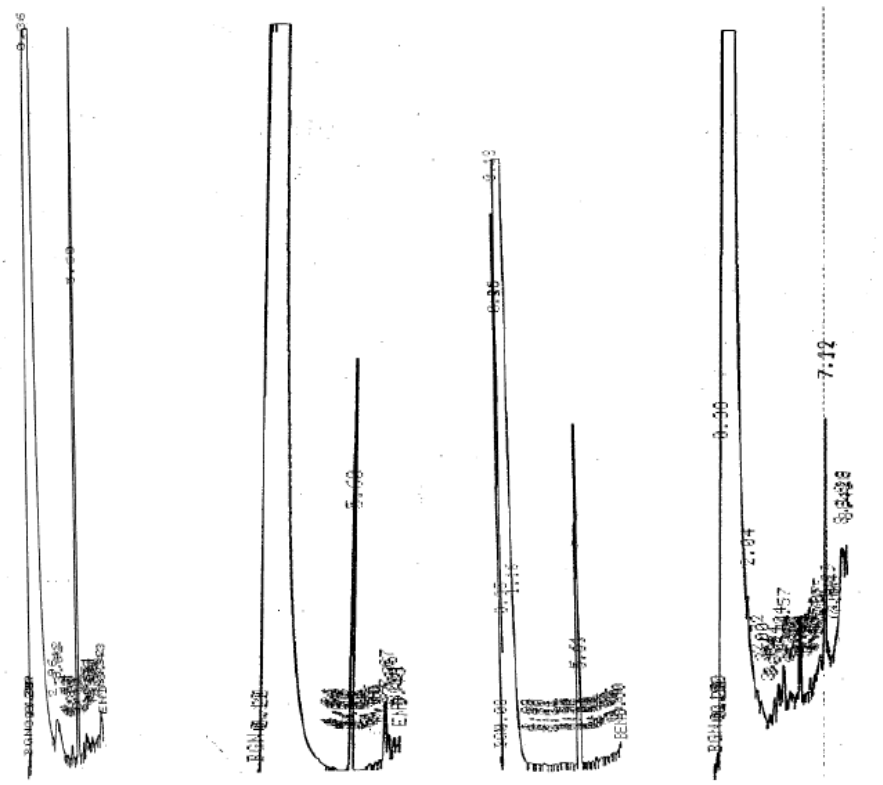


شکل ۱: آنالیز TLC سوسپانسیون(A) ، کالوس تاریکی(B) ، کالوس روشنایی(C) ،گیاه(D) ، استاندارد آرتمیزینین(E)

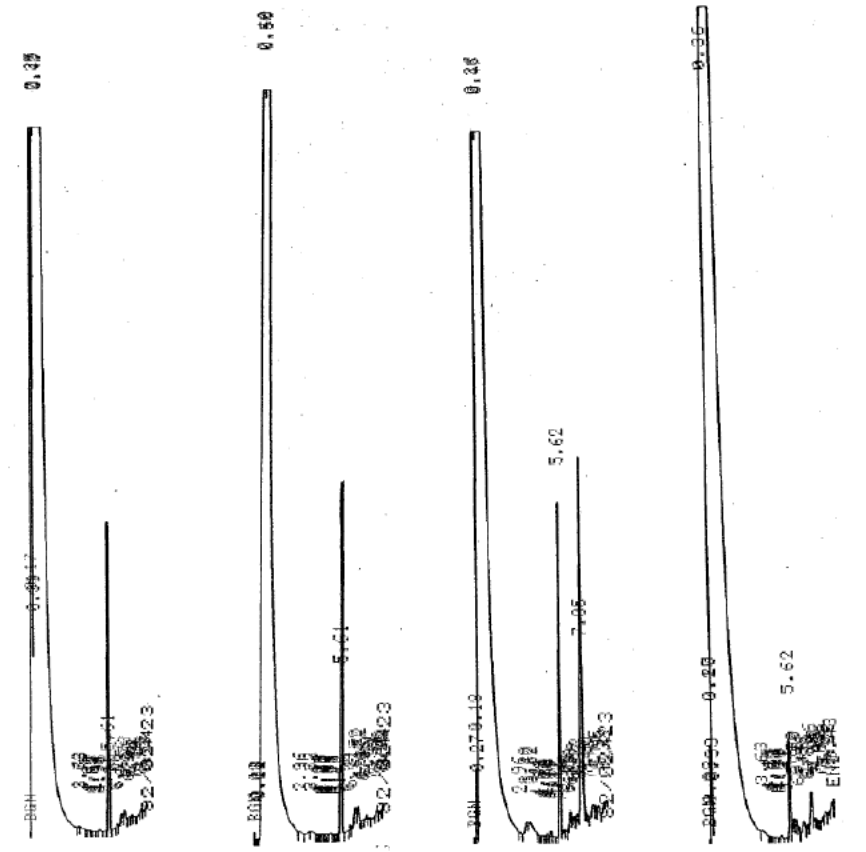
نتایج بررسی وجود آرتمیزینین در اندام هوایی گیاه، کالوس و سوسپانسیون سلولی با دستگاه گاز کروماتوگرافی:

همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده است با تزریق استاندارد آرتمیزینین به دستگاه گاز کروماتوگرافی پیک با R_t=۵/۶ دقیقه در کروماتوگرام مربوطه حاصل شد. نمونه مربوط به کالوس و سوسپانسیون سلولی نیز هر کدام یک پیک به ترتیب با R_t=۵/۶ و R_t=۵/۶۶ دقیقه ایجاد کردند ولی این پیک در عصاره اندام هوایی گیاه حضور نداشت.

www.SID.ir



شکل ۲: آنالیز GC عصارها به ترتیب از راست به چپ: گیاه ، کالوس، سوسپانسیون، استاندارد آرتمیزینین



شکل ۳ : آنالیز GC عصارها حاصل از تبدیلات بیوشیمیایی به ترتیب از راست به چپ: آرتمیزیاکتون ، بیزابولول ، کلسترول ، شاهد (سوسپانسیون سلولی فاقد پیش ساز)

www.SID.ir

بررسی توانایی تبدیلات بیوشیمیایی:

همان‌طور که در شکل ۳ نشان داده شده است با تزریق ۰/۵ میکرولیتر از عصاره نمونه شاهد سلولی به دستگاه پیک با R_t=۵/۶ و مساحت تقریبی ۸۱/۲۶ میلی‌متر مربع مشاهده شد که ۰/۵۳ درصد از مساحت کل پیک حاصل را شامل شد. نمونه حاوی کلسترول، آرتمیزیاکتون و بیزابولول هر کدام پیک مشابه به‌ترتیب به مساحت ۷۹/۳۰ میلی‌متر مربع (۰/۵۲ درصد مساحت کل پیک حاصل)، ۲۱/۱۴ میلی‌متر مربع (۰/۱۴ درصد مساحت کل پیک حاصل) و ۷۵/۷ میلی‌متر مربع (۰/۴۹ درصد مساحت کل پیک حاصل) ایجاد کردند. نمونه مربوط به بیزابولول پیک دیگری با R_t=۷/۰۵ دقیقه ایجاد کرد. با تزریق استاندارد بیزابولول پیک با R_t=۷/۰۲ دقیقه حاصل شد.

بحث

در بررسی کشت کالوس مشاهده شد کالوس‌های ایجاد شده در محیط‌های کشت متفاوت دارای خصوصیات ظاهری و رشد متفاوت هستند. بر اساس نتایج به‌دست آمده می‌توان به این نکته پی برد که نوع و نسبت هورمون‌های تنظیم کننده رشد در ایجاد کالوس و تمایز سلولی نقش بسزایی داشته است. نتایج مشابه نیز توسط Zia و همکارانش (۲۴) در مورد گیاه *Artemisia absinthium* به‌دست آمده است. همچنین مشاهده شد کالوس کشت شده در شرایط نوری متفاوت، رنگ و سرعت رشد متفاوت داشته که حاکی از این است که نور به‌عنوان یک فاکتور فیزیکی در رشد کالوس و قدرت فتوسنتز آن اثر گذار بوده است.

در بررسی TLC حاصل از عصاره کالوس و سوسپانسیون درمنه کوهی، باندی با R_f و رنگ مشابه با استاندارد آرتمیزینین مشاهده شد و به‌نظر می‌رسد آرتمیزینین در کشت سلولی گیاه تولید شده است ولی این باند در عصاره اندام هوایی گیاه حضور نداشت. در مطالعات قبلی TLC بارها برای شناسایی آرتمیزینین به‌کار گرفته شده است. Quispe-Condori و همکارانش (۲۵) برای شناسایی آرتمیزینین در عصاره های مختلف درمنه خزری از متد TLC استفاده کردند. Sarin و Sing (۲۶) نیز در مطالعه خود بر روی کالوس *Artemisia scoparia* با TLC به شناسایی آرتمیزینین پرداختند

همچنین مشاهده شد کالوس‌های کشت شده در شرایط نوری متفاوت باندهای مشابهی از لحاظ R_f و رنگ ایجاد کردند و به نظر می‌رسد نور نتوانسته است تاثیری بر نوع ترکیبات تولیدی در کالوس بگذارد، اما مقایسه TLC حاصل از کالوس با سوسپانسیون سلولی تفاوت‌هایی را نمایان کرد که بیانگر توان بیوشیمیایی متفاوت این محیط‌ها است.

با بررسی نتایج گازکروماتوگرافی، مشاهده شد که نمونه مربوط به کالوس و سوسپانسیون سلولی پیک با زمان بازداری (Rt) مشابه استاندارد آرتمیزینین دارند و به‌نظر می‌رسد آرتمیزینین در این نمونه‌ها وجود دارد. Peng و همکارانش (۲۷) نیز شناسایی و اندازه‌گیری آرتمیزینین و پیش‌سازهای آن را به‌طور مستقیم با دستگاه GC-FID انجام دادند و یک رابطه خطی بین غلظت‌های استاندارد آرتمیزینین و سطح طیف حاصل به‌دست آوردند.

علی رغم عدم تایید تولید آرتیمیزنین در گیاه درمنه کوهی بر اساس نتایج حاصل احتمال می‌رود مسیر تولید آرتمیزینین در کشت سلولی گیاه فعال شده و تنظیم کننده‌های رشد در فعال کردن این مسیر نقش داشته‌اند . در مطالعه‌ای نیز که بر گیاه *Artemisia absinthium* انجام شد افزودن NAA و BA به محیط MS باعث تولید آرتمیزینین و شناسایی آن در کالوس شد (۲۸).

با توجه به عدم افزایش کمی آرتیمیزنین در تبدیلات بیوشیمیایی سوسپانسیون سلولی گیاه درمنه کوهی، به‌نظر می‌رسد کلسترول، بیزابولول و آرتمیزیاکتون پیش‌ساز مناسبی برای آرتمیزینین در کشت سلولی درمنه کوهی نیستند. در این مطالعه افزودن کلسترول نتوانست تولید آرتمیزینین را در کشت سوسپانسیون سلولی درمنه کوهی تحت تاثیر قرار دهد در حالی‌که در مطالعه Baldi و Dixit (۲۹) بر گیاه درمنه خزری افزودن کلسترول به سوسپانسیون سلولی بر رشد سلول‌ها و تولید آرتمیزینین اثرگذار بود. با مقایسه پیک حاصل از گازکروماتوگرافی نمونه حاوی بیزابولول و شاهد سلولی نیز تغییر قابل توجهی مشاهده نشد. بیزابولول یک سزکوئی ترپن الکلی است و با توجه به مسیرهای بیوشیمیایی گیاهی درمنه خزری انتظار می‌رفت بتواند به پیش‌سازهای اصلی آرتمیزینین تبدیل شود (۳۰). کاهش تولید آرتیمیزنین با افزودن آرتمیزیاکتون به سوسپانسیون سلولی درمنه کوهی شاید به‌دلیل بلوک مسیر بیوسنتز آرتمیزینین شده باشد.

نتیجه گیری

درمجموع تولید آرتیمیزنین در کشت کالوس و سوسپانسون درمنه کوهی علی‌رغم عدم تولید آن در گیاه بیانگر توانمندی

Archive of SID
www.SID.ir

نهفته درمنه کوهی است که با فراهم نمودن شرایط مناسب امکان تولید آرتیمیزنین را که بیشتر در درمنه مازندرانی مطالعه شده است (۳۱) فراهم نمود و با بهینه کردن شرایط کشت بافت و سلول از جمله افزودن پیش‌سازهای مناسب بتوان میزان تولید آرتمیزنین را افزایش داد.

تشکر و قدردانی

هزینه های این تحقیق توسط معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تامین شده است که بدین‌وسیله قدردانی می‌شود. از مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی استان اصفهان در تامین اندام هوایی درمنه کوهی نیز تشکر به‌عمل می‌آید.

منابع

1. Crawley J, MRCP, Nahlen B. Prevention and treatment of malaria in young African children. Semin Pediatr Infect Dis. 2004; 15(3): 169-180.

2. Ashley E, Mc Gready R, Proux S, Nosten F. Malaria, Travel Med Infect Dis. 2006; 4(3-4): 159-173.

3. Bhakuni RS, Jain DC, Sharma RP, Kumar S. Secondary metabolites of *Artemisia annua* and their biological activity. Curr Sci. 2001; 80(1): 35-4.

4. Evans WC. Trease and Evans Pharmacognosy, 14th Ed. London: WB Sunders Company Limited. 1996; p. 428.

5. Asghari G. [Biotechnology of Medicinal Plant and Herbal Medicine Production], Isfahan: Jahad Danishgahi Publication. 1998; p. 217. persian

6. Zhao Y, Liu C. Biological Production of artemisinin for malaria therapy. Med Plant Biotechnol. 2007; 23(1): 529-540.

7. Abdin MZ, Israr M, Srivastava PS, Jain SK. In vitro production of artemisinin, a novel antimalarial compound from *Artemisia annua*. J Medicinal & Aromatic Plant Sci. 2000; 22-23.

8. Chen PK, Lukonis C, Go L, Leather GR. Increasing artemisinin production through biotransformation of precursors. Proceedings of the Plant Growth Regulator Society of America. 1991; 2-8.

9. Geldfre E, Vergauwe A, Eeckhout E. State of the art of the production of the antimalarial compound artemisinin in plants. Plant Mo Biol. 1997; 33(2): 199-209.

10. Paniego N, Maligne AE, Giulietti AM. *Artemisia annua* (Quing-Hoa): in vitro culture and the production of artemisinin. Biotech Agricult Forest. 1993; (24): 64-78.

11. Geoffrey BD, Lai-King S. In vivo transformations of dihydroartemisinic acid in *Artemisia annua* plants. Tetrahedron. 2004; 60(5): 1139-1159.

12. Chang YJ, Song SH, Park SH, Kim SU. Amorpha-4,11-diene synthase of *Artemisia annua*: cDNA isolation and bacterial expression of a terpene synthase involved in artemisinin biosynthesis. Arch Biochem Biophys. 2000; 383(2): 178-84.

13. Ghahraman A. [Flora of Iran], Tehran. Institute of Forests and Rangelands Publication. 1996; 15:1762. persian.

14. Hosseini R, Yazdani N, Garoosi GA. The presence of amorpha-4, 11-diene synthase, a key enzyme in artemisinin production in ten *Artemisia* species, Daru. 2011; 19(5): 332-338.

15. Van der Kooy F, Verpoorte R, Marion Meyer JJ. Metabolomic quality control of claimed anti-malarial *Artemisia afra* herbal remedy and *A. afra* and *A. annua* plant extracts. South Afr J Botany. 2008; 74(2): 186-189.

16. Kundan SB , Anupam SH. Phytochemical and pharmacological potential of *Artemisia absinthium* Linn. and *Artemisia asiatica* Nakai , J Pharm Res. 2010, 3(2): 325-328.

17. Kim SH, Heo K, Chang YJ, Park SH, et al. Cyclization mechanism of amorpha-4,11-diene synthase, a key enzyme in artemisinin biosynthesis. J Nat Prod. 2006; 69(5): 758-762.

18. Delabays N, Simonnet X, Gaudin M. The genetics of artemisinin content in *Artemisia annua* L. and the breeding of high yielding cultivars. Curr Med Chem. 2001; 8(15): 1795-

1801.

19. Dehshahri SH, Afsharypuor S, Asghari G, Mohagheghzadeh A. Determination of volatile glucosinolate degradation products in seed coat, stem and *in vitro* cultures of *Moringa peregrina* (Forssk.) Fiori. Ir J Pharmaceut Sci. 2012; 7(1): 51-56.

20. Xie D, Wang L, Ye H, Li G. Isolation and production of artemisinin and stigmasterol in hairy root culture of *Artemisia annua*. Plant cell Tissue Org Cult. 2000; 63: 161-166.

21. Wagner, H, Bladt, S. Plant drug analysis. Translated by scott A .2th Ed. Berline: Springer; 1996; 364.

22. Sipahimalani AT, Fulzele DP, Heble MR. Rapid method for the detection and determination of artemisinin by gas chromatography. J Chrom. 1991; 538**:** 452-455.

Archive of SID

www.SID.ir

23. Roth RJ, Acton N. A simple conversion of artemisinic acid into artemisinin. J Nat Prod. 1989; 52**:** 1183- 1185.

24. Zia M, Rehman RU, Fayyaz M. Hormonal regulation for calogenesis and organogenesis of *Artemisia absinthium* L. Aft J Biotech. 2007; 6(16): 1874-1878.

25. Quispe- condori S, Sanchez D, Foglio MA, Rosa PT, et al. Global yield isotherms and kinetic of artemisinin extraction from *Artemisia annua* L. leaves using super critical carbon dioxide. J Super Crit Fluids. 2005; 36(1): 40-48.

26. Sing A, Sarin R. Artemisinin content in *Artemisia Scoparia* .Recent Res Sci Technol. 2010; 2(6): 47-50.

27. Peng CA, Ferriera JF, Wood AJ. Direct analysis of artemisinin from *Artemisia annua* L using high-performance liquid chromatography with evaporative light Scattering detector , and gas chromatography with flame ionization detector. J Chormatogr A. 2006; 1136: 254-258.

28. Zia M, Mannan A, Chaudhary MF. Effect of growth regulators and amino acids on artemisinin production in the callus of *Artemisia absinthium*. Pak J Bot. 2007; 39(2): 799-805.

29. Baldi A, Dixit VK. Yield enhancement strategies for artemisinin production by suspension cultures of *Artemisia annua*. Bioresour Technol. 2008; 99(11): 4609-4614.

30. D'Andrea S, Caramiello R, Ghignone S, Siniscalco C. Systematic studies on some species of the genus Artemisia: Biomolecular analysis. Plant Biosystems. 2003;137(2): 121-130.

31. Yazdani N, Hosseini R, Garousi GA. Does any Artemisia species other than *A. annua* have potential to produce artemisinin?, OAJMAP. 2010; 1(2): 40-43.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Autumn 2013; 4(3): 243-250

Original Article

Artemisinin Production in Plant, Callus and Cell Suspension Culture of *Artemisia aucheri* Boiss.

Asghari G. Ph.D.[1*], Davazdah Emami S. Ph.D.[2], Hojjati M. Ph.D.[1], Valian Z. Pharm.D.[1], Shakoori A. Pharm.D. [1], Asghari M. M.Sc.[3]

1. Professor of Isfahan Pharmaceutical Sciences Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2. Assistants Professor of Isfahan Agriculture and Natural Resources Research Center, Isfahan, Iran

3. M.Sc. Student, Department of Agricultural Biotechnology, Tehran University, Tehran, Iran

* Email corresponding author: asghari@pharm.mui.ac.ir

Received: 11 Aug. 2012 Accepted: 23 Jul. 2013

Archive of SID

Abstract

Aim: Artemisinin, an outstanding cumpound in genus Artemisia, is the most important anti malaria medicine. Therefore, plant cell culture of *Artemisia aucheri* Bioss was established and production of artemisinin was studied on plant, callus, and cell suspension culture.

Material and Methods: *Artemisia aucheri* aerial parts and seeds were obtained. Seedling was prepared and transferred on solid MS medium containing different growth regulators and callus was established. Fresh callus was transferred to liquid MS medium and suspension culture was obtained. For detection of artemisinin, the dichloromethanolic extract of callus, suspension and seeds of the plant was analysed by TLC and GC methods. Biotransformation was studied by feeding cholesterol, bisabolol and artemisia ketone to suspension culture.

Results: MS medium supplemented with kinetin (0.5 mg/l), 2, 4-D (0.5 mg/l), NAA (1 mg/l) and BA (0.25 mg/l), NAA (0.05 mg/l) was suitable for establishment of callus. Light showed positive effect on calli growth. No artemisinin was detected on plant aerial part. It seems, however, that callus and suspension culture of *A. aucheri* produced artemisinin. Also, Cholesterol, bisabolol and artemisinin keton feeding did not influence artemisinin production. Therefore, it seems these precursors are not proper for biotransformation experiments.

Conclusion: Despite of undetected artemisinin in aerial parts of the *A. aucheri*, the production of artemisinin using new methods such as *in vitro* culture of *A. aucheri* is a promising result.

Keywords: Artemisinin, *Artemisia aucheri* Bioss, Callus, Cell culture, Biotransformation

www.SID.ir