

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

غلامرضا اصغری Ph.D.^{۱*}، سعید دوازده امامی Ph.D.^۲، محدثه حجتی Pharm.D.^۱، عاطفه شکوری Pharm.D.^۱،
زهرا ولیان Ph.D.^۱، متین اصغری M.Sc.^۳

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

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۵/۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۵/۲۱

چکیده

هدف: آرتیمیزین مهمترین متابولیت جنس *Artemisia* می باشد. به دلیل اهمیت آرتیمیزین در درمان مالاریا، تولید آرتیمیزین در درمنه کوهی، کشت کالوس و کشت سوسپانسیون سلولی گیاه بررسی شد. همچنین توانایی تبدیلات بیوشیمیایی در جهت تولید آرتیمیزین 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 به دست آمد. کالوس های به محیط کشت مایع منتقل و سوسپانسیون سلولی حاصل شد. بررسی وجود آرتیمیزین در عصاره دی کلرومتانی اندام هوایی گیاه، کالوس و سوسپانسیون سلولی گیاه با روش TLC و GC انجام گرفت. کلسترول، بیزابولول و آرتیمیزیاکتون به عنوان پیش ساز آرتیمیزین به سوسپانسیون افزوده و تولید آرتیمیزین با GC بررسی شد.

نتایج: محیط حاوی Kinetin ($0/5 \frac{mg}{l}$)، ۲-۴-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 TLC و GC تولید آرتیمیزین در گیاه اثبات نشد ولی کالوس و سوسپانسیون سلولی، گیاه آرتیمیزین تولید کردند اما افزودن کلسترول، بیزابولول و آرتیمیزیاکتون به سوسپانسیون سلولی درمنه کوهی بر تولید بیشتر آرتیمیزین تاثیر نداشت. به نظر می رسد این ترکیبات پیش ساز مناسبی برای تولید آرتیمیزین در گیاه درمنه کوهی نیست.

نتیجه گیری: این مطالعه نشان داد که می توان با به کارگیری روش های نوین ترکیب ارزشمند آرتیمیزین را در درمنه کوهی علی رغم عدم تولید آن در گیاه تهیه نمود.

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

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).

آرتیمیزینین و مشتقات حاصل از آن از پرکاربردترین داروهای ضد مالاریا در بازار دارویی جهان محسوب می‌شوند که اثر دهی سریع، ایمن و مناسب در برابر گونه‌های حساس و مقاوم به دارو دارند (۲). آرتیمیزینین، یک سزکوئی ترپن لاکتونی است که به‌طور طبیعی در گونه‌های مختلف جنس آرتیمیزیا از جمله *Artemisia annua L* یافت می‌شود (۳). با این حال راندمان تولید این ترکیب به‌طور طبیعی پائین است (۰/۱ 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 آرتیمیزینین، 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 آرتیمیزینیک اسید و دی هیدروآرتیمیزینیک اسید را فراهم کرده است. اثر عوامل متعدد، از قبیل تنظیم کننده‌های رشد، القاگرها و پیش‌سازها بر میزان آرتیمیزینین 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 آرتیمیزینین را تولید نمی‌کند اما ژن اصلی مسیر بیوسنتز آن در گیاه وجود دارد و احتمال فعال شدن آن در محیط کشت سلولی وجود دارد (۱۴). این جنس بالغ بر ۴۵۰ گونه دارد که

عدم تولید آرتیمیزینین در اغلب گونه‌های گیاه نیز گزارش شده است (۱۵ و ۱۶). یکی از علل عدم تولید آرتیمیزینین 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 آرتیمیزینین به‌علت عوامل فنوتیپی و ژنوتیپی حتی در خود گونه درمنه خزری گزارش شده است (۱۸). با توجه به جایگاه درمانی آرتیمیزینین 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 آرتیمیزینین 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 از کیلومتر 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 هر بار بومی آن به شماره ۱۳۸۴ در هر بار بوم گروه فارماکوگنوزی دانشکده داروسازی دانشگاه اصفهان نگهداری می‌شود.

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 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد نگه‌داری 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 به کار 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 نگه‌داری شد. واکشت کالوس با انتقال قطعه شاداب و تازه کالوس به محیط کشت تازه صورت گرفت (۱۹). مطالعه آنالیز آرتیمیزینین بر روی کالوس تیمار شماره ۱ که بهترین رشد را داشت تا ۷ نسل ادامه یافت و تولید آرتیمیزینین در سایر تیمارها مورد مطالعه قرار نگرفت.

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

(Rt) بررسی و با زمان بازداری نمونه استاندارد آرتیمیزینین و با استفاده از بیزابولن به عنوان استاندارد داخلی مقایسه شد (۲۲).

بررسی توانایی تبدیلات بیوشیمیایی سوسپانسیون گیاه

درمنه کوهی: به منظور بهبود تولید آرتیمیزینین، کلسترول، بیزابولول و آرتیمیزیاکتون که ساختار مشابه آرتیمیزینین دارند به عنوان سوبسترای پیش ساز استفاده شدند. محلول استوک این مواد در اتانول ۹۹ درصد آماده شد. کلسترول به میزان $100 \frac{mg}{l}$ ، بیزابولول $50 \frac{mg}{l}$ و آرتیمیزیاکتون $120 \frac{mg}{l}$ به کار گرفته شد. با توجه به سرعت رشد سوسپانسیون، سوبسترا به سوسپانسیون های هفته سوم افزوده و به ازای هر سوبسترا سه ظرف سوسپانسیون در نظر گرفته شد. ۶ روز بعد از افزودن سوبسترا، سوسپانسیون ها جمع آوری و خشک شدند و عصاره دی کلرومتانونی $0/25$ گرم آن بدست آمد. آنالیز تولید آرتیمیزینین با تزریق $0/5$ میکرولیتر از هر نمونه به دستگاه گاز کروماتوگرافی صورت گرفت و سطح زیر پیک حاصل بررسی گردید. به منظور مقایسه تغییرات احتمالی با نمونه شاهد سلولی، به سه ظرف از سوسپانسیون هر کدام $0/5$ میلی لیتر 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 محیط های کشت فاقد سلول انجام شد (۲۳).

نتایج

ایجاد کشت کالوس و کشت سوسپانسیون:

کشت کالوس در محیط های حاوی غلظت های مختلف تنظیم کننده های رشد نتایج متفاوتی داشت. نتایج به دست 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

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 محیط ها در طول زمان کشت بر روی تکان دهنده دوار 100 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 آرتیمیزینین در کالوس و سوسپانسیون

سلولی گیاه درمنه کوهی به روش TLC: برای انجام TLC از عصاره دی کلرومتانی اندام هوایی گیاه، کالوس های نسل هفتم و سوسپانسیون های نسل سوم به روش ماسراسیون با خیساندن پودر عصاره خشک کالوس و یا سلول های فیلتر شده سوسپانسیون که به نسبت ۵ به ۱ در حلال آلی به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفته بودند انجام شد. سلیکاژل 6OGF₂₅₄ به عنوان فاز ثابت و سیستم حلال اتیل استات-پترولیوم اتر (۴:۶) به عنوان فاز متحرک انتخاب گردید (۲۰). جهت آشکارسازی مواد مورد نظر، از معرف وانیلین-اسید سولفوریک استفاده که بر روی صفحه TLC اسپری شد (۲۱). استاندارد آرتیمیزینین به عنوان شاهد مورد استفاده قرار گرفت.

بررسی وجود آرتیمیزینین در اندام هوایی گیاه، کالوس و

سوسپانسیون سلولی با دستگاه گاز کروماتوگرافی: گاز کروماتوگرافی با دستگاه Perkin-Elmer، دارای دتکتور FID و ستون HP-5MS به طول ۳۰ متر و قطر داخلی $0/3$ میلی متر انجام شد. برنامه حرارتی ستون از دمای 100 درجه سانتی گراد شروع و تا دمای 270 درجه سانتی گراد ادامه یافت و دما در هر دقیقه 20 درجه افزایش یافت. دمای اتاق تزریق و دمای ردیاب 270 درجه سانتی گراد بود. فراکسیون جدا شده از صفحه TLC به عنوان نمونه انتخاب و $0/2$ میکرولیتر آن به دستگاه تزریق شد. زمان بین تزریق و ظهور پیک یعنی زمان بازداری

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

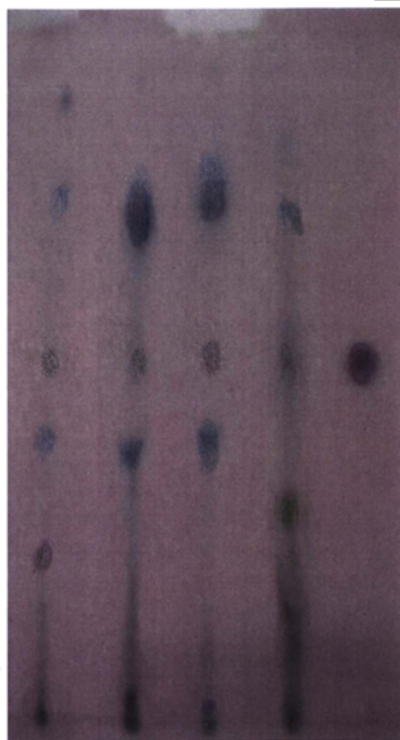
+++ رشد متوسط به طور تقریب هر مثبت بیانگر مساحتی معادل ۲ سانتی‌متر مکعب است.

آنالیز عصاره اندام هوایی گیاه، کالوس و سوسپانسیون

سلولی با TLC:

(۰/۷۶) را نشان داد. استاندارد آرتیمیزینین بانندی با $R_f = 0/52$ 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.

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،



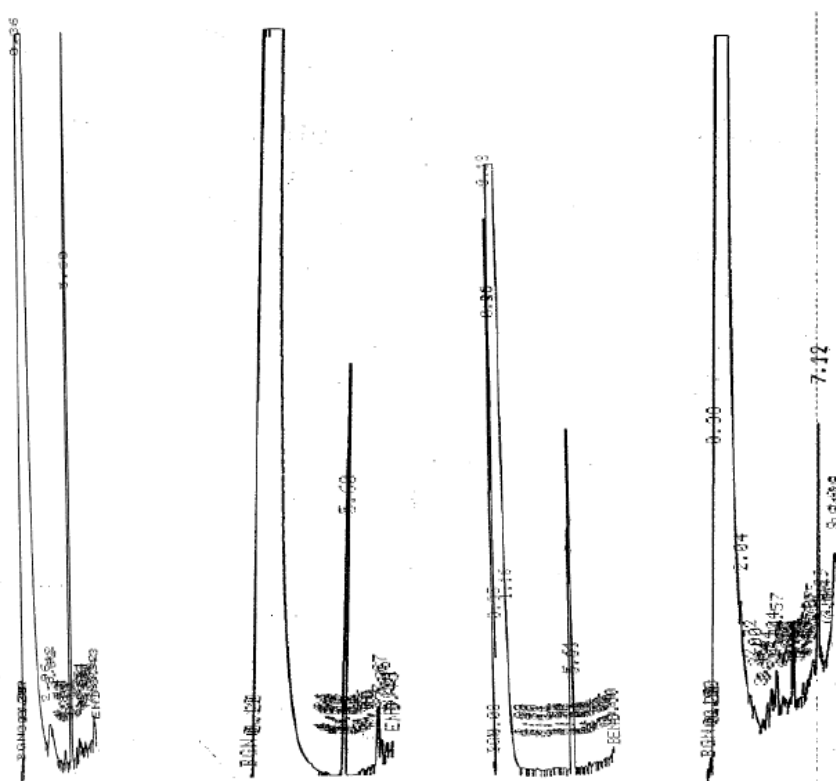
A B C D E

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

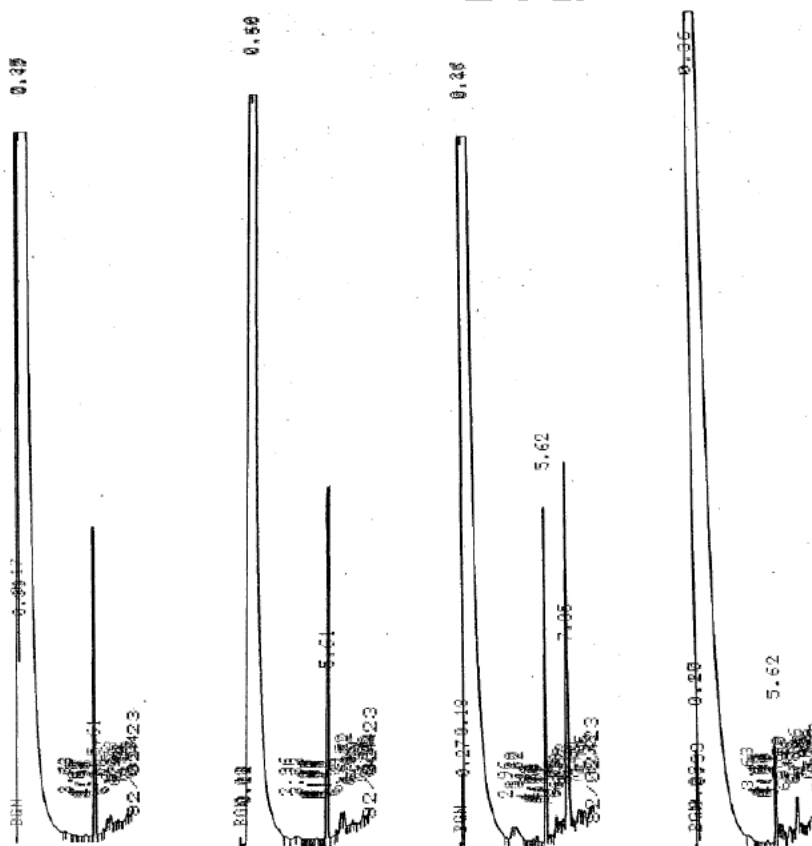
در کروماتوگرام مربوطه حاصل شد. نمونه مربوط به کالوس و سوسپانسیون سلولی نیز هر کدام یک پیک به ترتیب با $R_t = 5/6$ و $R_t = 5/66$ دقیقه ایجاد کردند ولی این پیک در عصاره اندام هوایی گیاه حضور نداشت.

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

همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده است با تزریق استاندارد آرتیمیزینین به دستگاه گاز کروماتوگرافی پیک با $R_t = 5/6$ دقیقه



شکل ۲: آنالیز GC عصاره‌ها به ترتیب از راست به چپ: گیاه، کالوس، سوسپانسیون، استاندارد آرتیمیزینین



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

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 $R_f=5/6$ و مساحت تقریبی ۸۱/۲۶ میلی‌متر مربع مشاهده شد که ۰/۵۳ درصد از مساحت کل پیک حاصل را شامل شد. نمونه حاوی کلسترول، آرتیمیزیاکتون و بیزابولول هر کدام پیک مشابه به ترتیب 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 $R_f=7/05$ دقیقه ایجاد کرد. با تزریق استاندارد بیزابولول پیک با $R_f=7/02$ 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 تنظیم‌کننده 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 آرتیمیزینین مشاهده شد و به‌نظر می‌رسد آرتیمیزینین در کشت سلولی گیاه تولید شده است ولی این باند در عصاره اندام هوایی گیاه حضور نداشت. در مطالعات قبلی TLC بارها برای شناسایی آرتیمیزینین به‌کار گرفته شده است. Quispe-Condori و همکارانش (۲۵) برای شناسایی آرتیمیزینین در عصاره‌های 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 آرتیمیزینین 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 گاز کروماتوگرافی، مشاهده شد که نمونه مربوط به کالوس و سوسپانسیون سلولی پیک با زمان بازداری (R_t) مشابه استاندارد آرتیمیزینین دارند و به‌نظر می‌رسد آرتیمیزینین در این نمونه‌ها وجود دارد. Peng و همکارانش (۲۷) نیز شناسایی و اندازه‌گیری آرتیمیزینین و پیش‌سازهای آن را به‌طور مستقیم با دستگاه GC-FID انجام دادند و یک رابطه خطی بین غلظت‌های استاندارد آرتیمیزینین و سطح طیف حاصل به‌دست آوردند.

علی‌رغم عدم تایید تولید آرتیمیزینین در گیاه درمنه کوهی بر اساس نتایج حاصل احتمال می‌رود مسیر تولید آرتیمیزینین در کشت سلولی گیاه فعال شده و تنظیم‌کننده‌های 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 آرتیمیزینین و شناسایی آن در کالوس شد (۲۸).

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

نتیجه گیری

در مجموع تولید آرتیمیزینین در کشت کالوس و سوسپانسیون درمنه کوهی علی‌رغم عدم تولید آن در گیاه بیانگر توانمندی

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, Afsharypour 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 stigmaterol 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. Berlin: 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.

نهفته درمنه کوهی است که با فراهم نمودن شرایط مناسب امکان تولید آرتیمیزینین 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 آرتیمیزینین را افزایش داد.

تشکر و قدردانی

هزینه‌های 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 Saunders 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, Giuletta AM. *Artemisia annua* (Quing-Hoa): in vitro culture and the

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.

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

Abstract

Aim: Artemisinin, an outstanding compound in genus *Artemisia*, is the most important anti malaria medicine. Therefore, plant cell culture of *Artemisia aucheri* Boiss 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 ketone 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* Boiss, Callus, Cell culture, Biotransformation