بررسی اثر متیل جاسمونات، نیترات پتاسیم و موالونیک اسید بر محتوای آرتمیزین در کشت سوسپانسیون سلولی درمنه خزری

ماندانا صمیمی زاد[۱*]، پریسا جنوبی[۱]، محمدرضا نقوی[۲و۳]، الیاس آریاکیا[۳]، بنیامین یزدانی[۴] و ابوالحسن شاهزاده فاضلی[۳]

[۱] تهران، دانشگاه خوارزمی، دانشکده علوم زیستی

[۲] تهران، دانشگاه تهران، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، گروه بیوتکنولوژی

[۳] کرج، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، بانک گیاهی

[۴] اردبیل، دانشگاه محقق اردبیلی، گروه ژنتیک مولکولی و مهندسی ژنتیک

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۰/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۴/۶/۹

چکیده

درمنه خزری (*Artemisia annua* L.) گیاهی دارویی و معطر از تیره کاسنیان می‌باشد. اهمیت عمده این گیاه ناشی از حضور لاکتون سزکویی ترپن اندوپراکسید به نام آرتمیزینین است که علاوه بر خاصیت ضد مالاریایی در درمان بسیاری از سرطانها نیز مؤثر می‌باشد. با توجه به مقدار اندک آرتمیزینین در این گیاه و غیراقتصادی بودن ساخت شیمیایی آن، کشت بافت آن به‌منظور تولید آرتمیزینین ضروری به نظر می‌رسد. هدف از این مطالعه کشت بافت و افزایش میزان آرتمیزینین در کشت سوسپانسیون سلولی با استفاده از القاگرهاست. به‌منظور کال زایی از محیط کشت MS حاوی تیمار هورمونی بنزیل آدنین (BA) و نفتالین استیک اسید (NAA) و ریزنمونه ریشه استفاده شد. سوسپانسیون سلولی از کالوسهای ریشه در محیط MS مایع حاوی $BA1.5\ mgl^{-1}$ و $NAA0.5\ mgl^{-1}$ تهیه گردید. به‌منظور مطالعه میزان آرتمیزینین در کشت سوسپانسیون سلولی از تیمارهای متیل جاسمونات، نیترات پتاسیم و لاکتون موالونیک اسید استفاده شد. در مرحله کال زایی $BA1.5\ mgl^{-1}$ و $NAA0.5\ mgl^{-1}$ بهترین تیمار محسوب شدند. در کشت سوسپانسیون سلولی بیشترین میزان آرتمیزینین در غلظتهای $5\ mgl^{-1}$ متیل جاسمونات، $۷۵۰mgl^{-1}$ نیترات پتاسیم و $75\ mgl^{-1}$ موالونیک اسید به‌دست آمد. به نظر می‌رسد کالوسهای گیاه درمنه خزری در تولید آرتمیزینین در کشت سوسپانسیون سلولی مؤثر باشند. همچنین افزودن القاگرها موجب افزایش قابل توجهی در میزان آرتمیزینین در کشت سوسپانسیون سلولی می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: درمنه خزری، کشت بافت، سوسپانسیون سلولی، آرتمیزینین

* نویسنده مسئول، تلفن:۰۹۱۹۹۲۷۳۲۶۶ ، پست الکترونیکی: mandanasamimizad@gmail.com

مقدمه

Artemisia annua L. از تیره کاسنیان، گیاهی است علفی و یکساله که بومی آسیا و شرق اروپاست و معمولاً در نواحی معتدل پراکنده شده است (۶). درمنه خزری غنی از موادی است که دارای اثرات گوناگونی از جمله ضد التهاب، ضد تومور، ضد زخم معده، آنتی اکسیدان، ضد مالاریا، کاهش دهنده سوء هاضمه و ضد انقباض کیسه صفرا می‌باشد. این گیاه منبع دارویی آرتمیزینین است که یک لاکتون سزکویی ترپن اندوپراکسید می‌باشد و فعالیت مؤثری علیه نژادهای پلاسمودیوم دارد (۸). به دلیل افزایش مقاومت پلاسمودیوم به داروهای تجاری ضد مالاریا مانند کلروکوئین و سولفادوکسین (۱۱) و عملکرد نسبی کم (۰/۰۱ تا ۱/۰۸ درصد) آرتمیزینین در گیاه *A. annua* (۳) باعث شد تا

Archive of SID
www.SID.ir

محققان به تولید مصنوعی و شیمیایی این ماده بپردازند. کشت بافت در *A. annua* علاوه بر ریزازدیادی روش مؤثری برای تولید آرتمیزین شناخته شده است (۱۱) و میزان آرتمیزین در سوسپانسیون سلولی (۱۸)، ساقه (۱۲) و کشت ریشه مویین (۲۲) مورد بررسی قرار گرفته است. افزودن پیش سازها و القاگرها روش مؤثری برای افزایش متابولیتهای ثانویه در کشت سوسپانسیون سلولی شناخته شده است (۴). القاگرها نه تنها باعث تجمع فیتوالکسینها در گیاهان می‌شوند بلکه به هر شکل مسیر مربوط به پاسخهای دفاعی را نیز تحریک می‌کنند. در واقع مولکول محرک با گیرنده های غشای سلول گیاهی برهمکنش نموده از طریق مکانیسمی که هنوز ناشناخته است، ژنهای خاصی را فعال می‌کند که نتیجه آن سنتز متابولیتهای ثانویه در گیاهان است (۷). تاکنون پیش سازها و القاگرهایی مانند لاکتون موالونیک اسید، کازئین اسید (۲۴)، اسید سالیسیلیک (۲۳) و جیبرلیک اسید (۲۴) برای بررسی متابولیتهای ثانویه مورد مطالعه قرار گرفته اند.

باتوجه به مقدار اندک آرتمیزینین در این گیاه و محدودیتها و غیراقتصادی بودن و نیز عدم موفقیت در ساخت شیمیایی این ماده ضروری به نظر می‌رسد که با توجه به ویژگیهای مهم دارویی این گیاه برای تولید سریع و انبوه متابولیت های ثانویه و مواد دارویی از کشت بافت آن به طور بهینه استفاده شود. بدین منظور پس از بهینه سازی محیط کشت کال زایی با به کارگیری القاگرهای مناسب مبادرت به افزایش تولید آرتمیزینین در کشت سوسپانسیون سلولی گردید.

مواد و روشها

جوانه‌زنی بذرها و کال زایی: بذرهای گیاه *Artemisia annua* از بانک گیاهی مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تهیه شد. این بذرها از استان گلستان، ۲۵ متر قبل از منطقه کلاله جمع آوری شده بودند. بذرها با استفاده از اتانول ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه ضدعفونی و پس از آن دو بار با آب مقطر استریل شستشو داده شد. سپس در هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد به مدت ۱۵ دقیقه ضدعفونی شده و پس از چندین بار شستشو با آب مقطر استریل برای تولید گیاهچه در محیط کشت MS پایه (۱۴) حاوی ۳ درصد ساکارز و ۰/۸ درصد آگار و pH: ۵/۸ کشت داده شدند. با توجه به اینکه مطالعاتی که در زمینه میزان آرتمیزینین کالوسهای ریشه انجام شده بسیار اندک است و همچنین کالوسهای ریشه برای تولید کشت سوسپانسیون سلولی دارای بافت شکننده مناسبی بودند، بدین منظور پس از گذشت سه هفته از جوانه زنی بذرها و رسیدن طول ریشه ها به ۸cm از قطعات ۱cm– ۰/۵ رأس ریشه به عنوان جداکشت استفاده شد. جداکشتها در محیط کشت MS حاوی تیمارهای هورمونی بنزیل آدنین (BA) به غلظت های (mgl^{-1} ۰/۵، ۱، ۱/۵) و نفتالین استیک اسید (NAA) به غلظت های (mgl^{-1} ۰/۵ ، ۰/۲۵ ، ۰/۰۵) برای کال زایی قرار داده شدند. درصد کال زایی بر اساس نسبت تعداد ریزنمونه های دارای کالوس به تعداد کل ریزنمونه های هر تیمار محاسبه گردید.

برای هر تیمار ۳ تکرار و در هر تکرار ۱۶ قطعه جداکشت استفاده شد. کشتها در اتاق رشد در شرایط دمایی ۲±۲۳ درجه سانتی گراد و فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. عمل واکشت به فواصل هر سه هفته یکبار انجام شد.

کشت سوسپانسیون سلولی: به منظور بررسی کشت سوسپانسیون سلولی از محیط کشت MS مایع استفاده شد. همچنین بهترین سطح هورمونی که به منظور کالزایی استفاده شد این بار به صورت محلول مورد استفاده قرار گرفت. محیط MS مایع با سطح هورمونی BA (mgl^{-1} ۱/۵) و NAA (mgl^{-1} ۰/۵) استریل شد، سپس ۵۰ ml از محیط کشت مورد نظر را در ارلن های ۱۵۰ml توزیع نموده و آن دسته از کالوس های جوان ریشه که شرایط مناسبی از لحاظ رنگ و اندازه داشتند به مقدار gl^{-1} ۲ به ارلنهای مورد

Archive of SID

www.SID.ir

نظر اضافه شدند، ارلنها بر روی شیکر با سرعت ۱۱۰ دور در دقیقه و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد در شرایط تاریکی قرار گرفتند.

تیماردهی به‌منظور افزایش میزان آرتمیزینین: برای مشخص شدن مرحله ایستایی به منظور اعمال کردن تیمارهای موردنظر وزن تر سلولها به مدت یک ماه هر هفته اندازه گیری شد. پس از ۲۱ روز که سلولها به حداکثر رشد خود رسیدند و وارد مرحله ایستایی شدند، تیمارهای مورد نظر اعمال گردید. موالونیک اسید با غلظتهای (mgl^{-1} ۷۵، ۵۰ ، ۲۵)، متیل جاسمونات (mgl^{-1} ۷/۵ ، ۵ ، ۲/۵) و نیترات پتاسیم با غلظتهای (mgl^{-1} ۲۲۵۰ ،۷۵۰ ،۲۵۰) به محیط کشت سوسپانسیون سلولی اضافه شدند. برای هر تیمار ۳ تکرار در نظر گرفته شد، همزمان برای هر تیمار یک شاهد بدون القاگر نیز به کار رفت. پس از گذشت یک هفته از اعمال تیمارها، سلولها برای عصاره گیری به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق خشک و بعد پودر شدند.

آماده سازی نمونه و سنجش آرتمیزینین توسط HPLC: ۱۰۰mg سوسپانسیون سلولی خشک و پودر شده پس از اضافه کردن ۲۰ml n- هگزان به مدت ۱۵ دقیقه در دستگاه اولتراسونیک قرار داده شد. پس از صاف کردن عصاره حاصل جهت خارج نمودن حلال، از دستگاه روتاری (دور ۱۲۵ rpm و ۴۰ درجه سانتی گراد) استفاده گردید. عصاره خشک حاصل در ۱ ml اتانول حل شد و پس از اضافه کردن ۴ ml NaOH ۰/۲ درصد به مدت ۳۰ دقیقه در آون در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد و بعد از خنک شدن در دمای اتاق ۵ ml اسید استیک ۰/۰۵ M اضافه گردید و قبل از تزریق به درون دستگاه بوسیلهٔ سرنگ از فیلتر سرنگی HPLC عبور داده شد (۲۷). حجم هر تزریق ۲۰ میکرولیتر بود. شناسایی آرتمیزینین توسط دستگاه HPLC با دتکتور G1315B-DAD و ستون Zorbax SB C18 (150× 4.6 mm × 5 µm) و طول موج UV ۲۶۰nm انجام شد. مرحله متحرک ترکیبی از متانول ۴۵ و ۵۵ درصد بافر فسفات سدیم ۰/۰۱ M با pH: ۷ بود، سرعت جریان حلال ml/min ۱ تنظیم شد. منحنی کالیبراسیون با استفاده از سطح زیر منحنی حاصل از ترکیب استاندارد آرتمیزینین رسم شد و از معادله خط حاصل برای محاسبه غلظت آرتمیزینین استفاده گردید. محتوای آرتمیزینین بر اساس سطح زیر منحنی به دست آمده با استفاده از منحنی استاندارد آنها محاسبه گردید (شکل ۲).

آنالیز آماری داده‌ها: مطالعات به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح بلوکهای کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شد و داده ها توسط آزمون دانکن در سطح احتمال $p \leq 0.01$ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج

کال زایی: یک هفته پس از کشت، در تمام تیمارهای هورمونی تشکیل کالوس در جداکشت ریشه مشاهده شد. کالوس در تمام قسمتهای ریشه ظاهر شد. کالوسها نرم، متراکم، شکننده، سبز کمرنگ، سبز مایل به زرد، سفید و کرم تا زرد کمرنگ بودند. در هیچ یک از کالوسهای حاصل از جداکشت ریشه باززایی شاخه مشاهده نشد.

تجزیه واریانس داده های مربوط به درصد تشکیل کالوس در جداکشتهای ریشه در سطوح هورمون های BA و NAA در سطح احتمال $P< 0.01$ معنی دار بود. افزایش غلظت BA از mgl^{-1} ۰/۵ به mgl^{-1} ۱ هیچ گونه اختلاف معنی داری را نشان نداد، در حالی که با افزایش غلظت از mgl^{-1} ۱ به mgl^{-1} ۱/۵ اختلاف معنی داری مشاهده شد. مقایسه میانگین داده ها با آزمون دانکن نشان می‌دهد که غلظت mgl^{-1} ۱/۵ BA با ۷۹/۹ درصد بیشترین میزان کال‌زایی را ایجاد کرده است. طبق مقایسه میانگین با آزمون دانکن بیشترین درصد کال زایی در غلظت mgl^{-1} ۰/۵ NAA با میزان ۸۴ درصد به دست آمد (جدول ۱).

Archive

www.SID.ir

جدول ۱- مقایسه میانگین درصد کال زایی در مقادیر مختلف هورمون BA و NAA

BA (mgl^{-1})	NAA (mgl^{-1})	درصد کال زایی
۰/۵		۵۹ b
۱		۶۳/۲ b
۱/۵		۷۹/۹a
	۰/۰۵	۵۳/۵c
	۰/۲۵	۶۴/۶b
	۰/۵	۸۴ a
۰/۵	۰/۰۵	۴۱/۷ a
	۰/۲۵	۵۸/۳ a
	۰/۵	۷۷/۱a
۱	۰/۰۵	۵۲/۱ a
	۰/۲۵	۶۲/۵ a
	۰/۵	۷۵ a
۱/۵	۰/۰۵	۶۶/۷ a
	۰/۲۵	۷۲/۹ a
	۰/۵	۱۰۰ a

حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار می‌باشند.
مقایسه میانگین‌ها براساس آزمون دانکن انجام شده است.

اثر القاگرها بر وزن تر: تجزیه واریانس تیمار اسید موالونیک و متیل جاسمونات اختلاف معنی داری را در سطح احتمال $p<0.01$ نشان داد. با وجود این پس از اعمال تیمار نیترات پتاسیم تجزیه واریانس هیچ گونه اختلاف معنی داری را در وزن تر نشان نداد. مقایسه میانگین براساس آزمون دانکن نشان می‌دهد که غلظت mgl^{-1} ۷۵ موالونات بیشترین تأثیر را در وزن تر داشته است. مقایسه میانگین براساس آزمون دانکن تأثیر متیل جاسمونات بر رشد سوسپانسیون را منفی نشان داد، به‌طوری‌که سه غلظت اعمال شده نسبت به نمونه شاهد کاهش معنی داری را نشان دادند (جدول ۲).

تأثیر القاگرها در میزان تولید آرتمیزینین: در منحنی استاندارد آرتمیزینین زمان بازداری آرتمیزینین ۰/۵±۸ دقیقه به دست آمد. محتوای آرتمیزینین بر اساس سطح زیر منحنی به دست آمده با استفاده از منحنی استاندارد آنها محاسبه شد (شکل ۱).

جدول ۲- اثرات غلظت موالونیک اسید، متیل جاسمونات و نیترات پتاسیم بر وزن تر سوسپانسیون سلولی

تیمار	غلظت (mgl^{-1})	وزن تر
موالونیک اسید	۰	۲/ ۶۱۰ b
	۲۵	۳/ ۴۲۶ b
	۵۰	۲/ ۳۶۰ ab
	۷۵	۴/ ۵۶۳ a
متیل جاسمونات	۰	۵/ ۸۳۰ a
	۲/۵	۴/۱۹۶ b
	۵	۴/۰۸۶ b
	۷/۵	۴/۵۶۳ b
نیترات پتاسیم	۰	۷/۲۵۶a
	۲۵۰	۶/۶۸۳ a
	۷۵۰	۷/۲۶۰ a
	۲۲۵۰	۴/۵۶۳ a

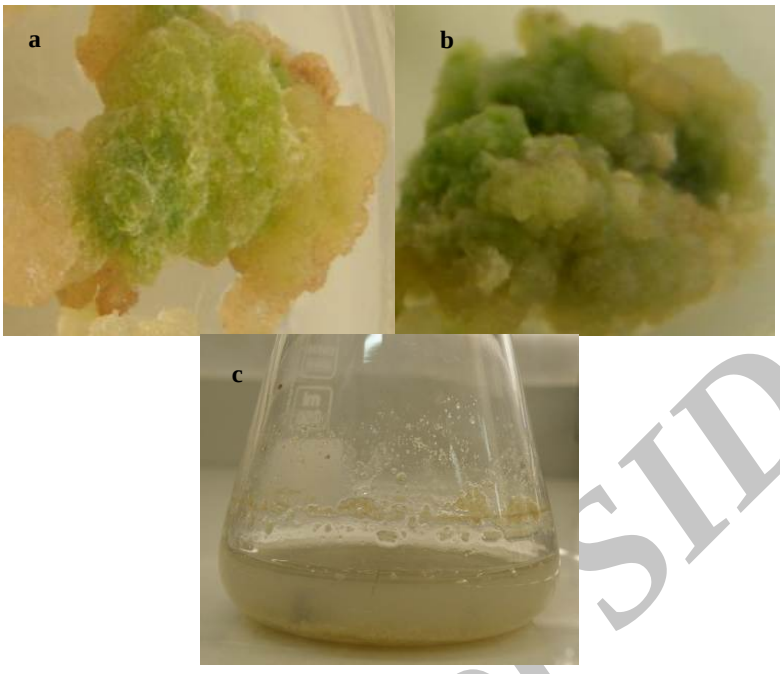
حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار می‌باشند.
مقایسه میانگین‌ها براساس آزمون دانکن انجام شده است.

میزان آرتمیزینین در غلظت mgl^{-1} ۵۰ موالونات μgl^{-1} ۴/۷ بود که نسبت به نمونه شاهد افزایش ۲/۱۳ برابری داشت. بیشترین مقدار آرتمیزینین در غلظت mgl^{-1} ۷۵ موالونات به میزان μgl^{-1} ۱۰/۶ به دست آمد که ۴/۸۱ برابر نمونه شاهد بود، در حالیکه در نمونه شاهد میزان آن μgl^{-1} ۲/۲ بود. هر سه غلظت افزوده شده متیل جاسمونات موجب افزایش در میزان متابولیت ثانویه مورد نظر گردید. به‌طوری‌که بیشترین میزان آرتمیزینین در غلظت mgl^{-1} ۵ متیل جاسمونات به مقدار μgl^{-1} ۷/۳ به دست آمد که نسبت به نمونه شاهد ۳/۳۱ برابر افزایش داشت. با افزودن غلظت نیترات پتاسیم به mgl^{-1} ۲۲۵۰ میزان آرتمیزینین ۰/۶۸ نسبت به نمونه شاهد کاهش نشان داد که می‌توان گفت افزایش بیش از حد نیترات موجب کاهش آرتمیزینین حتی کمتر از نمونه شاهد می‌گردد. بیشترین میزان آرتمیزینین در غلظت mgl^{-1} ۷۵۰ نیترات

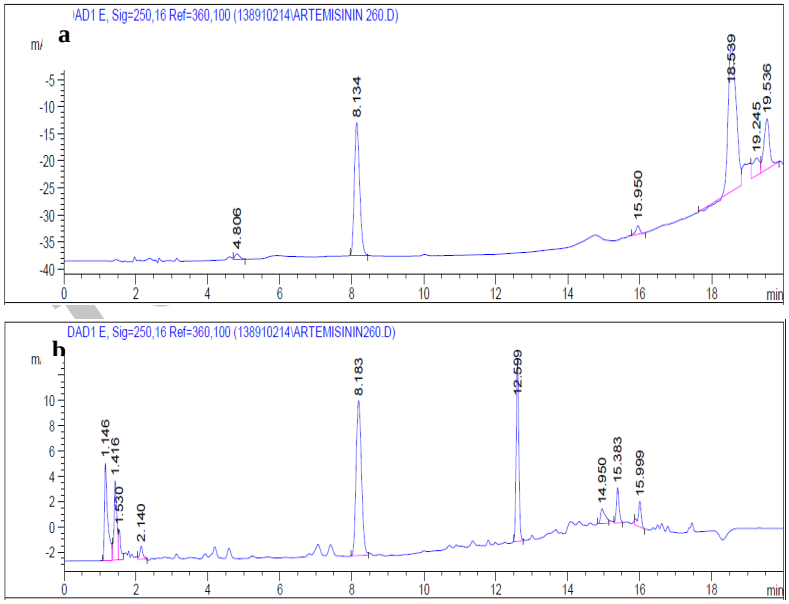
Archive of SID

www.SID.ir

پتاسیم به میزان μgl^{-1} ۶/۶ به دست آمد که افزایشی در حدود ۳ برابر نمونه شاهد داشت.



شکل ۱ –a: کال زایی در جداکشت ریشه در تیمار هورمونی mgl^{-1} ۱/۵ BA و mgl^{-1} ۰/۵ NAA. b: کال زایی در تیمار هورمونی mgl^{-1} ۱BA و mgl^{-1} ۰/۵ NAA. کشت سوسپانسیون سلولی در mgl^{-1} ۱/۵ BA و mgl^{-1} ۰/۵ NAA.



شکل ۲– a: کروماتوگرام HPLC استاندارد آرتمیزینین. b: کروماتوگرام HPLC نیترات پتاسیم در غلظت mgl^{-1} ۷۵۰

بحث

براساس طرح انجام شده در تمام غلظتهای متفاوت تنظیم کننده های رشد کال زایی وجود داشت. در ریزنمونه های ریشه پس از یک هفته تشکیل کالوس مشاهده شد. در حالی که Norma و همکاران تشکیل کالوس را در ریزنمونه های برگ، ریشه و هیپوکوتیل پس از ۳ هفته

www.SID.ir

اعلام کردند (۱۵). این تفاوت ممکن است به دلیل متفاوت بودن ژنوتیپها و یا تفاوت در شرایط آزمایش باشد.

ترکیبی از اکسین و سیتوکینین منجر به افزایش بیشتر تقسیمات سلولی در سطح زخمی قطعه جداکشت می‌گردد. مطالعات نشان می‌دهد که اکسینها و سیتوکینینها به عنوان مهمترین هورمونها مطرح هستند که نوع و غلظت مؤثر آنها در جداکشتها و نیز در جنسهای مختلف متفاوت است (۲). طبق مطالعات انجام شده هورمونهای گروه اکسین همراه با سیتوکینینها در تولید و رشد کالوس و تمایززدایی در گیاه Artemisia مؤثرند (۱).

در این پژوهش بیشترین درصد کال زایی در ۱/۵ mgl^{-1} BA و ۰/۵ mgl^{-1} NAA به دست آمد. Zia و همکاران میزان کال زایی ریزنمونه برگی گیاه *Artemisia absintium* در غلظت NAA۰/۵ mgl^{-1} را ۱۰۰ درصد اعلام کردند (۲۹) که با یافته های این پژوهش مطابقت دارد.

در این پژوهش در ریزنمونه ریشه باززایی شاخه مشاهده نشد که این می تواند مربوط به کمیت و کیفیت هورمونهای درون زا و برون زا باشد.

تلاش برای القا یا افزایش تولید متابولیتهای ثانویه با افزودن پیش سازها یا ترکیبات حدواسط مؤثر شناخته شده است (۱۷). از موالونیک اسید می توان به عنوان یک پیش ساز مؤثر برای افزایش آرتمیزینین نام برد (۴). در این پژوهش افزودن ۷۵ mgl^{-1} لاکتون موالونیک اسید به کشت سوسپانسیون سلولی علاوه بر افزایش وزن تر موجب افزایش محتوای آرتمیزینین به میزان ۴/۸۱ برابر نمونه شاهد گردید. Baldi و Dixit با افزودن۵۰mgl^{-1} موالونیک اسید به کشت سوسپانسیون سلولی حاصل از جداکشت برگ میزان افزایش آرتمیزینین را نسبت به نمونه شاهد ۲/۹۹ برابر اعلام کردند (۴). دو مسیر برای تولید ایزوپرنوئیدها در گیاهان وجود دارد: مسیر-1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate pathway (DXP) که در پلاستید اتفاق می افتد و مسیر وابسته به موالونات که در سیتوزول رخ می‌دهد (۱۳). Baldi و Dixit طبق تحقیقاتی اضافه کردن فرم لاکتون موالونیک اسید را در تأمین حلقه لاکتون آرتمیزینین و حفظ فعالیت بیولوژیکی آن ضروری دانستند (۴). Woerdenbag و همکاران نیز طی پژوهشی اعلام کردند که افزایش اسید موالونیک در کشت ساقه *A. annua* موجب افزایش میزان آرتمیزینین می‌شود (۲۴).

در این پژوهش، با افزایش غلظت متیل جاسمونات در محیط کشت سوسپانسیون سلولی، وزن تر سلولها نسبت به شاهد کاهش معنی داری نشان داد. Bulgakov و همکاران تأثیر متیل جاسمونات بر تولید آنتراکوئینون در کشت کالوس *Rubia Cordifolia* را بررسی کردند. نتایج مطالعه آنان نشان داد که متیل جاسمونات رشد تمام کشتهای *R. cordifolia* را مهار می‌کند و این وابسته به مقدار آن در محیط می‌باشد (۵). نتایج این تحقیق نشان داد که بیشترین محتوای آرتمیزینین در غلظت ۵ mgl^{-1} متیل جاسمونات به دست آمد. ترپنوئیدها مخصوصاً سزکویی ترپنوئیدها و مشتقات اکسیژنی آنها برای تولید اکثر متابولیتهای ثانویه در *A. annua* ضروری هستند. براساس مطالعات انجام شده آرتمیزینین، آرتمیزینیک اسید و دی هیدرو آرتمیزینیک اسید و بسیاری از سزکوئی ترپنوئیدها در گیاه *A. annua* با افزایش متیل جاسمونات افزایش می یابد (۹ و۲۶). متیل جاسمونات یکی از مولکولهای سیگنالی از خانواده جاسمونات هاست که می تواند موجب تولید آنزیمهای آنتی اکسیدانت و متابولیت های ثانویه در یکسری از گیاهان و کشتهای سلولی شود. همچنین متیل جاسمونات موجب افزایش میزان گونه های فعال اکسیژن (Reactive oxygen species)(ROS) می‌شود. تولید متابولیتهای ثانویه نیز با افزایش سطح ROS افزایش می‌یابد (۱۰). تحقیقات نشان می‌دهند که ROS موجب افزایش تبدیل دی هیدرو آرتمیزینیک اسید (Dihydroartemisinic acid) به آرتمیزینین می‌شود، به‌طوری‌که Wallaart و همکاران طی آزمایشهایی نشان دادند که پس از افزایش سطح ROS تحت تأثیر تیمار متیل جاسمونات میزان دی

Archive of SID

www.SID.ir

هیدرو آرتمیزینیک اسید کاهش می یابد، در صورتیکه در مقدار آرتمیزینین و آرتمیزینیک اسید افزایش قابل توجهی دیده می شود (۱۹). این نتایج با این نظریه که دی هیدروآرتمیزینیک اسید پیش ساز مستقیم آرتمیزینین است همخوانی دارد (۲۵).

Wang و همکاران گیاه *A. annua* را تحت تیمار متیل جاسمونات قرار دادند، پس از ۸ روز میزان آرتمیزینین ۴۹ درصد و میزان دی هیدروآرتمیزینیک اسید پس از ۱۰ روز ۴۸ درصد افزایش نشان دادند (۲۰). Putalum و همکاران گزارش کردند که ۲۰۰µM متیل جاسمونات تولید آرتمیزینین را تا ۵ برابر میزان شاهد در گیاه *A. annua* افزایش می‌دهد (۱۶).

افزایش نیترات پتاسیم به محیط کشت سوسپانسیون سلولی موجب افزایش میزان آرتمیزینین گردید. بیشترین میزان آرتمیزینین در غلظت mgl^{-1} ۷۵۰ پتاسیم به دست آمد که نسبت به نمونه شاهد ۳ برابر افزایش داشت. نیتروژن عنصری است که به دو صورت نیترات و آمونیوم توسط گیاهان جذب می‌شود. آمونیوم در مقادیر اندک توسط گیاهان تحمل پذیر است ولی در مقادیر بالا می تواند برای گیاه سمی باشد، از سویی افزایش نیترات برای گیاهان سمی نیست و موجب افزایش بیومس و میزان آرتمیزینین در *A. annua* می‌شود (۱۱). ازت یک عنصر ضروری در کشت سلول و بافت گیاهی به شمار می‌رود و در ساختمان RNA، DNA، اسیدهای آمینه و پروتئینها ضروری می‌باشد.

منابع

۱- شرفی، ع.، هاشمی سهی، ه.، جورابچی، ع. ۱۳۸۷. بهینه سازی شرایط باززایی گیاه دارویی *Artemisia annua* . مجله زیست شناسی ایران، ۲۱(۴) :۵۶۵ -۵۷۳.

۲- موافقی، ع.، حبیبی، ق.، علی اصغرپور، م .۱۳۸۷. باززایی گیاه دارویی کور (*Capparis spinosa*) با استفاده از کشت قطعات هیپوکوتیل. مجله زیست شناسی ایران، ۲۱(۲) :۲۹۷ – ۲۸۹.

3- Abdin, M. Z., M, Israr., R. U, Rehman and S. K, Jain. 2003. Artemisinin a novel antimalarial drug biochemical and molecular approaches for enhanced production. *Planta Medica*. 69. pp: 289-299.

4- Baladi, A. and Dixit, V.K. 2008. Yield enhancement strategies for artemisinin production by suspension cultures of *Artemisia annua*. *Bioresource Technology*. 99. pp: 4609-4614.

از سویی غلظت نیتروژن در تولید آمینو اسیدها در کشت سوسپانسیون سلولی مؤثر است (۱۷).

در پژوهشی که توسط Wang و Tan بر روی کشت ریشه *A. annua* انجام شد، افزایش میزان نیترات موجب افزایش محتوای آرتمیزینین گردید (۲۱). Liu و همکاران به بررسی میزان حساسیت کشت ساقه *A. annua* نسبت به تغییر در میزان نیتروژن محیط کشت پرداختند و بیان کردند که افزایش غلظت نیترات به آمونیوم به نسبت ۱:۳ موجب افزایش میزان آرتمیزینین می‌گردد (۱۱). نتایج فوق تأیید کننده نتایج این پژوهش در تأثیر نیترات بر افزایش میزان آرتمیزینین می‌باشد.

به طور کلی در این طرح بیشترین میزان آرتمیزینین در غلظت‌های mgl^{-1} ۵ متیل جاسمونات به میزان μgl^{-1} ۷/۳، mgl^{-1} ۷۵۰ نیترات پتاسیم μgl^{-1} ۶/۶ و mgl^{-1} ۷۵ موالونیک اسید به میزان μgl^{-1} ۱۰/۶ به دست آمد و نتایج بیانگر این بودند که افزودن القاگرها موجب افزایش قابل توجهی در میزان آرتمیزینین نسبت به نمونه شاهد می‌گردد.

سپاسگزاری

در پایان لازم است از مسئولان محترم مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران و دانشگاه تربیت معلم تهران تشکر و قدردانی گردد.

Archive of SID

www.SID.ir

5- Bulgakov V. P., Tchernoded G. K., Mischenko N. P., M.V., Khodakovskaya M.V., Glazunov V.P., Radchenko S.V., Zvereva E.V., Fedoreyev S.A. and Zhuravlev Yu.N. 2002. Effect of salicylic acid, methyl jasmonate,ethephon and cantharidin on anthraquinone production by *Rubia cordifolia* callus cultures transformed with the *rolB* and *rolC* genes. *Biotechnology*. 97. pp: 213–221.

6- Jame A. and T. Dasilva. 2003. Anthemediaceae: advances in tissue culture, genetics and transgenic biotechnology. *African journal of Biotechnology*. 12. pp: 544–556.

7- Kang, S.M., Jung, H.Y., Kang, Y.M., Yun, D.J., Bahk, J.K., Yang, J.K. and Choi.M.S. 2004. Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on the production of tropane alkaloids and the expression of PMT and H6H in adventitious root cultures of *Scopolia parviflora*. *Plant Science*. 166. pp: 745–751.

8- Kim,Y. Wethers, P. J. and B. E. Wyslouzil. 2003. A comparative study of mist and bubble column reactor in the in vitro production of artemisinin. *Plant Cell Reports*. 20. pp:451 – 455.

9- Li, Y., Huang, H., Wu, Y. L. 2006. Qinghaosu (Artemisinin)- a fantastic antimalarial drug from a Traditional Chinese Medicine. In: Xiao-Tian Liang, W.S.F. (Ed.), *Medicinal Chemistry of Bioactive Natural Products*. PP: 183-256.

10- Li, Z., Wang, X., Chen, F., Kim, H.J., 2007. Chemical changes and overexpressed genes in sweet basil (Ocimum basilicum L.) upon methyl jasmonate treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55. pp: 706–713.

11- Liu C., Guo C., Wang Y., Ouyang F. 2003. Factors influencing artemisinin production from shoot cultures of *Artemisia annua* L. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 19. pp: 535-538.

12- Liu C.Z., Wang Y.C., Guo C., Ouyang F., Ye H.C. and Li G.F. 1998. Production of artemisinin by shoot culture of *Artemisia annua* L. *in a* modified inner-loop mist bioreactor. *Plant Science*. 135. pp: 211–217.

13- Liu Y., Wong V. K. W., Ko B. C. B., Wong M. K., and Che C. M. 2005. Synthesis and Cytotoxicity Studies of Artemisinin Derivatives Containing Lipophilic Alkyl Carbon Chains. *Organic Letters*. *7*(8). pp: 1561-1564.

14- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*. 51. pp: 473-497.

15- Norma B., Giulietti P. and Maria A. 2008. Artemisini production by *Artemisia annua* L. transformed organ cultures. *Enzyme and Microbial Technology*. 18. pp: 526–530.

16- Putalun W., Luealon W., De-Eknamkul W., Tanaka H., Shoyama Y., 2007. Improvement of artemisinin production by chitosan in hairy root cultures of *Artemisia annua* L. *Biotechnology Letters*. 29. pp: 1143–1146.

17- Rao S., Ravishankar G.A. 2002. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*. 20. pp: 101–153.

18- Tawfiq N. K., L. A. Anderson, M. F. Roberts, j. D. Phillipson, D. H. Bray, and D. C. Warhurst. 1989. Antiplasmodial activity of *Artemisia annua* plant cell cultures. *Plant Cell Reports*. 8. pp: 425- 428.

19- Wallaart, T.E., Pras, N., Beekman, A.C., Quax, W.J. 2000. Seasonal variation of artemisinin and its biosynthetic precursors in plants of *Artemisia annua* of different geographical origin: proof for the existence of chemotypes. *Planta Medica*. 66. pp: 57–62.

20- Wang H., Ma C., Li Z., Ma L., Wang H., Ye H., Xu G., Liu B. 2010. Effects of exogenous methyl jasmonate on artemisinin biosynthesis and secondary metabolites in *Artemisia annua* L. *Industrial Crops and Products*. 31. pp: 214–218.

21- Wang, J. and Tan, R. 2002. Artemisinin production in *Artemisia annua* hairy root cultures with improved growth by altering the nitrogen source in the medium. *Biotechnology Letters*. 24. pp: 1153-1156.

22- Weathers P.J., Bunk G., Mccoy M.C. 2005. The Effect of phytohormones on growth and Artemisinin production in Artemisia annua hairy root. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*. 41. pp: 47–53.

23- Wen P., Chen J., Kong W., Pan Q., Wan S. and Huang W. 2005. Salicylic acid induced the expression of phenylalanine ammonia-lyase gene in *grape berry*, *Plant Science*. 169. pp: 928-934.

24- Woerdenbag H.J., Lfiers Jos F.J., van Uden W., Pras N., Malingr Th. M., Alfermann A. W. 1993. Production of the new antimalarial drug artemisinin in shoot cultures *of Artemisia annua* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 32. pp: 247-257.

Archive of SID

www.SID.ir

25- Zhang, Y., Teoh, K.H., Reed, D.W., Maes, L., Goossens, A., Olson, D.J., Ross, A.R., Covello, P.S. 2008. The molecular cloning of artemisinic aldehyde delta 11(13) reductase and its role in glandular trichome-dependent biosynthesis of artemisinin in Artemisia annua. *Journal of Biological Chemistry*. 283. pp: 21501–21508.

26- Zhao J., Davis L. C., Verpoorte R. 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*. 23. pp: 283–333.

27- Zhao S. S., Zeng M.Y. 1985. Studies on the analysis of qinghaosu by high-pressure liquid chromatograph and spectrometry (HPLC). *Planta Medica*. 51. pp: 233–237.

28- Zia M., Riaz- ur- Rehman and Chaudhary M. F. 2007. Hormonal regulation for callogenesis and organgenesis of *Artemisia absinthium* L. *African Journal of Biotechnology*. 6 (16). pp: 1874-1878.

Effect of methyl jasmonate, mevalonic acid and potassium nitrate in artemisinin content by suspension cultures of *Artemisia annua* L.

Samimizad M.[1], Jonoubi P.[1], Naghavi M.R.[2,3], Aryakia E.[3], Yazdani B.[4] and Shahzadefazeli A.[3]

[1] Biology Dept., Faculty of Science, Kharazmi University, Tehran, I.R. of Iran

[2] Biotechnology Group, College of Agriculture and Natural Resource, University of Tehran, Tehran, I.R. of Iran

[3] Plant Bank, Iranian Biological Resource Center (IBRC), Karaj, I.R. of Iran

[4] Molecular Genetics and Genetic Engineering Dept., Mohaghegh E Ardebili University, Ardebil, I.R. of Iran

Archive of SID

Abstract

Artemisinin, a sesquiterpene lactone endoperoxide derived from *Artemisia annua* L. (Asteraceae), is the most effective antimalarial Drug, It is also effective against a wide variety of cancers. Due to the low content of artemisinin in *A. annua* leaves and uneconomical chemical synthesis, tissue culture is essential. The purpose of this research is to focus the application of tissue culture technology and the cell suspension culture to increase artemisinin by elicitors. Callus cultures were induced from root explants at different BA and NAA concentrations in MS medium. The best callogenesis was on BA (1.5 mgl^{-1}) and NAA (0.5 mgl^{-1}). Suspension culture were initiated by transferring friable fraction of root callus into liquid MS medium with BA (1.5 mgl^{-1}) and NAA (0.5 mgl^{-1}). In an effort to increase the artemisinin production, methyl jasmonate, mevalonic acid lactone and potassium nitrate with different concentrations was tested by treating Suspension culture. A large increase in artemisinin content was found in 5 mgl^{-1} methyl jasmonate, 75 mgl^{-1} mevalonic acid lactone and 750 mgl^{-1} potassium nitrate. It seems suspension cultures of *Artemisia annua* is Effective in artemisinin Production. Also the addition of elicitors increase artemisinin content.

Key words: *Artemisia annua,* tissue culture, cell suspension culture, artemisinin

www.SID.ir