

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

ماندانا صمیمی زاد<sup>۱\*</sup>، پریسا جنوبی<sup>۱</sup>، محمدرضا نقوی<sup>۲</sup>، الیاس آریاکیا<sup>۳</sup>، بنیامین یزدانی<sup>۴</sup> و ابوالحسن شاهزاده فاضلی<sup>۳</sup>



<sup>۱</sup> تهران، دانشگاه خوارزمی، دانشکده علوم زیستی

<sup>۲</sup> تهران، دانشگاه تهران، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، گروه بیوتکنولوژی

<sup>۳</sup> کرج، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، بانک گیاهی

<sup>۴</sup> 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 ترین اندوپراکسید به نام آرتیمیزین است که علاوه بر خاصیت ضد مالاریایی در درمان بسیاری از سرطانها نیز مؤثر می‌باشد. با توجه به مقدار اندک آرتیمیزین در این گیاه و غیراقتصادی بودن ساخت شیمیایی آن، کشت بافت آن به منظور تولید آرتیمیزین ضروری به نظر می‌رسد. هدف از این مطالعه کشت بافت و افزایش میزان آرتیمیزین در کشت سوسپانسیون سلولی با استفاده از القاگرهاست. به منظور 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  $BA1.5 \text{ mg l}^{-1}$  و  $NAA0.5 \text{ mg l}^{-1}$  تهیه گردید. به منظور مطالعه میزان آرتیمیزین در کشت سوسپانسیون سلولی از تیمارهای متیل جاسمونات، نیترات پتاسیم و لاکتون موالونیک اسید استفاده شد. در مرحله کال زایی  $BA1.5 \text{ mg l}^{-1}$  و  $NAA0.5 \text{ mg l}^{-1}$  بهترین تیمار محسوب شدند. در کشت سوسپانسیون سلولی بیشترین میزان آرتیمیزین در غلظتهای  $5 \text{ mg l}^{-1}$  متیل جاسمونات،  $75 \text{ mg l}^{-1}$  نیترات پتاسیم و  $75 \text{ mg l}^{-1}$  موالونیک اسید به دست آمد. به نظر می‌رسد کالوسهای گیاه درمنه خزری در تولید آرتیمیزین در کشت سوسپانسیون سلولی مؤثر باشند. همچنین افزودن القاگرها موجب افزایش قابل توجهی در میزان آرتیمیزین در کشت سوسپانسیون سلولی می‌گردد.

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

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

### مقدمه

گیاه منبع دارویی آرتیمیزین است که یک لاکتون سزکویی ترین 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) آرتیمیزین در گیاه *A. annua* (۳) باعث شد تا

*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

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 آرتمی‌زین 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 ریشه‌ها 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 (۱، ۰/۵، ۰/۲۵) و نفتالین استیک اسید (NAA) به غلظت های (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  $23 \pm 2$  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 ( $1/5 \text{ mg l}^{-1}$ ) و NAA ( $0/5 \text{ mg l}^{-1}$ ) 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  $2 \text{ gl}^{-1}$  به ارلنهای مورد

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 مولونیک اسید، کازئین اسید (۲۴)، اسید سالیسیلیک (۲۳) و جیبرلیک اسید (۲۴) برای بررسی متابولیت‌های ثانویه مورد مطالعه قرار گرفته اند.

با توجه به مقدار اندک آرتمی‌زین 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 آرتمی‌زین در کشت سوسپانسیون سلولی گردید.

## مواد و روشها

**جوانه زنی 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 کلانله جمع آوری شده بودند. بذرها با استفاده از اتانول ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه ضدعفونی و

بافر فسفات سدیم  $0.1 \text{ M}$  با  $\text{pH}: 7$  بود، سرعت جریان حلال  $1 \text{ ml/min}$  تنظیم شد. منحنی کالیبراسیون با استفاده از سطح زیر منحنی حاصل از ترکیب استاندارد آرتیمیزینین رسم شد و از معادله خط حاصل برای محاسبه غلظت آرتیمیزینین استفاده گردید. محتوای آرتیمیزینین 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 داده‌ها 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 داده‌های مربوط به درصد تشکیل کالوس در جداکشت‌های ریشه در سطوح هورمون‌های BA و NAA در سطح احتمال  $P < 0.01$  معنی‌دار بود. افزایش غلظت BA از  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  به  $1 \text{ mg l}^{-1}$  هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری را نشان نداد، در حالی که با افزایش غلظت از  $1 \text{ mg l}^{-1}$  به  $1/5 \text{ mg l}^{-1}$  اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون دانکن نشان می‌دهد که غلظت  $1/5 \text{ mg l}^{-1}$  BA با  $79/9$  درصد بیشترین میزان کال‌زایی را ایجاد کرده است. طبق مقایسه میانگین با آزمون دانکن بیشترین درصد کال‌زایی در غلظت  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  NAA با میزان  $84$  درصد به دست آمد (جدول ۱).

نظر اضافه شدند، ارلنها بر روی شیکر با سرعت  $110$  دور در دقیقه و دمای  $25$  درجه سانتی‌گراد در شرایط تاریکی قرار گرفتند.

**تیماردهی به منظور افزایش میزان آرتیمیزینین:** برای مشخص شدن مرحله ایستایی به منظور اعمال کردن تیمارهای موردنظر وزن تر سلولها به مدت یک ماه هر هفته اندازه‌گیری شد. پس از  $21$  روز که سلولها به حداکثر رشد خود رسیدند و وارد مرحله ایستایی شدند، تیمارهای مورد نظر اعمال گردید. مولونیک اسید با غلظتهای ( $0.75 \text{ mg l}^{-1}$ ،  $0.5$ ،  $0.25$ )، متیل جاسمونات ( $0.75 \text{ mg l}^{-1}$ ،  $0.5$ ،  $0.25$ ) و نیترات پتاسیم با غلظتهای ( $0.250$ ،  $0.750$ ،  $2.250 \text{ mg l}^{-1}$ ) 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 عصاره‌گیری به مدت  $48$  ساعت در دمای اتاق خشک و بعد پودر شدند.

**آماده سازی نمونه و سنجش آرتیمیزینین توسط HPLC:**  $100 \text{ mg}$  سوسپانسیون سلولی خشک و پودر شده پس از اضافه کردن  $20 \text{ ml}$  -n هگزان به مدت  $15$  دقیقه در دستگاه اولتراسونیک قرار داده شد. پس از صاف کردن عصاره حاصل جهت خارج نمودن حلال، از دستگاه روتاری (دور  $125 \text{ rpm}$  و  $40$  درجه سانتی‌گراد) استفاده گردید. عصاره خشک حاصل در  $1 \text{ ml}$  اتانول حل شد و پس از اضافه کردن  $4 \text{ ml}$   $0.2 \text{ NaOH}$  درصد به مدت  $30$  دقیقه در آن در دمای  $45$  درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و بعد از خنک شدن در دمای اتاق  $5 \text{ ml}$  اسید استیک  $0.05 \text{ M}$  اضافه گردید و قبل از تزریق به درون دستگاه بوسیله سرنگ از فیلتر سرنگی HPLC عبور داده شد (۲۷). حجم هر تزریق  $20$  میکرولیتر بود. شناسایی آرتیمیزینین توسط دستگاه HPLC با دتکتور G1315B-DAD و ستون Zorbax SB  $(150 \times 4.6 \text{ mm} \times 5 \text{ } \mu\text{m})$  C18 و طول موج  $260 \text{ nm}$  UV انجام شد. مرحله متحرک ترکیبی از متانول  $45$  و  $55$  درصد

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

NAA و BA		
درصد کال زایی	NAA (mg l <sup>-1</sup> )	BA (mg l <sup>-1</sup> )
۵۹ b		۰/۵
۶۳/۲ b		۱
۷۹/۹a		۱/۵
۵۳/۵c	۰/۰۵	
۶۴/۶b	۰/۲۵	
۸۴ a	۰/۵	
۴۱/۷ a	۰/۰۵	۰/۵
۵۸/۳ a	۰/۲۵	
۷۷/۱a	۰/۵	
۵۲/۱ a	۰/۰۵	۱
۶۲/۵ a	۰/۲۵	
۷۵ a	۰/۵	
۶۶/۷ a	۰/۰۵	۱/۵
۷۲/۹ a	۰/۲۵	
۱۰۰ a	۰/۵	

حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار می‌باشند.

مقایسه میانگین‌ها براساس آزمون دانکن انجام شده است.

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

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

حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار می‌باشند.

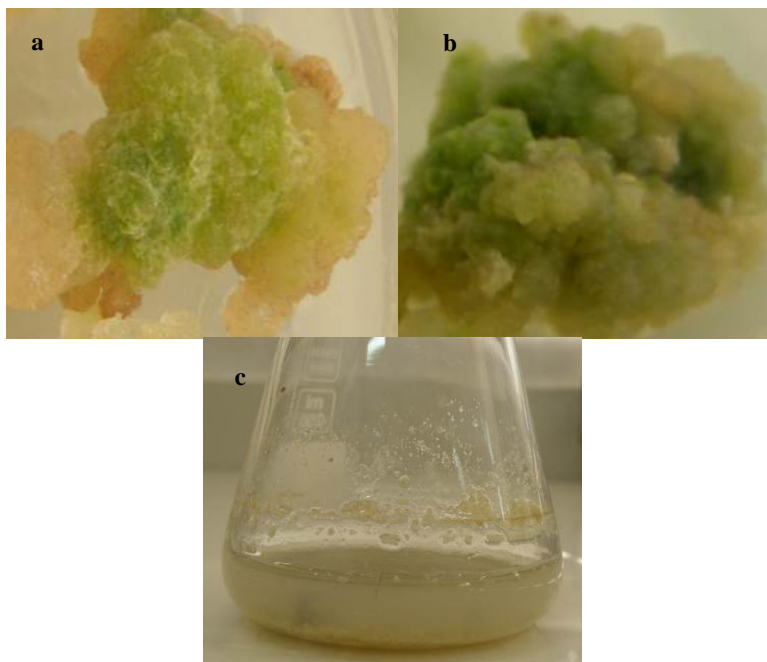
مقایسه میانگین‌ها براساس آزمون دانکن انجام شده است.

میزان آرتمیزینین در غلظت ۵۰ mg l<sup>-1</sup> موالونات ۴/۷ μg l<sup>-1</sup> بود که نسبت به نمونه شاهد افزایش ۲/۱۳ برابری داشت. بیشترین مقدار آرتمیزینین در غلظت ۷۵ mg l<sup>-1</sup> موالونات به میزان ۱۰/۶ μg l<sup>-1</sup> به دست آمد که ۴/۸۱ برابر نمونه شاهد بود، در حالیکه در نمونه شاهد میزان آن ۲/۲ μg l<sup>-1</sup> بود. هر سه غلظت افزوده شده متیل جاسمونات موجب افزایش در میزان متابولیت ثانویه مورد نظر گردید. به طوری که بیشترین میزان آرتمیزینین در غلظت ۵ mg l<sup>-1</sup> متیل جاسمونات به مقدار ۷/۳ μg l<sup>-1</sup> به دست آمد که نسبت به نمونه شاهد ۳/۳۱ برابر افزایش داشت. با افزودن غلظت نیترات پتاسیم به ۲۲۵۰ mg l<sup>-1</sup> 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 ۷۵۰ mg l<sup>-1</sup> نیترات

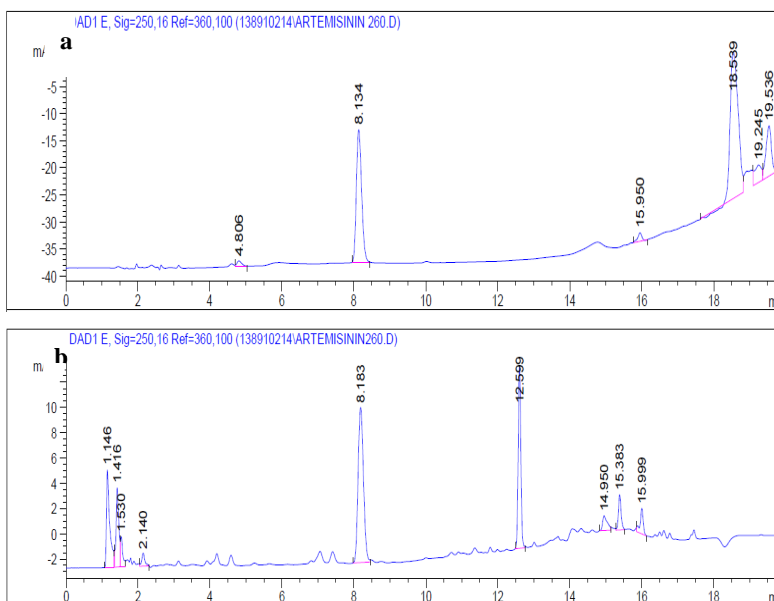
اثر القاگرها بر وزن تر: تجزیه واریانس تیمار اسید موالونیک و متیل جاسمونات اختلاف معنی‌داری را در سطح احتمال  $p < 0.01$  نشان داد. با وجود این پس از اعمال تیمار نیترات پتاسیم تجزیه واریانس هیچ گونه اختلاف معنی‌داری را در وزن تر نشان نداد. مقایسه میانگین براساس آزمون دانکن نشان می‌دهد که غلظت ۷۵ mg l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

تأثیر القاگرها در میزان تولید آرتمیزینین: در منحنی استاندارد آرتمیزینین زمان بازدارگی آرتمیزینین  $8 \pm 0.5$  دقیقه به دست آمد. محتوای آرتمیزینین بر اساس سطح زیر

پتاسیم به میزان  $6/6 \mu\text{gl}^{-1}$  به دست آمد که افزایشی در حدود ۳ برابر نمونه شاهد داشت.



شکل ۱- a: کال زایی در جداکشت ریشه در تیمار هورمونی  $BA \ 1/5 \text{ mg l}^{-1}$  و  $NAA \ 0/5 \text{ mg l}^{-1}$ . b: کال زایی در تیمار هورمونی  $BA \ 1 \text{ mg l}^{-1}$  و  $NAA \ 0/5 \text{ mg l}^{-1}$ . c: کشت سوسپانسیون سلولی در  $NAA \ 0/5 \text{ mg l}^{-1}$  و  $BA \ 1/5 \text{ mg l}^{-1}$ .



شکل ۲- a: کروماتوگرام HPLC استاندارد آرتمیزینین. b: کروماتوگرام HPLC نیترات پتاسیم در غلظت  $750 \text{ mg l}^{-1}$

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

## بحث

براساس طرح انجام شده در تمام غلظتهای متفاوت تنظیم کننده های رشد کال زایی وجود داشت. در ریزنمونه های

رخ می‌دهد (۱۳). Baldi و Dixit طبق تحقیقاتی اضافه کردن فرم لاکتون مولونیک 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 مولونیک 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 معنی‌داری 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  $5 \text{ mg l}^{-1}$  متیل جاسمونات به دست آمد. ترپنوئیدها مخصوصاً سزکوئی ترپنوئیدها و مشتقات اکسیژنی آنها برای تولید اکثر متابولیت‌های ثانویه در *A. annua* ضروری هستند. براساس مطالعات انجام شده آرتمیزینین، آرتمیزینیک اسید و دی‌هیدرو آرتمیزینیک اسید و بسیاری از سزکوئی ترپنوئیدها در گیاه *A. annua* با افزایش متیل جاسمونات افزایش می‌یابد (۹ و ۲۶). متیل جاسمونات یکی از مولکولهای سیگنالی از خانواده جاسمونات هاست که می‌تواند موجب تولید آنزیمهای آنتی‌اکسیدانت و متابولیت‌های ثانویه در یکسری از گیاهان و کشتهای سلولی شود. همچنین متیل جاسمونات موجب افزایش میزان گونه‌های 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 دی‌هیدرو آرتمیزینیک اسید (Dihydroartemisinic acid) به آرتمیزینین می‌شود، به طوری که Wallaart و همکاران طی آزمایشهایی نشان دادند که پس از افزایش سطح ROS تحت تأثیر تیمار متیل جاسمونات میزان دی

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 جداگشت می‌گردد. مطالعات نشان می‌دهد که اکسینها و سیتوکینینها به عنوان مهمترین هورمون‌ها مطرح هستند که نوع و غلظت مؤثر آنها در جداگشتها 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  $1/5 \text{ mg l}^{-1}$  BA و  $0/5 \text{ mg l}^{-1}$  NAA به دست آمد. Zia و همکاران میزان کال زایی ریزنمونه برگ گیاه *Artemisia absintium* در غلظت  $1/5 \text{ mg l}^{-1}$  NAA را ۱۰۰ درصد اعلام کردند (۲۹) که با یافته‌های این پژوهش مطابقت دارد.

در این پژوهش در ریزنمونه ریشه باززایی شاخه مشاهده نشد که این می‌تواند مربوط به کمیت و کیفیت هورمونهای درون‌زا و برون‌زا باشد.

تلاش برای القا یا افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه با افزودن پیش‌سازها یا ترکیبات حدواسط مؤثر شناخته شده است (۱۷). از مولونیک اسید می‌توان به عنوان یک پیش‌ساز مؤثر برای افزایش آرتمیزینین نام برد (۴). در این پژوهش افزودن  $75 \text{ mg l}^{-1}$  لاکتون مولونیک اسید به کشت سوسپانسیون سلولی علاوه بر افزایش وزن تر موجب افزایش محتوای آرتمیزینین به میزان  $4/81$  برابر نمونه شاهد گردید. Baldi و Dixit با افزودن  $50 \text{ mg l}^{-1}$  مولونیک اسید به کشت سوسپانسیون سلولی حاصل از جداگشت برگ میزان افزایش آرتمیزینین را نسبت به نمونه شاهد  $2/99$  برابر اعلام کردند (۴). دو مسیر برای تولید ایزوپرنوئیدها در گیاهان وجود دارد: مسیر 1-deoxy-D-xylose 5-phosphate pathway (DXP) که در پلاستید اتفاق می‌افتد و مسیر وابسته به مولونات که در سیتوزول

از سوی 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 آرتیمیزینین 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 آرتیمیزینین می‌گردد (۱۱). نتایج فوق تأیید کننده نتایج این پژوهش در تأثیر نیترات بر افزایش میزان آرتیمیزینین می‌باشد.

به طور کلی در این طرح بیشترین میزان آرتیمیزینین در غلظت‌های  $5 \text{ mg l}^{-1}$  متیل جاسمونات به میزان  $7/3 \text{ } \mu\text{gl}^{-1}$ ،  $750 \text{ mg l}^{-1}$  نیترات پتاسیم  $6/6 \text{ } \mu\text{gl}^{-1}$  و  $75 \text{ mg l}^{-1}$  موالونیک اسید به میزان  $10/6 \text{ } \mu\text{gl}^{-1}$  به دست آمد و نتایج بیانگر این بودند که افزودن القاگرها موجب افزایش قابل توجهی در میزان آرتیمیزینین 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.

هیدرو آرتیمیزینیک اسید کاهش می‌یابد، در صورتیکه در مقدار آرتیمیزینین و آرتیمیزینیک اسید افزایش قابل توجهی دیده می‌شود (۱۹). این نتایج با این نظریه که دی هیدروآرتیمیزینیک اسید پیش ساز مستقیم آرتیمیزینین است همخوانی دارد (۲۵).

Wang و همکاران گیاه *A. annua* را تحت تیمار متیل جاسمونات قرار دادند، پس از ۸ روز میزان آرتیمیزینین ۴۹ درصد و میزان دی هیدروآرتیمیزینیک اسید پس از ۱۰ روز ۴۸ درصد افزایش نشان دادند (۲۰). Putalum و همکاران گزارش کردند که  $200 \text{ } \mu\text{M}$  متیل جاسمونات تولید آرتیمیزینین را تا ۵ برابر میزان شاهد در گیاه *A. annua* افزایش می‌دهد (۱۶).

افزایش نیترات پتاسیم به محیط کشت سوسپانسیون سلولی موجب افزایش میزان آرتیمیزینین گردید. بیشترین میزان آرتیمیزینین در غلظت  $750 \text{ mg l}^{-1}$  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 می‌تواند برای گیاه سمی باشد، از سوی افزایش نیترات برای گیاهان سمی نیست و موجب افزایش بیومس و میزان آرتیمیزینین در *A. annua* می‌شود (۱۱). ازت یک عنصر ضروری در کشت سلول و بافت گیاهی به شمار می‌رود و در ساختمان DNA، RNA، اسیدهای آمینه و پروتئینها ضروری می‌باشد.

### منابع

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

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

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.

- 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. Artemisinin 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.



- 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 organogenesis 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.<sup>1</sup>, Jonoubi P.<sup>1</sup>, Naghavi M.R.<sup>2,3</sup>, Aryakia E.<sup>3</sup>, Yazdani B.<sup>4</sup> and Shahzadefazeli A.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Biology Dept., Faculty of Science, Kharazmi University, Tehran, I.R. of Iran

<sup>2</sup> Biotechnology Group, College of Agriculture and Natural Resource, University of Tehran, Tehran, I.R. of Iran

<sup>3</sup> Plant Bank, Iranian Biological Resource Center (IBRC), Karaj, I.R. of Iran

<sup>4</sup> Molecular Genetics and Genetic Engineering Dept., Mohaghegh E Ardebili University, Ardebil, I.R. of Iran

### 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 mg l<sup>-1</sup>) and NAA (0.5 mg l<sup>-1</sup>). Suspension culture were initiated by transferring friable fraction of root callus into liquid MS medium with BA (1.5 mg l<sup>-1</sup>) and NAA (0.5 mg l<sup>-1</sup>). 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 mg l<sup>-1</sup> methyl jasmonate, 75 mg l<sup>-1</sup> mevalonic acid lactone and 750 mg l<sup>-1</sup> 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