

تاثیر نانو الیستورهای کبالت و کیتوزان بر میزان تولید آرتمیزین و بیان دو ژن کلیدی SQS و DBR2 در گیاه *Artemisia annua*

The Effect of Nano Cobalt and Nano Chitosan on Artemisinin production and expression of SQS and DBR2 genes in *Artemisia annua*

بی تا قاسمی^۱، رامین حسینی^{۲*}، فاطمه دهقان نیری^۳

Bita Ghasemi¹, Ramin Hosseini², Fatemeh Dehghan Nayeri³

۱- کارشناس ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، ۲- دانشیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی،

۳- استادیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی

دانشکده فنی مهندسی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران

1- MSc in Agricultural Biotechnology, 2- Associate professor,
3- Assistant Professor, Agricultural Biotechnology Department, Imam Khomeini
International University, Gazvin, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: raminh_2001@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۳/۱۱/۱۸ - تاریخ پذیرش: ۹۴/۰۵/۱۲)

چکیده

گیاه درمنه (*Artemisia annua*) به دلیل تولید آرتمیزین با خاصیت‌های مختلف مانند مقابله با پلاسمودیم‌های عامل بیماری مالاریا و درمان انواع سرطان‌ها، دارای اهمیت ویژه می‌باشد. در این مطالعه به منظور بررسی تاثیر الیستور نانو کبالت و نانو کیتوزان روی میزان بیان ژن‌های کلیدی مسیر بیوستزی آرتمیزین (SQS و DBR2) و مقدار تولید این ماده در سوسپانسیون سلولی درمنه از غلظت‌های ۰، ۲/۵ و ۵ میلی گرم در لیتر نانو کبالت و ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی گرم در لیتر نانو کیتوزان در چهار بازه زمانی ۸، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت استفاده شد. بیشترین میزان تولید آرتمیزین در تیمار ۵ میلی گرم در لیتر نانو کبالت و بعد از ۲۴ ساعت حاصل شد. در تیمار فوق، تولید آرتمیزین نسبت به نمونه شاهد ۲/۲۵ برابر افزایش داشت (۱۱۳/۳۵ µg/g d.wt). همبستگی معکوس و معنی‌داری بین بیان دو ژن SQS و DBR2 با میزان تولید آرتمیزین در تیمارهای مختلف نانو کبالت وجود داشت. همچنین افزایش میزان غلظت نانو کبالت در بازه زمانی ۷۲ ساعت و افزایش غلظت نانو کیتوزان در بازه زمانی ۴۸ ساعت، باعث کاهش معنی‌داری در بیان ژن‌های SQS و DBR2 شد. نانو ذرات مورد مطالعه، در غلظت‌های بالا و در بازه‌های زمانی ذکر شده با کاهش بیان ژن‌های SQS و DBR2 به عنوان ژن‌های دخیل در مسیرهای انحرافی بیوستز آرتمیزین، باعث افزایش میزان بیوستز این ماده شد.

واژه‌های کلیدی

Artemisia annua

آرتمیزین

نانو کبالت

نانو کیتوزان

HPLC

qRT-PCR

مقدمه

متابولیت‌های ثانویه گیاهان یک منبع منحصر به فرد برای تهیه داروها هستند که اغلب هنگامی که گیاهان در معرض تنش‌های گوناگون مانند الیستورها و یا مولکول‌های پیام‌رسان قرار می‌گیرند، تولید می‌شوند (Zhao et al., 2005). آرتیمیزین، متابولیت ثانویه موجود در گیاه *Artemisia annua* یک اندوسزکویی‌ترین لاکتون است که در درمان بیماری مالاریا، برخی انواع سرطان‌ها مانند سرطان خون، سرطان سینه، سرطان کولون و سرطان ریه استفاده می‌شود (Lei et al., 2011). سطح تولید این ماده در گیاه بسیار پایین بوده است که به همین دلیل سبب گران قیمت شدن داروهای مربوطه شده است. سنتز شیمیایی آن نیز بسیار پرهزینه است و صرفه اقتصادی ندارد. از زمان شناخته شدن خواص دارویی آرتیمیزین، تلاش‌های زیادی جهت افزایش تولید این ماده انجام شده است، ولی تا به امروز محققین به یک روش تجاری برای افزایش سطح تولید آن دست نیافته‌اند (Ferreira et al., 1995). کشت سلولی جایگزین بسیار مناسبی برای تولید ترکیباتی است که استخراج مستقیم آن‌ها از گیاهان و یا سنتز شیمیایی آن‌ها دشوار است. بررسی بیان ژن‌ها و عوامل رونویسی مرتبط در یک مسیر متابولیتی مشخص در شناسایی و چگونگی تنظیم بیان ژن‌های آن مسیر متابولیتی کمک شایانی می‌کند. در واقع فهم چگونگی عملکرد ژن‌ها به محقق برای دستکاری هرچه بهتر و هدفمندتر بیان ژن‌ها و در نهایت افزایش تولید فرآورده مورد نظر اطمینان بالاتری می‌دهد (Zhao et al., 2005). استفاده از الیستور-ها در کشت سلولی یکی از روش‌های اصلی جهت افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه است. القاء، با اضافه کردن مقدار کمی الیستور موجب می‌شود تا زمان دستیابی به غلظت بالای محصولات کاهش یابد (Mulabagal and Tsay 2004). تغییر غلظت ریزمغذی‌ها یک روش برای افزایش محصولات متابولیت-های ثانویه در کشت سلولی است (Jimenez-Aparicio and Gutierrez-Lopez, 1999). خصوصیات مواد با تغییر اندازه آن‌ها به سمت نانو تغییر می‌کند و درصد اتم‌ها در واحد سطح حائز اهمیت می‌شود. شاخص‌های مهم و غیر قابل انتظار نانوذرات تا حدود زیادی در نتیجه ویژگی‌های سطحی مواد است که به جای خصوصیات توده ای مواد غالب شده است. با افزایش نسبت اتم‌ها

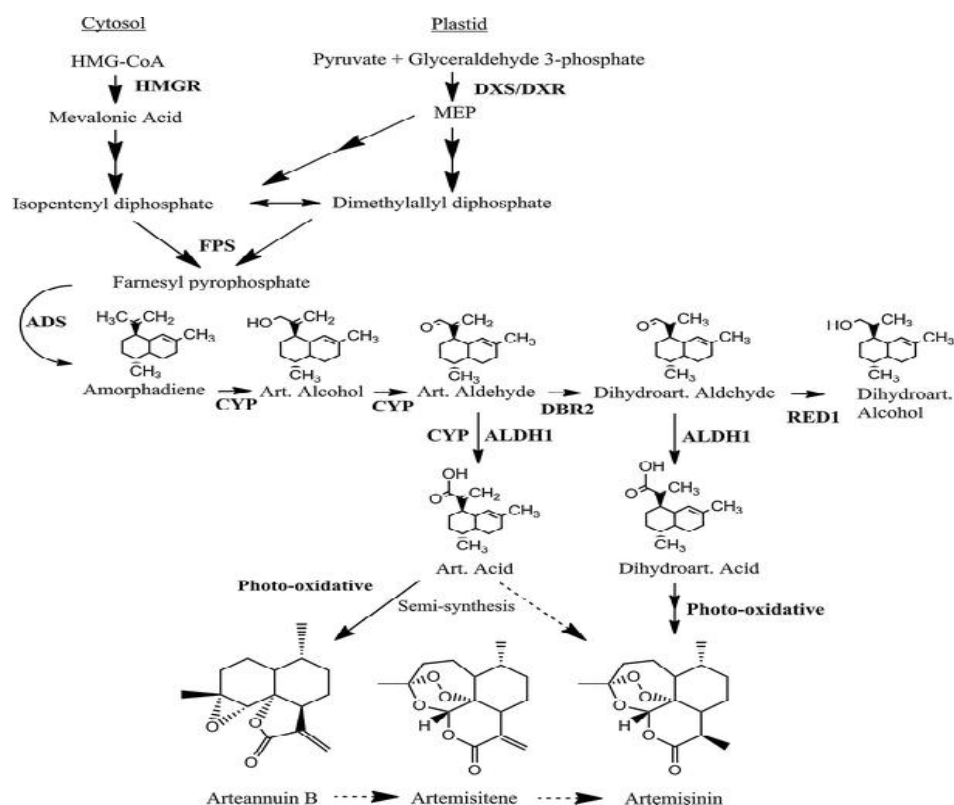
در سطح، انرژی آزاد نانوذرات بالا می‌رود که این خود باعث تغییرات زیادی در خواص ماده می‌شود. نانوفناوری زیستی می‌تواند سبب تغییرات شگرفی در کشاورزی شود البته مهندسی ژنتیک می‌تواند کمک شایانی به پیشرفت در این زمینه نماید. کیتوزان یک بیوپلیمر خطی با مونومرهای آن-استیل-گلوکزآمین با پیوندهای خطی (۴ به ۱ β) است. مونومرهای آن از نوع ۲-آمینو-۲-دزوکسی-β-D-گلوکان می‌باشد (Jahanshahi, 2011). امروزه نانوذرات کیتوزان به دلیل دارا بودن خواص گوناگون در زمینه‌های مختلفی از جمله تغذیه، دارویی و کشاورزی مورد توجه قرار گرفته است. پلی‌ساکارید کیتوزان به عنوان یک الیستور زیستی مؤثر جهت افزایش بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه در کشت سلولی بسیاری از گونه‌های گیاهان دارویی در پژوهش‌های زیادی اثبات شده است (Cheng et al., 2006). در این پژوهش به بررسی اثر نانوکیتوزان روی میزان بیان دو ژن دخیل در سنتز آرتیمیزین و مقدار تولید آن در کشت سلولی گیاه درمنه پرداخته شده است. کبالت یکی از فلزات سنگین (فلزاتی که چگالی بیش از ۵ گرم بر سانتی‌مترمکعب دارند) و جزو عناصر کم مصرف است (Fotouhi Ghaznini and Heidari, 2011). نانو ذرات جزو محرک‌های غیرزیستی و موادی هستند که بطور غیرمستقیم موجب القای تولید متابولیت‌های ثانویه می‌شوند. اخیراً یون‌های دو ظرفیتی کبالت و روی به علت تأثیر مثبتی که روی تولید متابولیت‌های ثانویه دارند مورد توجه قرار گرفته‌اند (Trejo-Tapia et al., 2001). در این پژوهش اثر نانوکبالت روی میزان بیان دو ژن دخیل در سنتز آرتیمیزین و مقدار تولید آن مورد بررسی قرار گرفت. شناخت ژن‌های مسیر تولید متابولیت‌ها و بررسی عملکرد الیستور بر بیان هر یک از آنها لازم است. در مسیر سنتز آرتیمیزین اولین مرحله تشکیل فارنزیل دی فسفات (FDP) از دو مسیر سیتوزولی و یا پلاستیدی است. بعد از آن انتخاب شاخه تولید سزکویی‌ترین‌ها و یا شاخه تولید استرول‌ها (از پیش ماده FDP) به صورت هماهنگ کنترل می‌شوند. برای تولید سزکویی‌ترین‌ها ابتدا آنزیم سزکویی‌ترین‌سیکلاز (SQS) Squalene Cyclase ساخته می‌شود و برای ساخته شدن استرول‌ها لازم است که ابتدا آنزیم اسکوالن سینتاز (SQS, Squalene Synthase) تولید شود. وقتی ساخت استرول افزایش می‌یابد تولید آرتیمیزین

هیدروآرتمیزینیک آلدئیدردوکتاز (Dihydroartemisinic Red1) (aldehyde reductase) در این مسیر شناخته شده است که باعث می شود دی هیدروآرتمیزینیک آلدئید (پیش ماده ساخت DHAA) به دی هیدروآرتمیزینیک الکل تبدیل شود و به این ترتیب سبب ایجاد رقابت و در نتیجه کاهش تولید آرتیمیزین گردد (Ryden et al., 2010).

مواد و روش ها

در این آزمایش از سوسپانسیون سلولی گیاه *A. annua* به عنوان ماده گیاهی استفاده شد. برای تهیه کالوس های ترد از تیمار هورمونی NAA ۰/۵ mg/l و BAP ۰/۵ mg/l و قند ساکارز (۳۰g/l) استفاده شد. بعد از ۳ مرتبه بازکشت، کالوس ها به محیط کشت مایع با همان ترکیب های هورمونی انتقال داده شدند و پس از چند بازکشت و بدست آوردن سوسپانسیون حاوی سلول های منفرد و جدا از هم، تیماردهی (غلظت های ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی گرم در لیتر نانوکیتوزان) در ۳ تکرار انجام شد. به منظور به دست آوردن زمان مناسب جهت اعمال الیستورها، منحنی رشد سلولی بر اساس وزن خشک سلول ها محاسبه گردید. به این منظور، هر دو روز یک بار و به مدت یک ماه، تمام نمونه برداری تیمارهای اعمال شده در بازه های زمانی ۸، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت جهت انجام آزمایش های ملکولی انجام شد. سوسپانسیون سلولی در شیکر انکوباتور در دمای ۲۵ °C و تاریکی نگهداری شدند. استخراج RNA با روش ترایزول (Sigma, USA) انجام شد. غلظت نمونه های RNA پس از استخراج، بوسیله نانودراپ (Thermo nano drop 1000, US) تعیین شدند و مقدار ۲ µg از آن جهت تیمار با DNaseI (Fermentas, Germany)، مورد استفاده قرار گرفت. در انتها صحت اثر آنزیم DNase روی RNA استخراجی، با استفاده از PCR و با بکارگیری آغازگرهای ژن یوبی کوئین و اکتین بررسی شد. تهیه cDNA (با 1 µg از RNA های تیمار شده با آنزیم DNase I) با استفاده از کیت RevertAid™ M-MuLV (Vivantis, Malaysia) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده صورت گرفت.

کاهش می یابد و بالعکس (Lange et al., 2000). کنترل معکوس این دو ژن از طریق مهار ژن SQS توسط میکونازول، در گیاه درمنه نیز اثبات شده است (Weathers et al., 2004). تشکیل اولین پیش ماده مخصوص آرتیمیزین، یعنی آمورفا-۴،۱۱- داین (Amorpha-4,11 dine) توسط سزکویی ترپن سیکلاز ویژه ای به نام آمورفا-۴،۱۱- داین سیتتاز (ADS)، (Amorphadiene dine synthase) صورت می گیرد که باعث حلقوی شدن FDP می شود. سپس آمورفا-۴،۱۱- داین P450 به آرتیمیزینیک الکل و سپس آلدئید آرتیمیزینیک آلدئید و در نهایت به دی هیدروآرتمیزینیک آلدئید (Dihydroartemisinic acid: DHAA) تبدیل می شود (شکل ۱) (Teoh et al., 2009). بعد از تشکیل آرتیمیزینیک آلدئید مسیر تشکیل آرتیمیزین و سایر محصولات به طور کامل مشخص نیست. به نظر می رسد دو مسیر پیش روی آرتیمیزینیک آلدئید وجود دارد، یک مسیر منجر به تشکیل آرتیمیزین بی (Artemisinin (AB) و دیگری منجر به تشکیل آرتیمیزین می شود. مسیر تشکیل AB با اکسیداسیون آرتیمیزینیک آلدئید به آرتیمیزینیک اسید (Artemisinic acid) (AA) توسط CYP و یا یک آلدئید هیدروژناز (*Aldh1*) انجام می شود و در نهایت AB تشکیل می شود (Teoh et al., 2009). دینگرا و ناراسو (۲۰۰۱) اظهار داشته اند که AB می تواند به آرتیمیزین (AT) (Artemisiten) و سپس به آرتیمیزین تبدیل شود (Dhingra and Lakshmi Narasu, 2001). براون و سی (۲۰۰۷) نشان دادند AA به آرتیمیزین تبدیل نمی شود (Brown and Sy 2007). با دانش کنونی، هیچ سیستم آنزیمی در گیاه برای تبدیل AB به آرتیمیزین به واسطه AT وجود ندارد (Nguyen et al., 2011). بنابراین، اینگونه به نظر می رسد که AB تنها محصول نهایی یکی از دو شاخه مسیر *seco-cadinanes* (شامل آرتیمیزین و AB) در گیاه *A. annua* است (Nguyen et al., 2011). همان طور که در شکل ۱ مشاهده می شود در شاخه دیگر از این مسیر آرتیمیزینیک آلدئید توسط سیتوکروم و توسط آنزیم DBR2 به دی هیدروآرتمیزینیک آلدئید و سپس به دی هیدروآرتمیزینیک اسید تبدیل می شود. در نهایت دی هیدروآرتمیزینیک اسید احتمال دارد که با چند مرحله غیر آنزیمی و واکنش های اکسیداسیون نوری به آرتیمیزین تبدیل می شود (Wallaart et al., 2001). اخیراً آنزیم جدیدی به نام دی-



شکل ۱- مسیر سنتز آرتمیزین، محصولات جانبی و آنزیم‌های دخیل در این مسیر (Nguyen *et al.*, 2011)

Figure 1. Artemisinin synthesis pathway, by products and enzymes involved in the pathway.

جدول ۱- اطلاعات مربوط به آغازگرهای هر ژن جهت واکنش Real Time PCR

Table 1. The information of primers for each gene in Real Time PCR.

Gene name	Primer name	Primer sequence F/R [5'-3']	Primer Tm [°C]	% GC	Amplicon length [bp]
SQS	AF302464	F-TTTGAAAGCAGTATTGAAACAC	51.3	31.8	192
		R- CAGACAGCATCACGAAGC	52.8	55.6	
DBR2	EU704257	F- CATCAACAAGCAAGCCCATTTC	56.5	45.5	125
		R- GCGATAGTCTTCAACCACCTC	55.7	52.4	
ACT	U36376	F- AGTGCTCCTGGTTAGTTGTC	54.1	50	166
		R- CTTGTTGCCTCGTAATCTTCG	54.7	47.6	

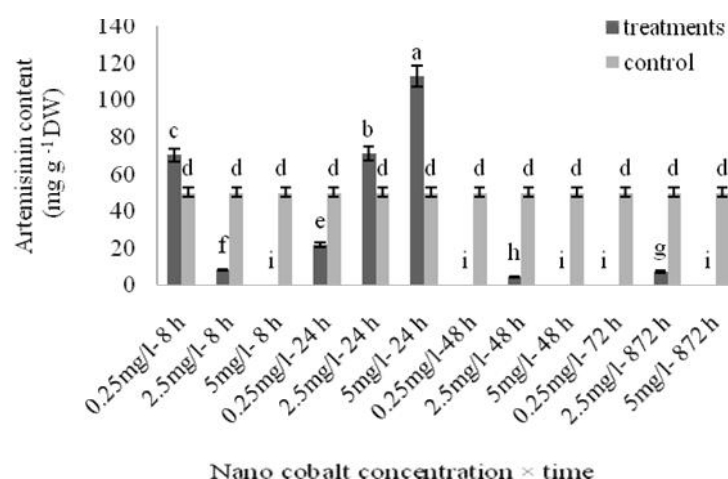
از نرم افزار SPSS صورت گرفت. برای عصاره گیری نمونه ها از روش اسمیت و همکاران استفاده شد (Smith et al., 1997).

نتایج

با مقایسه میانگین صفت وزن خشک سلولی، بیشترین میزان رشد سلول ها در روز چهاردهم پس از بازکشت به دست آمد. در روز شانزدهم فاز لگاریتمی تمام و سلول ها وارد فاز سکون و سپس فاز مرگ شدند. بنا براین الیستورها جهت عملکرد بهتر در روز چهاردهم (دارای بیشترین میزان رشد سلولی) به سوسپانسیون سلولی اضافه شدند. با توجه به نتایج حاصل از HPLC، سطوح مختلف نانوکبالت بعد از ۲۴ ساعت تأثیری در افزایش تولید آرتمیزین نداشتند. در تیمارهای ۵ mg/l و ۲۵ mg/l در ۸ ساعت، ۲/۵ mg/l در ۲۴ ساعت و تیمار ۵ mg/l در ۲۴ ساعت میزان آرتمیزین افزایش یافت. بیشترین میزان آرتمیزین در تیمار ۵ میلی گرم در لیتر نانوکبالت و ۲۴ ساعت بعد از اعمال الیستور به دست آمد (شکل ۲).

ژن SQS در بررسی بازه های زمانی مختلف، بیان ژن SQS، ۸ ساعت بعد از اعمال تیمارهای نانوکبالت بیشترین افزایش بیان را داشت و کمترین بیان ژن در بازه زمانی ۷۲ ساعت مشاهده شد (شکل ۳). بیان ژن SQS در غلظت ۰/۲۵ mg/l افزایش نشان داد و در دو غلظت ۲/۵ و ۵ mg/l بیان ژن SQS با نمونه شاهد (تیمار نشده) تفاوتی نشان نداد (شکل ۴). در مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت × زمان، افزایش بیان ژن SQS نسبت به شاهد، در تیمارهای ۰/۲۵ mg/l در بازه زمانی ۷۲ ساعت، ۲/۵ mg/l در بازه زمانی ۸ ساعت و بیشترین افزایش بیان ژن SQS در غلظت ۵ mg/l در بازه زمانی ۴۸ ساعت بعد از اعمال نانوکبالت مشاهده شد. با مقایسه میزان بیان ژن SQS (شکل ۵) و میزان تولید آرتمیزین مشاهده شد که به طور کلی با افزایش بیان ژن SQS، میزان تولید آرتمیزین کاهش یافت (شکل ۲). در بررسی غلظت های مختلف نانوکیتوزان، بیان ژن SQS در غلظت های ۱۰ و ۱۵ (mg/l) نانوکیتوزان نسبت به نمونه شاهد کاهش بیان داشتند (شکل ۶). بیشترین افزایش بیان ژن SQS در تیمار با الیستور نانوکیتوزان در بازه زمانی ۸ ساعت و کمترین میزان بیان ژن در بازه زمانی ۴۸ ساعت مشاهده شد (شکل ۷).

آغازگرهای اولیگونوکلئوتیدی جهت انجام واکنش PCR و qRT-PCR، براساس توالی ژن های مورد بررسی گیاه *A. annua* که در بانک داده های اطلاعاتی NCBI وجود دارد و با استفاده از نرم افزار Primer 3 (www.embnet.sk/cgi-bin/primer3) طراحی شد (جدول ۱). صحت آغازگرهای طراحی شده از لحاظ عدم اتصال غیراختصاصی و تشکیل دایمر، با استفاده از Primer Blast و در کل ژنوم و در نهایت نیز با واکنش PCR روی ژل آگارز ۱/۲٪ مورد تأیید قرار گرفت. جهت مقایسه میزان تظاهر ژن های دخیل در مسیر بیوستز آرتمیزین، آزمون Real Time PCR برای ۲۵ نمونه انجام شد. در این آزمون، کمیت سنجی بیان ژن به صورت نسبی انجام شد. آزمون Real Time PCR با استفاده از معرف سایبرگرین شرکت بیوپارس (biopars, SYBR Green, GUASNR, Iran) و بوسیله دستگاه iQ5 (Biorad, USA) انجام گرفت. واکنش ها در میکروپلیت های ۹۶ چاهکی و در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر و در ۴۰ سیکل انجام شد. پس از اندازه گیری میزان Ct برای ۳ ژن مورد مطالعه (۲ ژن دخیل در مسیر بیوستز آرتمیزین و نیز یک ژن خانه دار در ۲۴ نمونه تیمار شده (در ۳ غلظت متفاوت از نانوکبالت و نانو کیتوزان و در ۴ تیمار زمانی)، کارایی PCR با استفاده از نرم افزار LinRegPCR (version 11.0) تعیین و پس از محاسبات آماری میزان بیان نسبی هر نمونه (Ratio) با استفاده از فرمول Pfaffl و همچنین $\log_2 \text{Ratio}$ ، جهت مقایسه میزان بیان ژن های مورد مطالعه محاسبه شد (Livak and Schmittgen 2001). تجزیه واریانس داده ها با استفاده از نرم افزار MSTAT C و مقایسه میانگین های بیان هر یک از ژن ها با استفاده از روش دانکن صورت گرفت. جهت بررسی رابطه بیان دو ژن، ضریب همبستگی پیرسون محاسبه گردید. به منظور تعیین کمی مقدار آرتمیزین (برای تیمارهای نانوکبالت) از دستگاه HPLC (کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، مدل KNAUER آلمان)، دارای پمپ K-1001، ستون C8، دتکتور UV-K-2501 و نرم افزار eurochrom 2000 و از استونیتریل / اسیداستیک (۳۰/۷۰ v/v) به عنوان فاز متحرک استفاده شد. سرعت ۰/۲ ml/min در مدت زمان ۱۰ دقیقه در نظر گرفته شد. منحنی استاندارد با ماده تجاری آرتمیزین و خلوص ۹۸٪ (Sigma, USA) به دست آمد. هر نمونه در ۳ تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل های آماری با استفاده



شکل ۲ - میزان تولید آرتمیزینین در تیمارهای مختلف نانوکبالت و در بازه‌های زمانی مختلف. *حروف متفاوت نشانگر تفاوت معنی دار در آزمون دانکن است.

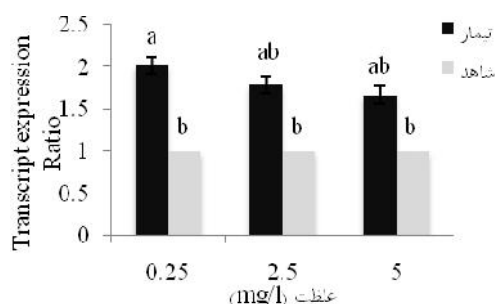
Figure 2. Artemisinin content in nanocobalt treatment, during different time courses.

* Different letters indicate significant differences in Duncan's test.

(شکل ۵) و میزان تولید آرتمیزینین مشاهده شد که به طور کلی با افزایش بیان ژن SQS، میزان تولید آرتمیزینین کاهش یافت (شکل ۲). در بررسی غلظت‌های مختلف نانوکیتوزان، بیان ژن SQS در غلظت‌های ۱۰ و ۱۵ (mg/l) نانوکیتوزان نسبت به نمونه شاهد کاهش بیان داشتند (شکل ۶). بیشترین افزایش بیان ژن SQS در تیمار با الیستور نانوکیتوزان در بازه زمانی ۸ ساعت و کمترین میزان بیان ژن در بازه زمانی ۴۸ ساعت مشاهده شد (شکل ۷).

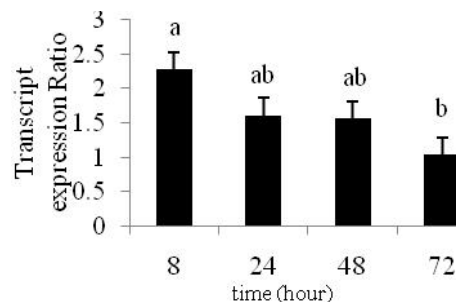
ژن SQS

در بررسی بازه‌های زمانی مختلف، بیان ژن SQS، ۸ ساعت بعد از اعمال تیمارهای نانوکبالت بیشترین افزایش بیان را داشت و کمترین بیان ژن در بازه زمانی ۷۲ ساعت مشاهده شد (شکل ۳). بیان ژن SQS در غلظت ۵ mg/l ۰/۲۵ افزایش نشان داد و در دو غلظت ۲/۵ و ۵ mg/l بیان ژن SQS با نمونه شاهد (تیمار نشده) تفاوتی نشان نداد (شکل ۴). در مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت × زمان، افزایش بیان ژن SQS نسبت به شاهد، در تیمارهای ۰/۲۵ mg/l در بازه زمانی ۷۲ ساعت، ۲/۵ mg/l در بازه زمانی ۸ ساعت و بیشترین افزایش بیان ژن SQS در غلظت ۵ mg/l در بازه زمانی ۴۸ ساعت بعد از اعمال نانوکبالت مشاهده شد. با مقایسه میزان بیان ژن SQS



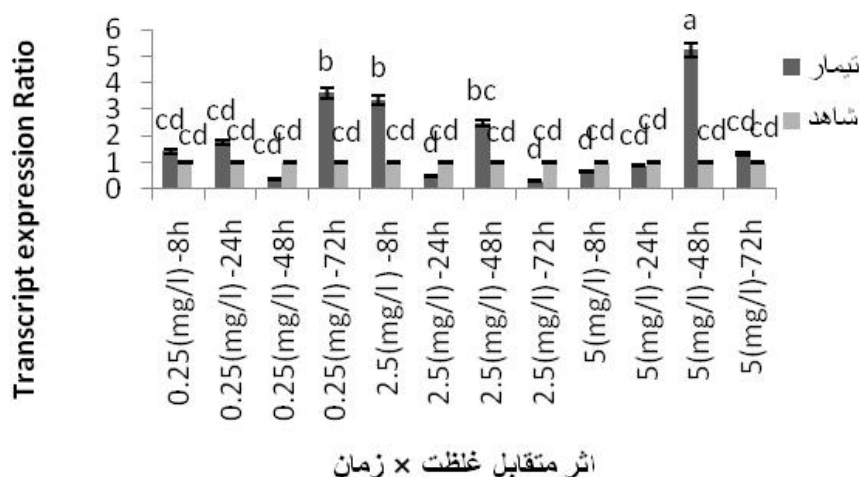
شکل ۴- میزان بیان ژن SQS در غلظت‌های مختلف نانوکبالت.

Figure 4. The expression levels of SQS gene in different concentrations of nanocobalt treatment



شکل ۳- میزان بیان ژن SQS در بازه‌های زمانی بعد از اعمال نانوکبالت.

Figure 3. The expression levels of SQS gene in different time courses after nano cobalt treatment.



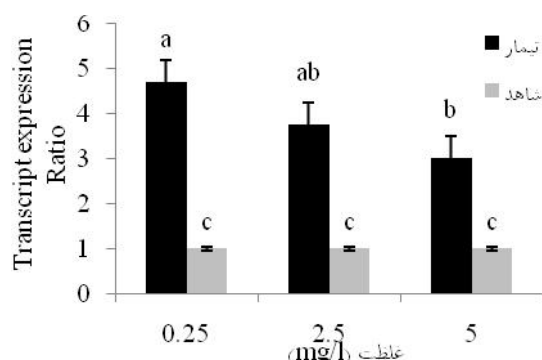
شکل ۵- میزان بیان ژن SQS در تیمارهای مختلف غلظت و زمان نانوکبالت. *حروف متفاوت نشانگر تفاوت معنی دار در آزمون دانکن است.

Figure 5. The expression levels of SQS gene in different times and concentrations of nanocobalt treatment. *Different letters indicate significant differences in Duncan's test.

ژن DBR2

همان طور که در شکل (۹) مشاهده می‌شود در تیمارهای ۵ mg/l و ۲/۵ و ۰/۲۵ نانوکبالت بیان ژن DBR2 نسبت به نمونه شاهد افزایش داشت. در بررسی بازه‌های زمانی و صرف نظر از غلظت-های مختلف، بیشترین افزایش بیان ژن DBR2 در بازه زمانی ۸ ساعت مشاهده شد و با گذشت زمان میزان بیان ژن کاهش داشت (شکل ۱۰).

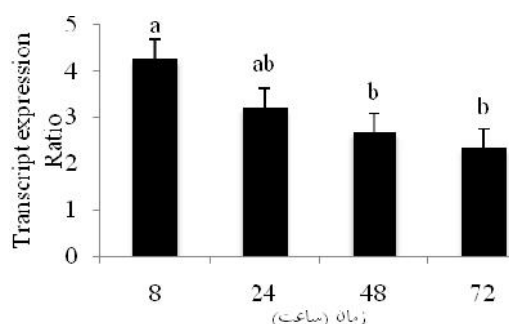
در بررسی اثر متقابل غلظت × زمان، تیمارهای ۵ mg/l در بازه زمانی ۴۸ ساعت، ۱۰ mg/l در بازه زمانی ۴۸ ساعت و نیز تیمار ۱۵ mg/l در بازه زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت، نسبت به نمونه شاهد کاهش بیان داشتند و در تیمارهای ۵ و ۱۰ mg/l در بازه زمانی ۷۲ ساعت و نیز تیمار ۱۵ mg/l در بازه زمانی ۸ ساعت افزایش بیان داشتند. در سایر تیمارها تفاوتی با نمونه شاهد مشاهده نشد (شکل ۸).



شکل ۹- میزان بیان ژن *DBR2* در غلظت‌های مختلف نانوکبالت.

*حروف متفاوت نشانگر تفاوت معنی دار در آزمون دانکن است.

Figure 9. The expression level of *DBR2* in different time courses after nanocobalt treatment. *different letters indicate significant differences in Duncan's test.

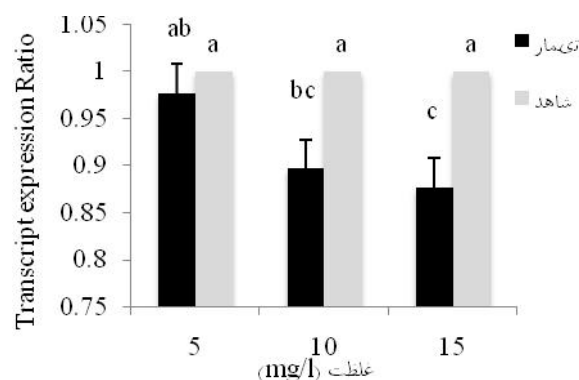


شکل ۱۰- میزان بیان ژن *DBR2* در بازه‌های زمانی بعد از اعمال نانوکبالت

*حروف متفاوت نشانگر تفاوت معنی دار در آزمون دانکن است.

Figure 10. The expression levels of *DBR2* in different nanocobalt concentration. *different letters indicate significant differences in Duncan's test.

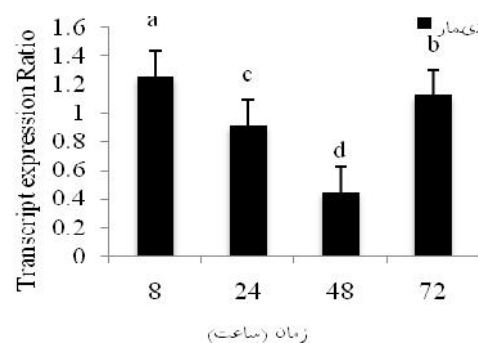
در بررسی اثر متقابل غلظت × زمان، ژن *DBR2* (شکل ۱۱) تیمارهای ۰/۲۵ mg/l بعد از ۷۲ ساعت، ۲/۵ mg/l بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت و نیز تیمار ۵ mg/l بعد از ۷۲ ساعت افزایش بیان داشتند. در سایر تیمارها تفاوتی در بیان ژن *DBR2* با نمونه شاهد مشاهده نشد ۵ mg/l. بین میزان تولید آرتیمیزین و بیان دو ژن *SQS* و *DBR2* همبستگی منفی وجود داشت در حالیکه میزان بیان این دو ژن با یکدیگر همبستگی مثبت نشان دادند. با توجه به شکل ۱۲، بیان ژن *DBR2* در غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی گرم در لیتر نانوکیتوزان نسبت به نمونه شاهد افزایش بیان و تیمار ۱۵ میلی گرم در لیتر کاهش بیان داشت. در بررسی بازه‌های زمانی مختلف بیشترین افزایش بیان پس از ۷۲ ساعت و کمترین میزان بیان ژن بعد از ۴۸ ساعت مشاهده شد (شکل ۱۳).



شکل ۶- بیان ژن *SQS* در غلظت‌های مختلف نانوکیتوزان.

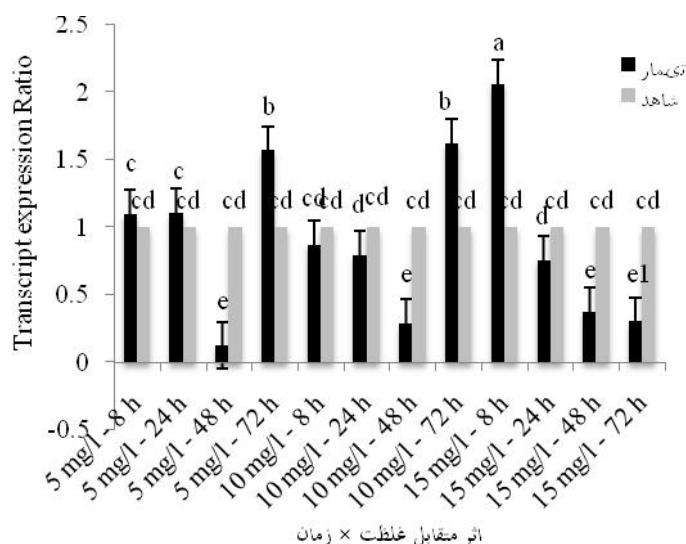
*حروف متفاوت نشانگر تفاوت معنی دار در آزمون دانکن است.

Figure 6. The expression levels of *SQS* gene in nano chitosan treatments. *Different letters indicate significant differences in Duncan's test.



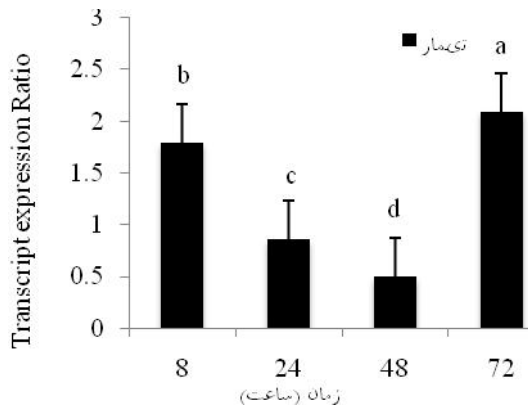
شکل ۷- بیان ژن *SQS* در بازه‌های زمانی بعد از اعمال نانوکیتوزان

Figure 7. The expression levels of *SQS* gene in different time courses after nano chitosan treatment. *Different letters indicate significant differences in Duncan's test.



شکل ۸- بیان ژن *SQS* در تیمارهای مختلف غلظت و زمان نانوکیتوزان

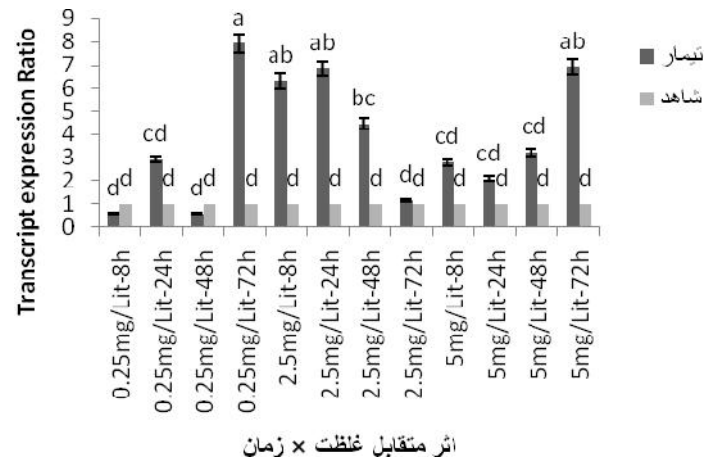
Figure 8. The expression levels of *SQS* in different time and concentration treatments of nanochitosan.



شکل ۱۳- بیان ژن *DBR2* در بازه‌های زمانی بعد از اعمال نانوکیتوزان.

*حروف متفاوت نشانگر تفاوت معنی دار در آزمون دانکن است.

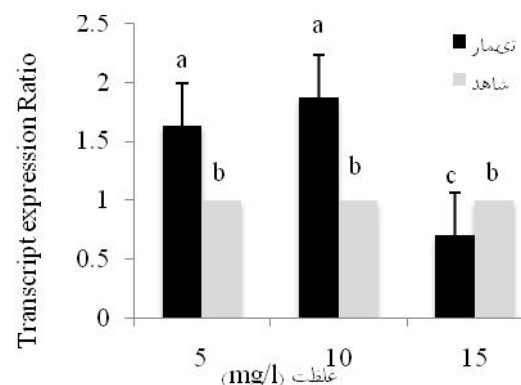
Figure 13. The expression levels of *DBR2* gene in different time courses after nanochitosan treatment. *Different letters indicate significant differences in Duncan's test.



شکل ۱۱- میزان بیان ژن *DBR2* در تیمارهای مختلف غلظت و زمان نانوکبالت

Figure 11. The expression levels of *DBR2* gene in different time and concentration treatments of nanocobalt.

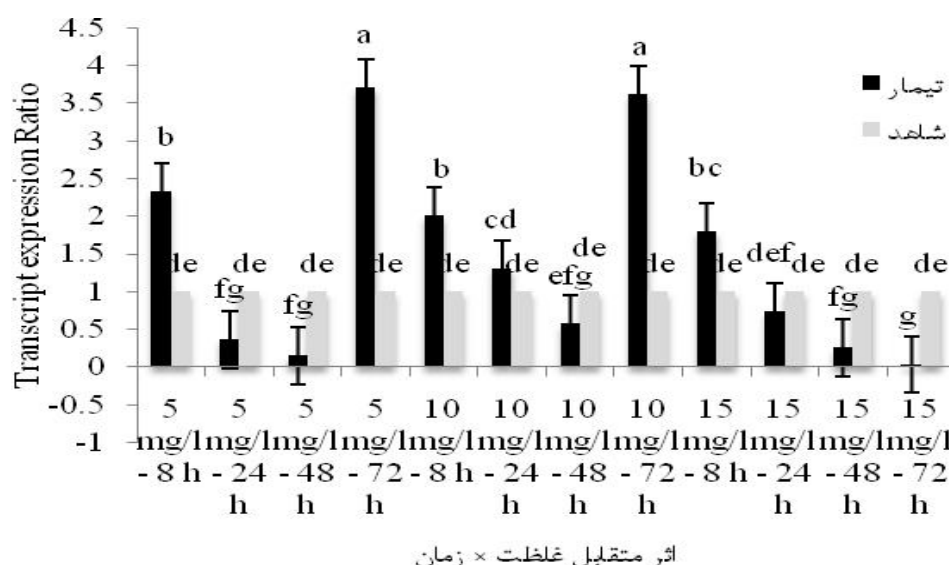
در بررسی اثر متقابل غلظت و زمان تیمارهای نانوکیتوزان، تیمارهای ۵ (mg/l) در بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت و نیز ۱۵ (mg/l) در بازه زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت نسبت به نمونه شاهد کاهش بیان داشتند و در تیمارهای ۵ (mg/l) در بازه زمانی ۸ و ۷۲ ساعت، تیمار ۱۰ (mg/l) در بازه زمانی ۸ و ۷۲ ساعت و نیز تیمارهای ۱۵ (mg/l) در بازه زمانی ۸ ساعت افزایش بیان داشتند. بیشترین افزایش بیان ژن *DBR2* در تیمارهای ۵ (mg/l) در بازه زمانی ۷۲ ساعت و ۱۰ (mg/l) در بازه زمانی ۷۲ ساعت مشاهده شد. بیان ژن *DBR2* در سایر تیمارها تفاوتی با نمونه شاهد نشان نداد (شکل ۱۴).



شکل ۱۲- میزان بیان ژن *DBR2* در غلظت‌های مختلف نانوکیتوزان.

*حروف متفاوت نشانگر تفاوت معنی دار در آزمون دانکن است.

Figure 12. The expression of *DBR2* gene in different nanochitosan concentrations. *Different letters indicate significant differences in Duncan's test.



شکل ۱۴- بیان ژن *DBR2* در تیمارهای مختلف غلظت و زمان نانوکیتوزان.

Figure 14. The expression levels of *DBR2* gene in different time and concentration treatments of nanochitosan.

بحث

پژوهش اخیر ثابت شد که می‌توان تولید آرتمیزین در کشت سوسپانسیون را با تحریک‌سازی به وسیله ۵ میلی‌گرم در لیتر نانوکبالت پس از ۲۴ ساعت به سطح ۱۱۳/۳۵ ($\mu\text{g/gDW}$) رساند. در تیمار فوق، تولید آرتمیزین نسبت به نمونه شاهد ۲/۲۵ برابر افزایش داشت. به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که کشت سوسپانسیون گیاه *A. annua* یک روش جایگزین مناسب به جای گیاه کامل برای تولید آرتمیزین است و با بهینه‌سازی غلظت و زمان مناسب می‌توان از نانوکبالت به عنوان الیستوری مناسب جهت افزایش تولید آرتمیزین استفاده کرد.

وجود همبستگی معکوس و معنی‌دار بین بیان دو ژن *SQS* و *DBR2* با میزان تولید آرتمیزین در تیمارهای مختلف نانوکبالت نشان دهنده رابطه منفی تولید آرتمیزین با بیان دو ژن *SQS* و *DBR2* است. به طور کلی بیان ژن *SQS* موجب می‌شود که فارنزیل دی فسفات وارد مسیر رقابتی و در نهایت به استرول تبدیل شود و به این ترتیب تولید آرتمیزین کاهش یابد. نتایج این پژوهش نیز این مطلب را تأیید می‌کند. بنا بر این جهت افزایش آرتمیزین می‌توان از مهار کننده‌های ژن *SQS* استفاده کرد. بیشترین میزان آرتمیزین در غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر نانوکبالت و بعد از ۲۴ ساعت مشاهده شد که در همین تیمار بیان ژن *SQS* بسیار کم بود. بر اساس نتایج پژوهش‌های دهینگرا و ناراسو

در تیمارهای مختلف نانوکبالت فقط در بازه زمانی ۸ و ۲۴ ساعت بعد از اعمال الیستور مقدار آرتمیزین نسبت به نمونه شاهد افزایش نشان داد و بعد از ۲۴ ساعت سطوح مختلف نانوکبالت اثر معنی‌داری در افزایش تولید آرتمیزین نداشتند. با توجه به رشد طبیعی سلول‌ها که در بازه زمانی روز چهاردهم تا شانزدهم در مرحله رشد لگاریتمی هستند و از روز شانزدهم به بعد وارد فاز سکون و سپس مرگ می‌شوند و نیز با توجه به این که الیستورها در روز چهاردهم اعمال شدند و افزایش تولید آرتمیزین تا ۲۴ ساعت بعد از اعمال الیستور، یعنی روز پانزدهم اتفاق افتاده است، می‌توان نتیجه گرفت که بهترین زمان برای اعمال الیستور جهت تحریک تولید آرتمیزین زمان قبل از وارد شدن سلول‌ها به فاز سکون می‌باشد. با توجه به بررسی میزان تولید آرتمیزین اثر تحریک با الیستور نانوکبالت (شکل ۲) میزان آرتمیزین از روز پانزدهم به بعد کاهش پیدا کرده است، بنا بر این این گونه به نظر می‌رسد که با وارد شدن سلول‌ها به فاز مرگ سلولی، آرتمیزین تولید شده (تولید طبیعی سلول و یا تحریک شده بوسیله نانوکبالت) احتمال دارد که برای فعالیت‌های مختلف سلول‌ها مصرف و یا به درون محیط کشت ترشح می‌شود، از این رو تخلیص و جداسازی این متابولیت از کشت سوسپانسیون سلولی بهتر است قبل از وارد شدن سلول‌ها به فاز مرگ صورت گیرد. در

(۲۰۰۱)، بعد از تشکیل آرتیمیزینیک آلدئید مسیر تشکیل آرتیمیزین و سایر محصولات به طور کامل مشخص نیست. دی هیدرو آرتیمیزین آلدئید (محصول ژن *DBR2*)، با بیان ژن *Red1* به دی هیدروآرتیمیزین الکل و با بیان ژن *ALDH* به دی هیدروآرتیمیزینیک اسید و در نهایت آرتیمیزین تبدیل می‌شود (Dhingra and Lakshmi Narasu, 2001). با وجود همبستگی معکوس بین بیان ژن *DBR2* و میزان آرتیمیزین در نتایج مشاهده شده در این پژوهش، این گونه به نظر می‌رسد که احتمال دارد که تبدیل دی هیدروآرتیمیزین آلدئید (محصول ژن *DBR2*) به دی هیدروآرتیمیزین الکل و در نتیجه تشکیل نشدن آرتیمیزین بیشتر از تبدیل آن به دی هیدروآرتیمیزینیک اسید و در نهایت تشکیل آرتیمیزین است. زیرا با افزایش بیان ژن *DBR2* میزان آرتیمیزین کاهش یافته است. در نهایت، این گونه به نظر می‌رسد که دو ژن *DBR2* و *ALDH* نیز رابطه معکوس با یکدیگر دارند زیرا کاهش میزان آرتیمیزین (افزایش بیان ژن *DBR2*) به این معنی است که دو مسیر تبدیل دی هیدروآرتیمیزین آلدئید به آرتیمیزینیک اسید (در نهایت آرتیمیزین) و نیز مسیر تبدیل آرتیمیزین آلدئید به آرتیمیزینیک اسید (در نهایت آرتیمیزین) کاهش یافته است و دو واکنش اخیر توسط آنزیم آلدئیددهیدروژناز (ژن *ALDH*) انجام می‌شود.

بیان ژن‌های *SQS* و *DBR2* در اثر متقابل غلظت و زمان در تیمارهای نانوکبالت به طور معنی‌داری نسبت به نمونه شاهد افزایش بیان نشان دادند و در مواردی نیز تغییری مشاهده نشد. با توجه به رابطه همبستگی معکوس بین میزان آرتیمیزین و بیان ژن-های *SQS* و *DBR2* ظاهراً به نظر می‌رسد که نانوکبالت به عنوان الیستور جهت تحریک تولید آرتیمیزین مناسب نمی‌باشد اما با توجه به نتایج حاصل از HPLC (اندازه‌گیری مقدار آرتیمیزین) در برخی از تیمارها (غلظت ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم در لیتر در بازه زمانی ۲۴ ساعت) افزایش معنی‌دار تولید آرتیمیزین مشاهده گردید. بنابراین این گونه به نظر می‌رسد که سایر ژن‌های مسیر در تولید آرتیمیزین نقش بیشتری دارند و الیستور نانوکبالت با تأثیر مثبت روی آن‌ها موجب افزایش سطح آرتیمیزین در تیمارهای نام برده گردیده است. به طور کلی احتمالاً سازوکار اثر نانوکبالت بر افزایش تولید آرتیمیزین با بررسی تمام ژن‌های مسیر سنتز

آرتیمیزین میسر می‌گردد. در پژوهشی روی مهندسی متابولیک مسیر سنتز آرتیمیزین به این نتیجه رسیدند که در مسیر سنتز آرتیمیزین بیش از یک نقطه محدود کننده وجود دارد. همچنین تنظیم مسیر بیوسنتز آرتیمیزین امکان‌پذیر است اما برای افزایش سطح متابولیت، افزایش بیان یک ژن کافی نیست. این نتایج با نتیجه مطالعه ژانگ و همکاران (۲۰۰۴) یکسان بود (Liu et al., 2011; Zhang et al., 2004). نتایج این پژوهش نیز این مطلب را تأیید می‌کند.

فلزاتی مانند کبالت، نیکل، آهن و نقره همگی باعث تحریک تولید دامنه وسیعی از متابولیت‌های ثانویه در گیاهان می‌شوند (Mithöfer et al., 2004). مقدار اندکی افزایش تولید آرتیمیزین با اضافه کردن عصاره مخمر به کشت سوسپانسیون *A. annua* مشاهده شد که این موضوع به وجود یون‌های فلزی مثل کبالت و روی نسبت داده شد که ممکن است به عنوان محرک واکنش‌های تولید آرتیمیزین عمل کنند (Baldi and Dixit 2008). تا به امروز اثر ذرات نانوکبالت به عنوان الیستور روی گیاه درمونه مورد بررسی قرار نگرفته است و بر اساس نتایج این پژوهش ذرات نانوکبالت می‌توانند به عنوان الیستوری مناسب جهت تحریک تولید آرتیمیزین استفاده شوند.

بیان دو ژن *SQS* و *DBR2* بعد از اعمال نانوکیتوزان به صورت موقتی افزایش بیان داشتند، سپس تا دو روز (بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از اعمال الیستور) بیان ژن‌ها کاهش پیدا کرد و در نهایت در روز سوم (تیمار زمانی ۷۲ ساعت) نیز مجدداً افزایش بیان نشان دادند. براساس گزارش دورته و همکاران (۲۰۱۱) بیان ژن *DBR2* در مدت زمان کوتاهی (۳۰ دقیقه تا ۱ روز) در اثر تیمار با متیل‌جاسمونات و سیکلودکستین افزایش بیان داشته است (Durante et al., 2011). این پژوهش نیز این افزایش موقتی بیان ژن *DBR2* در تیمار با نانوکیتوزان را نشان داد. در پژوهش دورته و همکاران میزان بیان ژن *DBR2* تا ۲۴ ساعت مورد بررسی قرار گرفت اما در این پژوهش مشخص شد که در بازه زمانی ۷۲ ساعت بیان دو ژن *SQS* و *DBR2* مجدداً افزایش می‌یابد. در پژوهش Lei و همکاران (2011) نیز ژن *DBR2* در اثر تیمار برگ گیاه با کیتوزان در بازه زمانی ۴ تا ۲۴ ساعت افزایش بیان نشان داد و بعد از ۲۴ ساعت (تا ۴۸ ساعت) کاهش بیان ژن

DBR2 مشاهده شد (Lei et al., 2011). هنگامی که الیستور میکونازول به محیط کشت سلول‌ها اضافه شد، میزان بیان ژن *DBR2* در بازه زمانی ۳۰ دقیقه، ۴ برابر و در بازه زمانی ۴ ساعت، ۳ برابر افزایش داشت و بعد از آن کاهش بیان ژن *DBR2* مشاهده شد (Durente et al., 2011). براساس مشاهدات این پژوهش و نیز نتایج سایر پژوهش‌های می‌توان اظهار داشت که بیان ژن *DBR2* به طور موقت و در بازه زمانی کوتاه مدت (قبل از ۲۴ ساعت) به طور کلی تحت تأثیر الیستورها قرار می‌گیرد و در پاسخ به الیستورهای گوناگون در طولانی مدت نقشی ندارد.

با توجه به مسیر سنتز آرتمیزین این احتمال وجود دارد که سلول‌ها در پاسخ اولیه به الیستور نانوکیتوزان به صورت موقت تولید آرتمیزین را متوقف می‌کنند (افزایش بیان ژن *SQS* و خروج از مسیر تولید آرتمیزین)، سپس در بازه زمانی ۲۴ تا ۴۸ ساعت تولید آرتمیزین افزایش (کاهش بیان ژن *SQS*) می‌یابد که مطابق نتایج نانوکبالت است (شکل‌های ۳ و ۷).

نتایج حاصل از qRT-PCR نشان داد که غلظت (mg/l) ۱۵ نانوکیتوزان باعث کاهش معنی‌دار در میزان بیان ژن *SQS* نسبت به بیان این ژن در نمونه شاهد شد. همچنین بررسی تغییرات بیان این ژن در بازه‌های زمانی مختلف نشان داد که ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار نانوکیتوزان، میزان بیان ژن *SQS* بیش از ۲ برابر نسبت به نمونه شاهد، کاهش یافت. از آنجا که ژن *SQS* یک مسیر انحرافی را در مسیر بیوسنتز آرتمیزین کنترل می‌کند می‌توان انتظار داشت که اعمال (mg/l) ۱۵ نانوکیتوزان پس از ۴۸ یا ۷۲ ساعت، با کاهش معنی‌دار در میزان بیان ژن *SQS*، سبب القای میزان آرتمیزین درون سلولی گردد. نتایج حاصل از این بررسی با کمک مسیرهای بیوشیمیایی شناخته شده در بیوسنتز آرتمیزین نشان می‌دهد که تیمار نانوکیتوزان با کاهش بیان ژن‌های دخیل در مسیرهای انحرافی بیوسنتز آرتمیزین می‌تواند در القای تولید درون سلولی آن نقش مثبت ایفا کند.

در کشت ریشه مؤین گیاه *A. annua* با اضافه کردن ۱۵۰ میلی-گرم بر لیتر کیتوزان، میزان تولید آرتمیزین تا ۶ برابر افزایش یافت (به مقدار ۱/۸ میکروگرم بر میلی‌گرم وزن خشک) (Putalun et al., 2007). Lee و همکاران (2011) با تیمار برگ *A. annua* با

۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان مقدار آرتمیزینیک اسید و آرتمیزین به ترتیب ۷۲٪ و ۵۳٪ در مقایسه با نمونه شاهد، افزایش نشان دادند. آنها اعلام کردند با مصرف کیتوزان مقدار پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و آنیون سوپراکسید (O_2^-) در برگ‌های گیاه به ترتیب ۱/۴ و ۳ بار افزایش می‌یابد. تجمع انواع رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) احتمال دارد که موجب تسریع تبدیل دی‌هیدروآرتمیزینیک اسید به آرتمیزین می‌شود، به علاوه استفاده از کیتوزان روی برگ‌های *A. annua* اثر منفی روی رشد گیاه نداشت (Lei et al., 2011). بین و همکاران (۲۰۱۲) با اسپری کردن الیگو-ساکاریدکیتوزان (COS) و اسیدسالیسیلیک روی برگ‌های گیاه کامل *A. annua* به بررسی میزان بیان برخی ژن‌های دخیل در سنتز آرتمیزین پرداختند. تأثیر محدود الیگوساکاریدکیتوزان و اسیدسالیسیلیک بر مقدار تولید آرتمیزین روی گیاه کامل نشان داد که الیستورها روش قطعی برای افزایش تولید آرتمیزین نیستند و یا ممکن است تحریک تولید آرتمیزین به زمان بیشتر از ۴۸ ساعت احتیاج داشته باشد (Yin et al., 2012).

با توجه به اثر مثبت کیتوزان بر تولید آرتمیزین در سایر پژوهش‌های و نیز اثر منفی نانوکیتوزان بر بیان ژن *SQS* (مسیر انحرافی تولید آرتمیزین) و براساس نتایج این پژوهش، انتظار می‌رود نانوکیتوزان در غلظت‌های بهینه شده، الیستوری مناسب جهت تحریک تولید آرتمیزین باشد.

بررسی ایمنی زیستی نانوکیتوزان و نانوکبالت و نتایج پژوهش-های پیشین

کیتوزان یک بیوپلیمر طبیعی است که از داستیلاسیون کیتین موجود در پوسته سخت پوستان دریایی مانند میگو و خرچنگ و یا کیتین موجود در ساختار بعضی از قارچ‌ها به دست می‌آید (جهانشاهی، ۱۳۹۰). نانو کیتوزان دارای ویژگی‌های منحصر به فردی مانند تجزیه‌پذیری، سازگاری زیستی، خاصیت ضد توموری (از طریق القاء تحریک سیستم ایمنی بدن) (Aranaz et al., 2009) و کاهش جذب گلوکز و پایین آوردن سطح ATP در سلول‌های تومور موجب کاهش رشد تومور می‌شود (Ta et al., 2008)، خاصیت ضد میکروبی، چسبندگی موکوزی، افزایش

نفوذپذیری (از طریق بازکردن اتصالات محکم و حلالیت‌پذیری در آب) است. به علاوه، به دلیل داشتن گروه‌های هیدروکسیل و آمین در ساختار کیتوزان می‌توان با تغییرات شیمیایی این پلیمر را کنترل کرد. از کیتوزان به عنوان حامل دارو (از دو طریق غیر فعال و هدفدار) در درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله سرطان استفاده می‌شود (Park *et al.*, 2010).

فراوانی، زیست تخریب‌پذیری، عدم سمیت و منشاء طبیعی داشتن از جمله خصوصیات است که سبب استفاده از کیتوزان در کاربردهای کشاورزی می‌شود. استفاده در پوشش دانه، پوشش برگ و داروهای آهسته رهش نمونه‌هایی از کاربرد کیتوزان در کشاورزی می‌باشد. کیتوزان به عنوان یک محرک رشد با افزایش جوانه‌زنی، ریشه‌زنی، رشد برگ، بازدهی دانه و نگه‌داری رطوبت خاک، رشد گیاه را افزایش می‌دهد و سبب کاهش ابتلا به عفونت‌های قارچی و سایر آفات گیاهی می‌شود. همچنین پلی-ساکارید کیتوزان به عنوان یک الیستور زیستی مؤثر جهت افزایش بیوستز متابولیت‌های ثانویه در کشت سلولی بسیاری از گونه‌های گیاهان دارویی در پژوهش‌های زیادی به اثبات رسیده است (Cheng *et al.*, 2006).

تأثیر الیستور کیتوزان روی رشد سلولی و تولید متابولیت ثانویه فیل اتانویید گلیکوزیدها در کشت سلولی *Cistanche deserticola* مورد بررسی قرار گرفت. مقدار متابولیت ثانویه ۳/۴ برابر بیشتر از نمونه شاهد به دست آمد و مشخص شد که افزایش متابولیت ثانویه پس از تحریک با الیستور کیتوزان با افزایش فعالیت آنزیم PAL مرتبط است (Cheng *et al.*, 2006). بطورکلی اثر مثبت کیتوزان در تولید آرمیزین نیز پیشتر توسط دانشمندان به اثبات رسیده است.

یون‌های فلزات سنگین نظیر آهن، مس، روی، کبالت و نیکل جز عناصر کم مصرف می‌باشند که در فعالیتهای کارکردی بسیاری از پروتئین‌های مشارکت کننده در حفظ رشد و نمو موجودات زنده نقش دارند. با این وجود، این یون‌های فلزی در غلظت‌های بالا می‌توانند برای موجودات زنده مضر باشند (Fotouhi Ghazvini and Heidari, 2011). یون‌های فلزی نظیر نیکل، کبالت، روی و منگنز با وجود مسمومیت‌زا بودن در غلظت‌های

بالا، برای تنظیم فعالیت بسیاری از آنزیم‌ها ضروری هستند (Ahmadikhah, 2011). تغییر غلظت میکروالمنت‌ها یک روش برای افزایش محصولات متابولیت‌های ثانویه در کشت سلولی است (Jimenez-Aparicio and Gutierrez-Lopez 1999). اثر مثبت فلزاتی مانند کبالت، نیکل، آهن و نقره را جهت تحریک تولید دامنه وسیعی از متابولیت‌های ثانویه در گیاهان گزارش شده است (Mithöfer *et al.*, 2004). در پژوهش انجام شده مشخص شد که فلزاتی مانند Ni^{2+} ، Co^{2+} ، Fe^{2+} و Ag^{2+} و V تولید گستره وسیعی از متابولیت‌های ثانویه را در گونه‌های مختلف گیاهان تحریک می‌کنند (Zhao *et al.*, 2005). گرچه ساز و کار این فلزات برای تحریک تولید متابولیت‌های ثانویه به طور واضح مشخص نیست ولی در پژوهش‌های Mithöfer و همکاران (2004) و نیز Zhao و همکاران (2005) تولید تنش‌های اکسیداتیو و یا تولید ROS (Reactive Oxygen Species) به وسیله این فلزات به اثبات رسیده است. مشخص شده است که الیستورهای زیستی مانند پاتوژن‌ها و الیستورهای غیرزیستی (مانند فلزات سنگین، تنش‌های شوری و آسمتیک اغلب سبب القای تجمع متابولیت‌های ثانویه در فعالیتهای دفاعی گیاه می‌شود (Zhao *et al.*, 2005). پیش از این اثر مثبت کبالت (به صورت CoCl_2) در تولید پاکلی‌تاکسول در گیاه سرخدار (Zhang *et al.*, 2007)، افزایش تولید متابولیت ثانویه در کشت سلولی *Vaccinium pahalae* (Shibli *et al.*, 1997) و جنین‌زایی سوماتیکی در هویج (Roustan *et al.*, 1989) (*Daucus carota*)، رشد ریشه موئین *Stizolobium hassojoo* (Sung and Huang 2000)، افزایش تولید متابولیت ثانویه اسکوپال آمین در کشت ریشه موئین *Brugmansia candida* (Pitta-Alvarez *et al.*, 2000) به اثبات رسیده است.

سپاسگزاری

این پژوهش با کمک مالی دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره) انجام شد که به این وسیله تشکر می‌گردد.

منابع

- Ahmadikhah A. 2011.** Plants Reaction to Environmental Abiotic Stresses. Agricultural Science and Natural Resources University of Gorgan Publication.
- Aranaz I, Mengibar M, Harris R, Paños I, Miralles B, Acosta N, Galed G and Heras Á. 2009.** Functional characterization of chitin and chitosan. *Current Chemical Biology* 3: 203-230.
- Baldi A and Dixit V. 2008.** Yield enhancement strategies for artemisinin production by suspension cultures of *Artemisia annua*. *Bioresource Technology* 99: 4609-4614.
- Brown GD and Sy LK. 2007.** In vivo transformations of artemisinic acid in *Artemisia annua* plants. *Tetrahedron* 63: 9548-9566.
- Caretto S, Quarta A, Durante M, Nisi R, De Paolis A, Blando F and Mita G. 2011.** Methyl jasmonate and miconazole differently affect artemisinin production and gene expression in *Artemisia annua* suspension cultures. *Plant Biology* 13: 51-58.
- Cheng XY, Zhou HY, Cui X, Ni W and Liu CZ. 2006.** Improvement of phenylethanoid glycosides biosynthesis in *Cistanche deserticola* cell suspension cultures by chitosan elicitor. *Journal of biotechnology* 121: 253-260.
- Dhingra V, Lakshmi and Narasu M. 2001.** Purification and Characterization of an enzyme involved in biochemical transformation of arteannuin B to artemisinin from *Artemisia annua*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 281: 558-561.
- Durante M, Caretto S, Quarta A, De Paolis A, Nisi R and Mita G. 2011.** β -Cyclodextrins enhance artemisinin production in *Artemisia annua* suspension cell cultures. *Applied microbiology and biotechnology*: 1-9.
- Ferreira JFS, Simon JE and Janick J. 1995.** Developmental studies of *Artemisia annua*: flowering and artemisinin production under greenhouse and field conditions. *Planta Medica-Journal of Medicinal Plant Research* 61: 167-170.
- Fotouhi Ghazvini R and Heidari R. 2011.** Physiology and Molecular Biology of Stress tolerance in Plants. ACECR Mashad.
- Jahanshahi M. 2011.** Molecular Nanotechnology and Bionanotechnology. Tehran University Publication.
- Jimenez-Aparicio A and Gutierrez-Lopez G. 1999.** Production of Food Related Colorants by Culture of Plant Cells. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 464: 195-210.
- Lange BM, Rujan T, Martin W and Croteau R. 2000.** Isoprenoid biosynthesis: the evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97: 13172.
- Lei C, Ma D, Pu G, Qiu X, Du Z, Wang H, Li G, Ye H and Liu B. 2011.** Foliar application of chitosan activates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. *Industrial Crops and Products* 33: 176-182.
- Liu B, Wang H, Du Z, Li G and Ye H. 2011.** Metabolic engineering of artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. *Plant cell reports* 30: 689-694
- Livak KJ and Schmittgen TD. 2001.** Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ Method. *Methods* 25: 402-408.
- Mithöfer A, Schulze B and Boland W. 2004.** Biotic and heavy metal stress response in plants: evidence for common signals. *FEBS Letters* 566: 1-5.
- Mulabagal V and Tsay HS. 2004.** Plant cell cultures—an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. *International Journal of Applied Science and Engineering* 2: 29-48.
- Nguyen KT, Arsenault PR and Weathers PJ. 2011.** Trichomes+ roots+ ROS= artemisinin: regulating artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. In *Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 47: 329-338.
- Park JH, Saravanakumar G, Kim K and Kwon IC. 2010.** Targeted delivery of low molecular drugs using chitosan and its derivatives. *Advanced Drug Delivery Reviews* 62: 28-41.
- Pitta-Alvarez SI, Spollansky TC and Giulietti AM. 2000.** The influence of different biotic and abiotic elicitors on the production and profile of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. *Enzyme and Microbial Technology* 26: 252-258.
- Putalun W, Luealon W, De-Eknamkul W, Tanaka H and Shoyama Y. 2007.** Improvement of artemisinin production by chitosan in hairy root cultures of *Artemisia annua* L. *Biotechnology Letters* 29: 1143-1146.
- Roustan J, Latche A, Fallot J. 1989.** Stimulation of *Daucus carota* somatic embryogenesis by inhibitors of ethylene synthesis: cobalt and nickel. *Plant Cell Reports* 8: 182-185.
- Ryden AM, Ruyter-Spira C, Quax WJ, Osada H, Muranaka T, Kayser O and Bouwmeester H. 2010.** The Molecular cloning of dihydroartemisinic aldehyde reductase and its implication in artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua*. *Planta Medica* 76: 1778-1783.

- Shibli RA, Smith M and Kushad M. 1997.** Headspace ethylene accumulation effects on secondary metabolite production in *Vaccinium pahalae* cell culture. *Plant Growth Regulation* 23: 201-205.
- Smith TC, Weathers PJ and Cheetham RD. 1997.** Effects of gibberellic acid on hairy root cultures of *Artemisia annua*: growth and artemisinin production. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 33: 75-79.
- Sung LS and Huang SY. 2000.** Headspace ethylene accumulation on *Stizolobium hassjoo* hairy root culture producing L-3, 4-dihydroxyphenylalanine. *Biotechnology Letters* 22: 875-878.
- Ta HT, Dass CR and Dunstan DE. 2008.** Injectable chitosan hydrogels for localised cancer therapy. *Journal of Controlled Release* 126: 205-216.
- Teoh KHTKH, Polichuk DRPDR, Reed DWRDW and Covello PSCPS. 2009.** Molecular cloning of an aldehyde dehydrogenase implicated in artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua*. This paper is one of a selection of papers published in a Special Issue from the National Research Council of Canada-Plant Biotechnology Institute. *Botany* 87: 635-642.
- Trejo-Tapia G, Jimenez-Aparicio A, Rodriguez-Monroy M, De Jesus-Sanchez A and Gutierrez-Lopez G. 2001.** Influence of cobalt and other microelements on the production of betalains and the growth of suspension cultures of *Beta vulgaris*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 67: 19-23.
- Wallaart TE, Bouwmeester HJ, Hille J, Poppinga L and Maijers NCA. 2001.** Amorpho-4, 11-diene synthase: cloning and functional expression of a key enzyme in the biosynthetic pathway of the novel antimalarial drug artemisinin. *Planta* 212: 460-465.
- Weathers P, DeJesus-Gonzalez L, Kim Y, Souret F and Towler M. 2004.** Alteration of biomass and artemisinin production in *Artemisia annua* hairy roots by media sterilization method and sugars. *Plant cell reports* 23: 414-418.
- Yin H, Kjaer A, Fretté XC, Du Y, Christensen LP, Jensen M and Grevsen. 2012.** Chitosan oligosaccharide and salicylic acid up-regulate gene expression differently in relation to the biosynthesis of artemisinin in *Artemisia annua* L. *Process Biochemistry*
- Zhang CH, Fevereiro PS, He G and Chen Z. 2007.** Enhanced paclitaxel productivity and release capacity of *Taxus chinensis* cell suspension cultures adapted to chitosan. *Plant Science* 172: 158-163
- Zhang L, Ding R, Chai Y, Bonfill M, Moyano E, Oksman-Caldentey KM, Xu T, Pi Y, Wang Z and Zhang H. 2004.** Engineering tropane biosynthetic pathway in *Hyoscyamus niger* hairy root cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 6786
- Zhao J, Davis LC and Verpoorte R. 2005.** Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances* 23: 283-333.

The Effect of Nano Cobalt and Nano Chitosan on Artemisinin production and expression of SQS and DBR2 genes in *Artemisia annua*

Bitah Ghasemi¹, Ramin Hosseini², Fatemeh Dehghan Nayeri³

1- MSc in Agricultural Biotechnology, 2- Associate professor, 3- Assistant Professor,
Agricultural Biotechnology Department, Imam Khomeini International University, Gazvin, Iran

*Corresponding Author, Email: raminh_2001@yahoo.com

ABSTRACT

A *Artemisia annua* is particularly important for the production of artemisinin, a bioproduct which can be used to combat the causal agent of malaria, treat some kind of cancers and in other activities. The low artemisinin content in the plant has caused this compound to be among the more expensive medicines. Several attempts have been made to increase artemisinin production, for example by using different elicitors, but none of the approaches has been cost effective. In this study, the expression levels of two important genes in the artemisinin biosynthetic pathway, *SQS* and *DBR2* and artemisinin content were investigated in *Artemisia* cell suspension cultures. *SQS* and *DBR2* genes have essential roles in the regulation of artemisinin pathway. For this purpose, nano-cobalt particles in concentrations of 0.25, 2.5 and 5 mg/L were used for cell culture treatment and samples were collected after 8, 24, 48 and 72 h. The highest artemisinin content was observed 24 h after 5 mg/L nanocobalt treatment. In this case, artemisinin production was 2.25 times (113.35 mg/g d.wt) higher than that of the control. Our results showed a negative and significant correlation between *SQS* and *DBR2* gene expression and artemisinin content at different levels of nano cobalt treatments. Results also showed an increase in nano cobalt concentration after 72 hour and an increase in nano chitosan after 4h hour caused a significant decrease in the expression of *SQS* and *DBR2* genes. In conclusion, it appears that the content of artemisinin was increased by high concentrations of the nano cobalt particles because of a decrease in the expression of *SQS* and *DBR2* genes.

Key Words

Artemisia annua, Artemisinin, Nano Cobalt, Nano Chitosan, HPLC, qRT-PCR,