مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره چهارم، شماره ۱، بهار و تابستان ۱۳۹۴
صفحه ۳۹-۲۵

تاثیر نانو الیسیتورهای کبالت و کیتوزان بر میزان تولید آرتمیزنین 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 Ghasemi [1], Ramin Hosseini [2], Fatemeh Dehghan Nayeri [3]

۱- کارشناس‌ارشد 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 آرتمیزنین 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 الیسیتور نانوکبالت و نانو کیتوزان روی میزان بیان ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتزی آرتمیزنین (*SQS* و *DBR2*) و مقدار تولید این ماده در سوسپانسیون سلولی درمنه از غلظت‌های ۰/۲۵، ۲/۵ و ۵ میلی گرم در لیتر نانوکبالت 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 آرتمیزنین در تیمار ۵ میلی گرم در لیتر نانوکبالت و بعد از ۲۴ ساعت حاصل شد. در تیمار فوق، تولید آرتمیزنین نسبت به نمونه شاهد ۲/۲۵ برابر افزایش داشت (۳۵ µg/g d.wt /۱۱۳). همبستگی معکوس و معنی-داری بین بیان دو ژن *SQS* و *DBR2* با میزان تولید آرتمیزنین در تیمارهای مختلف نانوکبالت وجود داشت. همچنین افزایش میزان غلظت نانوکبالت در بازه زمانی ۷۲ ساعت و افزایش غلظت نانوکیتوزان در بازه زمانی ۴۸ ساعت، باعث کاهش معنی‌داری در بیان ژن‌های *SQS* و *DBR2* شد. نانوذرات مورد مطالعه، در غلظت‌های بالا و در بازه‌های زمانی ذکر شده با کاهش بیان ژن-های *SQS* و *DBR2* به عنوان ژن‌های دخیل در مسیرهای انحرافی بیوسنتز آرتمیزنین، باعث افزایش میزان بیوسنتز این ماده شد.

واژه‌های کلیدی

Artemisia annua
آرتمیزنین
نانوکبالت
نانوکیتوزان
HPLC
qRT-PCR

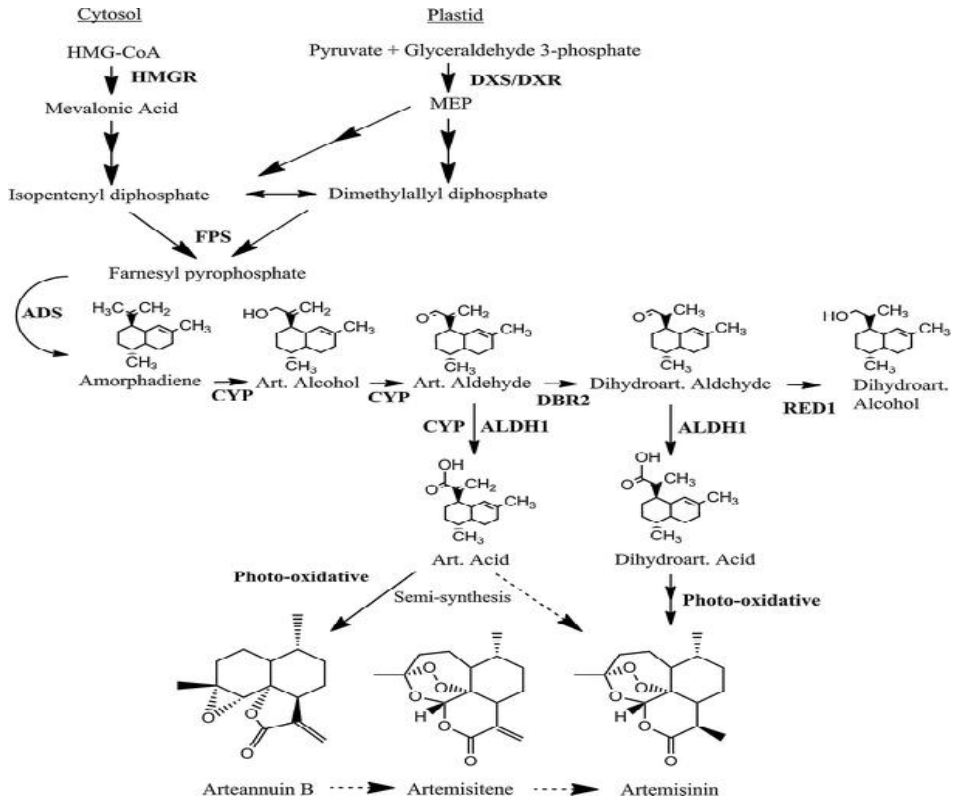
مقدمه

متابولیت‌های ثانویهٔ گیاهان یک منبع منحصر به فرد برای تهیه داروها هستند که اغلب هنگامی که گیاهان در معرض تنش‌های گوناگون مانند الیسیتورها و یا مولکول‌های پیام‌رسان قرار می‌گیرند، تولید می‌شوند (Zhao *et al.*, 2005). آرتمیزنین، متابولیت ثانویه موجود در گیاه *Artemisia annua* یک اندوسزکویی‌ترپن 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 پر هزینه است و صرفه اقتصادی ندارد. از زمان شناخته شدن خواص دارویی آرتمیزنین، 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 الیسیتورها در کشت سلولی یکی از روش‌های اصلی جهت افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه است. القاء، با اضافه کردن مقدار کمی الیسیتور موجب می‌شود تا زمان دست‌یابی به غلظت بالای محصولات کاهش یابد (Mulabagal and Tsay 2004). تغییر غلظت ریزمغذی‌ها یک روش برای افزایش محصولات متابولیت‌های ثانویه در کشت سلولی است (Jimenez-Aparicio and Gutierrez-Lopez, 1999). خصوصیات مواد با تغییر اندازهٔ 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 نتیجهٔ ویژگی‌های سطحی مواد است که به جای خصوصیات توده ای مواد غالب شده است. با افزایش نسبت اتم‌ها در سطح، انرژی آزاد نانو ذرات 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 ان- 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 الیسیتور 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 آرتمیزنین 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 آرتمیزنین و مقدار تولید آن مورد بررسی قرار گرفت. شناخت ژن‌های مسیر تولید متابولیت‌ها و بررسی عملکرد الیسیتور بر بیان هر یک از آنها لازم است. در مسیر سنتز آرتمیزنین اولین مرحله تشکیل فارنزیل دی فسفات (FDP) از دو مسیر سیتوزولی و یا پلاستیدی است. بعد از آن انتخاب شاخهٔ تولید سزکویی‌ترپن‌ها و یا شاخهٔ تولید استرول‌ها (از پیش مادهٔ FDP) به صورت هماهنگ کنترل می‌شوند. برای تولید سزکویی‌ترپن‌ها ابتدا آنزیم سزکویی‌ترپن‌سیکلاز *(SQC)* Squalene Cyclase ساخته می‌شود و برای ساخته شدن استرول‌ها لازم است که ابتدا آنزیم اسکوالن سینتاز (Squalene Synthase, SQS) تولید شود. وقتی ساخت استرول افزایش می‌یابد تولید آرتمیزنین

کاهش می‌یابد 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 آرتمیزنین، یعنی آمورفا-۴،۱۱- داین (Amorpha-4,11 dine) توسط سزکویی‌ترپن‌سیکلاز ویژه‌ای به نام آمورفا-۴،۱۱-داین سینتاز (*ADS*)، (Amorphadiene dine synthase) صورت می‌گیرد که باعث حلقوی شدن FDP می‌شود. سپس آمورفا-۴،۱۱-داین P450 به آرتمیزنیک الکل و سپس آلدهید آرتمیزنیک‌آلدهید و در نهایت به دی‌هیدروآرتمیزنیک-آلدئید (Dihydroartemisinic acid: DHAA) تبدیل می‌شود (شکل ۱) (Teoh *et al.*, 2009). بعد از تشکیل آرتمیزنیک آلدئید مسیر تشکیل آرتمیزنین و سایر محصولات به طور کامل مشخص نیست. به نظر می‌رسد دو مسیر پیش روی آرتمیزنیک‌آلدئید وجود دارد، یک مسیر منجر به تشکیل آرته‌آنوئین‌بی (Arteannuin (AB) B) و دیگری منجر به تشکیل آرتمیزنین می‌شود. مسیر تشکیل AB با اکسیداسیون آرتمیزنیک‌آلدئید به آرتمیزنیک‌اسید (Artemisinic acid) (AA) توسط *CYP* و یا یک آلدئیددهیدروژناز (*Aldh1*) انجام می‌شود و در نهایت AB تشکیل می‌شود (Teoh *et al.*, 2009). دینگرا و ناراسو (۲۰۰۱) اظهار داشته‌اند که AB می‌تواند به آرتمیزیتن (AT) (Artemisitene) و سپس به آرتمیزنین تبدیل شود (Dhingra and Lakshmi Narasu, 2001). براون و سی (۲۰۰۷) نشان دادند AA به آرتمیزنین تبدیل نمی‌شود (Brown and Sy 2007). با دانش کنونی، هیچ سیستم آنزیمی در گیاه برای تبدیل AB به آرتمیزنین به واسطهٔ AT وجود ندارد (Nguyen *et al.*, 2011). بنابراین، اینگونه به نظر می‌رسد که AB تنها محصول نهایی یکی از دو شاخهٔ مسیر *seco*-cadinanes (شامل آرتمیزنین 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 آرتمیزنیک‌آلدئید توسط سیتوکروم و توسط آنزیم DBR2 به دی‌هیدروآرتمیزنیک‌آلدئید و سپس به دی-هیدروآرتمیزنیک‌اسید تبدیل می‌شود. در نهایت دی-هیدروآرتمیزنیک‌اسید احتمال دارد که با چند مرحلهٔ غیر آنزیمی و واکنش‌های اکسیداسیون نوری به آرتمیزنین تبدیل می‌شود (Wallaart *et al.*, 2001). اخیراً آنزیم جدیدی به نام دی-هیدروآرتمیزنیک‌آلدئیدردوکتاز (Dihydroartemisinic (Red1) aldehyde reductase) در این مسیر شناخته شده است که باعث می‌شود دی‌هیدروآرتمیزنیک‌آلدئید (پیش مادهٔ ساخت DHAA) به دی‌هیدروآرتمیزنیک الکل تبدیل شود و به این ترتیب سبب ایجاد رقابت و در نتیجه کاهش تولید آرتمیزنین گردد (Ryden *et al.*, 2010).

مواد و روش‌ها

در این آزمایش از سوسپانسیون سلولی گیاه *A. annua* به عنوان ماده گیاهی استفاده شد. برای تهیه کالوس‌های 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، کالوس‌ها به محیط کشت مایع با همان ترکیب‌های هورمونی انتقال داده شدند و پس از چند بازکشت و بدست آوردن سوسپانسیون حاوی سلول‌های منفرد و جدا از هم، تیماردهی (غلظت‌های ۰/۲۵، ۲/۵ و ۵ میلی گرم در لیتر نانوکبالت و ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی گرم در لیتر نانوکیتوزان) در ۳ تکرار انجام شد. به منظور به دست آوردن زمان مناسب جهت اعمال الیسیتورها، منحنی رشد سلولی بر اساس وزن خشک سلول‌ها محاسبه گردید. به این منظور، هر دو روز یک بار و به مدت یک ماه، تمام نمونه برداری تیمارهای اعمال شده در بازه‌های زمانی ۸، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت جهت انجام آزمایش‌های 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 یوبی‌کوئیتن و اکتین بررسی شد. تهیهٔ cDNA (با 1µg 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.



شکل ۱- مسیر سنتز آرتمیزنین، 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.

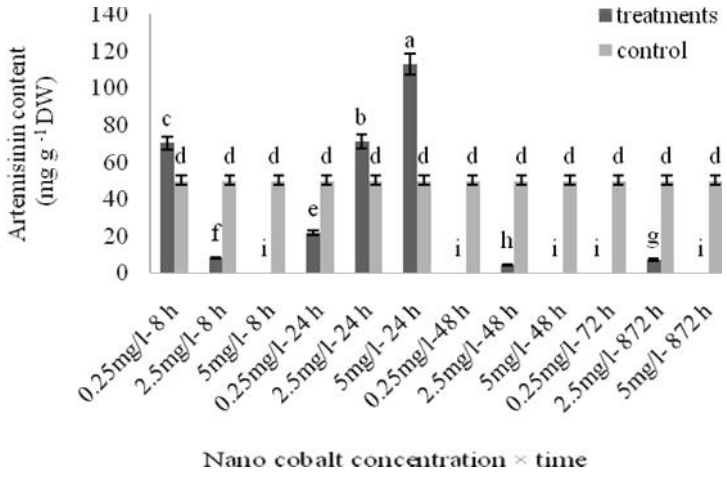
Gene name	Primer name	Primer sequence F/R [5'-3']	Primer Tm [°C]	% GC	Amplicon length [bp]
SQS	AF302464	F-TTTGAAAGCAGTATTGAAACAC	51.3	31.8	192
		R- CAGACAGCATCACGAAGC	52.8	55.6	
DBR2	EU704257	F- CATCAACAAGCAAGCCCATTTC	56.5	45.5	125
		R- GCGATAGTCTTCAACCACCTC	55.7	52.4	
ACT	U36376	F- AGTGCTCCTGGTTAGTTGTC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

آغازگرهای اولیگونوکلئوتیدی جهت انجام واکنش PCR و qRT-PCR، براساس توالی ژن‌های مورد بررسی گیاه *A. annua* که در بانک داده‌های 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 ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز آرتمیزنین، 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. واکنش‌ها در میکروپلیت‌های ۹۶ چاهکی و در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر و در ۴۰ سیکل انجام شد. پس از اندازه‌گیری میزان Ct برای ۳ ژن مورد مطالعه (۲ ژن دخیل در مسیر بیوسنتز آرتمیزنین 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 نرم‌افزار LinRegPCR (version 11.0) تعیین و پس از محاسبات آماری میزان بیان نسبی هر نمونه (Ratio) با استفاده از فرمول Pfaffl و همچنین $\log_2$Ratio ، جهت مقایسه میزان بیان ژنهای مورد مطالعه محاسبه شد (Livak and Schmittgen 2001). تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار MSTAT C و مقایسه میانگین‌های بیان هر یک از ژن‌ها با استفاده از روش دانکن صورت گرفت. جهت بررسی رابطهٔ بیان دو ژن، ضریب همبستگی پیرسون محاسبه گردید. به منظور تعیین کمی مقدار آرتمیزنین (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 نرم‌افزار 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 آرتمیزنین و خلوص ۹۸٪ (Sigma, USA) به دست آمد. هر نمونه در ۳ تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS صورت گرفت. برای عصاره‌گیری نمونه‌ها از روش اسمیت و همکاران استفاده شد (Smith *et al.*, 1997).

نتایج

با مقایسه میانگین صفت وزن خشک سلولی، بیشترین میزان رشد سلول‌ها در روز چهاردهم پس از بازکشت به دست آمد. در روز شانزدهم فاز لگاریتمی تمام و سلول‌ها وارد فاز سکون و سپس فاز مرگ شدند. بنا براین الیسیتورها 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 آرتمیزنین نداشتند. در تیمارهای mg/l ۰/۲۵ در ۸ ساعت، mg/l ۲/۵ در ۲۴ ساعت و تیمار mg/l ۵ در ۲۴ ساعت میزان آرتمیزنین افزایش یافت. بیشترین میزان آرتمیزنین در تیمار ۵ میلی‌گرم در لیتر نانوکبالت و ۲۴ ساعت بعد از اعمال الیسیتور به دست آمد (شکل۲).

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 (شکل۳). بیان ژن *SQS* در غلظت 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 mg/l ۰/۲۵ در بازه زمانی ۷۲ ساعت، mg/l ۲/۵ در بازه زمانی ۸ ساعت و بیشترین افزایش بیان ژن *SQS* در غلظت mg/l ۵ در بازه زمانی ۴۸ ساعت بعد از اعمال نانوکبالت مشاهده شد. با مقایسه میزان بیان ژن *SQS* (شکل ۵) و میزان تولید آرتمیزنین مشاهده شد که به طورکلی با افزایش بیان ژن *SQS*، میزان تولید آرتمیزنین کاهش یافت (شکل ۲). در بررسی غلظت‌های مختلف نانوکیتوزان، بیان ژن *SQS* در غلظت‌های ۱۰ و۱۵ (mg/l) نانوکیتوزان نسبت به نمونه شاهد کاهش بیان داشتند (شکل۶). بیشترین افزایش بیان ژن *SQS* در تیمار با الیسیتور نانوکیتوزان در بازهٔ زمانی ۸ ساعت و کمترین میزان بیان ژن در بازهٔ زمانی ۴۸ ساعت مشاهده شد (شکل ۷).

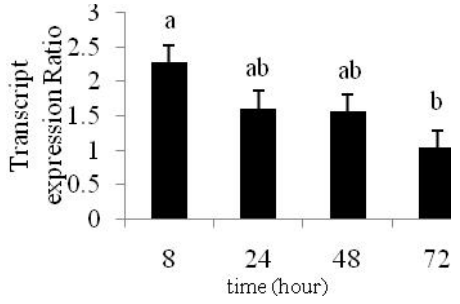


شکل ۲ – میزان تولید آرتمیزنین در تیمارهای مختلف نانوکبالت و در بازه‌های زمانی مختلف. *حروف متفاوت نشانگر تفاوت معنی دار در آزمون دانکن است.

Figure 2. Artemisinin content in nanocobalt treatment, during different time courses.
* Different letters indicate significant differences in Duncan's test.

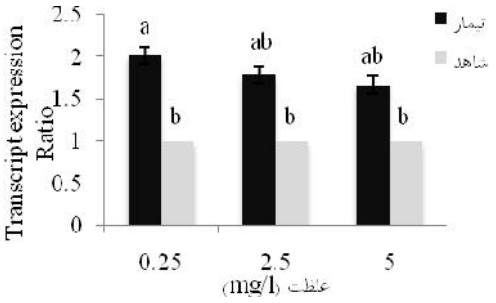
ژن *SQS*

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 (شکل۳). بیان ژن *SQS* در غلظت 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 mg/l ۰/۲۵ در بازه زمانی ۷۲ ساعت، mg/l ۲/۵ در بازه زمانی ۸ ساعت و بیشترین افزایش بیان ژن *SQS* در غلظت mg/l ۵ در بازه زمانی ۴۸ ساعت بعد از اعمال نانوکبالت مشاهده شد. با مقایسه میزان بیان ژن *SQS* (شکل ۵) و میزان تولید آرتمیزنین مشاهده شد که به طورکلی با افزایش بیان ژن *SQS*، میزان تولید آرتمیزنین کاهش یافت (شکل ۲). در بررسی غلظت‌های مختلف نانوکیتوزان، بیان ژن *SQS* در غلظت‌های ۱۰ و۱۵ (mg/l) نانوکیتوزان نسبت به نمونه شاهد کاهش بیان داشتند (شکل۶). بیشترین افزایش بیان ژن *SQS* در تیمار با الیسیتور نانوکیتوزان در بازهٔ زمانی ۸ ساعت و کمترین میزان بیان ژن در بازهٔ زمانی ۴۸ساعت مشاهده شد (شکل ۷).



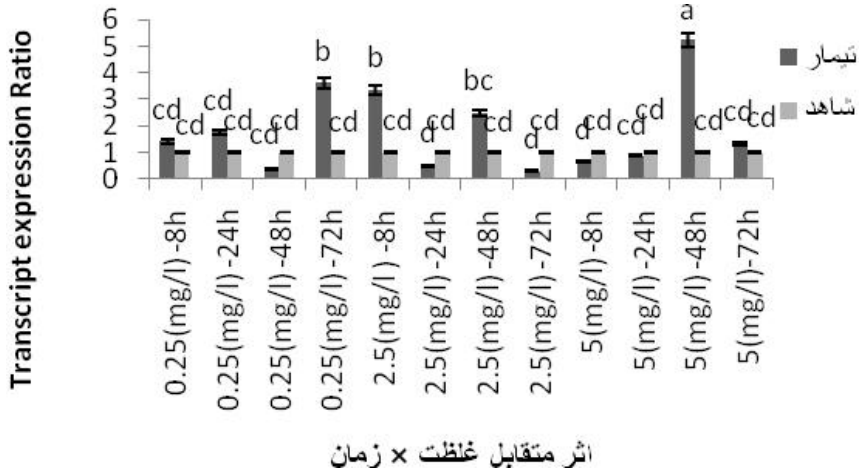
شکل ۳- میزان بیان ژن *SQS* در بازه‌های زمانی بعد از اعمال نانوکبالت.

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



شکل۴- میزان بیان ژن *SQS* در غلظت‌های مختلف نانوکبالت.

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



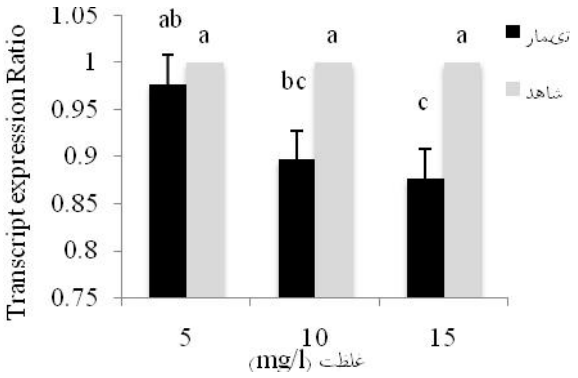
شکل ۵- میزان بیان ژن *SQS* در تیمارهای مختلف غلظت و زمان نانوکبالت. *حروف متفاوت نشانگر تفاوت معنی دار در آزمون دانکن است.

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*

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 (شکل۸).

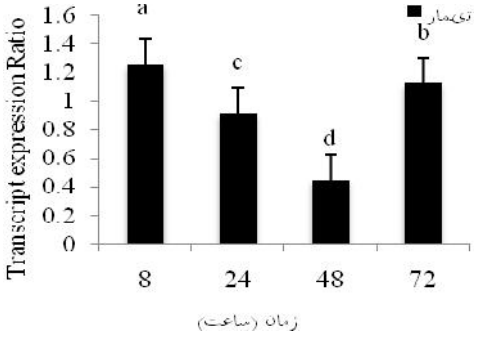
همان طور که در شکل (۹) مشاهده می‌شود در تیمارهای mg/l ۰/۲۵، ۲/۵ و ۵ نانوکبالت بیان ژن *DBR2* نسبت به نمونهٔ شاهد افزایش داشت. در بررسی بازه‌های زمانی و صرف نظر از غلظت-های مختلف، بیشترین افزایش بیان ژن *DBR2* در بازه زمانی ۸ ساعت مشاهده شد و با گذشت زمان میزان بیان ژن کاهش داشت (شکل۱۰).



شکل۶- بیان ژن *SQS* در غلظت‌های مختلف نانوکیتوزان.

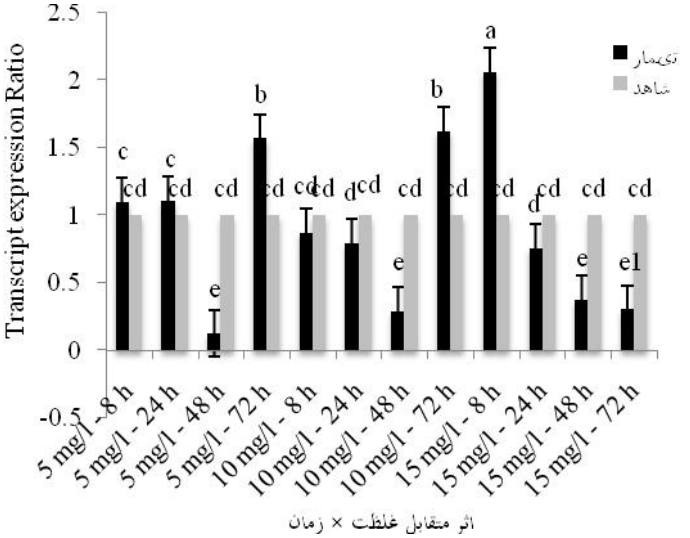
*حروف متفاوت نشانگر تفاوت معنی دار در آزمون دانکن است.

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



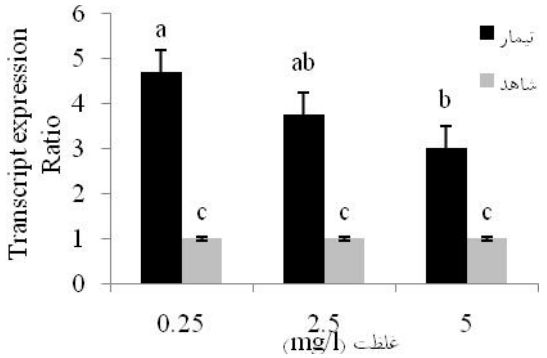
شکل۷- بیان ژن *SQS* در بازه‌های زمانی بعد از اعمال نانوکیتوزان

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

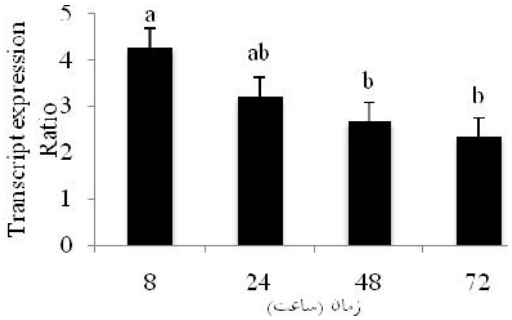
Figure 8. The expression levels of *SQS* in different time and concentration treatments of nanochitosan.



شکل 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.

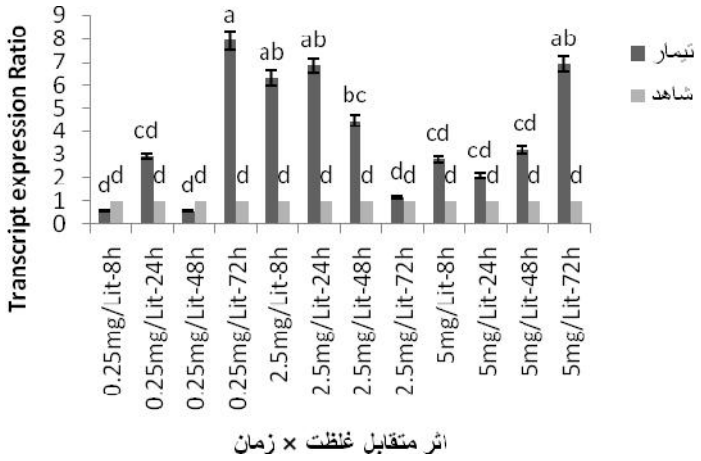


شکل ۱۰- میزان بیان ژن *DBR2* در بازه‌های زمانی بعد از اعمال نانوکبالت

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

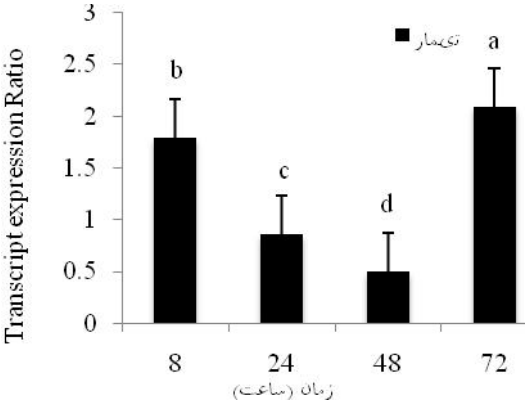
Figure 10. The expression levels of *DBR2* in different nanocobalt concentration. *different letters indicate significant differences in Duncan's test.

در بررسی اثر متقابل غلظت × زمان، ژن *DBR2* (شکل ۱۱) در تیمارهای ۰/۲۵ mg/l بعد از ۷۲ ساعت، ۲/۵ mg/l بعد از ۸، 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 نمونهٔ شاهد مشاهده نشد ۵ mg/l. بین میزان تولید آرتمیزنین و بیان دو ژن *SQS* و DBR_2 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 میلی‌گرم 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 ۱۱- میزان بیان ژن *DBR2* در تیمارهای مختلف غلظت و زمان نانوکبالت

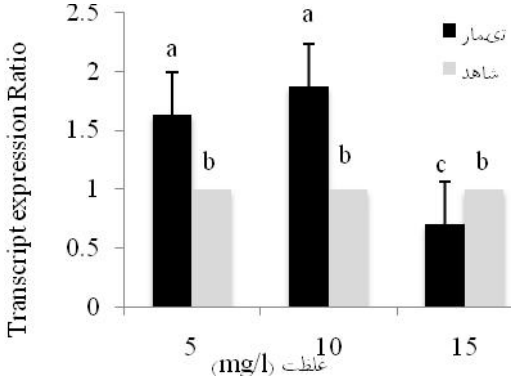
Figure 11. The expression levels of *DBR2* gene in different time and concentration treatments of nanocobalt.



شکل ۱۳- بیان ژن *DBR2* در بازه‌های زمانی بعد از اعمال نانوکیتوزان.
*حروف متفاوت نشانگر تفاوت معنی دار در آزمون دانکن است.

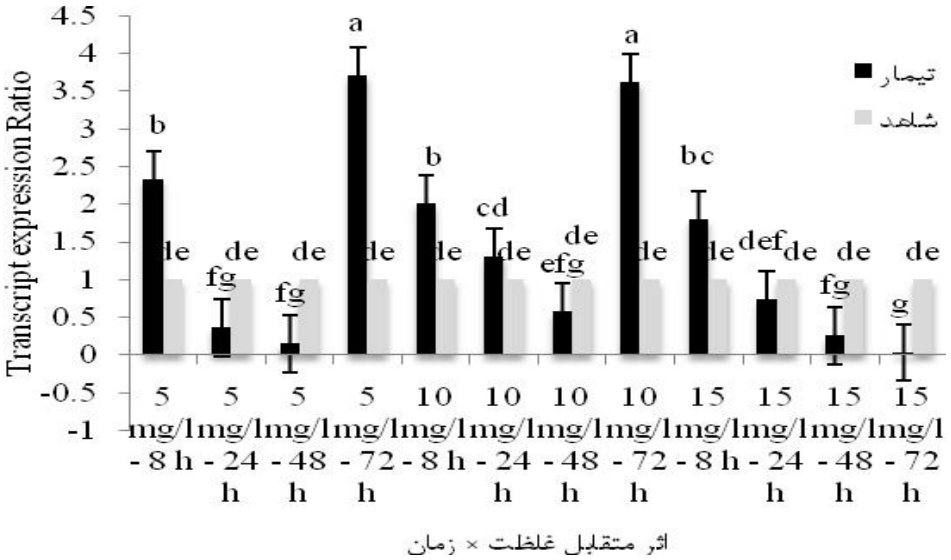
Figure 13. The expression levels of *DBR2* gene in different time courses after nanochitosan treatment. *Different letters indicate significant differences in Duncan's test.

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 (شکل۱۴).



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

در تیمارهای مختلف نانوکبالت فقط در بازه زمانی ۸ و ۲۴ ساعت بعد از اعمال الیسیتور مقدار آرتمیزنین نسبت به نمونه شاهد افزایش نشان داد و بعد از ۲۴ ساعت سطوح مختلف نانوکبالت اثر معنی‌داری در افزایش تولید آرتمیزنین نداشتند. با توجه به رشد طبیعی سلول‌ها که در بازهٔ 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 الیسیتورها در روز چهاردهم اعمال شدند و افزایش تولید آرتمیزنین تا ۲۴ ساعت بعد از اعمال الیسیتور، یعنی روز پانزدهم اتفاق افتاده است، می‌توان نتیجه گرفت که بهترین زمان برای اعمال الیسیتور جهت تحریک تولید آرتمیزنین زمان قبل از وارد شدن سلول‌ها به فاز سکون می‌باشد. با توجه به بررسی میزان تولید آرتمیزنین اثر تحریک با الیسیتور نانوکبالت (شکل ۲) میزان آرتمیزنین 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، آرتمیزنین 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 پژوهش اخیر ثابت شد که می‌توان تولید آرتمیزنین در کشت سوسپانسیون را با تحریک‌سازی به وسیلهٔ ۵ میلی‌گرم در لیتر نانوکبالت پس از ۲۴ ساعت به سطح ۱۱۳/۳۵ (µg/gDW) رساند. در تیمار فوق، تولید آرتمیزنین 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 آرتمیزنین است و با بهینه‌سازی غلظت و زمان مناسب می‌توان از نانوکبالت به عنوان الیسیتوری مناسب جهت افزایش تولید آرتمیزنین استفاده کرد.

وجود همبستگی معکوس و معنی‌دار بین بیان دو ژن *SQS* و *DBR2* با میزان تولید آرتمیزنین در تیمارهای مختلف نانوکبالت نشان دهندهٔ رابطهٔ منفی تولید آرتمیزنین 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 آرتمیزنین کاهش یابد. نتایج این پژوهش نیز این مطلب را تأیید می‌کند. بنا بر این جهت افزایش آرتمیزنین می‌توان از مهار کننده‌های ژن *SQS* استفاده کرد. بیشترین میزان آرتمیزنین 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 پژوهش های دهینگرا و ناراسو

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

بیان ژن‌های *SQS* و *DBR2* در اثر متقابل غلظت و زمان در تیمارهای نانوکبالت به طور معنی‌داری نسبت به نمونهٔ شاهد افزایش بیان نشان دادند و در مواردی نیز تغییری مشاهده نشد. با توجه به رابطهٔ همبستگی معکوس بین میزان آرتمیزنین و بیان ژن-های *SQS* و *DBR2* ظاهراً به نظر می‌رسد که نانوکبالت به عنوان الیسیتور جهت تحریک تولید آرتمیزنین مناسب نمی‌باشد اما با توجه به نتایج حاصل از HPLC (اندازه‌گیری مقدار آرتمیزنین) در برخی از تیمارها (غلظت ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم در لیتر در بازهٔ زمانی ۲۴ ساعت) افزایش معنی‌دار تولید آرتمیزنین مشاهده گردید. بنابراین این گونه به نظر می رسد که سایر ژن‌های مسیر در تولید آرتمیزنین نقش بیشتری دارند و الیسیتور نانوکبالت با تأثیر مثبت روی آن‌ها موجب افزایش سطح آرتمیزنین در تیمارهای نام برده گردیده است. به طور کلی احتمالاً سازوکار اثر نانوکبالت بر افزایش تولید آرتمیزنین با بررسی تمام ژن‌های مسیر سنتز آرتمیزنین میسر می‌گردد. در پژوهشی روی مهندسی متابولیک مسیر سنتز آرتمیزنین به این نتیجه رسیدند که در مسیر سنتز آرتمیزنین بیش از یک نقطه محدود کننده وجود دارد. همچنین تنظیم مسیر بیوسنتز آرتمیزنین امکان‌پذیر است اما برای افزایش سطح متابولیت، افزایش بیان یک ژن کافی نیست. این نتایج با نتیجهٔ مطالعهٔ 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 می شوند (Mithöfer *et al.*, 2004). مقدار اندکی افزایش تولید آرتمیزنین با اضافه کردن عصارهٔ 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 آرتمیزنین عمل کنند (Baldi and Dixit 2008). تا به امروز اثر ذرات نانوکبالت به عنوان الیسیتور روی گیاه درمنه مورد بررسی قرار نگرفته است و بر اساس نتایج این پژوهش ذرات نانوکبالت می‌توانند به عنوان الیسیتوری مناسب جهت تحریک تولید آرتمیزنین 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 الیسیتور) بیان ژن‌ها کاهش پیدا کرد و در نهایت در روز سوم (تیمار زمانی ۷۲ ساعت) نیز مجدداً افزایش بیان نشان دادند. . براساس گزارش دورَنته و همکاران (۲۰۱۱) بیان ژن *DBR2* در مدت زمان کوتاهی (۳۰ دقیقه تا ۱ روز) در اثر تیمار با متیل‌جاسمونات و سیکلودکسترین 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 دورنته 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 می-یابد. 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 الیسیتور 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 پژوهش های 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 الیسیتورها قرار می‌گیرد و در پاسخ به الیسیتورهای گوناگون در طولانی مدت نقشی ندارد.

با توجه به مسیر سنتز آرتمیزنین این احتمال وجود دارد که سلول‌ها در پاسخ اولیه به الیسیتور نانوکیتوزان به صورت موقت تولید آرتمیزنین را متوقف می‌کنند (افزایش بیان ژن *SQS* و خروج از مسیر تولید آرتمیزنین)، سپس در بازه زمانی ۲۴ تا ۴۸ ساعت تولید آرتمیزنین افزایش (کاهش بیان ژن *SQS*) می‌یابد که مطابق نتایج نانوکبالت است (شکل های 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 آرتمیزنین 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 آرتمیزنین درون سلولی گردد. نتایج حاصل از این بررسی با کمک مسیرهای بیوشیمیایی شناخته شده در بیوسنتز آرتمیزنین نشان می‌دهد که تیمار نانوکیتوزان با کاهش بیان ژن‌های دخیل در مسیرهای انحرافی بیوسنتز آرتمیزنین می‌تواند در القای تولید درون سلولی آن نقش مثبت ایفا کند.

در کشت ریشهٔ موئین گیاه *A. annua* با اضافه کردن ۱۵۰ میلی-گرم بر لیتر کیتوزان، میزان تولید آرتمیزنین 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 آرتمیزنیک اسید و آرتمیزنین به ترتیب ۷۲٪ و ۵۳٪ در مقایسه با نمونهٔ شاهد، افزایش نشان دادند. آنها اعلام کردند با مصرف کیتوزان مقدار پراکسیدهیدروژن (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 دی‌هیدروآرتمیزنیک اسید به آرتمیزنین می‌شود، به علاوه استفاده از کیتوزان روی برگ‌های *A. annua* اثر منفی روی رشد گیاه نداشت (Lei *et al.*, 2011). یین 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 آرتمیزنین پرداختند. تأثیر محدود الیگوساکاریدکیتوزان و اسیدسالیسیلیک بر مقدار تولید آرتمیزنین روی گیاه کامل نشان داد که الیسیتورها روش قطعی برای افزایش تولید آرتمیزنین نیستند و یا ممکن است تحریک تولید آرتمیزنین به زمان بیشتر از ۴۸ ساعت احتیاج داشته باشد (Yin *et al.*, 2012).

با توجه به اثر مثبت کیتوزان بر تولید آرتمیزنین در سایر پژوهش های و نیز اثر منفی نانوکیتوزان بر بیان ژن *SQS* (مسیر انحرافی تولید آرتمیزنین) و براساس نتایج این پژوهش، انتظار می‌رود نانوکیتوزان در غلظت‌های بهینه شده، الیسیتوری مناسب جهت تحریک تولید آرتمیزنین 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 وخرچنگ 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 گروهای 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 خصوصیاتی است که سبب استفاده از کیتوزن 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 الیسیتور زیستی مؤثر جهت افزایش بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه در کشت سلولی بسیاری از گونه‌های گیاهان دارویی در پژوهش های زیادی به اثبات رسیده است (Cheng *et al.*, 2006).

تأثیر الیسیتور کیتوزان روی رشد سلولی و تولید متابولیت ثانویهٔ فنیل اتانوئید گلیکوزیدها در کشت سلولی *Cistanche deserticola* مورد بررسی قرار گرفت. مقدار متابولیت ثانویه ۳/۴ برابر بیشتر از نمونهٔ شاهد به دست آمد و مشخص شد که افزایش متابولیت ثانویه پس از تحریک با الیسیتور کیتوزان با افزایش فعالیت آنزیم PAL مرتبط است (Cheng *et al.*, 2006). بطورکلی اثر مثبت کیتوزان در تولید آرتمیزنین 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). یون های 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 متابولیت های 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+}، Ag^{2+} و V تولید گسترهٔ 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 وسیلهٔ این فلزات به اثبات رسیده است. مشخص شده است که الیسیتورهای زیستی مانند پاتوژن‌ها و الیسیتورهای غیرزیستی (مانند فلزات سنگین، تنش‌های شوری و اُسمُتیک 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 (*Daucus carota*) (Roustan *et al.*, 1989) ، رشد ریشه موئین *Stizolobium hassojoo* (Sung and Huang 2000)، افزایش تولید متابولیت ثانویه اسکوپال آمین در کشت ریشه موئین *Brugmansi 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, Mengíbar 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 arteminisin 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- ΔΔCT 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. Amorpha-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.

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Vol4, Number1, Spring and summer 2015, Bi-seasonal

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

Bita Ghasemi [1], Ramin Hosseini [2], Fatemeh Dehghan Nayeri [3]

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

A B S T R A C T

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,