مجله علوم باغبانی ایران
دوره ۴۳، شماره ۳، ۱۳۹۱ (۳۳۰-۳۲۳)

بررسی تاثیر برخی هورمونها بر روی افزایش تولید آرتمیزین در گیاه درمنه *Artemisia annua*

محبوبه زارع مهرجردی[۱] ، محمدرضا بی همتا[۲*]، منصور امیدی[۳] و محمدرضا نقوی[۴]
۱، ۲، ۳، ۴، دانشجوی سابق دوره دکتری و استادان پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
(تاریخ دریافت : ۹۰/۴/۹ - تاریخ تصویب: ۹۰/۱۰/۱۸)

چکیده

آرتمیزینین یک سزکوئی ترپن لاکتون است که توسط گیاه *Artemisia annua* تولید می شود و در حال حاضر موثرترین دارو علیه بیماری مالاریا می باشد. این ترکیب به همراه مشتقاتش در درمان بیماری های هپاتیت B و سرطان های مختلف نیز کاربرد دارد. با وجودی که سنتز شیمیایی آن امکان پذیر است ولی به دلیل ساختار پیچیده و عملکرد پایین آن از لحاظ اقتصادی مناسب نمی باشد. از آنجایی که این گیاه به عنوان تنها منبع تجاری تولید، مقادیر بسیار پایینی از آن را تولید می کند، تلاش برای افزایش تولید این ترکیب دارویی ارزشمند ضروری به نظر می رسد. در این مطالعه، تاثیر الیسیتوری چهار هورمون جیبرلیک اسید(GA3)، سیتوکنین (2-iP)، متیل جاسمونات (MeJA) و سالیسیلیک اسید (SA) بر روی تولید آرتمیزینین در زمانهای مختلف پس از اعمال تیمار مورد بررسی قرار گرفت. مشاهده شد که MeJA بیشترین تاثیر را بر روی افزایش تولید آرتمیزینین در مقایسه با سه هورمون دیگر داشته،2iP و SA در رتبه بعد و GA3 کمترین تاثیر را نسبت به سایرین داشته است. بنابراین هورمون MeJA به دلیل تحریک بیشتر و نیز تاثیر افزایشی یکنواخت بر روی تولید آرتمیزینین در زمانهای مطالعه شده، کاندیدای مناسبی برای انجام مطالعات بیشتر جهت استفاده از آن برای کاربرد در سطح مزرعه می باشد.

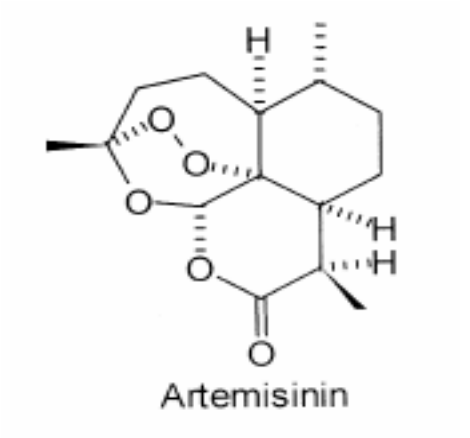
واژه های کلیدی: آرتمیزینین- جیبرلیک اسید- سیتوکنین- متیل جاسمونات- سالیسیلیک اسید

مقدمه

متابولیسم های ثانویه نقش مهمی را در بقا گیاه در محیط، از جمله در جذب گرده افشان ها، دفاع علیه دشمنان طبیعی، بیماری ها و غیره ایفا می کنند. همچنین متابولیت های ثانویه گیاهی متعددی مثل آلکالوئید ها، آنتوسیانین ها، فلاونوئید ها، کوئینون ها، استروئید ها و ترپنوئید ها کاربرد های تجاری به عنوان دارو، رنگ، طعم، بو، حشره کش و غیره دارند و از مواد گیاهی استخراج و خالص سازی می شوند (Verpoorte et al., 2002). آرتمیزینین یک سزکوئی ترپن لاکتون(Sesquiterpene lactone) تولید شده توسط بسیاری از گونه های جنس آرتمیزیا از جمله، گیاه *Artemisia annua* (Asteraceae) می باشد که ساختار آن در سال ۱۹۷۹ تعیین شده است (Klayman, 1985) (شکل ۱). آرتمیزینین در حال حاضر بهترین درمان در برابر استرین های مقاوم به داروی *Plasmodium falciparum*، عامل بیماری مالاریا، می باشد و به طور وسیعی در سراسر جنوب شرقی آسیا و آفریقا، جائیکه

* نویسنده مسئول: محمدرضا بی همتا تلفن: ۰۲۶۱۲۲۴۶۰۷۴ E-mail:mrghanad@ut.ac.ir

عامل مالاریا تقریبا به همه داروهای ضد مالاریا مقاوم شده است مورد استفاده قرار می گیرد. همچنین به همراه مشتقاتش یک درمان اثبات شده برای تعدادی از بیماری ها از جمله هپاتیت B، و پارازیت هایی که باعث شیستوزومیازیس(Schistosomiasis) می شوند، می باشد. به علاوه نشان داده شده که در برابر یک واریته از لاین های سلول سرطانی از جمله سرطان سینه، سرطان خون، روده بزرگ و ریه موثر است و ممکن است به طور خاص در درمان سرطان های مقاوم به دارو تاثیر گذار باشد. از آنجایی که آرتمیزینین داروی نسبتا بی خطری است و دارای فعالیت های ضد میکروبی دیگری نیز می باشد و هیچ واکنش ظاهری بد یا اثرات جانبی جدی حتی برای خانمهای باردار ندارد، در درمان یک سری از بیماری ها مورد توجه خاص قرار گرفته است (Weathers et al., 2006).



شکل ۱- ساختار آرتمیزینین

آرتمیزینین در ساقه، برگ، گل، ریشه و بذر گیاه *A. annua* تجمع می یابد و بالاترین میزان آن در برگها و گلها و کمترین میزان آن در ریشه شناسایی شده است(Mannan et al., 2010; Weathers et al., 2006). مقدار آرتمیزینین در *A. annua* پائین و بین ۰/۸- ۰/۰۱ ٪ (وزنی به وزنی) می باشد، اگرچه در بعضی استرین ها ممکن است تا ۱/۵ ٪ هم باشد. از طرفی با وجودی که سنتز شیمیایی آن امکان پذیر است ولی به دلیل ساختار پیچیده و عملکرد پایین آن از لحاظ اقتصادی مناسب نمی باشد (Weathers et al., 2006). بنابراین گیاه به عنوان تنها منبع تولید تجاری دارو باقی مانده است و عملکرد نسبتا پایین آن یک محدودیت جدی برای تجاری کردنش می باشد، به همین دلیل و برای رویارویی با این مشکل افزایش تولید آرتمیزینین در گیاهان کامل یا در کشت های بافتی *A. annua* مورد توجه قرار گرفته است. یکی از روشهای مورد استفاده برای تحریک تولید متابولیت های ثانویه در کشت سلولی و در گیاه کامل استفاده از الیسیتورهای غیر زنده (برای مثال هورمون های گیاهی) می باشد، که در مطالعات مختلفی تاثیر برخی هورمونها بر روی افزایش تولید آرتمیزینین در گیاه درمنه مورد بررسی قرار گرفته است. به طوریکه Weathers et al. (2005) تاثیر ۵ هورمون اکسین، سیتوکنین، اتیلن، جیبرلین و آبسیزیک اسید را روی رشد ریشه های مویی(Hair roots) و تولید آرتمیزینین مورد بررسی قرار دادند و مشاهده کردند که جیبرلیک اسید (GA3) و 2-isopentenyladenine (2-iP) به ترتیب بالاترین تاثیر را روی رشد ریشه های مویی و تولید آرتمیزینین داشتند. همچنین در مطالعات دیگری نشان داده شد که کاربرد برون زاد GA3 منجر به افزایش تولید آرتمیزینین در گیاه کامل شد(Banyai et al., 2010; Zhang et al., 2005). Baldi & Dixit (2008) تاثیر اضافه کردن پیش سازهای شناخته شده

بیوسنتز آرتمیزینین و اضافه کردن بعضی الیسیتورهای زنده و غیر زنده را بر روی تولید آرتمیزینین در کشت سوسپانسیون مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند که استراتژی تلفیقی پیش ساز موالونیک اسیدلاکتون و الیسیتور متیل جاسمونات (MeJA) منجر به افزایش ۵/۹۳ برابری تولید آرتمیزینین در مقایسه با شاهد شد. بر طبق دیگر مطالعات انجام گرفته در کشت سلولی یا گیاه کامل مشاهده شد که کاربرد هورمونهای متیل جاسمونات، سالیسیلیک اسید (SA) و آبسیزیک اسید (ABA) منجر به افزایش تولید آرتمیزینین شد(Caretto et al., 2010; Guo et al., 2010; Jing et al., 2009; Pu et al., 2009; Wang et al., 2010). اگرچه اخیرا Wu et al. (2011) بیان کردند که پاسخ درمنه به کاربرد متیل جاسمونات وابسته به تیپ شیمیایی (chemotype) می باشد. همچنین در مطالعه اخیر Maes et al. (2011)، به طور متناقضی مشاهده شد که سیتوکنین و جیبرلین باعث تحریک بیوسنتز آرتمیزینین نشده و تنها جاسمونات باعث افزایش تولید آن شد.

با وجودی که در زمینه افزایش تولید آرتمیزینین مطالعه ای در ایران انجام نشده است، ولی بررسی های مختلفی بر روی تولید آن در گیاه انجام شده است که می توان به موارد زیر اشاره کرد:

Lari Yazdi et al. (2002a) برگهای گیاه *A. annua* را از رویشگاه های مختلف شمال ایران جمع آوری کرده و میزان آرتمیزینین را در عصاره آنها اندازه گیری و مشاهده کردند که میزان آرتمیزین حداقل ۰/۰۲۴ درصد در نمونه دوآب و حداکثر ۰/۰۹۷ در نمونه مکارود بود.

Lari Yazdi et al. (2002b) اثر بافت خاک، تغذیه معدنی و pH های مختلف محلول غذایی را بر روی تولید ماده آرتمیزینین در گیاه درمنه مورد بررسی قرار داده و بیان کردند که می توان با تغییر برخی از شرایط محیطی، بازده تولید آرتمیزینین را افزایش داد.

Rashidi et al. (2011) با مطالعه بر روی ژن ADS (ژن دخیل در مسیر بیوسنتز آرتمیزینین) در شش ژنوتیپ *A. annua* که از نواحی مختلف استان گلستان جمع آوری شده بودند، بیان کردند که عامل رونویسی WRKY نقش مهمی را در تنظیم بیان این ژن دارا می باشد. در مطالعه حاضر از آنجایی که این گیاه به عنوان تنها منبع تولید آرتمیزینین مورد توجه است، تاثیر کاربرد چهار هورمون GA3، 2iP، MeJA و SA به صورت برون زاد بر روی گیاهان کامل *A. annua* ، در زمانهای مختلف بعد از اعمال تیمار به منظور مقایسه چگونگی و میزان تاثیر این هورمون ها بر روی تولید آرتمیزینین، برای انتخاب الیسیتور مناسب جهت استفاده کاربردی برای افزایش تولید این ترکیب دارویی ارزشمند مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

کشت گیاهان و اعمال تیمار

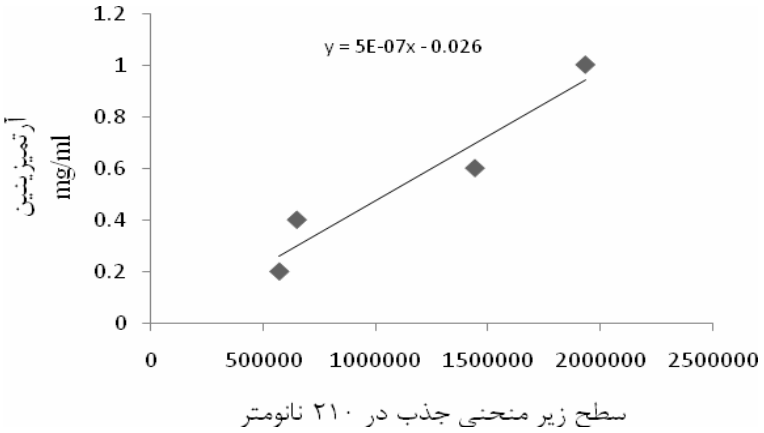
بذرهای گیاه *A. annua* با عملکرد آرتمیزینین بالا جمع آوری شده از منطقه گنبد(استان گلستان)، تهیه شده از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت. بذر ها با محلول اتانول ۷۰ ٪ به مدت ۵ دقیقه به طور سطحی استریل شدند و سپس سه بار با آب مقطر استریل شستشو داده شده و در پتری دیش های دارای کاغذ صافی مرطوب قرار گرفتند. سپس به انکوباتور منتقل شده و به مدت ۱۴روز در دمای ۲۵^0C با شرایط رشدی ۱۶ h روشنایی و شدت نور ۳۰۰۰ Lux نگهداری شدند. پس از این مدت بذور جوانه زده به گلدان های پلاستیکی حاوی خاک برگ و ماسه به نسبت ۱:۲ منتقل شده و در شرایط رشدی ذکر شده در بالا نگهداری شدند. بعد از سه ماه و زمانی که گیاهان به اندازه کافی رشد کردند، گیاهان یکنواخت برای انجام آزمایش انتخاب شدند. هورمون های مورد نظر از شرکت Duchefa خریداری شده و سپس محلولهای GA3 ۱۴ µM (حل شده در اتانول ۰/۸ ٪)، 2iP ۵ µM (حل شده در NaOH ۰/۵ ٪)، MeJA ۳۰۰ µM (حل شده در اتانول ۰/۸ ٪) و SA ۱ mM (حل شده در آب (تنظیم PH 7 با استفاده از NaOH)) تهیه شدند (غلظت ها بر طبق مطالعات قبلی انتخاب شدند(Pu et al., 2009; Wang et al., 2010; Weathers et al., 2005; Zhang et al., 2005). محلولهای تهیه شده به طور مجزا بر روی واحدهای آزمایشی مربوطه اسپری شدند و گیاهان شاهد مربوط به هر تیمار هم با حلالهای ذکر شده در بالا مورد اسپری قرار گرفتند. هر گیاه به عنوان یک نمونه در نظر گرفته شد و نمونه

برداری بعد از ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۱۶۸ ساعت پس از اعمال تیمار برای اندازه گیری آرتمیزینین انجام گرفت.

اندازه گیری میزان آرتمیزینین با استفاده از HPLC

برای اندازه گیری محتوی آرتمیزینین از روش Ferreira & Gonzalez (2009) با اندکی تغییرات استفاده شد. گیاهان نمونه برداری شده جهت خشک شدن به مدت ۴۸ ساعت به آون ^{0}C ۴۵-۴۰ منتقل شدند. سپس به ۵۰ میلی گرم از پودر برگهای خشک شده برای هر نمونه، ۲۰ ml پترولئوم اتر اضافه شده و نمونه ها در حمام اولتراسونیک به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفتند. محلول روشناور به یک ارلن ۵۰ ml منتقل شد و به کمک دستگاه خشک کن(Rotary evaporator) تبخیر حلال در دمای ^{0} C ۲۰ انجام گرفت تا نمونه ها خشک شوند . سپس بقایا در ۳ ml استونیتریل مجددا حل شده و توسط فیلتر نایلونی (۰/۲۰µm) فیلتر شدند. در نهایت نمونه ها به ویالهای HPLC منتقل شده و مورد آنالیز قرار گرفتند.

برای اندازه گیری آرتمیزینین از طول موج nm ۲۱۰، ستون KNAUER C18, 5µm، دمای ^{0} C ۲۵ و فاز متحرک استونیتریل- ۰/۱ ٪ اسید استیک (V/V ۴۰:۶۰) استفاده شد. سرعت جریان دستگاه نیز ۰/۷ ml min^{-1} در نظر گرفته شد. برای رسم منحنی استاندارد آرتمیزینین، از آرتمیزینین خالص(تهیه شده از پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی) حل شده در استونیتریل در غلظت های ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶ و ۱ میلی گرم در میلی لیتر استفاده شد(شکل ۲).



شکل ۲- منحنی کالیبراسیون آرتمیزینین استاندارد

آنالیز داده ها

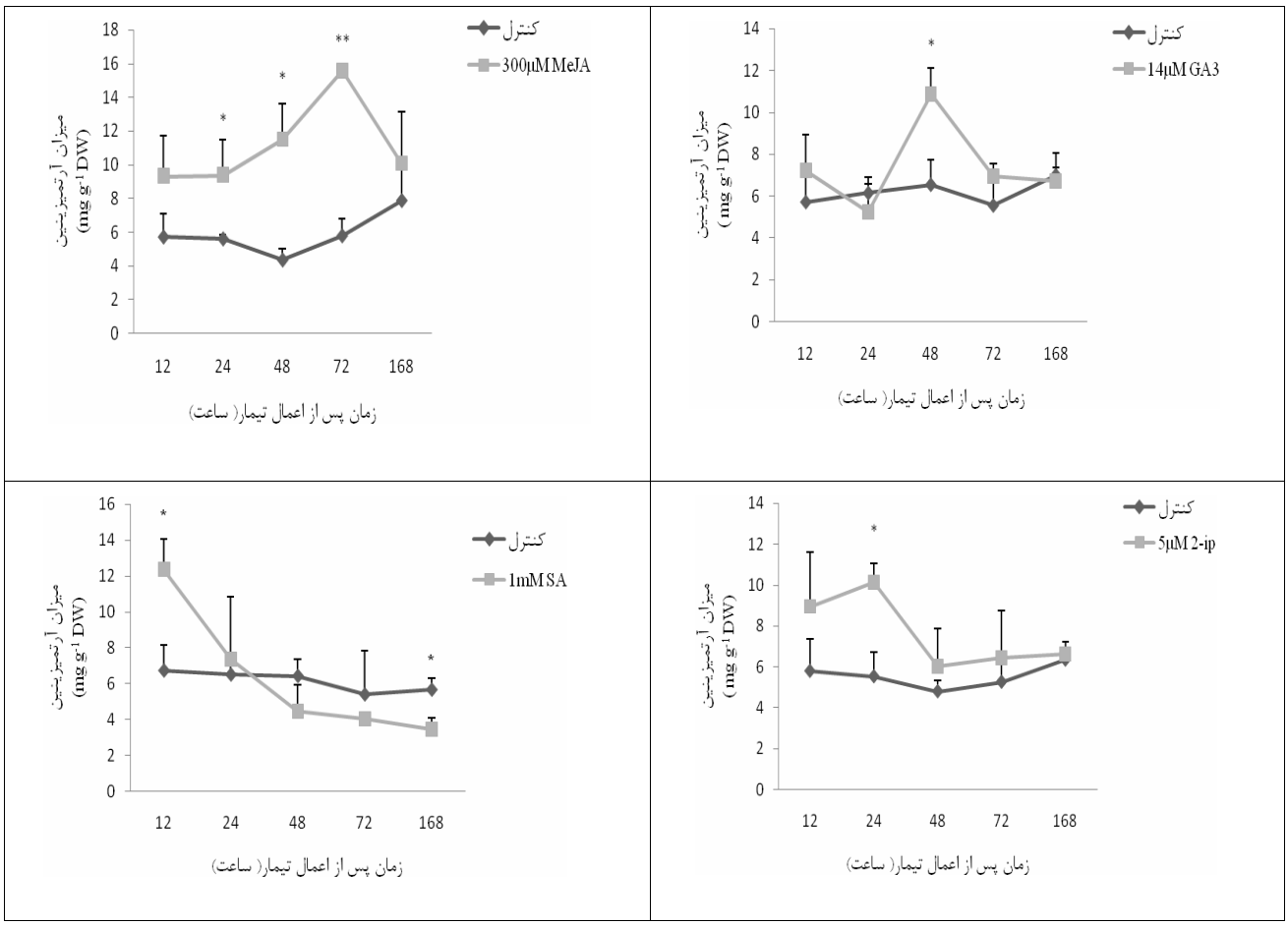
داده های بدست آمده به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شدند و آنالیز آماری آنها با روش T-test و با نرم افزار Excel انجام گرفت.

نتایج و بحث

در گیاهان تیمار شده با GA3 افزایش غلظت آرتمیزینین به صورت دو مرحله ای بود، به نحوی که این افزایش در زمانهای ۱۲ و ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار مشاهده شد و در زمانهای ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از اعمال تیمار میزان آرتمیزینین نسبت به زمان قبل کاهش نشان داد. بالاترین میزان آرتمیزینین در گیاهان تیمار شده در ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار دیده شد که به طور معنی دار و به میزان ۶۶٪ بالاتر نسبت به شاهد بود. در گیاهان تیمار شده با 2iP میزان آرتمیزینین در ۱۲و ۲۴ ساعت بعد از به کاربرد آن به طور معنی داری افزایش نشان داد که این افزایش در ۲۴ ساعت بالاترین مقدار را داشته و به میزان ۸۳٪ نسبت به شاهد افزایش نشان داد و پس از آن این میزان کاهش پیدا کرد و به سطحی مشابه سطح شاهد رسید.

در این مطالعه تاثیر هورمونهای MeJA و SA که در سیگنالینگ مولکولی گیاه نقش دارند نیز بر روی تولید آرتمیزینین مورد بررسی قرار گرفت. مشاهده شد که MeJA در زمانهای مطالعه شده باعث افزایش تدریجی محتوی آرتمیزینین در گیاهان تیمار شده نسبت به شاهد شد که این روند به صورت صعودی بوده و در زمانهای ۲۴، ۴۸ و۷۲ ساعت پس از اعمال تیمار این اختلاف معنی دار بود. بالاترین میزان آرتمیزینین در ۷۲ ساعت پس از اعمال تیمار مشاهده و به میزان ۱۶۹٪ افزایش در مقایسه با شاهد بود.

در مورد تیمار با SA مشاهده شد که حداکثر افزایش در میزان آرتمیزینین نسبت به شاهد ۸۳٪ و در ۱۲ ساعت پس از اعمال بودکه اختلاف معنی داری بین گیاهان تیمار شده و شاهد دیده شد. پس از آن میزان آرتمیزینین به صورت تدریجی کاهش پیدا کرد و به مقادیری پایین تر از شاهد رسید به طوری که در ۱۶۸ ساعت پس از اعمال تیمار این میزان ۶۳٪ کمتر از شاهد بود(شکل ۳).



شکل ۳- تاثیر کاربرد هورمونهای GA3، 2-iP، MeJA و SA بر روی تولید آرتمیزینین در گیاهان *A. annua*. داده ها نشان دهنده میانگین ± انحراف معیار هستند. مقادیر معنی دار از لحاظ آماری(۰/۰۱ ≤ P < ۰/۰۵) به صورت * و مقادیر بسیار معنی دار(P < ۰/۰۱) با ** نشان داده شدند.

تلاشهای زیادی برای افزایش تولید آرتمیزینین در گیاه *A. annua* انجام گرفته است. بطوری که در بعضی مطالعات، از هورمونهای گیاهی به عنوان الیسیتور برای این منظور استفاده شده و موفقیتهایی در این زمینه حاصل شده است(Baldi and Dixit, 2008; Banyai et al., 2010; Caretto et al., 2010; Guo et al., 2010;

Jing et al., 2009; Maes et al., 2011; Pu et al., 2009; Wang et al., 2010; Weather et al., 2005; Wu et al., 2011; Zhang et al., 2005).

در مطالعه حاضر تاثیر چهار هورمون GA3، 2iP، MeJA و SA بر روی تولید آرتمیزینین بررسی و مشاهده شد که تیمار با آنها باعث افزایش میزان آرتمیزینین در گیاه *A. annua* خواهد شدکه این نتایج منطبق با نتایج ارائه شده توسط سایر محققان بود(Baldi and Dixit 2008; Banyai et al., 2010; Caretto et al., 2010; Guo et al., 2010; Pu et al., 2009; Wang et al., 2010; Weather et al., 2005; Zhang et al., 2005).

اگرچه در کار اخیر Maes et al. (2011) تاثیر محرکی سیتوکنین و جیبرلین بر روی بیوسنتز آرتمیزینین مشاهده نشده است. این که هورمونها برای افزایش میزان آرتمیزینین دقیقا چه مکانیسمی را به کار می برند کاملا مشخص نیست ولی به نظر می رسد که این افزایش با تغییراتی در بیان ژنهای مسئول در مسیر بیوسنتز آرتمیزینین همراه است و گزارشاتی نیز در زمینه افزایش بعضی از آنها پس از اعمال تیمارهای هورمونی وجود دارد(Banyai et al., Pu et al., 2009 2010; Caretto et al., 2010; Guo et al., 2010;). همچنین از آنجایی که مراحل انتهایی بیوسنتز آرتمیزینین مستلزم تبدیل دهیدروآرتمیزیک اسید به آرتمیزینین است و مشخص شده که این پروسه به صورت اتواکسیداسیون خودبخودی انجام می شود(Brown &Sy, 2004) و از آنجایی که شواهدی وجود دارد که تیمار با MeJA و SA موجب افزایش انواع اکسیژن فعال (ROS) می شود(Guo et al., 2010; Zhang & Xing, 2008)، بنابراین این احتمال وجود دارد که افزایش آرتمیزینین مشاهده شده در این دو تیمار در نتیجه افزایش تبدیل دهیدروارتمیزیک اسید به آرتمیزینین نیز باشد. همچنین مشاهده شده است که کاربرد GA3 باعث افزایش بیوسنتز SA در گیاه آرابیدوپسیس شده است و ممکن است چنین مکانیسمی که این هورمون از طریق تحریک تولید SA موجب افزایش تولید ROS شود، در گیاه درمنه هم وجود داشته باشد(Alonso-Ramirez et al., 2009).

با توجه به اینکه روند های افزایش در میزان آرتمیزینین در زمانهای مطالعه شده در بین هورمونهای به کاربرده شده تا حدودی متفاوت است، این احتمال شکل می گیرد که این الیسیتورها از طریق روشهای متفاوتی نیز بر روی تولید آرتمیزینین تاثیر گذار باشند. به طور مثال، با کاربرد MeJA، افزایش تدریجی در میزان آرتمیزینین دیده می شود و تا ۷۲ ساعت پس از اعمال آن این روند افزایشی وجود دارد. ولی در SA این روند ابتدا افزایش و سپس کاهش می یابد به حدی که حتی تا زیر حد شاهد نیز می رسد و SA تنها یک تاثیر تحریکی گذرایی را بر روی افزایش تولید آرتمیزینین داشته و در ادامه تاثیر منفی بر روی تولید آن دارد. یک دلیل احتمالی برای مشاهده چنین روندهایی می تواند ناشی از تاثیر متفاوت این دو الیسیتور بر روی تریکوم های گیاه درمنه (محل تولید آرتمیزینین) باشد. به طوری که در مطالعه ای که بر روی گیاه آرابیدوپسیس انجام شده است، اثر مثبت کاربرد MeJA بر روی شکل گیری، تعداد و اندازه تریکوم ها در این گیاه گزارش شده است و بیان شده که SA دارای تاثیر منفی بر روی آنها است(Traw and Bergelson,2003). بنابراین این احتمال وجود دارد که این دو الیسیتور، با داشتن تاثیری مشابه بر روی تریکوم های درمنه نیز بر روی تولید آرتمیزینین اثر بگذارند. برای شناخت بهتر در این زمینه به مطالعات بیشتری نیاز می باشد.

با توجه به نتایج بدست آمده مشاهده شد که MeJA در غلظت مورد استفاده بیشترین تاثیر را بر روی افزایش تولید آرتمیزینین در مقایسه با سه هورمون دیگر داشته ، 2iP و SA در رتبه بعد و GA3 کمترین تاثیر را نسبت به سایرین داشته اند. بنابراین به نظر می رسد که هورمون MeJA به دلیل تاثیر بیشتر و نیز عدم نوسان در افزایش آرتمیزینین در زمانهای مورد مطالعه، پس از انجام مطالعات بیشتر برای استفاده در کشت های مزرعه ای جهت افزایش عملکرد آرتمیزینین سودمند باشد. همچنین بررسی های بیشتر روی نحوه تاثیر این هورمونها بر روی بیان ژنهای مسیر بیوسنتزی آرتمیزینین منجر به افزایش دانش ما از نحوه تاثیر آنها شده و سپس منجر به برداشتن گامهایی در جهت افزایش تولید آرتمیزینین خواهد شد.

نتیجه گیری کلی

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که می توان از الیسیتورهای هورمونی برای افزایش تولید آرتمیزینین در گیاه*Artemisia annua* استفاده کرد. در بین هورمونهای استفاده شده در این تحقیق (GA3، 2-iP، MeJA، SA)، MeJA بیشترین کارایی را در جهت افزایش تولید آرتمیزینین داشت.

سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت مالی صندوق حمایت از پژوهشگران کشور با شماره ۸۹۰۰۱۱۱۵ صورت گرفته است. مولفان از دانشگاه تهران جهت در اختیار گذاشتن امکانات انجام تحقیق و نیز پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی به دلیل اهداء ماده آرتمیزینین تشکر و قدردانی می نمایند.

REFERENCES

1. Alonso-Ramirez, A., Rodriguez, D., Reyes, D., Jimenez, J.A., Nicolas, G., Lopez-Climent, M., Gomez-Cadenas, A. & Nicolas, C. (2009). Evidence for a Role of Gibberellins in Salicylic Acid-Modulated Early Plant Responses to Abiotic Stress in Arabidopsis Seeds. *Plant Physiology*, 150(3), 1335-1344.
2. Baldi, A. & Dixit, V.K. (2008). Yield enhancement strategies for artemisinin production by suspension cultures of Artemisia annua. *Bioresource Technology*, 99(11), 4609-4614.
3. Banyai, W., Mii, M. & Supaibulwatana, K. (2010). Enhancement of artemisinin content and biomass in Artemisia annua by exogenous GA(3) treatment. *Plant Growth Regulation*, 63(1),45-54.
4. Brown, G.D. & Sy, L.K. (2004). In vivo transformations of dihydroartemisinic acid in Artemisia annua plants. *Tetrahedron*, 60(5), 1139-1159.
5. Caretto, S., Quarta, A., Durante, M., Nisi, R., De Paolis, A., Blando, F. & Mita, G. (2010). Methyl jasmonate and miconazole differently affect arteminisin production and gene expression in Artemisia annua suspension cultures. *Plant Biology*, 13(1), 51-58.
6. Ferreira, J.F.S. & Gonzalez, J.M. (2009). Analysis of underivatized artemisinin and related sesquiterpene lactones by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Phytochemical Analysis*, 20(2), 91-97.
7. Guo, X.X., Yang, X.Q., Yang, R.Y. & Zeng, Q.P. (2010). Salicylic acid and methyl jasmonate but not Rose Bengal enhance artemisinin production through invoking burst of endogenous singlet oxygen. *Plant Science*, 178(4), 390-397.
8. Jing, F., Zhang, L., Li, M., Tang, Y., Wang, Y., Wang, Y., Wang, Q., Pan, Q., Wang, G. & Tang, K. (2009). Abscisic acid (ABA) treatment increases artemisinin content in Artemisia annua by enhancing the expression of genes in artemisinin biosynthetic pathway. *Biologia (Bratislava)*, 64(2), 319-323.
9. Klayman, D.L. (1985). Qinghaosu (Artemisinin) - an Antimalarial Drug from China. *Science*, 228(4703), 1049-1055.
10. Lari Yazdi, H., Khavari nejad, R.& Roostaeian, A. (2002a). Artemisinin, as an antimalarial compound,of *Artemisia annua* L. growing wild in north of Iran. *Journal of Medicinal Plants*, 2,37-41.(In Farsi)
11. Lari Yazdi, H., Khavari nejad, R., Roostaeian, A.& Godarzi, A. (2002b). The study of the soil texture effect, nutrition, and pH on the production of artemisinin in *Artemisia annua* L. *Journal of Medicinal Plants*, 3,61-74.(In Farsi)
12. Maes, L., Van Nieuwerburgh, F.C.W., Zhang, Y.S., Reed, D.W., Pollier, J., Casteele, S., Inze, D., Covello, P.S., Deforce, D.L.D. & Goossens, A. (2011). Dissection of the phytohormonal regulation of trichome formation and biosynthesis of the antimalarial compound artemisinin in Artemisia annua plants. *New Phytologist*, 189(1), 176-189.
13. Mannan, A., Ahmed, I., Arshad, W., Asim, M.F., Qureshi, R.A., Hussain, I. & Mirza, B. (2010). Survey of artemisinin production by diverse Artemisia species in northern Pakistan. *Malaria Journal*, 9, 310.
14. Pu, G., Ma, D., Chen, J., Ma, L., Wang, H., Li, G., Ye, H. & Liu, B. (2009). Salicylic acid activates artemisinin biosynthesis in Artemisia annua L. *Plant Cell Reports*, 28(7), 1127-1135.
15. Rashidi Monfared, S., Naghavi, M. R., Yazdi Samadi, B., Alizade, H.& Soltanloo, H. (2011). Study of expression regulation of key gene Amorpha-4,11-diene synthase (ADS) of artemisinin biosynthesis pathway in different Iranain *Artemisia annua* genotypes. *Iranian Journal of Field Crop Science*, 42(2), 409-419.(In Farsi)
16. Traw, M. B.& Bergelson, J. (2003). Interactive effects of jasmonic acid, salicylic acid, and gibberellin on induction of trichomes in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 133, 1367-1375.
17. Verpoorte, R., Contin, A. & Memelink, J. (2002). Biotechnology for the production of plant secondary methabolite. *Phytochemistry Review*, 1, 13-25.

18. Wang, H.H., Ma, C.F., Li, Z.Q., Ma, L.Q., Wang, H., Ye, H.C., Xu, G.W. & Liu, B.Y. (2010). Effects of exogenous methyl jasmonate on artemisinin biosynthesis and secondary metabolites in Artemisia annua L. *Industrial Crops and Products*, 31(2), 214-218.
19. Weathers, P.J., Bunk, G. & McCoy, M.C. (2005). The effect of phytohormones on growth and artemisinin production in Artemisia annua hairy roots. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 41(1), 47-53.
20. Weathers, P.J., Elkholy, S. & Wobbe, K.K. (2006). Artemisinin: the biosynthetic pathway and its regulation in Artemisia annua, a terpenoid-rich species. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 42(4), 309-317.
21. Wu, W., Yuan, M., Zhang, Q., Zhu, Y., Yong, L., Wang, W., Qi, Y. & Guo, D. (2011). Chemotype-dependent metabolic response to methyl jasmonate elicitation in *Artemisia annua*. *Planta Medica*, 77,1048-1053
22. Zhang, L. & Xing, D. (2008). Methyl jasmonate induces production of reactive oxygen species and alterations in mitochondrial dynamics that precede photosynthetic dysfunction and subsequent cell death. *Plant and Cell Physiology*, 49(7), 1092-1111.
23. Zhang, Y.S., Ye, H.C., Liu, B.Y., Wang, H. & Li, G.F. (2005). Exogenous GA(3) and flowering induce the conversion of artemisinic acid to artemisinin in Artemisia annua plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 52(1), 58-62.