Ph.D. thesis abstract

Enhancement of Artemisinin Production from *Seriphidium Herba- Album* using Biotechnological Tools

Fatma Mohamed Omran Aboelhasan[1], Yasser Mohamed Mabrouk[1], Hemaid Ibrahim Soliman[2], Ayman Salah El-Seedy[1]

1 Genetics Department, Faculty of Agriculture, Alexandria University, Alexandria, Egypt

2 Plant Biotechnology, Plant Genetic Resources Department, Desert Research Center

ABSTRACT

The experiments of the present study were conducted in the Plant Tissue Culture and Biotechnology Labs, Maryuot Research station, Desert Research Center, Egypt and the Department of genetics, Faculty of Agriculture, Alexandria University, Alexandria, Egypt. *Seriphidium herba-album* is very important medicinal plants that have been used in folk medicine for many years till now for the treatment of gastric disturbances and healing external wounds, remission of diabetic symptoms, activating of the liver and healing rashes, joint pains, inflammations and rheumatoid arthritis, with no side-effects. *S. herba-album* belongs to Artemisia *genus*, family of Asteraceae which contains about 23000 species. *Artemisia genus* plant produces a various number of secondary metabolites that showed biological activity. Artemisinin is sesquiterpene lactones. This substance is known for its medical efficacy, antioxidant, strong anti-inflammatory, antitumor activity, antimalarial, and for the fact Artemisinin could increase immunity.

The results:

1. Establishment of a regeneration system for (*Seriphidium herba-album*)

1.1.The highest percentage of Culture asepsis in the stem nodal section explants was (90%) with (73.33%) survival. This result was obtained when used 25% of sodium hypochlorite (Clorox) for 20 minutes then soaking in 0.1 % mercuric chloride ($HgCl_2$) for five minutes

1.2. The highest callus induction percentage (97.44%) and callus fresh weight (7.89 gram) were obtained on MS medium supplemented with 1.5 mg/L 2, 4-D and 0.5 mg/L BAP after four weeks from callus culture

1.3. The highest percentage of somatic embryos formation (95.30%) and the average number of somatic embryos per 1.0 g fresh weight of embryogenic callus (86.38) wre obtained on MS medium supplemented with 5.0 mg/L BAP and 0.5 mg/L NAA compared to the other treatments after eight weeks from callus calture

1.4. The best results of somatic embryo germination percentage (89.75%) and mean shoot length (3.98 cm) of the *Seriphidium herba-album* were obtained on MS medium supplemented with 3.0 mg/L GA3 and 1.0 mg/L kinetin compared to the other treatments after eight weeks from callus calture

1.5. The highest percentage of shoots that forming roots reached value of 100% and the highest mean number of roots/shoot (25.0%) and the highest mean length of roots/shoots (9.0 cm) were on MS medium free-hormone

1.6. The survival rate 100% after four weeks from the removal of transparent bags plantlets were maintained successfully. It decreased to 97% after 10 weeks of acclimatization

2. Enhancement of Artemisinin production from *Seriphidium herba- album* callus

Different concentrations from Jasmonic acid (JA), Salicylic acid (SA) and Sucrose (SU) were used to enhance the Artemisinin production in callus cultures. Moreover, measure their effect on callus biomass (callus fresh weight and dry weight).

Salsylic acid at 10, 20, 30, 40 mg/L; Jasmonic acid at 2, 4, 6, 8 mg/L and sucrose at 40, 50, 60 and 70 mg/L were aseptically added to callus cultivation medium (MS containing 1.5 2, 4-D and 0.5 BAP) for enhancing Artemisinin production. The results were taken after four weeks from callus culture and it appear that Salsylic acid was better than Jasmonic acid and sucrose for enhancing Artemisinin content

2.1. When used SA. Maximum Artemisinin concentration 36.75 mg /mL/100 mg DW with biomass (callus fresh weight 2.84 g and 0.13 g dry weight) on 40 mg/L SA.

2.2.When used JA. Maximum Artemisinin concentration was 34.94 mg /mL/100 mg DW with biomass (callus fresh weight 5.74 g and 0.32 g dry weight) on 4 mg/L JA

2.3.When used Sucrose. Maximum Artemisinin concentration was 22.55 mg /mL/100 mg DW with biomass (callus fresh weight 11.52 g and 0.58 g dry weight on 50 g/L

3. Quantitative RT-QPCR for three main genes in Artemisinin bathway

The best concentrations of each elecitor that gave the highest Artemisinin content were also used to measure their effect on gene expression level compared with non- treated callus (control) Sucrose 50 g/L and Salsylic acid 40 mg/L increased the gene expression of The key Artemisinin biosynthesis genes *ADS* and *CYP71AV1* to (2.77; 39.124 fold chang) and (1.95; 6.916 fold chang) in order.

Jasmonic acid (8mg/L) inceased only *CYP71AV1* gene expression to (36.252 fold change) but decreased *ADS* gene expression to (0.031fold chang), probably due to the negative feedback and all treatment (sucrose 50 g/L, Salsylic acid 40 mg/L, Jasmonic acid 8 mg/L) decreased DBR2 gene expression to (0.003, 0.005, 0.0059 fold chang) in order. It appears that the decline in *DBR2* gene expression level caused the Artemisinin content to increase.

5.2. Recommendations

There are no previous studies available to demonstrate the production of Artemisinin from this Egyption species *seriphidium herba –album* and the only source for producing this substance is artemesia plants because it is very complicated complex so we recommend that:

1- Expand the study of this species and concern for preservation.

2- Economic production of Artemisinin with large quantities to be available as a medicin.

زيادة إنتاج الأرتيمزينين من الشيح الجبلي بإستخدام طرق التكنولوجيا الحيوية

فاطمه محمد عمران ابوالحسن[1]، ياسر محمد مبروك[1]، حميد إبراهيم سليمان[2]، أيمن صلاح الصعيدي[1]

1 قسم الوراثة – كلية الزراعة – جامعة الإسكندرية

2 التكنولوجيا الحيويه النباتية – قسم الأصول الوراثية – مركز بحوث الصحراء

الملخص

تم اجراء الدراسه فى معامل زراعه الأنسجه النباتيه والتكنولوجيا الحيويه– محطه بحوث مريوط – مركز بحوث الصحراء– وقسم الوراثه – كليه الزراعه الشاطبى– جامعه الاسكندريه

يعتبرنبات الشيح الجبلى *Seriphidium herba-album* (الاسم السابق *Artemesia herba-alba*) من *Artemesia genus* من النباتات الطبيه المهمه في مصر حيث يحتوى على بعض المركبات الطبية الهامة ومنها مادة Artemisinin والتى تم اثبات نجاحها فى علاج الكثير من الأمراض الخطيرة والتى تؤدى إلى الوفاة ومنها الملاريا والسرطان وبعض الامراض الفيروسية والبكتيرية كما يستخدم فى الطب الشعبى لعلاج امراض المفاصل والمعدة والاسنان ومضاد للالتهابات والفطريات ويتحكم فى إنتاج هذه المادة مجموعة من الانزيمات وهم: *ADS*, amorpha-4, 11-diene synthase; *CYP71AV1*, cytochrome P450 monooxygenase; *DBR2*, artemisinic aldehyde Delta11 (13) reductase.

يهدف البحث الى:

إنشاء نظام معملى مناسب للإنتاج نبات الشيح الجبلى باستخدام الاجزاء النباتيه الورقيه على بيئه غذائيه مناسبه تحتوى على تركيزات مختلفه من منظمات النمو النباتيه وأيضا تم استخدام سالسيلك اسيد وجاسمونك اسيد وسكروز بتركيزات مختلفه فى البيئه الغذائيه للكالس وذلك بغرض حث الخلايا النبات على زياده إنتاج ماده الأرتيمزينين ومعرفه تأثير التركيز المناسب من هذه المواد والتى تنتج أعلى تركيز من الماده فى خلايا الكالس المجففه على التعبير الجينى لثلاثه من الجينات المهمه والمسئوله عن إنتاج ماده الأرتيمزينين

1. إعاده تكشف خلايا نبات الشيح الجبلي (*In vitro* regeneration of *Seriphidium herba- album*)

* تم تجميع العينات النباتية من أماكن تواجدها (الساحل الشمالى الغربى) وتجهيز الأجزاء النباتية وزراعتها معمليا.
* تعقيم الأجزاء النباتية باستخدام تركيزات مختلفة من الإيثانول وهيبوكلوريد الصوديوم وكلوريد الزئبيقيك وكانت أفضل النتائج المتحصل عليها كانت عند أستخدام هيبوكلوريد الصوديوم 25% (كلوركس) لمده 20 دقيقه مع كلوريد الزئبقيك 0,1 %($HgCl_2$) لمده خمس دقائق مقارنة بباقى المواد.

* زراعة الأجزاء النباتية على بيئة Murashige and Skoog مضافا إليها تركيزات مختلفة من منظمات النمو النباتية فى كل مرحلة.

أ- المرحلة البادئة ويستخدم فيها تركيزات مختلفة من السيتوكينين(BAP, 2iP TDZ, KN) والأوكسين (IAA, IBA, NAA and 2,4-D) للحصول على افضل بيئه لانتاج الكالس وكانت أفضل البيئات الغذائية لإنتاج الكالس من حيث الوزن(89. 7) جرام كالس كانت على بيئه تحتوى على1.5 mg/L 2, 4-D and 0.5 mg/L BAP .

ب- مرحلة إنتاج اجنه جسديه بطريقه غير مباشره من الكالس بإستخدم تركيزات مختلفة من السيتوكينين والاوكسين وأثبت التجارب المعملية أن أفضل البيئات الغذائية لإنتاج الإجنه الجسديه كانت على بيئه تحتوى على (5.0 mg/L BAP and 0.5 mg/L NAA).

ج- مرحله تكشف الاجنه الجسديه بإستخدم تركيزات مختلفة من السيتوكينين وكانت أفضل النتائج المتحصل عليها على بيئة غذائية المحتوية على 1mg/L KIN and 3mg/LGA_3 .

د- مرحلة التجذير تم إستخدام بيئه غذائيه تحتوى على تركيزات مختلفة من الاوكسين وبيئه غذائيه خاليه من منظمات النمو النباتيه وكانت أفضل النتائج على بيئة غذائية خاليه من منظمات النمو النباتيه.

و- مرحلة الأقلمة بالصوبه أعطت نسبة 100% على المخلوط المكون من 0.5 Sand (1Peat moss –1Vermiculite).