مقاله مروری

مروری بر کشت بافت، باززایی و انتقال ژن به *Artemisia annua* L.

علی شرفی[۱]، هاله هاشمی‌سهی[۲*]، کمال کاظمی‌تبار[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه مازندران
۲- استادیار، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فن‌آوری
۳- استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات ساری، دانشگاه مازندران
*آدرس مکاتبه: تهران، کیلومتر ۱۷ بزرگراه تهران – کرج، بلوار پژوهش، صندوق‌پستی: ٦٣٤٣ - ١٤١٥٥
کدپستی: ١٤١٧٨٦٣١٧١، تلفن: ٢٧-٤٤٥٨٠٣٠١ (٠٢١)، نمابر: ٤٤٥٨٠٣٩٩ (٠٢١)
پست الکترونیک: hashemi@nrcgeb.ac.ir

تاریخ دریافت: ۸۵/٦/۱۲ **تاریخ تصویب:** ۸۵/۹/۲۵

چکیده

Artemisia annua **گیاهی است یک ساله و آروماتیک که دارای ماده موثره ضد مالاریای آرتمیزینین بوده و به طور وسیعی در سراسر نواحی معتدل پراکنده است. به دلیل پایین بودن مقدار ماده آرتمیزنین در این گیاه و نیز عدم موفقیت در ساخت شیمیایی این ماده و تاثیر ناچیز روش‌های اصلاحی کلاسیک گیاهی، تنظیم مولکولی بیوسنتز این ماده از طریق انتقال ژن‌های آنزیم‌های کلیدی و یا جلوگیری از میان ژن‌های آنزیم‌های ممانعت‌کننده از تولید آن، مورد توجه قرار گرفته است. فراوانی تراریختی در این گیاه تحت تاثیر عواملی چون نوع ریز نمونه گیاهی، ژنوتیپ گیاه، سن منبع گیاهی و نژاد اگروباکتریوم است. لازمه تراریختی کشت بافت و باززایی گیاه است که کارهایی در این زمینه صورت گرفته است. این گیاه به میزان زیادی به کانامایسین حساس است و القای ساقه و ریشه در حضور این ماده به شدت کاهش می‌یابد. کشت‌های ریشه مویی نیز در این گیاه به دلیل رشد سریع و پایداری ژنتیکی و بیوسنتزی به عنوان جایگزین کشت‌های سوسپانسیون گیاهی جهت تولید این ماده انجام گرفته است که تلاش‌ها در طراحی بیوراکتورها برای تولید این متابولیت ثانویه از ریشه مویی ادامه دارد.**

گل‌واژگان: ***Artemisia annua*** **آرتمیزنین، متابولیت ثانویه، ریشه مویی**

مقدمه

Artemisia annua L. که به نام‌های *sweet annie* ، *annual wormwood* نیز نامیده می‌شود (در ایران به نام درمنه خزری معروف است) گیاهی است یک ساله و آروماتیک که بومی آسیا و شرق اروپا است و معمولاً در نواحی معتدل پراکنده شده است [۱]. این گیاه در چین به عنوان یک ماده ضدتب و ضدمالاریا به کار می‌رفته است. این گیاه منبع ماده دارویی آرتمیزنین[1] است که یک لاکتون سزکویی‌ترپن اندوپراکسید[2] است. آرتمیزنین یک متابولیت ثانویه است که فعالیت موثری علیه نژادهای پلاسمودیوم دارد. نژاده‌هایی که به داروهای چندگانه فعلی مقاوم شده‌اند [۲]. به دلیل افزایش مقاومت پلاسمودیوم به داروهای تجاری ضد مالاریا چون کلروکویین[3] و سولفادوکسین[4]، آرتمیزنین مورد توجه خاصی قرار گرفته و از طرفی به دلیل منابع محدود و سختی ساخت مصنویی و شیمیایی این ماده تلاش‌های زیادی برای افزایش تولید آرتمیزنین از *A.annua* توسط روش‌های فن‌آوری زیستی صورت گرفته است [۳]. عملکرد نسبی کم [۱/۰۸ – ۰/۰۱ درصد] این ماده در گیاه محدودیت عمده‌ای در تولید تجاری آن است. تغییرات در شرایط کشت و محیط رشد در کشت‌های سلولی و تغییر سطوح هورمونی در کشت بافت به منظور بالا بردن مقدار آرتمیزنین ناموفق بوده است [۴،۵]. در سال‌های اخیر پیشرفت‌های بیشتری در تنظیم مولکولی بیوسنتز این ماده صورت گرفته است. ژن‌های آنزیم‌های کلیدی در بیوسنتز این ماده مانند فارنسیل دی‌فسفات سینتاز[5] (FPS) و آمورفا ٤ و ١١ دی ان سینتاز[6] (AMS) و ژن‌های آنزیم‌هایی که مرتبط با بیوسنتز آرتمیزنین هستند مثل اسکوآلن سینتاز[7] (SQS)شناسایی و کلون شده‌اند [۶،۷]. شناسایی این ژن‌ها سبب شده است که بتوانیم توسط مهندسی ژنتیک بیان آنزیم‌های کلیدی موثر در ساخت آرتمیزنین نظیر FPS و AMS را بیشتر کنیم و یا از بیان آنزیم‌های مسیر رقابتی مثل SQS جلوگیری کنیم [۱]. cDNA کد کننده FPS از تعدادی از گیاهان از جمله *A. annua* L. ، *Arabidopsis thaliana* ، *Gossypium arbareum*، *Lupin ablus* جدا شده است [۸،۹].

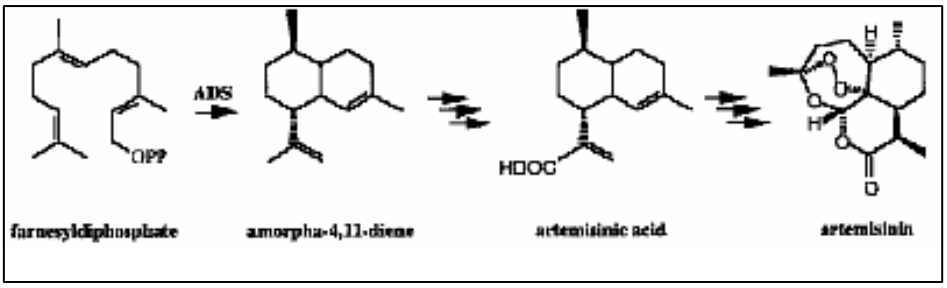
از اثرات مشتقات آرتمیزنین فعالیت آنها بر علیه سلول‌های سرطانی سینه انسان است که دارای اثر کشندگی انتخابی است و همچنین خاصیت ضد توموری دارد. تحقیقات جدید در سال ۲۰۰۵ نشان دادند که آرتمیزنین به تنهایی قادر به از بین بردن انتخابی سلول‌های سرطانی است. در حالی که بر سلول‌های طبیعی اثر سویی ندارد [۱۰]. خاصیت دیگر آسیبی بین گیاهی (آلیلوپاتی[1]) و دور کنندگی حشرات نیز از دیگر اثرات این گیاه است [۱۱،۱۲].

بیوسنتز آرتمیزینین

علی‌رغم تنوع ترپنوئیدها در طبیعت، همگی دارای مسیر بیوسنتزی واحدی بوده که از ایزوپنتیل دی فسفات[2] (IPP) مشتق می‌شوند. ثابت شده است که بیوسنتز IPP از مسیر وابسته به موالونات[3] سیتوزولی از استیل کوآنزیم A[4] منشاء می‌گیرد. در حالی که در پلاستیدها ذخیره IPP از مسیر وابسته به موالونات به واسطه ترکیب پیروات و D گلیسرآلدهید ۳ فسفات مشتق می‌شود. شواهد جدید تعامل این دو مسیر و تبادل IPP بین سیتوزول و پلاستید را تایید می‌کند. واکنش آنزیم کلیدی در مسیر موالونات احیای ۳ هیدروکسی ۳ متیل گلوتاریل کوآنزیم A [5] به فرم موالونیک اسید است که توسط ۳ هیدروکسی ۳ متیل کوآنزیم A ردوکتاز[6] کاتالیز می‌شود. در پلاستید ترکیب پیروات و D گلیسرآلدهید ۳ فسفات توسط D گزیلوز ۵ فسفات سینتاز[2] کاتالیز می‌شود. بازدارنده‌های مرحله اول آنزیمی مسیر وابسته به موالونات، با تشکیل ۱ دی اکسی D گزیلوز ۵ فسفات رهبری می‌شود. به هر حال اولین مرحله با IPP صورت می‌گیرد. در مسیر بیوسنتز ایزوپرنویید جریان

[1] Artemisinin [2] Endoperoxide sesquiterpene lacton
[3] Choloroquine [4] Sulphadoxin
[5] Farnesyl diphosphate [6] Amorpha-4, 11- dine synthase
[7] Squalen synthase

[1] Allelopathy [2] Isopenthenyl diphosphate
[3] Mevalonate [4] Acetyl-CoA
[5] 3-Hydroxy, 3-Metyl glutaryl-CoA
[6] HMG-CoA reductas



شکل شماره ۱- مسیر ساخت آرتمیزنین از فارنسیل دی فسفات

کربن از FPS حد واسط آغاز و ممکن است به دو مسیر مختلف برود یکی به سمت سزکویی‌ترپن‌هایی و دیگری برای سنتز استرول‌ها و ساپونین‌هایی که هر دو توسط اسکوآلن سینتاز کاتالیز می‌شوند [۱۳]. گزارش‌هایی مبنی بر جلوگیری از فعالیت اسکوآلن سینتاز با القای بیوسنتز فیتوالکسین سزکویی ترپنویید وجود دارد [۱٤]. مسیر سنتز ایزوپرنویید فارنسیل دی فسفات سینتاز (FPS) دو واکنش به هم آمیختن ایزوپنتیل دی فسفات با دی متیل آلیل دی فسفات و گرانیل دی فسفات[1] حاصل را کاتالیز می‌کند که محصول نهایی این دو واکنش فارنسیل دی فسفات است که در بیوسنتز استرول‌ها و دولیکول‌ها و ترکیبات زنجیره انتقال الکترون میتوکندری و دامنه گسترده‌ای از سزکویی ترپنوییدهای ثانویه مصرف می‌شود [۹]. شکل شماره ۱ مسیر سنتز آرتمیزنین را نشان می‌دهد [۱۳].

۱- کشت بافت *A. annua*

۱-۱- باززایی گیاه

جدول شماره ۱ نشان‌دهنده تلاش‌های صورت گرفته در کشت بافت *Artemisia annua* است. در یک آزمایش از گیاهچه‌های رشد یافته بالغ نوک ساقه جدا و بعد از استریل روی محیط MS حاوی ترکیب فاکتوریل از هورمون‌های ($^{-1}$mgl ۱ و ۰/۱ و ۰) 2-4D و ($^{-1}$mgl ۱۰ و ۱ و ۰/۱ و ۰) BAP (بنزیل آمینوپورین) کشت شد و در تمام این تیمارها ساقه‌دهی وجود داشت. BAP به تنهایی در $^{-1}$ mgl ۱۰ بیشترین تعداد ساقه‌دهی را دارد. ولی بیشترین ساقه طبیعی در میزان $^{-1}$ mgl ۱ ایجاد شد. میزان آرتمیزنین در ساقه‌های درون شیشه‌ای ۰/۰۳ تا ۰/۰۵ درصد وزن خشک بود. تمام ساقه‌ها توسط از هورمون IAA ریشه‌دار شدند [۱].

آزمایش دیگری برای القای ساقه بعد از تراریختی با ترکیبات مختلف هورمونی BAP و NAA صورت گرفت. در این آزمایش در ترکیب هورمونی NAA $^{-1}$ mgl ۰/۰۵ و BAP $^{-1}$ mgl ۲ در دو نژاد مورد آزمایش ژنوتیپ‌های ۰۰۱ و ۰۲۵ بالاترین میزان فراوانی ساقه‌دهی را داشتند، در حالی که غلظت NAA $^{-1}$ mgl ۰/۰۵ این نژادها مناسب‌ترین میزان ریشه‌دهی را دربرداشت. براساس این نتایج محیط استاندارد، محیط MS پایه حاوی NAA $^{-1}$ mgl ۰/۰۵ و BAP $^{-1}$ mgl ۲ به عنوان محیط منتخب جهت القای ساقه بعد از تراریختی معرفی شد [۱۵].

آزمایش دیگر نشان داد که فراوانی القای ساقه در ژنوتیپ گیاهی Nj با هورمون‌های NAA $^{-1}$ mgl ۰/۰۵ و BAP $^{-1}$ mgl ۰/۵ بالاترین مقدار بود و فراوانی القای ساقه در ژنوتیپ گیاهی ۰۰۱ با ترکیب هورمونی NAA $^{-1}$ mgl۰/۰۵ و BAP $^{-1}$ mgl ۰/۱ بالاترین مقدار بود [۵]. نکته مهم در القای ساقه این بود که در این روش ساقه‌ها به طور مستقیم از محل زخم و بدون واسطه کالوس به وجود می‌آمدند ولی در روش‌های قبلی ابتدا کالوس‌دهی رخ داده سپس تبدیل به ساقه می‌گردد. این روش القای ساقه با روش‌های قبلی متفاوت بود. اولاً اینکه در روش‌های قبلی یک برگ به قسمت‌های متعددی تقسیم می‌شد، در حالی که در این روش تمام برگ به طور کامل درون محیط القای ساقه قرار می‌گیرد. برای ژنوتیپ گیاهی ۰۰۱ سلول‌ها در محل زخم دمبرگ مستعد رشد ساقه هستند در حالی که سلول‌های سایر بخش‌های برگ مستعد

[1] Granyl diphosphate

جدول شماره ۱- مطالعات کشت بافت *A. annua* [۱]

منبع	ترکیب هورمونی محیط پایه MS (میلی‌گرم در لیتر)	نتیجه	ریزگیاه	منبع گیاهی
Nair و همکاران، ۱۹۸٦	IBA ۲, NAA ۰/۰۵ BAP۰/۲ , NAA ۰/۰۵	کالوس ساقه، ریشه	ساقه	وحشی
Tawfiq و همکاران، ۱۹۸۹	kinetin ۰/۱, 2-4D ۱	کالوس	کالوس	-
Kim و همکاران، ۱۹۹۲	BAP ۵ , pcPA ۰/۰۵	کالوس-گال	ریشه	- تراریخت با *A. rhizogenes*
Basile و همکاران، ۱۹۹۳	BA ۰/۱-۰/۰۲۵ 2-4D ۰/۵ NAA ۲ -۰/۵	کالوس	برگ	-
Woerdenbag ، ۱۹۹۳	NAA ۰/۰۵ BAP ۰/۲	ساقه	برگ و ساقه	ویتنام
Brown ، ۱۹۹٤	NAA۰/۵,2-4D ۱ NAA ۲/۵ BAP , ۲/۵-۰/۵	کالوس	هیپوکوتیل	-
Panigo ، ۱۹۹۵	BA۲NAA ۱ zeatin۲ NAA۰/۲, BA ۳	کالوس- ساقه	هیپوکوتیل برگ- ریشه	وحشی
Moraes ، ۱۹۹۵	IAA۰/۲, Kinetin ۰/۵	ساقه	ساقه	-
Mukherjee ، ۱۹۹۵	BA۲۵-۳۵	ریشه مویی	ریشه	تراریخت با *A. rhizogenes*
Ferreia ، ۱۹۹٦	GA3.,۰/۳۵ BAP۵-۰/۵ 2-4D,۰/٦۷	کالوس-ساقه	برگ	لاین‌هایP1,P2
Gulati ، ۱۹۹٦	GA۰/۱ BAP ۳ NAA ۱	ساقه	برگ-ساقه	-
Vergauwe ، ۱۹۹٦	BAP۰/۵ ,NAA ۰/۰۵	کالوس – ساقه - ریشه	برگ- ساقه ریشه	ویرجینیا- یوگسلاوی
Smith ، ۱۹۹۷	GA3۰/۰۱	ریشه مویی	ریشه	تراریخت با *A. rhizogenes*
Weathers ، ۱۹۹۷	بدون هورمون	ریشه مویی	ریشه	تراریخت با *A. rhizogenes*
Liu ، ۱۹۹۸- ۱۹۹۹	NAA۰/۰۵, BAP, ۰/۵	کشت سلول	کشت سلول	-
Chen ، ۲۰۰۰	BAP ۲, NAA۰/۰۵	ساقه	برگ	لاین‌های 025,001
Xie ، ۲۰۰۰	بدون هورمون	ریشه مویی	ریشه	تراریخت با *A. rhizogenes*

ادامه جدول شماره ۱- مطالعات کشت بافت *A. annua* [۱]

منبع	ترکیب هورمونی محیط پایه MS (میلی‌گرم در لیتر)	نتیجه	ریزگیاه	منبع گیاهی
Chenshu ، ۲۰۰۳	BAP۰/۵ ,NAA ۱	کالوس- ساقه	برگ	A201,A202
Sharafi, Hashemi ۲۰۰۶ – ۲۰۰۵ (منتشر نشده)	BAP 2 , NAA0.5	کالوس – ساقه - ریشه	برگ	ایران
Sharafi, Hashemi ۲۰۰۶ - ۲۰۰۵ (منتشر نشده)	بدون هورمون	ریشه مویی	برگ	ایران

تولید کالوس هستند. ثانیاً سن گیاهان ژنوتیپ ۰۰۱ استفاده شده حدود ۱۵ روز پیرتر از روش قبلی بود. به نظر می‌رسد برگ‌های جوان برای القای ساقه در ژنوتیپ گیاهی ۰۰۱ مناسب نبودند. برای *A. annua* القای ریشه نسبت به القای ساقه آسان‌تر است. یک هفته پس از انتقال ساقه‌ها به محیط القای ریشه، ریشه‌دهی صورت می‌گیرد. نتایج نشان داده است که القای ریشه حتی در محیط بدون هورمون و MS پایه رخ می‌دهد. با این حال محیط حاوی NAA $^{-1}$ mgl ۰/۰۵ را برای القای ریشه پیشنهاد داده شده و در غلظت‌های بالاتر امکان ایجاد کالوس‌دهی وجود دارد [۵].

آزمایش‌های کشت بافت و باززایی و ریشه مویی که توسط نگارندگان در ایران انجام شد، نشان داد که باززایی گیاه با استفاده از ریز نمونه گیاهی[1] برگی در محیط حاوی هورمون‌های BAP و NAA صورت گرفت. القای ریشه مویی با *Agrobacterium rhizogenes* نژاد GMI 9534 نیز در ایران انجام شد. شکل شماره ۲ گیاه *Artemisia annua* ، باززایی از برگ و القای ریشه مویی را نشان می‌دهد.

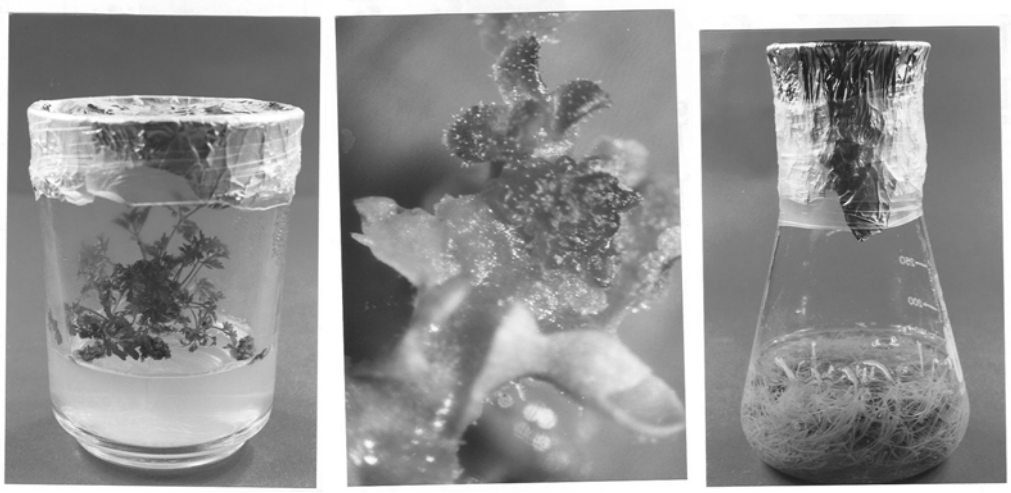
۱-۲- مقاومت *A. annua* به کانامایسین

نتایج آزمایش Hun و همکاران در سال ۲۰۰٤ نشان داده است که القای ساقه *A. annua* به میزان زیادی به کانامایسین حساس است. القای ساقه به طور کامل در $^{-1}$ mgl ۱۰ کانامایسین بازداشته می‌شود. ژنوتیپ گیاهی Nj از ژنوتیپ گیاهی ۰۰۱ به کانامایسین حساس‌تر بود. هیچ ساقه‌ای از ژنوتیپ گیاهی Nj حتی در $^{-1}$ mgl ۵ کانامایسین نیز القا نشد. برای ژنوتیپ‌های گیاهی ۰۰۱ و NJ زمانی که غلظت کانامایسین$^{-1}$ mgl ۱۰ یا بالاتر باشد ساقه‌ای القا نمی‌شود. همچنین کالوس نیز توسعه نمی‌یابد و زرد و رنگ پریده می‌شوند. با این حال رشد ساقه به کانامایسین نسبت به القای ساقه کمتر حساس است. زمانی که ساقه‌های القا شده در معرض $^{-1}$ mgl ۱۰ و ۱۵ و ۲۰ کانامایسین قرار گرفتند بعضی برگ‌ها در یک تا دو هفته زرد و بعضی دفرمه می‌شدند. القای ریشه نیز به کانامایسین بسیار حساس است. القای ریشه در این آزمایش‌ها به طور کامل در $^{-1}$ mgl ۱۰ کانامایسین متوقف شد. در $^{-1}$ mgl ۵ کانامایسین ٤٦/۷ درصد ریشه‌دهی بر روی ساقه‌هایی از ژنوتیپ گیاهی ۰۰۱ رخ می‌دهد در حالی که هیچ ریشه‌ای از ساقه‌های ژنوتیپ گیاهی Nj حاصل نمی‌شود. در غلظت‌های بالاتر هیچ ریشه‌ای از زیر ساقه ایجاد نمی‌شود. ولی ریشه‌های هوایی گاهی از ساقه‌های به سمت بالای محیط حاصل می‌شوند [۵].

۱-۳- کشت‌های ریشه مویی در *A. annua*

ترپنوئیدها به عنوان خانواده بزرگی از متابولیت‌های گیاهی برای عملکرد نرمال گیاهان بسیار مهم هستند و از لحاظ علمی و اقتصادی منبعی از مواد شیمیایی مفید و مهم هستند که شامل موادیست مانند داروهای گیاهی، عطرها، چاشنی‌ها و حشره‌کش‌ها.

[1] Explant



شکل شماره ۲ – از راست به چپ: گیاه *Artemisia annua* ، باززایی از ریز نمونه برگی و القای ریشه مویی

ریشه مویی *A. annua* از لحاظ بیوشیمیایی یک مدل پایدار برای مطالعه ترپنوییدها است که شامل لاکتون سزکویی ترپنوییدآرتمیزنین نیز می‌شود. تنظیم مراحل متابولیسمی ترپنوییدها در این مدل گیاهی بسیار مهم است زیرا نقش مراحل متعهد که هدایت مستقیم و یا غیرمستقیم سنتز را به عهده دارند اساسی است تنظیم رونویسی مراحل آنزیمی اولیه در بیوسنتز فارنسیل دی فسفات می‌تواند در ریشه مویی صورت گیرد [۱۳].

پاتوژن خاکزی *Agrobacterium rhizogenes* عامل ایجاد ریشه‌های نابجای مویی در محل آلودگی و همچنین باعث تغییرات بیوشیمیایی ویژه ای در متابولیسم گیاه می‌شود [۱۶]. کشت‌های ریشه مویی چند خاصیت دارند که به استفاده از آنها به عنوان جایگزین در کشت‌های سوسپانسیون گیاهی جهت تولید متابولیت‌های ثانویه کمک کرده است رشد سریع آنها، پایداری ژنتیکی و بیوسنتزی آنها از جمله این مزیت‌ها به شمار می‌آیند.

در مطالعه انجام گرفته برای القای ریشه مویی در *A. annua* سطوح متنوعی از آرتمیزنین (۰/۴۵ – ۰/۰۰۱) در کشت‌ها گزارش شده است فراوانی تراریختی با نژادهای مختلف *A. rhizogenes* متفاوت است ترکیبات فنلی مثل استوسیرنگون و α هیدروکسی استوسیرنگون برای تحریک نسخه‌برداری نواحی vir موثر هستند مطالعات اثر استوسیرنگون روی فراوانی تراریختی و القای ریشه مویی و امکان افزایش تولید بالای آرتمیزنین در کشت‌های ریشه مویی با نژادهای مختلف *A. rhizogenes* صورت گرفته است [۱۷].

اصولاً در خانواده *Anthemediaceae* تمرکز اصلی استفاده از ریشه مویی در سیستم‌های بیورآکتور برای بهبود عملکرد مواد مهم دارویی و اقتصادی مثل آرتمیزنین در *A. annua* بوده است [۱] طراحی بیورآکتور برای تولید متابولیت‌های ثانویه از ریشه‌های مویی می‌تواند به طور اقتصادی مفید باشد کشت‌های ریشه مویی تراریخت شده یک مدل پایدار ژنتیکی و بیوشیمیایی برای سنجش ساخت و بالا بردن محصولات طبیعی مهم دارویی است. توانایی رشد سریع ریشه‌های مویی برای تولید دامنه وسیعی از مولکول‌های آلی مزیت‌های بیشتری در مقایسه با روش‌های مرسوم در مزرعه و کشت‌های سوسپانسیون سلولی بدون سازمان یافتگی دارد.

توانایی ریشه مویی برای رشد کردن با تراکم بالا و تولید مقادیر معنی‌داری از متابولیت‌های ثانویه نیز آنها را یک سیستم مناسب برای کشت در حد وسیع در راکتور ساخته است. فاکتورهای زیادی در حین تکثیر هر نوع کشت سلولی تاثیر می‌گذارند که شامل میزان انتقال اکسیژن، انتقال گرما، حجم هوای مرتبط با کشت و سن و پایداری کشت هستند. تاکنون چندین نوع راکتور برای کشت‌های ریشه مویی بهینه‌سازی شده است که شامل راکتورهای فاز مایع مثل تانک‌های هم‌زن، ستون

حباب، راکتورهای هوا بالا دهنده، راکتورهای فاز گازی، و راکتورهای mist و بالاخره راکتورهای هیبرید هستند [۱۳].

مشخص شده است که میزان آرتمیزنین در ریشه‌های مویی *A. annua* به طور معنی‌داری در راکتورهای mist بیشتر از ستون حباب بوده و ریشه‌های رشد یافته در فلاسک‌های لرزان دارای میزان آرتمیزنین اندکی بود.

راکتور mist به طور معنی‌داری میزان آرتمیزنین بیشتری به ازای هر گرم وزن تر کشت دارد در حالی که راکتور ستون حباب میزان بیوماس بیشتری تولید می‌کند. آزمایش‌های دیگر سطوح بیانی ٤ ژن کلیدی بیوسنتز ترپنوئیدها شامل ۳ هیدروکسی ۳ متیل گلوتاریل کوآنزیم A ردوکتاز (HMGR)، ۱- داکسی D گزیلوز ۵ فسفات سینتاز (DXS)، ۱- داکسی D گزیلوز ۵ فسفات ردوکتو ایزومراز (DXR) و فارنسیل دی فسفات سینتاز (FPS) را در سه شرایط کشت مقایسه کردند. بیان هر ٤ ژن در راکتورها مشابه، برابر یا بیشتر از ریشه‌هایی بود که در فلاسک‌های لرزان رشد داده شده بود. در این آزمایش ثابت شده است که نور بربیان ٤ ژن موثر است [۱۸].

در یک مطالعه اثر ۵ فیتوهورمون اکسین، سیتوکنین، اتیلن، جیبرلین و آبسیزیک اسید (ABA) را روی رشد ریشه مویی و میزان آرتمیزنین ریشه مویی *A. annua* بررسی شد. زمانی که طول ریشه کل مقایسه شد بهترین شرایط برای تحریک طویل شدن به صورت GA $^{-1}$ mgl ۰/۱ > ABA $^{-1}$ mgl ۰/۰۱> GA $^{-1}$ mgl ۰/۰۲ بوده و تمام کشت‌هایی که هورمون ABA داشتند بیشترین عملکرد بیوماس را داشتند. دو هورمون ٦ بنزیل آمینو پورین و ایزوپنتیل آدنین از رشد ریشه جلوگیری کردند با این حال ایزوپنتیل آدنین باعث تحریک تولید آرتمیزنین شد که بیشتر از محیط شاهد B5 و هر هورمون دیگری بود [۱۹].

۲- تراریختی *A. annua*

یکی از دلایل اهمیت ایجاد یک سیستم تراریختی برای *A. annua*، انتقال ژن‌های مفید نظیر ژن‌های آنزیم‌های کلیدی در بیوسنتز آرتمیزنین است سیستم معمولی تراریختی در گیاهان دولپه‌ای استفاده از اگروباکتریوم است که در گیاه *A. annua* نیز به کار گرفته شده است. آزمایش‌های اولیه تراریختی به منظور بهینه‌سازی تراریختی نشان داد که فراوانی تراریختی به طور معنی‌داری تحت تاثیر پارامترهایی چون نوع ریز گیاه، نوع نژاد و سن منبع گیاهی و نوع پلاسمید vir است [۲۰]. انتقال ژن‌هایی چون ژن گزارشگر *gus*، نئومایسین فسفوترانسفراز، منگنز و آهن سوپراکسید دسموتاز و بلومایسین استیل ترانسفراز بررسی شده است [۲۱].

۲-۲- تاثیر نژاد اگروباکتریوم و ژنوتیپ *A. annua* در بازدهی تراریختی

نژادهای باکتریایی و ژنوتیپ‌های گیاهی نقش مهمی در عملکرد تراریختی دارند. نژاد باکتری EHA105 برتر از LBA4404 و ژنوتیپ گیاهی ۰۰۱ برتر از ژنوتیپ Nj بود. اگروباکتریوم توانایی مختلفی برای آلوده کردن گونه‌های مختلف گیاهان حتی ژنوتیپ‌های مختلف یک گونه دارند. به طور کلی اختصاصی بودن ژنوتیپ وابسته به شرایط فیزیولوژیکی است که تحت تاثیر واکنش‌های فیزیولوژیکی پس از زخمی شدن، غلظت هورمون‌های درون سلولی، و ساختار دیواره سلولی است [۲۲].

از بین برگ‌ها، قطعات ساقه و ریشه مطلوب‌ترین ریز گیاه جهت تراریختی برگ‌ها هستند [۲۰،۲۳]، زیرا علاوه بر فراوانی بالاتر القای ساقه از برگ، اگروباکتریوم نیز توانایی بیشتری برای آلوده کردن برگ‌ها دارد [۲۳]. زمانی که کوتیلدون ۸ روزه به عنوان ریز گیاه جهت تراریختی به کار رفت، بازده تراریختی بسیار پایین بود و زمانی که بذور به عنوان ریز گیاه به کار رفتند، بذور تراریخت فقط توانایی جوانه‌زنی داشتند امّا توانایی ریشه‌دهی در محیط انتخابی را نداشتند. این بذور ٤ روز پس از رفع آلودگی در محیط غیرانتخابی جوانه زدند و توسط آزمایش تشکیل ریشه روی محیط حاوی $^{-1}$ mgl ۲۰ کانامایسین نشان داده شد هیچ کدام از گیاهچه‌ها تراریخت نشده بودند. در حالی که روی محیط شاهد ۵۸ درصد ساقه ها ریشه دادند که این امر نشان می‌دهد که تراریختی بذور گیاه تراریخت تولید نمی‌کند، اگر چه جوانه‌زنی و ایجاد گیاه بالغ بعد از هم کشتی با باکتری هنوز هم امکان‌پذیر است [۲۱].

۲-۳- تاثیر دوره پیش کشت روی تراریختی

ریز گیاه‌های پیش کشت شده هیچ تاثیر مثبتی روی بازدهی

تراریختی ندارد برعکس دوره پیش کشت طولانی، فراوانی القای ساقه مقاوم به کانامایسین را کاهش می‌دهد [۵].

۲-٤- اثر ترکیب سوسپانسیون باکتریایی آلوده کننده روی بازدهی تراریختی

A. tumefaciens در محیط LB بهتر از محیط MS رشد می‌کند با این وجود محیط LB برای تراریختی مناسب نیست احتمالاً ترکیبات محیط LB مثل تریپتون و عصاره مخمر از القای ساقه جلوگیری می‌کنند [۵].

۲-۵- اثر روش‌های هم‌کشتی روی بازدهی تراریختی

نتایج آزمایش‌ها نشان داده که در روش هم‌کشتی مایع برای برگ‌های آلوده شده فراوانی ساقه‌های مقاوم به کانامایسین ۲٤/٤ درصد بود در حالی که این نرخ برای برگ‌های آلوده نشده در همان محیط ۳۲/۸ درصد بود [۱٤]. بازدهی تراریختی می‌تواند توسط افزودن هورمون به محیط هم‌کشتی بهبود یابد زیرا تقسیم سلولی ریز گیاهان تسریع می‌شود و نگهداری و فعالیت سلولی بهبود می‌یابد [۲٤]. البته این احتمال هم وجود دارد که القای ساقه در مراحل اولیه اتفاق افتد و در دوره کوتاهی شروع شود و ساقه‌ها در محیط انتخابی رشد خود را ادامه دهند به این دلیل پیشنهاد می‌شود محیط MS جامد بدون هیچ هورمونی به عنوان محیط هم‌کشتی انتخاب شود [۵].

دوره هم‌کشتی تاثیر مهمی در تراریختی دارد سرزندگی اگروباکتریوم درون زخم گیاه بیش از ۱٦ ساعت است که می‌تواند تشکیل تومور را تحریک کند. بنابراین دوره هم‌کشتی کوتاه برای تراریختی مناسب نیست همچنین دوره هم‌کشتی خیلی طولانی منجر به رشد بیش از حد اگروباکتریوم شده و برای سلول‌های گیاهی مضر است.برای *A. annua* دوره ۳ روزه مناسب است.

در روش‌های اولیه تراریختی برای این گیاه جهت ساخت محیط انتخابی از آنتی‌بیوتیک وانکومایسین استفاده شده بود که علاوه بر گران بودن بر علیه اگروباکتریوم عملکرد ضعیفی داشت [۲۰]. سپس از پنی‌سیلین استفاده شد که برای رفع آلودگی کارآمد بود ولی تنها کالوس تراریخت به وجود می‌آمد و ساقه تراریخت تولید نمی‌شد [۱۵] ولی ثابت شد که سفوتاکسیم فعالیت قوی‌تری بر علیه باکتری دارد و هیچ اثر منفی روی القای ساقه ندارد [۵].

در آزمایشی که در سال ۲۰۰٤ صورت گرفت ۲۰ درصد ساقه‌های مقاوم به کانامایسین به ازای تراریختی وجود داشت و ۲۰ تا ۵۰ درصد آنها روی محیط ریشه‌دهی MS و $0/05\ mgl^{-1}$ NAA و $15\ mgl^{-1}$ کانامایسین ریشه دادند و به گیاهچه تبدیل شدند محیط انتخابی باززایی دارای NAA $0/05\ mgl^{-1}$، BAP $1\ mgl^{-1}$ و $15\ mgl^{-1}$ کانامایسین و نیز سفوتاکسیم بود [۵].

منابع

1. Jame A. and T Dasilva. Anthemediaceae: advances in tissue culture, genetics and transgenic biotechnology. *African jou. Biotech*. 2003; 12: 544 – 556.

2. Kalyman D L. Qinghaoso (Artemisinin): An antimalarial drug from china. *Science* 1985; 228: 149 – 1055.

3. Geldre V Vergauwe and E Vanden Eeckhout. State of art of the production of the antimalarial compound artemisinin in plants. *Plant Mol. Biol*. 1997; 33: 199 – 209.

4. Abdin M Z Israr M Rehman RU and S K Jain. Artemisinin a novel antimalarial drug: biochemical and molecular approaches for enhanced production. *Planta Med*. 2003; 69: 289-299.

5. Hun J L, Wang H, Chun H, Liu Y, Li Z and Y Sheng. High efficiency of transformation and regeneration of *Artemisia annua* via A.

tumifaciense. *Plant science*. 2004; 34-38.

6. Matsushita Y, Kang W and B V Charlwood. Cloning and analysis of a cDNA encoding famesyl diphosphate synthase from *Artemisia annua. Gene.* 1996; 172: 207 – 209.

7. Liu Y Ye H C Wang H and G F Li. Molecular cloning *Escherichia coli* expression and genomic organization of squalene synthase gene from *Artemisia annua*. *Acta Bot. Sin*. 2003; 45: 608 – 613.

8. Bohlmannm J, Meyer G and R Croteau. Plant terpenoid synthases: molecular and phytogenetic analysos. *Proc. Nat. acad. Sci.* 1998; 4126 – 4133.

9. Chappell J. Biochemistry and molecular biology of the isoprenoid bio synthetic pathway in plants. *Plant. Mol. Biol*. 1995; 46: 521 – 547.

10. Singh N P and H Lai. Selective toxicity of dihdroar temisinin and holotransferrin toward human breast cancer cell. *Life Sci*. 2001; 70: 49 – 56.

11. Duke S O Vaughn K C and H N Elsohly Artemisinin a constituent of annual wormwood, is a selective phytotoxin. *Weed Sci*. 1987; 35: 499 – 505.

12. Hold K M Sirisoma N S Nara hashi T and J E Casida 2000.

13. Souret F Kim Y Wyslouzil B E, Wobbe K and PJ Weathers. Scale – up of *Artemisia annua* hairy root cultures produces complex patterns of terpenoid Gene expression. *Willey inter. science* 2003; 78: 1523 - 1528.

14. Vogeli U and J Chappell Induction of sesquiterpene cyclese and suppression of squalen synthase activity in plant cell culture treated with fungal elicitor. *plant physiol*. 1988; 88: 1991 – 1996.

15. Chen D H Ye H C and G F Li. Expression of a chemeric farnesyl diphophate synthase gene in *Artemisia annua* transgenic plant via *Agrobacterium tumefaciens – mediated* transformation, *plant Sci*. 2000; 155: 179 – 185.

16. Grant J E Domisse, E M Christy M C and Aj conner. in advanced method in plant breeding and biotechnology, CAB international. walling ford, 1991; 50 – 70.

17. Archana G Sarish T Dhingra V and M L Narasu. Influence of different strains of *Agrobacterium rhizogenes* on induction of hairy roots and artemisinin production in *Artemisia annua*. *Current Science* 2002; 112-115.

18. Kim Y Wethers P J and B E Wyslouzil. A comparative study of mist and bubble column reactor in the *in vitro* production of artemisinin. *Plant cell Rep*. 2003; 20: 451 – 455.

19. Weathers P J Bunk G and M C Mcoy. The effect of phytohormones on growth and Artemisinin production in *Artemisia annua*. Hairy roots. *In vitro cellular and development*. 2005; 41: 47 -53.

20. Vergawe A. Cammaert, R Vanden berghe D Genetello, C Inzeo, D Van Montagu M and E vanden Eeckhout. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Artemisia annua* and regeneration of transgenic plants. *Plant cell Rep*. 1996; 15: 929 – 933.

21. Vergawe A, VanGelder E. Inze D, Vanmontagu M and E vanden Eeckhat. The use of amoxicillin and ticarcillin in combination with β-lactamase inhibitor as decontaminationg agents in the *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Artemisia annua*. *J. Biotechnol.* 1998; 52: 89- 95.

22. Wang G L and H J Fang. Mechanism and technology of plant genetic Engineering. *Science publisher*. 1998; 123 – 124.

23. Ghosh B, Mukherjee S and S Jha. Genetic transformation of Artemisia annua by *Agrobacterium tumefaciense* and artemisinin

State of the art of the production of the antimalaral compound artemisinin in plant. *Plant Mol Biol*. 1997; 33: 199 – 209.

24. Van Goldre E, vergauwe A and V D Eeckhout. synthesise in transformed cultures. *Plant Sci*: 1997; 122: 193 – 1999.