بهبود تولید آرتمیزینین در ریشه‌های مویین گیاه درمنه خزری (*Artemisia annua*) با استفاده از باکتری استافیلوکوکوس اورئوس

الهه بنده‌علی[1]، مهرناز کیهان‌فر[2]*، غلامرضا اصغری[3]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌فناوری، دانشکده علوم و فناوری نوین، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
۲- استادیار، گروه زیست‌فناوری، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
۳- استاد، گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
*آدرس مکاتبه: اصفهان، خیابان هزار جریب، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم و فناوری نوین، گروه زیست‌فناوری، کدپستی: ۷۳٤٤۱ – ۸۱۷٤٦، تلفن و نمابر: ۷۹۳٤٤۰۲ (۰۳۱۱)
پست الکترونیک: m.keyhanfar@ast.ui.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۱/۲۳ **تاریخ تصویب:** ۹۲/٤/۱٦

چکیده

مقدمه: آرتمیزینین، یک متابولیت ثانویه گیاهی است که علیه مالاریای مقاوم به درمان به کار می‌رود، همچنین خاصیت ضدویروسی و ضد سرطانی آن ثابت شده است. در سال‌های اخیر تلاش‌های متعددی برای افزایش تولید آرتمیزینین از طریق کشت بافت صورت گرفته است.

هدف: در این پژوهش تأثیر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بر تولید آرتمیزینین در ریشه‌های مویین درمنه خزری بررسی شد.

روش بررسی: نژادهای **A7** و **Ar318** آگروباکتریوم رایزوژنز برای القای ریشه مویین استفاده شد. ۲ گروه ریزنمونه تهیه شد، در اولین گروه برگ‌ها از ۲ انتها برش یافت (ریزنمونه ۱) و در دومین گروه ساقه از ناحیه گره برش یافت (ریزنمونه ۲). سوسپانسیون آگروباکتریوم (**A7** و **Ar318**) به محل زخم ریزنمونه‌های ۱ و محل گره در ریزنمونه‌های ۲ تزریق شد. ماهیت تراریختگی ریشه‌ها با تکثیر ژن ***rolB*** و به وسیله واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز **(PCR)** تأیید شد. پس از تحریک ریشه‌های مویین با باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، آنالیز کروماتوگرافی گازی **(GC)** به منظور تعیین مقدار آرتمیزینین تولید شده در ریشه‌ها انجام شد.

نتایج: ریشه‌های مویین ۵ الی ۱۰ روز پس از آلودگی با آگروباکتریوم تنها توسط نژاد **A7** ظاهر شدند. ریشه‌ها از محل زخم در ریزنمونه‌های ۲ ظاهر شدند ولی ریز نمونه های ۱ نکروزه شدند. بالاترین مقدار آرتمیزینین در ریشه‌های مویین تیمار شده با سوسپانسیون استافیلوکوکوس اورئوس ، ۰/۱۳۳ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک محاسبه شد.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که فاکتورهای مختلفی مانند منبع ریزنمونه‌ها و نژاد آگروباکتریوم در القای ریشه مؤثر می‌باشند. همچنین باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در تحریک افزایش تولید آرتمیزینین در ریشه‌های مویین درمنه خزری مؤثر می‌باشد.

گل‌واژگان: آرتمیزینین، درمنه خزری، آگروباکتریوم رایزوژنز، استافیلوکوکوس اورئوس، ریشه مویین

www.SID.ir

مقدمه

آرتمیزینین یک سزکویی‌ترپن لاکتون‌اندوپراکسیداز مشتق شده از بخش‌های هوایی گیاه درمنه خزری (*Artemisia annua*) می‌باشد که به طور گسترده‌ای علیه انگل مالاریا به کار می‌رود. به دنبال مقاومت این انگل به داروهای موجود مانند کینین‌ها، در سال ۱۹۷۱ اولین بار ترکیب ضد مالاریای آرتمیزینین از عصاره گیاه درمنه خزری جداسازی شد. در سال ۲۰۰۵ سازمان بهداشت جهانی ترکیب دارویی بر پایه آرتمیزینین را برای درمان مالاریا معرفی نمود [۱]. بررسی‌ها نشان می‌دهد که آرتمیزینین در شرایط آزمایشگاهی از فعالیت ویروس‌های ایدز، هپاتیت B وC، هرپس ویروس نوع یک و ویروس EBR (Epstein Barr *virus*) جلوگیری می‌نماید [۲]. همچنین این ترکیب خاصیت ضد سرطانی انتخابی داشته و به سلول‌های سالم آسیب نمی‌رساند. این ویژگی به دلیل برهم‌کنش آرتمیزینین با آهن درون سلول‌ها و تولید رادیکال‌های سمی می‌باشد [۳].

امروزه به منظور بهبود تولید آرتمیزینین، استفاده از محرک‌ها در کشت ریشه‌های مویین درمنه خزری مورد توجه قرار گرفته است، با این حال در تعداد معدودی از مطالعات انجام شده، از محرک‌های میکروبی در کشت ریشه‌های مویین درمنه خزری استفاده شده است. لیو (Liu) و همکارانش (۱۹۹۹) تأثیر غلظت‌های مختلف سوسپانسیون قارچ *Penicillium chrysogenum* (۱ - ۰/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) را در کشت ریشه‌های مویین درمنه خزری بررسی کردند. نتایج نشان داد که این محرک در غلظت‌های پایین بر رشد و بیوسنتز آرتمیزینین مؤثر می‌باشد [٤]. پس از تیمار ریشه‌های مویین درمنه خزری با ۲۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره قارچ *Colletotrichum* SP، تولید آرتمیزینین تا ٦٤/۲۹ درصد در مقایسه با نمونه کنترل افزایش یافت [۵]. تولید آرتمیزینین در کشت ریشه‌های مویین درمنه خزری با استفاده از الیگوساکارید مشتق شده از دیواره قارچ *Fusarium oxysporum* (۰/۳ میلی‌گرم در لیتر) بهبود یافت. این الیگوساکارید با القای نیتریک اکسید، تولید این متابولیت را افزایش می‌دهد [٦].

همان‌طور که اشاره شد استفاده از محرک‌ها (زیستی و غیرزیستی) یکی از راهکارهای زیست فناوری برای بهبود تولید متابولیت‌های ثانویه در ریشه‌های مویین می‌باشد. با توجه به اینکه تولید برخی از متابولیت‌های ثانویه گیاهی در پاسخ به استرس‌های محیطی و حمله پاتوژن‌ها افزایش می‌یابد، استفاده از محرک‌های میکروبی از جمله باکتری‌ها می‌تواند راهکار مناسبی برای افزایش تولید این گروه از متابولیت‌ها باشد. هدف از انجام این پژوهش القای ریشه مویین در گیاه درمنه خزری با استفاده از سویه‌های مختلف آگروباکتریوم رایزوژنز و بهینه‌سازی تولید آرتمیزینین در کشت ریشه‌های مویین گیاه درمنه خزری توسط باکتری استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشد.

مواد و روش‌ها

کشت بذر

بذر درمنه خزری از مرکز جهاد کشاورزی شهرستان نوشهر (استان مازندران) تهیه شد. ابتدا بذرها با آب مقطر استریل شستشو داده شد و به مدت یک دقیقه در اتانول ۷۰ درصد (V/V) غوطه‌ور شد. پس از شستشو با آب مقطر، بذرها به مدت ۲۰ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۵ درصد (V/V) تیمار شد و در نهایت با آب مقطر استریل سه بار و هر بار به مدت پنج دقیقه شستشو داده شد. بذرهای استریل شده در پلیت‌های حاوی محیط موراشی - اسکوگ (MS) نیمه جامد (دارای ۳ درصد ساکارز، ۷ گرم بر لیتر آگار و pH برابر با ۵/۷) کشت شد و به اتاق رشد با دمای ۲ ± ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۸ :۱٦ ساعت روشنایی به تاریکی منتقل شد.

کشت نژادهای آگروباکتریوم

به منظور القای ریشه مویین از نژادهای A7 و Ar318 آگروباکتریوم رایزوژنز (تهیه شده از مرکز تحقیقات زیست‌فناوری کرج) استفاده شد. یک تک کلون از هر دو نژاد باکتری در ۱۰ میلی‌لیتر محیط LB مایع با pH برابر با ۷ و حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک ریفامپین کشت داده شد و به مدت ٢٤ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد شیک شد. پس از ٢٤ ساعت

Archive of SID
www.SID.ir

و کشت‌هایی با OD_{600} بین ۰/۵ تا ۱ انتخاب و به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و پس از حذف روشناور، رسوب حاصل در ۱۰ میلی‌لیتر محیط تازه MS مایع (حاوی ۳ درصد ساکارز و pH برابر با ۵/۷) حل شد [۷].

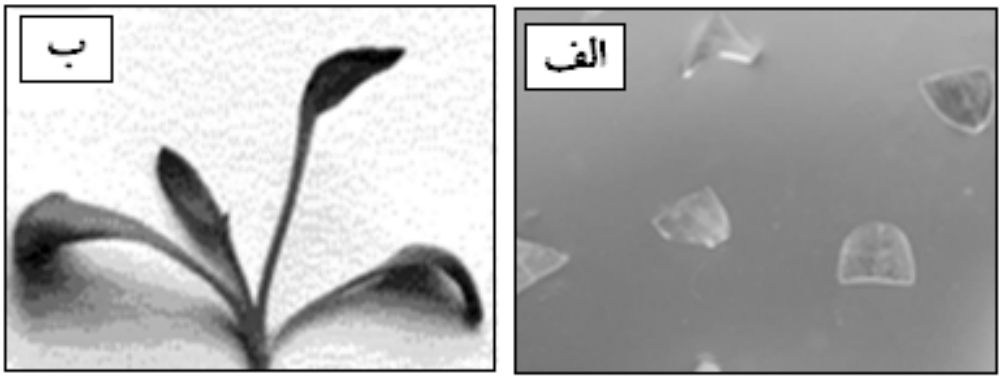
القای ریشه مویین

برای تهیه ریزنمونه، از گیاهچه‌های استریل دو هفته‌ای استفاده شد (شکل شماره ۱). ریزنمونه‌ها به دو روش زیر تهیه شد، در روش اول برگ‌های گیاه از دو انتها به قطعاتی با ابعاد ۳ میلی‌متر برش یافت (ریزنمونه ۱) و در روش دوم ساقه از محل گره قطع شد (ریزنمونه ۲). از هر گروه از ریزنمونه‌ها، ٦ عدد تهیه شد. ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون آگروباکتریوم (A7 و Ar318) با استفاده از سرنگ استریل به سطح ریزنمونه‌های ۱ و محل گره در ریزنمونه‌های ۲ تزریق شد (به ریزنمونه‌های شاهد آب مقطر استریل تزریق شد). پس از کشت هر دو گروه از ریزنمونه‌ها در پتری دیش‌های حاوی محیط MS نیمه (با شرایط ذکر شده در بالا)، ریزنمونه‌ها به اتاق رشدی با دمای $25 \pm 2^{\circ}C$ و نسبت ١٦:٨ روشنایی و تاریکی منتقل شدند. ٤٨ ساعت پس از آلودگی، ریزنمونه‌ها به محیط MS نیمه جامد حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم منتقل شدند، تا باکتری‌های باقی مانده در محیط حذف شود. واکشت‌های بعدی ریزنمونه‌ها هر دو هفته یک‌بار و با غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم صورت گرفت.

پس از ظهور ریشه‌ها، حدود ۲ تا ۳ سانتی‌متر از نوک آنها بریده شد و به محیط B مایع (دارای ۱۵ درصد ساکارز و pH برابر با ۵/۷) حاوی ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم منتقل شد. ارلن حاوی ریشه‌ها به مدت ٤٥ روز در دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد و سرعت ۸۰ دور در دقیقه با دوره ١٦:٨ روشنایی و تاریکی شیک شدند.

تأیید مولکولی ریشه‌های القا شده از طریق واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)

برای شناسایی ریشه‌های مویین، حضور ژن *rolB* از قطعه T-DNA پلاسمید آگروباکتریوم در ژنوم ریشه‌های القا شده با استفاده از تکنیک PCR بررسی شد. برای این منظور DNA ریشه‌های القا شده و نمونه‌های کنترل به روش کای و همکارانش (۱۹۹۷) استخراج شد [۸]. پلاسمید نژادهای آگروباکتریوم نیز به روش لیز قلیایی استخراج شد و عنوان کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفت. برای واکنش PCR از آغازگرهای اختصاصی ژن *rolB* استفاده شد [۹]. توالی این آغازگرها در جدول شماره ۱ آورده شده است. شرایط دمایی



شکل شماره ۱- تهیه ریزنمونه‌ها: (الف) ریزنمونه‌های ۱، (ب) ریزنمونه‌های ۲

www.SID.ir

جدول شماره ۱- توالی پرایمرهای اختصاصی ژن *rolB*

نام پرایمر	توالی
پرایمر بالادست	5-ATGGATCCCAAATTGCTATTCCCCACGA-3
پرایمر پایین دست	5-TTAGGCTTCTTTCATTCGGTTTACTGCAGC-3

برای PCR شامل ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه برای واسرشت‌سازی اولیه، سپس ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه برای واسرشت (۳۷ چرخه)، ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه برای اتصال (۳۷ چرخه)، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه جهت بسط (۳۷ چرخه) و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه برای بسط نهایی بود [۱۰]. برای مشاهده و بررسی محصولات تکثیر شده، از الکتروفورز در ژل ۱/۵ درصد با ولتاژ ۹۰ ولت استفاده شد و رنگ آمیزیژل با استفاده از اتیدیوم بروماید صورت گرفت.

افزودن محرک به کشت ریشه‌های مویین

قبل از افزودن محرک، ۳ تا ٤ سانتی‌متر از ریشه‌های رشد یافته به۵۰ میلی‌لیتر محیط B5 مایع منتقل شد و مطابق با شرایط ذکر شده در بالا نگهداری شد. کشت ریشه‌ها در این شرایط به مدت ۲۱ روز به طول انجامید.

باکتری استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 6538 (تهیه شده از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های ایران) در ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت TSB (Tryptic Soy Broth) کشت داده شد و در شیکر ۳۷ درجه قرار گرفت. پس از ۲٤ ساعت میزان جذب نور سوسپانسیون باکتری در طول موج ٦۰۰ نانومتر بین ۰/۵ تا ۱ تنظیم شد ($۱۰^{۹}$ سلول در هر میلی‌لیتر) و برای تحریک ریشه‌ها مورد استفاده قرار گرفت [۱۱].

۱٦ ارلن هر کدام حاوی ۳۰ میلی‌لیتر محیط مایع B5 تهیه شد (برای هر یک از نمونه‌های مورد آزمایش و کنترل آنها در ٤ بازه زمانی ۱۲، ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت، ۲ تکرار در نظر گرفته شد). ۲ سانتی‌متر از انتهای ریشه‌های ۲۱ روزه بریده شد و به ارلن‌ها منتقل شد و به هر ارلن حاوی ریشه، ٤ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری اضافه شد. ۱۲ ساعت پس از تیمار، دو ارلن از ریشه‌های تیمار شده و دو ارلن از نمونه‌های کنترل برداشته شد. پس از شستشوی ریشه‌ها با آب مقطر، ریشه‌ها به مدت ٤۸ ساعت در آون ٤۰ درجه خشک شد. ریشه‌های موجود در سایر ارلن‌ها نیز به ترتیب در بازه‌های ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار برداشت شدند.

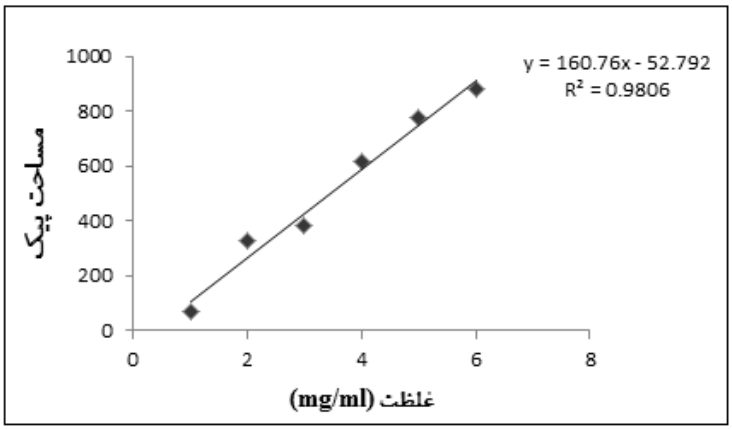
عصاره‌گیری از ریشه‌ها و آنالیز GC

ابتدا ۰/۰۲ گرم از ریشه‌های خشک شده (ریشه‌های تیمار شده و کنترل) در هاون استریل کاملاً پودر شد. پودر حاصل به لوله‌های آزمایش حاوی ۳ میلی‌لیتر هگزان منتقل شد. لوله‌های آزمایش به مدت ۲۰ ساعت بر روی شیکری با دمای محیط و سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه قرار گرفت، سپس لوله‌ها با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و محلول رویی به ظرف جدید منتقل شد. عصاره حاصل در دمای اتاق خشک شد. عصاره‌های خشک شده مجدداً در ۱ میلی‌لیتر حلال متانول حل شد.

به منظور سنجش آرتمیزینین، ابتدا محلول استاندارد آرتمیزینین (361593، ساخت شرکت سیگما) به دستگاه GC (مدل ٦۸۹۰، ستون HP-5 با قطر داخلی ستون، ضخامت لایه‌ای و طول ستون به ترتیب ۰/۲۵ میلی‌متر، ۰/۲۵ میکرومتر و ۳۰ میلی‌متر) با فاز ساکن غیرقطبی و آشکارگر FID) تزریق شد [۱۲]. منحنی کالیبراسیون برای نمونه‌های استاندارد رسم شد (شکل شماره ۲). پس از تزریق عصاره‌های گیاهی به دستگاه، غلظت آرتمیزینین در نمونه‌ها با استفاده از رابطه رگرسیون Y=160.7x-52.79 محاسبه شد.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل شماره ۲- منحنی استاندارد آرتمیزینین درآنالیز کروماتوگرافی (۳ تکرار)

نتایج

در ریزنمونه‌های ۱ آلوده شده با سوسپانسیون آگروباکتریوم (A7 و Ar318)، ریشه‌ای مشاهده نشد و ریزنمونه‌ها به تدریج قهوه‌ای و نکروزه شدند. ۵ الی ۱۰ روز پس از تزریق سوسپانسیون نژاد A7 به ریزنمونه‌های ۲، ریشه‌ها از محل زخم ظاهر شدند (در ۵ ریزنمونه از ٦ ریزنمونه آلوده شده ریشه مشاهده شد و فراوانی القای ریشه ۸۳/۳ درصد محاسبه شد)، در حالی که در ریزنمونه‌های آلوده شده با نژاد Ar318 هیچ ریشه‌های القا نشد (شکل شماره ۳). نتایج الکتروفورز محصولات PCR (برای تأیید تراریختی ریشه‌ها) در شکل شماره ٤ مشاهده می‌شود. وجود تک باند برای ژن *rolB* با طول ۷۸۰ bp در ریشه‌های مویین و پلاسمید باکتری (شاهد مثبت) مورد بررسی قرار گرفت.

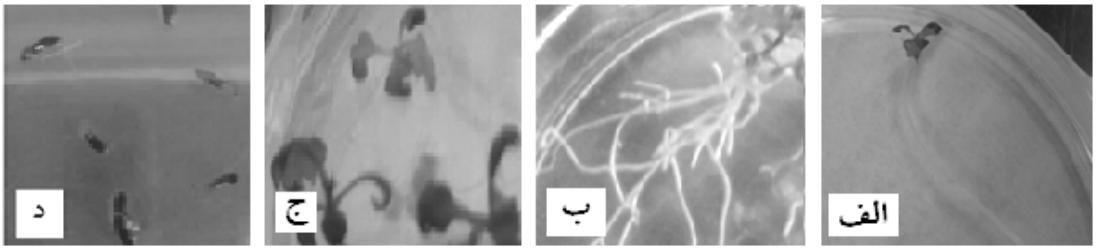
پس از تیمار ریشه‌ها با محرک، میزان رشد آنها محاسبه شد (شکل شماره ۵). نتایج نشان داد که ۱۲ ساعت پس از تیمار با باکتری، رشد ریشه‌ها ادامه یافته و در ٢٤ ساعت پس از تیمار به میزان حداکثر می‌رسد. در بازه‌های زمانی ٤٨ و ۷۲ ساعت کاهش رشد مشاهده شد. تجزیه واریانس داده‌ها (با روش ANOVA در سطح ۵ درصد) برای هر یک از بازه‌های زمانی (بین نمونه‌های تیمار شده و کنترل) اختلاف معنی‌داری را در میزان آرتمیزینین تولید شده نشان می‌دهد. پس از آنالیز آماری داده‌ها، حداکثر میزان تولید آرتمیزینین در بازه زمانی ٢٤ ساعت (۰/۱۳۳ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک و ٤ برابر بیشتر از نمونه کنترل) و کمترین میزان آن در بازه زمانی ۷۲ ساعت (۰/۰٤۳ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) محاسبه شد (شکل شماره ٦).

بحث

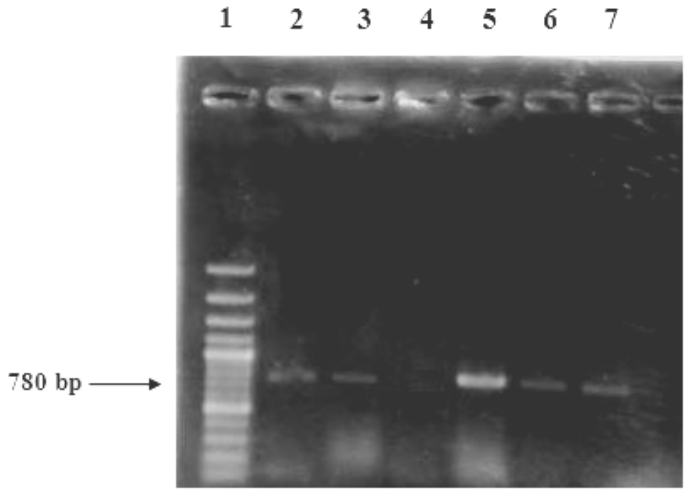
القای ریشه مویین

همان‌طور که قبلاً ذکر شد، تنها در ریزنمونه‌های ۲ آلوده شده با سویه **A7** ریشه مویین مشاهده شد. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که القای ریشه مویین به فاکتورهایی مانند منبع تهیه ریزنمونه‌ها و نژاد آگروباکتریوم وابسته است. در این مطالعه از برگ‌های گیاه و ناحیه گره در ساقه برای تهیه ریزنمونه استفاده شد. نتایج به دست آمده نشان داد که نواحی گره‌ای در مقایسه با برگ‌ها برای تهیه ریزنمونه و القای ریشه مناسب‌تر بوده که این امر به دلیل توانای رشد و تقسیم سلول‌های این ناحیه می‌باشد. مطالعات قبلی نشان می‌دهد که توانایی رشد و تقسیم سلولی یکی از فاکتورهایی است که به انتقال ژن به سلول‌هایی میزبان و تراریختی آنها توسط باکتری آگروباکتریوم کمک می‌کند. به دلیل عبور بافت‌های مریستمی از ناحیه دمبرگ و گره، رشد و تقسیم سلولی در این ناحیه سریع‌تر می‌باشد. از طرف دیگر هورمون اکسین با تأثیر بر سلول‌ها در ناحیه دمبرگ و گره، می‌تواند رشد و تقسیم سلولی را در این نواحی تحریک می‌نماید [۱۳]. با انتقال ناحیه **T-DNA** به ژنوم میزبان، سنتز این هورمون در سلول‌های میزبان افزایش می‌یابد.

Archive of SID
www.SID.ir

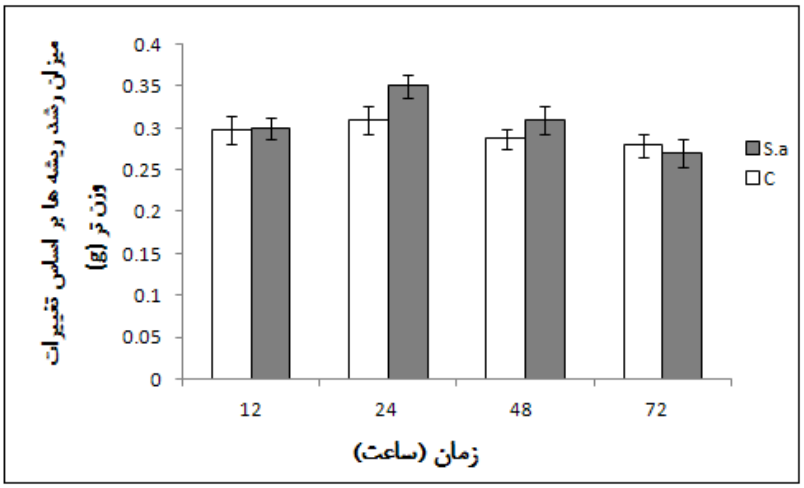


شکل شماره ۳- الف) نمونه کنترل، ب) ریشه القا شده در ریزنمونه ۲ آلوده شده با سویه A7، ج) عدم تولید ریشه در ریزنمونه ۲ آلوده شده با سویه Ar318، د) قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های ۱ آلوده شده با سویه A7



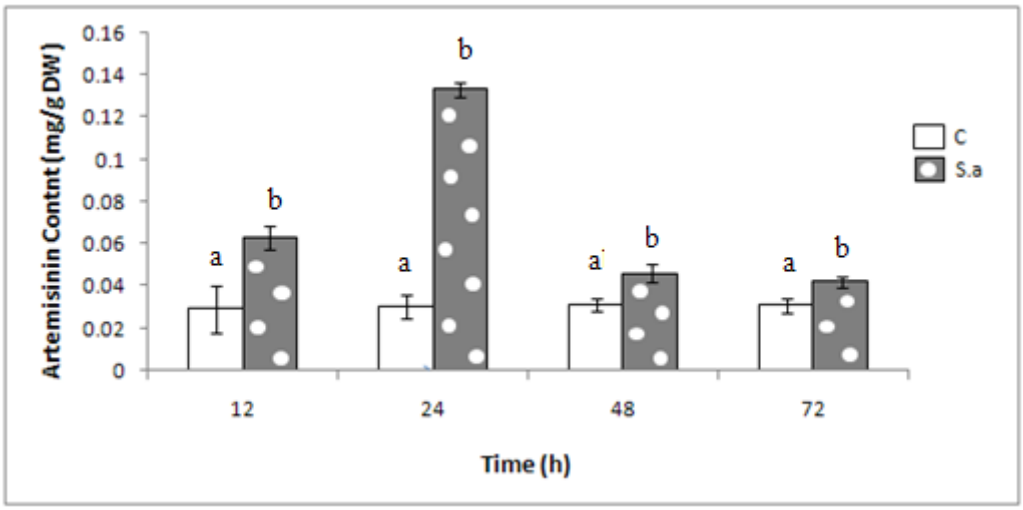
شکل شماره ٤- نتایج الکتروفورز محصولات PCR

(۱) مارکر ۱۰۰bp، (۲ و ۳) کنترل مثبت (به ترتیب پلاسمید باکتری A7 و Ar318)، (٤) کنترل منفی (ریشه‌های شاهد)، (٥) ریشه‌های مویین القا شده توسط توسط A7 در ریزنمونه‌های ۲



شکل شماره ٥- مقایسه میزان رشد ریشه‌های تیمار شده با محرک (S.a) و ریشه‌های کنترل (C)

www.SID.ir



شکل شماره ٦- تأثیر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بر تولید آرتمیزینین (۲ تکرار)

تجزیه واریانس داده‌ها برای هر بازه زمانی اختلاف معنی‌داری را در سطح ۵ درصد بین ریشه‌های تیمار شده با محرک (S.a) و نمونه‌های کنترل (C) نشان می‌دهد

پژوهش‌های قبلی نیز تأیید می‌کنند که انتخاب بافت مناسب برای تهیه ریزنمونه اهمیت دارد. برای مثال پس از آلوده کردن برگ‌ها و ساقه گیاه درمنه خزری با سویه LBA9402، فراوانی تولید ریشه در این ریزنمونه‌ها به ترتیب ۱۰۰ و ۲۰ درصد گزارش شد. همچنین نتایج نشان داد که سویه NRRL B193 قادر به القای ریشه در ساقه گیاه نبوده، درحالی که می‌تواند ٤٠ درصد از ریزنمونه‌های برگی را آلوده کند [١٤].

نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که پس از برش برگ‌ها برای تهیه ریزنمونه، این گروه از ریزنمونه‌ها به تدریج قهوه‌ای و نکروزه شدند. قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها احتمالاً به دلیل آسیب به سلول‌ها در ناحیه برش و آزاد شدن بیش از حد ترکیبات فنولی از محل زخم صورت می‌گیرد

(لازم به ذکر است که ترکیبات فنولی اغلب در واکوئل سلول‌ها وجود داشته و در صورت زخمی شدن سلول‌ها آزاد می‌شود. اکسید شدن این ترکیبات توسط آنزیم پلی فنول اکسیداز (آزاد شده از پلاست‌های گیاهی) باعث قهوه‌ای شدن بافت‌ها می‌شود.

در این پژوهش تنها سویه A7 قادر به القای ریشه در گروهی از ریزنمونه‌ها می‌باشد که نشان می‌دهد نژاد آگروباکتریوم نیز یکی از فاکتورهای مهم در القای ریشه است. طول ناحیه T-DNA پلاسمید القا کننده ریشه و توالی ژن‌های آن در سویه‌های مختلف آگروباکتریوم متفاوت می‌باشد. مطالعات نشان می‌دهد که دو فاکتور اندازه و توالی ژنی این ناحیه از پلاسمید در الحاق و بیان ژن‌های T-DNA در ژنوم میزبان اهمیت دارد و در برخی موارد ناحیه T-DNA توانایی الحاق در ژنوم میزبان را ندارد.

در مطالعات متعددی تأثیر سویه‌های مختلف آگروباکتریوم بر القای ریشه در مطالعات مختلفی مورد بررسی قرار گرفته است. برای مثال تأثیر سویه‌های LBA9402، 9365، 9340، 15834 و A_4 برای تراریختی درمنه خزری بررسی شده و به ترتیب درصد تراریختی ۱۰۰، ۹۵، ۹۵، ۸۰ و ۷۵ درصد گزارش شد [١٥]. در مطالعه دیگری پس از آلوده کردن ریزنمونه‌های گیاه درمنه خزری با سویه‌های مختلف آگروباکتریوم مانند 1855، A4، 2626، LBA9402 و 8196 مشخص شد که تنها سویه LBA9402 می‌تواند در ۲۰ درصد از ریزنمونه‌ها، ریشه مویین را القا نماید [١٦].

تأثیر محرک‌ها بر میزان رشد و تولید آرتمیزینین

در این پژوهش ادامه یافتن رشد ریشه‌ها تا ٢٤ ساعت پس از تیمار (شکل شماره ۵)، احتمالاً نشان‌دهنده فعال شدن

Archive of SID
www.SID.ir

پاسخ‌های مقاومتی در سلول‌های ریشه و بقای آنها می‌باشد. قبلاً اشاره شد یکی از راه‌های مقاومت گیاهان در برابر حمله پاتوژن‌ها، تولید متابولیت‌های ثانویه می‌باشد. همان‌طور که در ادامه بیان خواهد شد، پس از تیمار ریشه‌ها با این باکتری میزان تولید آرتمیزینین به عنوان یک متابولیت ثانویه افزایش می‌یابد. این نتیجه با نتایج مطالعات لیو (Liu) و همکارانش (۱۹۹۹) مطابقت دارد. آنها نیز افزایش رشد ریشه‌ها هم‌زمان با تولید متابولیت در سلول‌ها، پس از تیمار ریشه‌های مویین درمنه خزری با قارچ *Penicillium chysogenum* را گزارش دادند [٤]. کاهش میزان رشد پس از ٢٤ ساعت می‌تواند به دلیل جذب عناصر ضروری محیط مانند کربن توسط باکتری، آسیب دیواره و یا لیز سلول‌ها به دلیل تهاجم باکتری‌ها صورت گیرد که منجر به مرگ سلول‌ها و توقف رشد ریشه‌ها می‌شود.

نتایج این پژوهش نشان داد که ٢٤ ساعت پس از تیمار ریشه‌ها با محرک، تولید آرتمیزینین افزایش یافت (شکل شماره ٦). مکانیزم اثر استافیلوکوکوس اورئوس مانند سایر محرک‌ها باکتریایی مشخص نمی‌باشد، با این حال مطالعات نشان می‌دهد که این باکتری با روش‌های مختلفی مانند مصرف مواد مغذی محیط و ایجاد یک فقر غذایی به عنوان یک استرس محیطی، کاهش pH و افزایش ورود کلسیم از فضای بین سلولی به درون سیتوپلاسم و تأثیر آن بر بیان ژن‌های مؤثر در بیوسنتز متابولیت‌ها، پاسخ‌های مقاومتی در گیاه را فعال می‌کند. فعال شدن این پاسخ‌ها در گیاه، منجر به بیان ژن‌های دخیل در بیوسنتز آنزیم‌های کلیدی در مسیر بیوسنتز یک متابولیت می‌شود. برای مثال افزایش تولید اسکوپولامین پس از تیمار ریشه‌ها با باکتری استافیلوکوکوس اورئوس گزارش شده است. این باکتری با مهار آنزیم هیوسیامین ٦- بتا هیدروکسیلاز (Hyoscyamine 6-B-ydroxylase) (آنزیم رقابتی در مسیر تولید اسکوپولامین) تولید این متابولیت را افزایش می‌دهد [١٧].

کاهش تولید متابولیت در بازه زمانی ٤٨ تا ٧٢ ساعت، احتمالاً به علت کاهش کربن مورد نیاز در مسیر بیوسنتز آرتمیزینین می‌باشد. جذب عناصر ضروری مانند کربن توسط باکتری، میزان کربن مورد نیاز در مسیر بیوسنتز آرتمیزینین را کاهش می‌دهد. از طرف دیگر فعال شدن سیستم فیدبک منفی در پاسخ به تجمع آرتمیزینین نیز می‌تواند از تولید بیشتر آرتمیزینین جلوگیری نماید. مطالعات لیو و همکارانش نشان می‌دهد که ٣ روز پس از تیمار ریشه‌های مویین گیاه درمنه خزری با سوسپانسیون قارچ *Penicillium chysogenum* تولید آرتمیزینین کاهش می‌یابد. تجمع آرتمیزینین در سلول‌های ریشه از تولید بیشتر این متابولیت جلوگیری می‌نماید [٤].

نتیجه‌گیری

نتایج به دست آمده در این پژوهش نشان داد که باکتری استافیلوکوکوس اورئوس می‌تواند تولید آرتمیزینین را در کشت ریشه‌های مویین درمنه خزری بهبود بخشد، در نتیجه پیشنهاد می‌شود به منظور درک بهتر مکانیزم عمل این محرک، تأثیر این محرک بر بیان آنزیم‌های کلیدی در مسیر بیوسنتز آرتمیزینین مانند آنزیم‌های آمورفا ٤ و ١١ دی ان سینتاز (Amorpha-4, 11- dine synthase) و بتا هیدروکسی – بتا متیل گلوتاریل ردوکتاز (B-hydroxy-B-methyl-glutaryl-coA reductase) نیز در ریشه‌های مویین درمنه خزری مورد بررسی قرار گیرد.

منابع

1. Bhakuni RS, Jain DC, Sharma RP and Kumar S. Secondary metabolites of *Artemisia annua* and their biological activity. *Current Science* 2001; 80: 35 - 48.

2. Efferth T, Romero MR, Wolf DG, Stamminger T, Marin JJ and Marschall M. The antiviral activities of artemisinin and artesunate. Clinical Infectious *Diseases* 2008; 47: 804 - 11.

Archive of SID
www.SID.ir

3. Lai H, Sasaki T, Singh NP and Messay A. Effects of artemisinin-tagged holotransferrin on cancer cells. *Life Sciences* 2005; 76: 1267 - 79.

4. Liu C, Wang Y, Xu X, ouyang F, Ye H and Li G. Improvement of artemisinin accumulation in hairy roots cultures of *Artemisia annua* L. by fungal elicitors. *Bioprocess Engineering* 1999; 20: 161 - 4.

5. Wang JW, Zhong-Hao X and Xiang T. Elicitation on atremisinin biosynthesis in *Artemisia annua* hairy roots by the oligosaccharide extract from the endophytic Colletotrichum sp B501. *Acta Botanica Sinica* 2002; 44: 1233 - 8.

6. Zheng LP. Zhang B, Zou T, Chen ZH and Wang JW. Nitric oxide intracts with reactive oxygen speices to regulate oligosaccharide-induced atremisinin biosynthesis in *Atremisia annua* hairy roots. *Journal of Medicinal Plant Research* 2010; 4: 758 - 65.

7. Inoue Y, Yamaoka K, Kimura K, Sawai K and Arai T. Effects of Low pH on the Induction of root hair formation in young lettuce (Lacfuca sativa L. cv. Grand Rapids) seedlings. *Journal Plant Research* 2000; 113: 39 - 44.

8. Cai D, Kleine M, Kifle S, Horloff HJ, Sandal NN, Marcker KA, Lankhorst RMK, Salentijn EMJ, Lange W, Stiekema WJ, Wyss V, Grundler FMW and Jung C. Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugarbeet. *Science* 1997; 275: 832 - 4.

9. Zanousi MB, Soleimani T, Keyhanfar M, Shirali S and Raeesi M. Thin layer chromatography (TLC) technique in the investigation of artemisinin production in *Artemisia annua* L. medicinal plant hairy roots. *Journal of Medicinal Plants Research* 2012; 6: 1842 - 5.

10. Pal A, Swain S, Makherhee A.K and Chand P.k. *Agrobacterium* pRi T_L-DNA *rolB* and T_R-DNA opine genes transferred to the spiny amaranth (*Amaranthus spinosus* L.) nutraceutical crop. *Food Technology and Biotechnology* 2012; 5: 112 - 40.

11. Jung HY, Kang SM, Kang YM, Kang MJ, Yun DJ, Bahk JD, Yang JK and Choi MS. Enhnced production of scopolamine by bacterial elicitors in adventitious hairy root culture of *Scopolia parviflora*. *Enzyme and Microbial Technol.* 2003; 33: 987 - 90.

12. Liu SH, Tian N, Liu ZH, Huang J, Li J, Ferreira J. Affordable and sensitive determination of artemisinin in *Artemisia annua* L. by gas chromatography with electron-capture detection. Journal of Chromatography A, 2008; 1190: 302 – 6.

13. Rajasekaran K, Hudspeth R.L. Cary J.W, Anderson D.M and Cleveland T.F. High-frequency transformation of catton (*Gossypium hirsutum* L.) by particle bombardment of embrogenic cel suspension cultures. *Plant Cell Report* 2000; 19: 539 - 45.

14. Ahlawat S, Saxena P, Ram M, Alam P, Nafis T, Mohd A and Abdin MZ. Influence of *Agrobacterium rhizogenes* on induction of hairy roots for enhanced production of artemisinin in *Artemisia annua* L. plants. *African Journal of Biotechnol*. 2012; 11: 8684 - 91.

15. Giri A, Ravindra ST, Dhingra V and Narasu L. Influence of different strains of *Agrobacterium rhizogenes* on induction of hairy roots and artemisinin production in *Artemisia annua*. *Current Science* 2001; 81: 378 - 82.

16. Paniego. Artemisinin production by *Artemisia annua* L. transform organ cultures. *Enzyme and Microbial Technol.* 1996; 18: 520 - 30.

17. Jung HY, Kang SM, Kang YM, Kang MJ, Yun DJ, Bahk JD, Yang JK and Choi MS. Enhnced production of scopolamine by bacterial elicitors in adventitious hairy root culture of *Scopolia parviflora*. *Enzyme and Microbial Technol*. 2003; 33: 987 - 90.

Archive of SID

www.SID.ir