بهینه سازی شرایط باززایی گیاه دارویی *Artemisia annua*

علی شرفی[۱]، هاله هاشمی سهی[۲*] و عصمت جورابچی[۲]

[۱] ساری، دانشگاه مازندران، دانشکده کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی

[۲] تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک وزیست فن آوری، پژوهشکده بیوتکنولوژی گیاهی

تاریخ دریافت: ۸٦/٦/۱۳ تاریخ پذیرش: ۸٦/۱۲/۲۰

چکیده

Artemisia annua گیاهی است یک ساله و معطر، دارای ماده آرتمیزنین که ضد مالاریا، ضد تب و کشنده انتخابی سلولهای سرطانی سینه انسان است. این گیاه بطور وسیعی در نواحی معتدل وجود دارد. بدلیل پایین بودن مقدار ماده آرتمیزنین در این گیاه و نیز عدم موفقیت در ساخت شیمیایی این ماده و تأثیر ناچیز روشهای اصلاحی رایج گیاهی، امروزه تنظیم مولکولی بیوسنتز این ماده از طریق انتقال ژنهای آنزیمهای کلیدی در ساخت آرتمیزنین و یا جلوگیری از بیان ژنهای آنزیمهای مسیر رقابتی آن مورد توجه واقع شده است. معمولاً پیش نیاز تراریختی، کشت بافت و باززایی گیاه از جداکشت می باشد. در این آزمایش با استفاده از تیمارهای هورمونی مختلف شامل هورمون 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) 2,4,D)، هورمون BAP(6-Benzylaminopurin)،هورمون NAA(naphthaleneacetic acid) و Kinetin درصد بالای باززایی در تیمار ۲ میلی گرم در لیترBAP و ۰/۵ میلی گرم در لیتر NAA همچنین ۲ میلی گرم در لیترBAP و ۱ میلی گرم در لیتر IAA(Indole-3-acetic acid)محاسبه شد. به این ترتیب که پس از چند بار واکشت جدا کشتها در محیطهای حاوی هورمون و القای کالوس، جهت القای ساقه جدا کشتها به محیط فاقد هورمون منتقل شد. القای ریشه نیز در تیمار یک هفته ای NAA ۰/۰۵ mg/l در محیط پایه MS(Mourashige & Skoog) انجام گرفت.

واژه های کلیدی: *Artemisia annua* ، باززایی، آرتمیزنین، تنظیم مولکولی

*نویسنده مسئول، تلفن تماس:٤٤٥٨٠٣٦٧-۰۲۱ ، پست الکترونیکی: halehsohi@yahoo.com

مقدمه

Artemisia annua که به نامهای *sweet annie* و *annual wormwood* نامیده می شود (در ایران بنام درمنه خزری معروف است) گیاهی است یک ساله و معطر که بومی آسیا و شرق اروپا می باشد و بطور وسیعی در نواحی معتدل وجود دارد (۱۰). این گیاه در پزشکی برای سالهای متمادی بعنوان یک ماده ضد تب و ضد مالاریا در چین بکار می‌رفت. این گیاه منبع آرتمیزنین(Artemisinin) است که یک لاکتون سزکویی ترپن اندوپراکسید (Endoperoxide sesquiterpene lacton) می‌باشد. آرتمیزنین یک متابولیت ثانویه(Secondary metabolite) بوده که فعالیت مؤثری بر علیه نژادهای پلاسمودیوم، مقاوم به داروهای چند گانه فعلی، دارد (۱۲). بدلیل افزایش مقاومت پلاسمودیوم به داروهای تجاری ضد مالاریا چون کلروکوئین(Choloroquine)، سولفادوکسین(Sulphadoxin) و پریمتامین (Primtamin)، آرتمیزنین مورد توجه خاص قرار گرفته است. از طرفی بدلیل منابع محدود و سختی ساخت شیمیایی این ماده تلاشهای زیادی برای افزایش تولید آرتمیزنین از *A. annua* توسط روشهای فن آوری زیستی صورت گرفته است (٦). عملکرد نسبی کم (۱/۰۸ – ۰/۰۱ درصد) این ماده در گیاه محدودیت عمده ای در تولید تجاری آن است. تغییر در شرایط کشت و محیط رشد در کشتهای سلولی و تغییر سطوح هورمونی در کشت

Archive of SID
www.SID.ir

بافت بمنظور بالا بردن آرتمیزنین ناموفق بوده است (۱و ۱۱).

جدول(۱) نتایج تحقیقات محققین در مورد تأثیر هورمونهای مختلف در محیط کشت پایه MS در گیاه *A.annua*:

شماره منبع	ترکیب هورمونی محیط پایهMS (میلی گرم در لیتر)	نتیجه	جدا کشت	منبع گیاهی
۱٦	BAP۰/۲, NAA ۰/۰۵	کالوس، ساقه	ساقه	خود رو
	kinetin۰/۱ , 2,4-D ۱	کالوس	کالوس	-
۲	BA۰/۱-۰/۰۲۵ , 2,4-D ۰/۵	کالوس	برگ	-
۱۲	NAA۰/۰۵ , BAP ۰/۲	ساقه	برگ و ساقه	ویتنام
۳	NAA۰/۵ , 2,4-D ۱	کالوس	هیپوکوتیل	-
۱۷	BA۲, NAA ۱, zeatin۲	کالوس-ساقه	هیپوکوتیل	خود رو
۱٤	IAA۰/۲, Kinetin ۰/۵	ساقه	ساقه	-
۷	GA3۰/۳۵ BAP۵-۰/۵, 2,4-D,۰/٦۷	کالوس-ساقه	برگ	دودمانهای گیاهی P1,P2
۹	GA۰/۱, BAP۰٫۳ NAA ۱	ساقه	برگ-ساقه	-
۱۸	BAP۰/۵ , NAA ۰/۰۵	کالوس-ساقه-	برگ- ساقه ریشه	ویرجینیا- یوگسلاوی
٤	BAP ۲ , NAA۰/۰۵	ساقه	برگ	دودمانهایگیاهی025,001
۵	BAP۰/ ۵ , NAA ۱	کالوس- ساقه	برگ	دودمانهای گیاهی A201,A202

از جمله اثرات مشتقات آرتمیزنین: فعالیت آنها بر علیه سلولهای سرطانی سینه انسان می باشد که دارای اثر کشندگی انتخابی است و همچنین خاصیت ضد توموری دارد. تحقیقات جدید در سال ۲۰۰۵ نشان داد که آرتمیزنین به تنهایی قادر به از بین بردن انتخابی سلولهای سرطانی است. در حالی که اثر آن بر سلولهای نرمال مضر نمی باشد (۱۳). خاصیت آللوپاتیک(Allelopathy) و دور کنندگی حشرات نیز از اثرات دیگر این گیاه است (٤ و ۸).

جدول ۱ نشان دهنده تحقیقات انجام گرفته در زمینه کشت بافت *Artemisia annua* می باشد. طبق گزارشات موجود در باززایی این گیاه عواملی چون ژنوتیپ منبع گیاهی مورد استفاده، نوع جداکشت و سن آن مؤثر است (۱۳ و ۱۸). تحقیق حاضر نیز بمنظور یافتن بهترین محیط کشت برای باززایی گونه ایرانی این گیاه انجام شد تا پس از ایزوله نمودن ژنهای موثر در افزایش ماده دارویی آرتمیزنین، در مراحل انتقال این ژنها به کار رود و با افزایش این ماده در این گیاه، استخراج تجاری و صنعتی این ماده دارویی، با توجه به اثبات خواص ضد سرطانی آن، (۱۳) محقق شود.

مواد و روشها

مواد گیاهی و شرایط کشت: بذرهای گیاه *A. annua* تهیه شده از شهرستان لاهیجان، را با استفاده از الکل ۷۰ درصد بمدت دو دقیقه در حالت غوطه‌ور ضدعفونی و پس از آن دو بار با آب مقطر استریل شستشو داده شد. سپس در هیپوکلریت سدیم ۵ درصد بمدت ۲۰ دقیقه غوطه ور گردید. سپس بذرها با آب مقطر استریل سه بار و حدود نیم ساعت شستشو داده شد. پس از آن در لیوانهای حاوی

Archive of SID

www.SID.ir

محیط MS (Murashige& Skoog) جامد کشت شد (۱۵). pH محیط MS با سود یک نرمال، در ۵/۸ تنظیم و به محیط کشت ۷ گرم در لیتر آگار و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز افزوده شد. جوانه زنی بذرها طی ۳ تا ٤ روز آغاز و گیاهان در شرایط نور فلورسنت با شدت نور ۳۰۰۰ لوکس و ١٦ ساعت روشنایی در روز و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد رشد داده شد.

از برگ بعنوان جداکشت استفاده شد، به این ترتیب که از گیاهان رشد یافته یک ماهه استریل برگها از ناحیه دمبرگ جدا و در محیطهای MS حاوی ترکیبات مختلف هورمونی قرار گرفت. در این محیطها از هورمون های Benzylaminopurin), NAA(naphthalene acetic acid) BAP(6- ، Kinetin ، 2,4,D(2,4- Dichlorophenoxyacetic acid) و IAA(Indole-3-acetic acid) استفاده شده بود. تیمارهای هورمونی این محیطها بر اساس میلی گرم در لیتر به شرح زیر است:

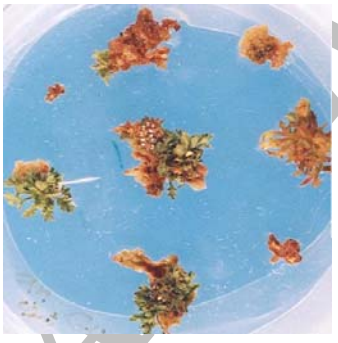
BAP (0, 1, 2) NAA (0.05, 0.1, 0.5)
BAP (1, 2, 3) IAA (0, 0.5, 1)
BAP (1, 2) 2, 4-D (0.5, 1)
Kinetin (0.1, 0.5, 1) 2, 4-D (1, 2)

علاوه بر این یک محیط MS بدون هورمون بعنوان شاهد در نظر گرفته شد. همچنین یک محیط MS حاوی مقادیر بالای ویتامین از جمله ۱ میلی گرم در لیتر نیکوتینیک اسید و پیریدوکسین و ۰/۵ میلی گرم در لیتر تیامین استفاده شد.

پس از کشت جدا کشتهای برگی در محیطهای ذکر شده، هردو هفته یک بار در محیطهای جدید واکشت شد. واکشت نمودن قطعات جداکشت برگی در مورد این گیاه بدلیل جلوگیری از قهوه ای شدن و از بین رفتن جداکشتها ضروری است. پس از چند بار واکشت در محیطهای دارای هورمون جداکشتهای واجد کالوس وارد محیط MS بدون هورمون کرده و پس از طی سه هفته در بعضی تیمارها باززایی و القای نوساقه مشاهده شد. ساقه های باززایی شده در محیطهای واجد هورمون جهت القای ریشه به محیط MS حاوی ۰/۵و ۰/۱ میلی گرم در لیتر NAA منتقل شد. کلیه تیمارهای هورمونی در سه تکرار انجام شد و تجزیه واریانس و مقایسه میانگین با آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال ۱ درصد با نرم افزار MSTAT-C صورت گرفت.

نتایج

بذرهای *Artemisia annua* کشت شده در لیوانهای حاوی محیط MS جامد بعد از ۳ تا ٤ روز شروع به جوانه زنی کردند. گیاهچه ها پس از رشد یک ماهه دارای برگهای قابل توجهی شدند که برای استفاده بعنوان جداکشت مناسب، استفاده شد. اگر قطعات جداکشت منتقل شده به محیطهای واجد هورمون هر دو هفته یک بار به محیط کشت جدید واکشت نشوند امکان قهوه ای شدن و از بین رفتن نمونه ها وجود دارد. پس از چند بار واکشت در محیطهای واجد هورمون، قطعات جداکشت به کالوس رفته و با انتقال به محیط MS بدون هورمون باززایی از جدا کشتهای برخی از تیمارها مشاهده شد(شکل ۱).



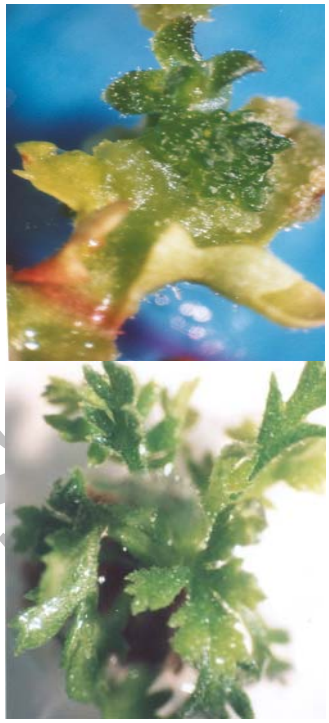
شکل ۱- القای ساقه از جداکشتهای موجود در پتریدیش حاوی محیط کشت ۲ میلی گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی گرم در لیتر IAA

باززایی صورت گرفته در محیط حاوی۲ میلی گرم در لیترBAP و ۰/۵ میلی گرم در لیتر NAA شامل باززایی از کالوس (شکل۲) و نیز باززایی مستقیم از قطعات جداکشت برگی (شکل۳) باشد. در نمونه شاهد یعنی MS بدون هورمون در غالب نمونه ها القای ریشه و گاهی نیز تشکیل کالوس انجام می شود. لازم بذکر است که اغلب

Archive of SID

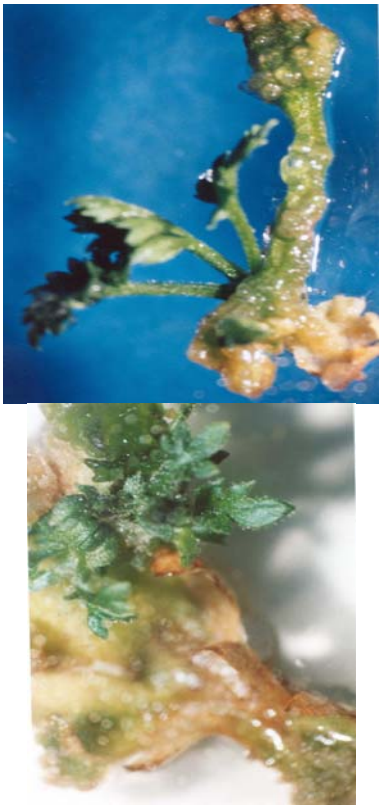
www.SID.ir

جداکشتهای محیط MS حاوی مقادیر بالای ویتامین، کالوس داده و در برخی از آنها نیز ریشه القا شد.



شکل ۲- تصاویرالقای ساقه از روی کالوس در تیمار هورمونی حاوی۲ میلی گرم در لیترBAP و ۰/۵ میلی گرم در لیتر NAA

همانطور که از نتایج برمی آید، در تیمار هورمونی حاوی۲ میلی گرم در لیترBAP و ۰/۵ میلی گرم در لیتر NAA بالاترین میزان باززایی مشاهده شد. دیگر محیطی که باززایی قابل توجهی از خود نشان داد محیط حاوی۲ میلی گرم در لیترBAP و ۱ میلی گرم در لیتر IAA بود. در این تیمار نیز باززایی از روی کالوس بعد از انتقال کالوس به محیط فاقد هورمون مشاهده (شکل٤)، ولی هیچ گونه باززایی مستقیم و بدون القای اولیه کالوس مشاهده نشد. تیمارهای بکار رفته با هورمونهای Kinetin و 2,4-D تنها منجر به تولید کالوس و نیز تشکیل ریشه از روی کالوس شد(شکل۵) و هیچ ساقه ای بدست نیامد. همچنین تیمارهای حاوی هورمونهای BAP و 2,4-D نیز تنها منجر به تولید کالوس و نیز القای ریشه از روی کالوس شدند و هیچ ساقه ای در آنها القا نشد.



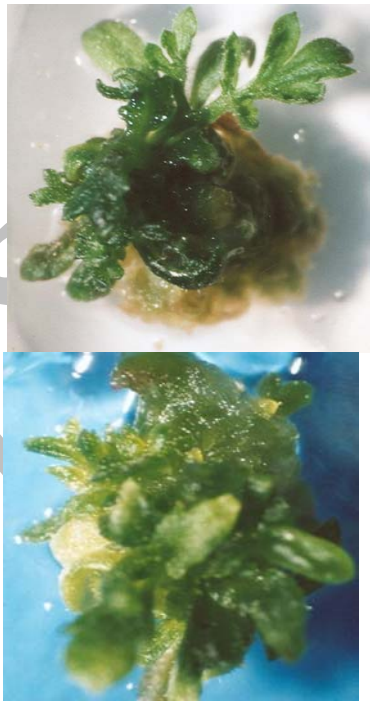
شکل ۳- تصاویر القای مستقیم ساقه از روی جدا کشت برگی در محیط حاوی۲ میلی گرم در لیترBAP و ۰/۵ میلی گرم در لیتر NAA

همانطور که بیان شد در کلیه تیمارهای حاصل ازBAP و 2,4-D و نیزKinetin و 2,4-D هیچ گونه باززایی ساقه وجود نداشت. در تعدادی از تیمار های حاصل از ترکیبات مختلف جفت هورمونهای NAA،BAP و IAA،BAP نیز هیچ گونه باززایی ساقه وجود نداشت. با اینحال درکلیه تیمارهای بکار برده شده القای کالوس صورت گرفت. همچنین در برخی از تیمارها القای ریشه نابجا از روی کالوس صورت گرفت و در مجموع از ۳۰ تیمار به کار برده شده ۸ تیمار القای ساقه مشاهده شد (جدول۲). با استفاده ازتجزیه واریانس داده های حاصل از تیمارهای دارای القای ساقه و در سه تکرار، مشخص شد که اثر تیمارها در سطح ۱ درصد معنی دار است. مقایسه میانگین با استفاده از آزمون دانکن و نرم افزار MSTAT-C صورت گرفت. CV آزمایش ٦/۳۱ درصد است (جدول۳).

Archive of SID

www.SID.ir

همانطور که در جدول ۲ مشاهده می شود بین تیمار حاوی ۲ میلی گرم در لیترBAP و ۰/۵ میلی گرم در لیتر NAA و تیمار حاوی ۲ میلی گرم در لیترBAP و ۱ میلی گرم در لیتر IAAهیچ گونه تفاوت معنی داری در سطح احتمال ۱ درصد و با آزمون دانکن مشاهده نمی‌شود. این دو تیمار بالاترین میزان باززایی را دارند.



شکل ٤- تصاویر القای ساقه از روی کالوس حاصل از جداکشت برگی حاوی ۲ میلی گرم در لیترBAP و ۱ میلی گرم در لیتر IAA

شکل۵- القای ریشه نابجا از روی کالوس در محیط حاوی Kinetin و 2,4-D

جدول(۲) نتایج حاصل از تیمارهای هورمونی مختلف (کلیه مقدار هورمون بر حسب میلی گرم در لیتر می باشد):

درصد تشکیل ریشه روی کالوس	درصد القای ساقه	درصد کالوس	NAA	BAP
۰	۰	۸٦/٦	۰/۰۵	۱
۱۰	۰	۹۰	۰/۱	۱
۳٦/٦	۰	۱۰۰	۰/۵	۱
۰	۰	۹۳	۰/۰۵	۲
۱٦/٦	۲۳/۳	۱۰۰	۰/۱	۲
۰	۸٦/٦	۸٦/٦	۰/۵	۲
۸۳/۳	۰	۷٦/٦	۰/۰۵	۳
۹۰	۰	۸۳/۳	۰/۱	۳
۹۰	۰	۱۰۰	۰/۵	۳
			IAA	BAP
۰	۰	٤۳/۳	۰	۱
٦	۱۰	۷۰	۰/۵	۱
۱۲	۱۰	۹٦/٦	۱	۱
۰	۰	۵۰	۰	۲
۰	٤۳/۳	۱۰۰	۰/۵	۲
۰	۸۰	۱۰۰	۱	۲
۰	۰	۳٦/٦	۰	۳
۰	۲٦/٦	٦٦/٦	۰/۵	۳
۰	۳۰	۹۰	۱	۳
			2,4-D	BAP
۱۰۰	۰	۱۰۰	۰/۵	۱
۱۰۰	۰	۱۰۰	۱	۱
۳۳/۳	۰	۱۰۰	۰/۵	۲
۱۰۰	۰	۱۰۰	۱	۲
			2,4-D	Kinetin
۱۰۰	۰	٤۰	۱	۰/۱
۱۰۰	۰	۱۰۰	۲	۰/۱
۱۰۰	۰	۳۳/۳	۱	۰/۵
۱۰۰	۰	۱۰۰	۲	۰/۵
۱۰۰	۰	۱۰۰	۱	۱
۱۰۰	۰	۱۰۰	۲	۱
۲۳/۳	۰	۷۰	MS با ویتامین بالا	
۸٦/٦	۰	۱۰	MS شاهد	

بمنظور القای ریشه در ساقه های تولید شده از محیط MS حاوی۰/۰۵ و ۰/۱ میلی گرم در لیترNAA استفاده شد که ریشه دهی در MS حاوی ۰/۰۵ میلی گرم در لیتر NAA بهترین نتیجه را داد. برای القای ساقه کافیست بمدت یک هفته ساقه ها را در محیط هورمون دار قرار داده تا ریشه

Archive of SID
www.SID.ir

القا شود ، سپس ساقه های ریشه دار شده وارد محیط MS بدون هورمون شود. محیط MS حاوی۰/۱ میلی گرم در لیتر NAA بدلیل امکان تولید کالوس مناسب نمی باشد. لذا بمنظور القای ریشه در این گیاه پیشنهاد می شود از ساقه های القایی تیمار هورمونی ۰/۰۵ میلی گرم در لیترNAA بمدت یک هفته استفاده تا باززایی گیاه کامل حاصل شود (شکل٦).

شکل٦- باززایی گیاه کامل *A. annua*

بحث

همانطورکه مشخص شد بالاترین میزان باززایی در آزمایش انجام شده در محیط۲ میلی گرم در لیترBAP و ۰/۵ میلی گرم در لیتر NAA بوده و در تیمارهای هورمونی حاصل از این دو هورمون به میزان ۸٦/٦ درصد باززایی صورت می‌گیرد. باززاییهای مستقیم نیز در این تیمار وجود دارد، یعنی القای ساقه از روی کالوس روی نمی دهد. در گزارش سایر محققین باززایی با این تیمار هورمونی وجود ندارد، تنها Chen و همکارانش با کاربرد این دو هورمون (البته با مصرف ۰/۰۵ میلی گرم NAA در تیمار) موفق به باززایی از قطعات جداکشت برگ از ناحیه دمبرگ شدند(٤). آنها بیان داشتند که در محل دمبرگ قطع شده باززایی صورت می گیرد و بقیه سطح برگ مستعد تولید کالوس است. این در حالی است که در آزمایش حاضر ، باززایی ساقه از تمام سطح برگ مشاهده شد. در محیطهای آزمایش با ترکیبات هورمونی Kinetin ، 2,4-D و ترکیبات هورمونی BAP ،2,4-D جداکشتها اغلب کالوس تولید کرده و سپس در کالوسها القای ریشه صورت گرفت، اما القای ساقه انجام نشد. احتمال دارد مقدار هورمونهای اکسین بکار رفته در این تیمارها بالاتر از حد نیاز برای تشکیل ساقه باشد. این در حالی است که در آزمایشات قبلی صورت گرفته درمحیط MS حاوی ترکیب فاکتوریل از هورمونهای 2,4-D (۱ و ۰/۱ و ۰ میلی گرم در لیتر) و BAP (۱۰ و ۱ و ۰/۱ و ۰ میلی گرم در لیتر) در تمام این تیمارها ساقه دهی وجود داشته است (۱۰). بنابراین با توجه به نتایج سایر تحقیقات استفاده از این هورمونها در باززایی گیاه *A. annua* بسته به ژنوتیپ است (۱۷ و ۱۸). این احتمال نیز وجود دارد که استفاده از هورمون قوی و مصنوعی 2,4-D باعث تقسیم بسیار زیاد سلولی و در نتیجه تشکیل کالوس فراوان بدون استعداد باززایی شود (۷).

در محیط های حاوی BAP و IAA تاکنون گزارشی از باززایی ارائه نشده است ولی در مطالعه حاضر در محیط حاوی ۲ میلی گرم در لیترBAP و ۱ میلی گرم در لیترIAA در محیطهای کشت حاوی این دو هورمون ۸۰ درصد باززایی رخ داد.

در این آزمایشات با انتقال کالوسها و ریزنمونه ها به محیط MS فاقد هورمون و پس از حذف هورمون القای ساقه رخ داد که این می تواند بدلیل حذف اکسین از محیط باشد. در مورد محیط شاهد MS نیز غالبا تشکیل ریشه و گاهی تشکیل کالوس مشاهده شد، در حالیکه در محیط MS با ویتامین زیاد تشکیل کالوس رخ می دهد، بنابراین می توان نتیجه گرفت که احتمالاً سطوح بالای ویتامین باعث القای کالوس در قطعات جداکشت می شود. نحوه القای ساقه در مطالعه حاضر با روش Chen و همکاران (٤) بر روی این گیاه متفاوت است، زیرا Chen و همکاران از برگ استفاده کردند در حالیکه در مطالعه حاضر برگ بطور کامل در محیط القای ساقه قرار داده شد. چرا که بنظر می آید در

Archive of SID

www.SID.ir

مورد این گونه از جنس *Artemisia* برای جلوگیری از قهوه ای شدن بهتر است از ایجاد زخمهای زیاد در برگ خودداری شود. بهمین سبب واکشت دو هفته یک بار قطعات جداکشت نیز برای جلوگیری از فرآیند قهوه ای شدن (که ناشی از ترشح مواد مضر از جدا کشت به درون محیط کشت اطراف است) مؤثر می باشد. شکل ۷ نشان دهنده عدم واکشت به موقع و پدیده قهوه ای شدن است.

جدول(۳) مقایسه میانگین اثر تیمارهای هورمونی در باززایی گیاهچه

تیمار هورمونی (میلی گرم در لیتر)	درصد باززایی	مقایسه میانگین
BAP 2 NAA 0.1	۲۳/۳	c
BAP 2 NAA 0.5	۸٦/٦	a
BAP 1 IAA 0.5	۱۰	d
BAP1 IAA 0.5	۱۰	d
BAP 2 IAA 0.5	٤۳/۳	b
BAP 2 IAA 1	۸۰	a
BAP 3 IAA 0.5	۲٦/٦	c
BAP 3 IAA 1	۳۰	bc

شکل ۷- عدم واکشت به موقع و پدیده قهوه ای شدن در کالوس و ساقه القا شده

برای ریشه زایی در محیطهای حاوی هورمون کافیست بمدت یک هفته نمونه ها را در محیط هورمون دار قرار داده و پس از القای ریشه وارد محیط پایه بدون هورمون نمود. زیرا هورمون اکسین تنها برای القای ریشه ضروری است و پس از آن از رشد ریشه جلوگیری می کند. همانطور که Chen و همکارانش از محیطهای واجد هورمون NAA استفاده کردند، ما نیز از محیط MS حاوی ۰/۰۵ میلی گرم در لیتر و ۰/۱ میلی گرم در لیتر NAA استفاده کردیم که القای ریشه در هر دو مورد رخ داد ولی بدلیل القای همزمان ریشه و کالوس در تیمار ۰/۱ میلی گرم در لیتر NAA ، این مورد توصیه نمی شود. بهمین دلیل همانند گزارش Hun و همکاران (۱۰) به جهت اینکه استفاده از اکسین بیشتر موجب القای کالوس ناخواسته می شود تیمار ۰/۰۵ میلی گرم در لیتر NAA توصیه می شود.

بطور خلاصه، برای القای ساقه در گیاه دارویی *A. annua* با استفاده از تیمار برگی، دو محیط با ترکیب هورمونی حاوی۲ میلی گرم در لیترBAP و ۰/۵ میلی گرم در لیتر NAA همچنین ۲ میلی گرم در لیترBAP و ۱ میلی گرم در لیترIAA در محیط پایه MS پیشنهاد معرفی شد. همچنین بمنظور القای ریشه از ساقه های القایی نیز تیمار یک هفته ای حاوی ۰/۰۵ میلی گرم در لیتر NAA پیشنهاد می شود.

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

1. Abdin , M. Z. Israr, M.Rehman, R. U. and S. K. Jain .(2003). Artemisinin a novel antimalarial drug : biochemical and molecular approaches for enhanced production. Planta Med. 69:289-299.

2. Basile D.V., Akhtari N., Durand Y. and M. Nair (1993). Toward the production of artemisinin through tissue culture: determining nutrient hormone combination suitable for cell suspension cultures. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant. 29: 143-147.

3. Brown G.D. (1994) secondary metabolism in tissue culture in *Artemisia annua*. J. Natl. Prod. 57:975-977.

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

5. Chenshu A., Wang X., Yuan X., Zhao B., Wang Y.(2003). optimization of cryopreservation of *Artemisia annua*.L. callus. Biotechnol. Lett. 25:35-38.

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

7. Ferreira J., Janick J. (1996). Roots as an enhancing factor for production of artemisinin in shoot cultures of *Artemisia annua* . Plant Cell Tiss. Org. Cult. 44: 211-217.

8. Grant, J. E. Domisse , E. M. Christy, M. C. and A.j. Conner (1991). In advanced method in plant breeding and biotechnology, CAB International, Walling Ford , 50 – 70. Natl. Acad. Sci. USA 97 : 3826 – 3831.

9. Gulati.A., Bharel,S.,and M.Z.Abdin. (1996). Invitro micropropagation and flowering in *Artemisia annua*. J. Plant Biochem.Biotechnol. 5:31-35.

10. Han J.L., Hong W., Ye H.C., Liv Y., Li Z.G., zhang Y.S., Guo F.Y., and Feng Li. (2004). High efficiency of genetic transformation and regeneration of *A.annua* via Agrohacteriew tomefaaency – mediated procedure. Plant Science.175: 7- 20.

11. Hold, K.M. Sirisoma,N.S.Nara hashi, T. and J. E. Casida.(2000). Thujone : aminobutyric acid type a receptor moduclation and metabolic detoxification. Natl. Acad. Sci.55:322-328.

12. Kim,Y. Wethers, P. J. and B. E. Wyslouzil. (2003). A comparative study of mist and bubble column reactor in the in vitro production of artemisinin. Plant Cell Rep. 20 : 451 – 455.

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

14. Moraes R.M., Krans J.V., and S.C.Franca.(1995). Cotton fiber as a substitute for agar support in tissue culture. Hort.Science. 30: 1082-1083.

15. Murashige, T. and F. Skoog. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. J. Physiol. Plant, 15: 473-497.

16. Nair.M.S. Acton.N. and D.L.Klyman. (1996). Production of artemisinin in tissue culture of *Artemisia annua*. J. Nut.Prod. 49:504-507.

17. Paniego N.B., Maligene A.E. and A.M. Giulietti.(1996). Artemisinin production of *Artemisia annua* by transformed organ cultures. Enzymes Microb. Technol. 18: 526-530

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

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

Archive of SID

www.SID.ir

Improvement on the situation of regeneration of medicinal plant *Artemisia annua* L.

Sharafi A. [1], Hashemi Sohi H. [2], and Jourabchi E.[2]

[1] Biotecnology Dept.,Faculty of Agriculture, University of Mazandaran, Sary,I.R.of IRAN

[2] Plant Biotechnology Dept., National Institute for Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, I.R.of IRAN

Abstract

Artemisia annua is an aromatic annual plant which has artemisinin, an antimalarial drug, was used as treatment for fever. Its derivatives have selective toxicity toward human breast cancer cells. This plant is widely dispersed throughout the temperate regions. The yield of artemisinin in this plant is low and chemosynthesis and conventional breeding methods have not been successful. For artemisinin production, in recent years, there are more progresses in molecular regulation of artemisinin biosynthesis via transferring genes of key enzymes involved in biosynthesis of artemisinin or inhibit the enzymes involved in other pathways competing for its precursors. Tissue culture and regeneration of are prerequisites for transformation. We successeded in regenerating this plant using different combination of hormones including 2,4-D, BAP, NAA, IAA and Kinetin. The highest regeneration frequency of shoot induction was obtained using 2 mg/l BAP, 0.5 mg/l NAA and 2 mg/l BAP, 1 mg/l IAA. After several subcultures of the leaf explants, callus induction was obtained. These calli were transferred to free hormone MS medium for shoot induction. For root induction, the induced shoots were transferred to MS medium supplemented by 0.05 mg/l NAA for one week.

Key words: *Artemisia annua*, regeneration, artemisinin, molecular regulation

Archive of SID

www.SID.ir