

بیان موقت عامل‌های رونویسی دو خانواده WRKY و MYB و دو آنزیم OPR3 و DBR2 در دو کموتایپ *Artemisia annua* (آنآمد و وحشی ایرانی) به منظور افزایش تولید پیش‌ماده آرتمیزینین

سجاد رشیدی منفرد^۱، محمدرضا نقوی^{۲*}، بهمن یزدی‌صمدی^۳، هوشنگ علیزاده^۴، کی یانگ^۵،
اینلی لوندگرن^۶ و پیتر برودلیوس^۷

۱. دانشجوی سابق دکتری، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج و استادیار،

گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

۲، ۳ و ۴. استادان و استادیار، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

۵، ۶ و ۷. گروه بیوشیمی گیاهی دانشگاه لینوس سوئد

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۶/۲۴ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۱/۲۵)

چکیده

بیان موقت در بافت برگ با ناقل‌های دوتایی روش سریعی برای تولید پروتئین در گیاهان است. عامل‌های رونویسی باعث تغییر بیان همزمان چند ژن می‌شوند. به همین دلیل می‌توان از آنها برای اصلاح صفات کمی مانند سوخت‌وسازگر (متابولیت)‌های ثانویه که با چند ژن کنترل می‌شوند، استفاده کرد. گیاه *Artemisia annua* گیاهی یک‌ساله، بومی آسیا و به احتمال بسیار زیاد چین است و یکی از مهم‌ترین سوخت‌وسازگرهای دارویی یعنی ترکیب سسکویی‌ترین آرتمیزینین را که دارای خواص ضد‌مالاریایی و ضدسرطانی بالایی است تولید می‌کند. برای بررسی میزان تأثیر عامل‌های رونویسی مختلف مورد بررسی (سه عامل رونویسی متعلق به خانواده WRKY و دو عامل رونویسی متعلق به خانواده MYB) و آنزیم‌های OPR3 و DBR2 روی میزان بیان ژن‌های مسیر زیست‌ساخت (بیوسنتز) آرتمیزینین و تولید سوخت‌وسازگرهای حدواسط، از روش بیان موقت با اعمال نفوذپذیری تدریجی آگروباکتریوم (آگرواینفیلتریشن) استفاده شد. ژن‌های مختلف مورد بررسی از برگ گیاه *A. annua* استخراج و در آغاز در ناقل *pJET1.2* همسانه (کلون) و آن‌گاه در حامل بیانی ویروسی *pEAQ-HT* همسانه‌سازی شده و در برگ‌های دو کموتایپ (chemotype) وحشی ایران و آنآمد (anamed) به صورت موقت بیان شدند. نتایج تجزیه سوخت‌وسازگرهای مسیر زیست‌ساخت آرتمیزینین با استفاده از دستگاه GC-MS نشان داد که عامل‌های رونویسی مورد بررسی نقش مهمی در تولید دو سوخت‌وسازگر AA و DHAA در گیاهان آگرواینفیلتره شده نسبت به کنترل داشتند. این نتایج نشان می‌دهد که عامل‌های رونویسی بالا قادر به تنظیم رونویسی ژن‌های دخیل در زیست‌ساخت آرتمیزینین هستند.

واژه‌های کلیدی: آرتمیزینین، بیان موقت، عامل‌های رونویسی، GC-MS.

مقدمه

مهم تلقی می‌شود. این بیماری سالانه ۱۲ میلیارد دلار برای قاره آفریقا هزینه در پی دارد. هر ساله مالاریا حدود

مالاریا پس از بیماری ایدز یا HIV دومین بیماری عفونی

آرتمیزیینیک آلدهید ترکیب بسیار ناپایداری است و با یک فرایند کاهشی توسط آنزیم *DBR2* به دای‌هیدروآرتمیزیینیک آلدهید (DHAAA) تبدیل می‌شود و این ترکیب پس از آن توسط آنزیم *ALDH1* با یک فرایند اکسایشی به ترکیب بسیار مهم آرتمیزیینیک اسید (AA) تبدیل می‌شود. در واقع این ترکیب پیش‌ساز اصلی آرتمیزیینین است. بررسی‌های مختلف نشان داده است که تبدیل ترکیب دای‌هیدروآرتمیزیینیک اسید (DHAA) به آرتمیزیینین یک فرایند غیرآنزیمی است (Lommen *et al.*, 2006; Teoh *et al.*, 2009).

البته هر دو آنزیم *ALDH1* و *CYP71AV1* می‌توانند ترکیب آرتمیزیینیک آلدهید را به آرتمیزیینیک اسید تبدیل کنند. به نظر می‌رسد یکی از مراحل مهم در زیست‌ساخت آرتمیزیینین، تولید سوخت‌وسازگر دای‌هیدروآرتمیزیینیک اسید^۴ است، زیرا بررسی‌های مختلف نشان داده است همبستگی بالایی بین تولید دای‌هیدروآرتمیزیینیک اسید و آرتمیزیینین وجود دارد. شواهد فراوانی وجود دارد که دای‌هیدروآرتمیزیینیک اسید پیش‌ساز ساخت آرتمیزیینین است. در واقع کموتایپ‌هایی که آرتمیزیینین بالا دارند، دای‌هیدروآرتمیزیینیک اسید بالا داشته و کموتایپ‌های که آرتمیزیینیک اسید بالا دارند، دارای آرتنیون B بالا نیز هستند (Covello *et al.*, 2007; Teoh *et al.*, 2009). در واقع علت آن رقابت ژن‌های *DBR2* و *ALDH1* با *CYP71AV1* است. با نگاهی به مسیر زیست‌ساختی درمی‌یابیم که ترکیب آرتمیزیینیک آلدهید بستره (سوبسترا)ی دو ماده دای‌هیدروآرتمیزیینیک اسید و آرتمیزیینیک اسید است. راهبرد مهندسی سوخت‌وسازگرهای^۵ گیاهی در سه محور افزایش میزان یک سوخت‌وسازگر خاص، کاهش تولید یک سوخت‌وسازگر ناخواسته^۶ برای افزایش سوخت‌وسازگر موردنظر و تولید یک سوخت‌وسازگر جدید در گیاه، قابل بحث است. در حالت دوم در واقع به‌دلیل اینکه سوخت‌وسازگرهای

۳۰۰ میلیون نفر در سراسر جهان را آلوده کرده و باعث مرگ ۰/۵ تا ۲/۷ میلیون نفر که بیشترشان کودکان هستند، می‌شود. در دو دهه گذشته گیاه *Artemisia annua* که یکی از اعضای قبیله Anthemideae از زیرخانواده Asteroideae به‌شمار می‌آید، در حال تبدیل شدن به یکی از متداول‌ترین گیاهان دارویی جهان است (Bouwmeester *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2009). آرتمیزیینین یک ترکیب سسکوئی‌ترین لاکتونی^۱ است که افزون بر لاکتون، دارای پل اندوپراکسیدی در ساختار خود است که بسیار کم در سوخت‌وسازگرهای ثانویه وجود دارد. بررسی‌های فراوان نشان داده که این ویژگی مهم ساختاری عامل فعالیت ضد مالاریا و ضد سرطانی این ترکیب فعال است. این ترکیب شیمیایی به‌صورت کامل توسط محققان زیادی ساخته شده است. اما به‌دلیل عملکرد پایین، پیچیدگی و هزینه بالا مقرون به صرفه نیست. در واقع، استخراج آن از گیاه اقتصادی‌ترین روش خواهد بود. آرتمیزیینین اثرگذاری‌های جانبی کمی روی انسان دارد و دارویی مؤثر علیه همه تک‌یاخته‌های جنس *Plasmodium* شامل *Vivax*، *Falciparum* که دو گونه عامل بیماری مالاریا در انسان هستند، خواهد بود (White *et al.*, 2004). ترکیب آرتمیزیینین در کرک‌های حلقوی ترشحی^۲ که در سطوح هوایی گیاه *A. annua* وجود دارند، تولید می‌شود (Olsson *et al.*, 2009). نخستین مرحله در زیست‌ساخت آرتمیزیینین در گیاه *A. annua* حلقوی شدن^۳ پیش‌ساز اولیه FDP به ترکیب آمورفاداین سنتاز است. این واکنش به‌وسیله آنزیم آمورفاداین سنتاز کاتالیز می‌شود که یکی از آنزیم‌های کلیدی در این مسیر زیست‌ساختی به‌شمار می‌آید (Rashidi Monfared *et al.*, 2011; Bouwmeester *et al.*, 2009; Wallaart *et al.*, 1999). در مرحله بعد ترکیب آمورفاداین به‌وسیله آنزیم سیتوکروم P450 هیدروکسیلاز، هیدروکسیله شده و ترکیب آرتمیزیینیک الکل (AAOH) را به‌وجود می‌آورد. در ادامه آنزیم *CYP71AV1* آرتمیزیینیک الکل را اکسیده کرده و به ترکیب آرتمیزیینیک آلدهید تبدیل می‌کند.

4. Dihydroartemisinic acid
5. Metabolic engineering
6. Unwanted metabolite

1. Sesquiterpen lacton
2. Glandular secretory trichomes
3. Cyclization

بیان موقت^۱ بافت برگ با ناقل‌های دوتایی^۲ روش سریعی برای تولید پروتئین در گیاهان است. در سال‌های اخیر نشان داده شده است که قرار دادن ناحیه‌های 5UTR و 3UTR از ویروس CPMV مربوط به ژن RNA2 در درون ناقل PBINPLUS می‌تواند به شدت روی میزان بیان ژن‌های همسانه‌سازی شده اثر بگذارد. برای استفاده از این دستاورد مجموعه‌ای از حامل‌های دوتایی کوچک برای بیان گذرا ایجاد شد. بیش از 7 Kb از توالی غیرضروری از بدنه ناقل PBINPLUS حذف شد و ناحیه T-DNA و توالی‌های محدودکننده منحصراً به‌فرد برای قرار دادن چندین کاست بیانی تعبیه شده است و ناقل جدیدی با نام pEAQ طراحی شد. این ناقل امکان بیان در سطح بالا در مدت زمان کوتاه را فراهم می‌آورد. افزون‌بر این ناقل‌ها امکان همسانه‌سازی با آنزیم و نوترکیبی GATEWAY را فراهم می‌آورند. توالی His-Tag (توالی با ۶ تا ۹ هسیتیدین که به وفور در ناقل‌ها برای تولید پروتئین‌های نوترکیب استفاده می‌شود)، ممکن است به توالی هدف متصل شود. این ناقل‌ها ابزار آسان و سریعی برای تولید یک پروتئین در حد میلی‌گرم را فراهم می‌آورند (Sainsbury *et al.*, 2009). یکی از راهبردهای بیماری‌زایی برای ویروس‌های گیاهی بیان پروتئین‌های متصل به dsRNA گیاه است، در واقع با کمک این پروتئین‌ها، ویروس‌ها سامانه دفاعی یاخته میزبان خود را از کار می‌اندازند. یکی از این پروتئین‌های سرکوبگر گیاهی *p19* است. این پروتئین با ویروس‌های خانواده tombusvirus بیان می‌شود. این پروتئین‌ها به siRNA ۲۱ نوکلئوتیدی متصل می‌شود. پروتئین *p19* به ساختار قند-فسفات بدنه RNA متصل شده و میان دو مارپیچ آلفا بخش انتهایی RNA دورشته‌ای را پوشش می‌دهد.

امروزه از این توان بالقوه (پتانسیل) طبیعی برای افزایش بیان ژن‌ها به‌صورت موقت در گیاهان بهره می‌گیرند. هنگامی که محقق در حال کاربرد یک ناقل ویروسی مانند pEAQ باشد به هنگام تراخت کردن گیاه ناقل ویروسی را به عنوان یک ویروس مهاجم

مختلف در یک مسیر زیست‌ساختی ممکن است که دارای بسترهای مشترکی باشند و هنگامی که یک سوخت‌وسازگر خاص بستره تشکیل چندین ترکیب مشخص باشد دراصل با کاهش فعالیت آنزیم‌های دیگر که از این بستره استفاده می‌کنند، می‌توان شانس تولید ترکیب موردنظر را با افزایش بستره اولیه فراهم آورد. در حالت سوم ممکن است یک سوخت‌وسازگر خاص به دلیل نبود آنزیم اختصاصی‌اش در گیاه میزبان تولید نشود ولی بستره آن موجود باشد، در نتیجه می‌توان تولید آن را فراهم کرد (Capell *et al.*, 2004; Iwase *et al.*, 2009).

برای اجرایی کردن راهبردهای بالا، سه روش افزایش بیان ژن‌های اختصاصی در گیاه میزبان، استفاده از روش‌های خاموشی برای کاهش بیان ژن‌های ناخواسته و در نهایت بیان عامل‌های رونویسی را می‌توان عمل کرد. برتری کاربرد عامل‌های رونویسی این است که با افزایش بیان آنها می‌توان همزمان بیان چندین ژن را افزایش داد. این روش همان‌طور که پیشتر اشاره شد برای اصلاح صفات کمی مانند تولید سوخت‌وسازگرهای ثانویه که با شمار زیادی ژن کنترل می‌شود، می‌تواند راه‌گشا باشد، زیرا با تغییر بیان یک ژن خاص (عامل رونویسی) همانند اصلاح یک صفت کیفی می‌توان بیان همزمان شمار زیادی ژن را که احتمال همپوشانی فعالیت آنها می‌رود، فراهم کرد. در واقع ژن‌هایی که در یک مسیر زیست‌ساختی بیان می‌شوند، انتظار بر این است که کنترل تنظیمی همسانی داشته باشند در نتیجه، می‌توان بیان آنها را با کمک این روش بهبود نسبی بخشید (Wray *et al.*, 2003). ژن‌های *MYB* در فرایندهای چندی شامل پیشرفت چرخه یاخته‌ای، تمایز یاخته، قطبیت انتهایی اندام، نمو گل و بذر، سوخت‌وساز ثانویه، انتقال علامت (سیگنال) نور و هورمون و پاسخ‌های دفاعی و تنش‌ها نقش دارند (Kim *et al.*, 2010; Yanhui *et al.*, 2006; Petroni *et al.*, 2008). عامل‌های رونویسی *WRKY* نیز با کنترل میزان تولید سوخت‌وسازگرهای ثانویه می‌توانند به نقش حفاظتی خود در گیاهان بپردازند (Borrone *et al.*, 2007).

1. Transient expression

2. Binary vectors

استفاده شد. با PCR ناحیه رمزکننده (CDS) ژن‌های لازم با استفاده از cDNA برگ *A. annua* به عنوان الگو و آنزیم Pfu DNA پلیمرزافزونش شد. توالی آغازگرها و جایگاه برشی آنزیم‌های محدودکننده در جدول ۱ آمده است.

قطعه‌های افزونش‌شده با استفاده از Fermentas GeneJET Gel Extraction Kit خالص‌سازی و در ناقل pJET1.2 blunt با استفاده از Fermentas CloneJET™ PCR Cloning Kit همسانه‌سازی شدند. ناقل‌های همسانه‌شده به باکتری *E. coli* سویه NovaBlue انتقال داده شد. همسانه (کلون)‌های مثبت با استفاده از کشت باکتری در محیط پادزیست (آنتی‌بیوتیک) دار آمپی‌سیلین 50µg/ml شناسایی شدند. سپس با استفاده از کشت شبانه همسانه‌های مثبت تأییدشده با PCR (با آغازگرهای اختصاصی ناقل pJET1.2 blunt اطراف ناحیه الحاق ژن‌های موردنظر)، پلاسمیدها بر پایه روش GeneJET Fermentas Plasmid Miniprep Kit استخراج و برای توالی‌یابی ارسال شدند. قطعه‌های موردنظر از طریق جایگاه‌های برشی لازم در پلاسمید pEAQ-HT دارای راه‌انداز 35S، ژن مقاومت به پادزیست کانامایسین (*NptII*) همسانه‌سازی شدند. وجود قطعه موردنظر و برای قرار گرفتن آن در پلاسمید pEAQ-HT توسط آنزیم‌های برشی تأیید شد. پلاسمیدهای دارای ژن‌های همسانه‌سازی‌شده به آگروباکتریوم انتقال داده شد. انتقال پلاسمیدهای دارای ژن‌ها به آگروباکتریوم سویه EHA105 با استفاده از روش انجماد و ذوب^۱ صورت پذیرفت سپس به کمک PCR با استفاده از آغازگرهای مبتنی بر ناقل pEAQ اطراف ناحیه الحاق ژن تأیید شد که اندازه قطعه‌ها در جدول ۱ آمده است.

Fwd: pEAQ
5-CCCGTGGTTTTTCGAACCTTGGAG-3

Rev: pEAQ
5-GCACACCGAATAACAGTAAATTC-3

تلقی کرده و برای سرکوب آن تلاش می‌کند. به همین دلیل با استفاده از بیان ژن *p19* می‌توان سامانه دفاعی گیاه را مورد حمله قرار داد تا پروتئین موردنظر در میزان بالایی تولید شود. بررسی‌ها نشان داده است که بیان پروتئین موردنظر به کمک سامانه *p19* تا ۵۰ برابر افزایش می‌یابد (Voinnet et al., 2003).

گیاه *A. annua* تنها منبع اقتصادی برای تولید داروی ارزشمند آرتمیزینین است. بنابراین برای افزایش میزان ماده آرتمیزینین در گیاه *A. annua* بایستی سعی کرد اطلاع جامعی راجع به مسیر سوخت‌وسازگری موردنظر به دست آورد. برای دستیابی به این هدف استفاده از توان‌های بالقوه ژنتیکی طبیعی (مانند کموتایپ‌های وحشی) و مقایسه آنها با کموتایپ‌های تجاری (دارای آرتمیزینین بالا) به درک هرچه بیشتر چگونگی تنظیم این مسیر سوخت‌وسازگری کمک شایانی می‌کند. در این پژوهش، بیان پنج عامل رونویسی و دو آنزیم *DBR2* و *OPR3* (آنزیم کدکننده ۱۲-اکسوفیتودینوات ردکتاز که از نظر توالی بسیار همانند به آنزیم *DBR2* است) بر روی میزان تولید سوخت‌وسازگرهای نهایی مرحله آنزیمی مسیر زیست‌ساخت آرتمیزینین یعنی آرتمیزینیک اسید (AA) و دی‌هیدروآرتمیزینیک اسید (DHAA) با استفاده از روش پمپ خلأ در دو کموتایپ وحشی ایرانی دارای آرتمیزینین پایین و تجاری آنامد دارای میزان آرتمیزینین بالا صورت گرفت. هدف از انجام عمل بالا شناسایی عامل‌های رونویسی دخیل در زیست‌ساخت آرتمیزینین و سوخت‌وسازگرهای حدواسط این مسیر و تعیین میزان تأثیر دو آنزیم *DBR2* و *OPR3* روی تولید سوخت‌وسازگر حدواسط دی‌هیدروآرتمیزینیک اسید (DHAA) با استفاده از روش نفوذپذیری تدریجی آگروباکتریوم پیش از انتقال پایدار آنها به ژنگان (ژنوم) گیاه *A. annua* است.

مواد و روش‌ها

ساخت سازه‌های ژنی

در این تحقیق پنج عامل رونویسی متعلق به دو خانواده *WRKY* و *MYB* و دو آنزیم *DBR2* و *OPR3*

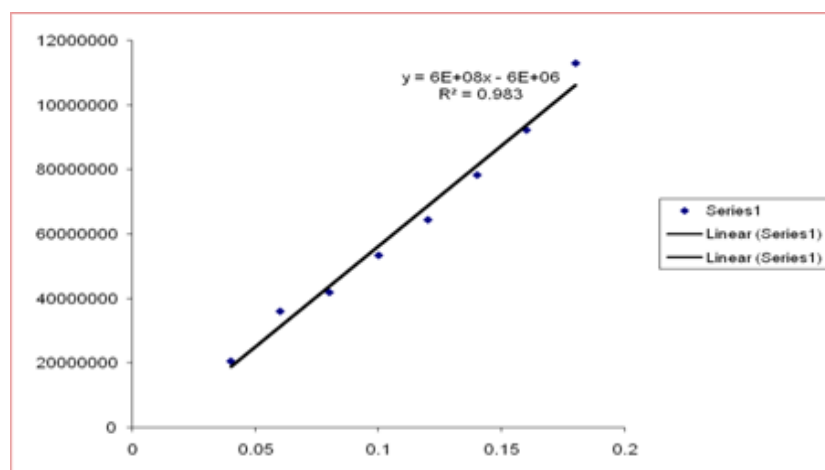
1. Freeze and thaw

جدول ۱. آغازگرهای لازم برای افزونش عامل‌های رونویسی مختلف و آنزیم‌های مورد استفاده

نام ژن	آغازگرها	جایگاه برشی	طول CDS
<i>AaWRKY1Fwd</i>	5'- ATACCCGGGATGGAAAGTGTGTTGTTTATG-3'	<i>XmaI</i>	۹۳۶
<i>AaWRKY1Rev</i>	5'- GCGCTCGAGTTAAAAATTTGAAATCAAGGTCT-3'	<i>XhoI</i>	
<i>AaMYB1Fwd</i>	5'- ATA ACCGGT ATGAAAGAGCGTCAAAGATGGCAG-3'	<i>AgeI</i>	۱۲۶۳
<i>AaMYB1Rev</i>	5'- CG TCGAGTTAACTTAACCCATGATGATGTTGATG-3'	<i>XhoI</i>	
<i>AaMYB2Fwd</i>	5'- CCCGGGGCCAGGCATTCCACTTGTACAAAC-3'	<i>XmaI</i>	۹۹۳
<i>AaMYB2Rev</i>	5'- CTCGAGCTATGTAATGCCCCATAGCTTGCAC-3'	<i>XhoI</i>	
<i>AaDBR2Fwd</i>	5'- TCGCGAATGTCTGAAAAACCAACCTTGTGTTTCTGC-3'	<i>NruI</i>	۱۱۶۴
<i>AaDBR2Rev</i>	5'- CTCGAGCTAGAGGAGTGACCCTTTGTCAAGAGAAG-3'	<i>XhoI</i>	
<i>AaOPR3Fwd</i>	5'- TCGCGA ATGTCTGAAAAACCAACCTTGTGTTTCTCC-3'	<i>NruI</i>	۱۱۷۹
<i>AaOPR3Rev</i>	5'- CTCGAGCTAGAGGCGTGACAGTCGTTCAAC-3'	<i>XhoI</i>	
<i>AaWRKY1Fwd</i>	5'- TCGCGA ATGGAATATACGAGCTTGGTTAATACTTC-3'	<i>NruI</i>	۹۷۵
<i>AaWRKY1Rev</i>	5'- CTCGAGTTACCCTTTGGGACTGATTTTGTGTTG-3'	<i>XhoI</i>	
<i>AaWRKY3Fwd</i>	5'- TCGCGA ATGCAACATAAGGGTAGTAATAATTGGGGTC-3'	<i>NruI</i>	۹۳۶
<i>AaWRKY3Rev</i>	5'- CTCGAGCTAAGGCCCGAGCGGTAACCTGTTG-3'	<i>XhoI</i>	

بیان موقت سازه‌های مختلف در گیاه *A. annua* شمار ۲۰-۳۰ عدد برگ جوان گیاه *A. annua* از دو کموتایپ وحشی و آنامد برای بیان موقت سازه‌های ساخته‌شده جداسازی شد. بیان موقت ژن‌های بالا به همراه ژن *p19* با استفاده از روش پمپ خلأ برپایه روش *Ma et al.* (2009) با تغییرهایی صورت پذیرفت. برای کمی‌سنجی^۱ دو ترکیب DHAA و AA شناسایی شده با استفاده از رنگ‌نگاری (کروماتوگرافی) به یک استاندارد با غلظت‌های مشخص نیاز است. برای این کار ما از استاندارد فارنسل^۲ با وزن مولکولی

۲۲۲/۳۷g/mol) همسان دو ترکیب بالا استفاده کردیم. برای تهیه منحنی استاندارد فارنسل از هشت سطح غلظت مختلف ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸، ۱/۰، ۱/۲، ۱/۴، ۱/۶ و ۱/۸ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر محلول استفاده شد. که منحنی استاندارد آن را در زیر ملاحظه می‌کنید. فارنسل به دلیل واکنش پذیری با مخلوط مشتق‌ساز مورد استفاده و به دلیل اینکه دارای وزن مولکولی ۲۲۲/۳۷ g/mol و تا حدودی همانند با ترکیبات بالادست آرتیمیزینین ترکیب مناسبی برای کمی‌سنجی سوخت‌وسازگرهای موردنظر است (شکل ۱).



شکل ۱. منحنی استاندارد مربوط به ترکیب فارنسل

تجزیه و تحلیل سوخت‌وسازگرها برای شناسایی سوخت‌وسازگرهای گیاه *A. annua* از نمونه‌های مختلف آگرواینفیلتره^۳ شده کنترل (ناقل

خالی) و ناقل دارای سازه‌های بالا در آغاز آنها در آن در شرایط دمایی ۳۰ درجه سلسیوس و مدت زمان ۲۴ ساعت قرار داده شدند. پس از آن، در شرایط تاریکی و دمای ۲۶ درجه سلسیوس تا هنگامی که نمونه‌ها به طور کامل خشک شوند، نگهداری شدند. ۱۰۰ میلی‌گرم از

1. Quantification
2. Farnesol
3. Agroinfiltrated

اسید (AA) و دی هیدروآرتمیزینیک اسید (DHAA) به صورت آنزیمی است و تشکیل دو سوخت‌وسازگر نهایی آرتمیزینین و آرتنیون B به صورت غیرآنزیمی و تحت تأثیر نور است. با توجه به این فرایند، نفوذپذیری تدریجی اگر با کتریوم ژن‌های عامل‌های نسخه‌برداری و دیگر ژن‌ها در یک بازه زمانی کوتاه پنج روزه و در شرایط تاریکی انجام پذیرفته است. برای بررسی تأثیر ژن‌های موردنظر در این مسیر زیست‌ساختی بهترین گزینه سوخت‌وسازگری ترکیب نهایی مسیر زیست‌ساختی آنزیمی یعنی AA و DHAA است، زیرا تا تولید آنها آنزیم‌های زیادی دخیل هستند و از سوی دیگر به عنوان یک گلوگاه بین مسیر آنزیمی و غیرآنزیمی به‌شمار می‌آیند.

به دلایلی که بیان شد، در بررسی GC-MS به اندازه‌گیری و کمی‌سنجی دو ترکیب AA و DHAA به‌عنوان یک شاخص برای ارزیابی تأثیر ژن‌های بیان‌شده در گیاهان پرداخته شد (شکل‌های ۲، ۳ و ۴). نکته‌ای که بایستی در اینجا به آن اشاره شود این است که فرایند زیست‌ساخت آرتمیزینین تنها در کرک‌های سطح برگ گیاه *A. annua* صورت می‌گیرد یعنی در قسمت اعظمی از برگ این فرایند رخ نمی‌دهد و همچنین به‌دلیل اینکه بین سن برگ و شمار کرک‌ها رابطه معکوسی وجود دارد باید به هنگام گردآوری برگ‌ها دقت فراوانی داشت که تنها برگ‌های جوان گزینش شوند. از این‌رو در این آزمایش افزون بر محدودیت‌های ذاتی که هر روش آزمایشی برای مثال در اینجا بیان موقت دارد، برای بررسی مسیر زیست‌ساختی آرتمیزینین با استفاده از بیان موقت این نارسایی‌ها نیز وجود دارد. ما از روش بیان موقت با استفاده از پمپ خلأ استفاده کردیم زیرا نمی‌توانیم با استفاده از روش تزریقی شانس آلودگی کرک‌ها را با استفاده از باکتری‌های ناقل ژن‌های موردنظر افزایش دهیم. اما در روش پمپ خلأ این شانس بسیار بالا می‌رود.

در این آزمایش از دو کموتایپ آنامد و وحشی استفاده شده است که به ترتیب میزان بالایی از DHAA و AA را دارند. در واقع وجود دو کموتایپ دارای توانمندی بسیار متفاوت در این مسیر زیست‌ساختی به ما در بررسی بهتر و شناسایی

هر نمونه به‌طور دقیق وزن شد و با استفاده از ۱۰ میلی‌لیتر هگزان به مدت ۱۷-۲۰ ساعت عصاره نمونه‌های مختلف استخراج شد. پس از پالایش نمونه‌های استخراج‌شده، حجم نهایی نمونه‌ها پیش از تجزیه با کمک دستگاه GC-MS با استفاده از هگزان به یک میلی‌لیتر رسانده شد.

نمونه‌ها با استفاده از دستگاه GC-MS Agilent 6890 و ستون HP-5M5 5% phenyl methyl silo (0.25µm film hexane capillary column thickness, 0.25mm×30m i.d) Agilent و شناساگر 5973 Network Mass Selective Detector تجزیه شدند. پیش از قراردادن نمونه‌ها در دستگاه GC-MS در آغاز با استفاده از مخلوط پیریدین و BSA (Bis(trimethylsilyl)acetamide) تغییر داده شدند. مخلوط واکنشگر بالا دارای سرعت واکنش‌پذیری بسیار بالایی است، به‌طوری که با افزودن این مخلوط به عصاره استخراج‌شده از گیاه می‌توان بدون فاصله زمانی آن‌را برای تجزیه به دستگاه GC-MS تزریق کرد. با این کار می‌توان ترکیبات اسیدی را با اطمینان بالاتری کمی‌سنجی کرد. برای این کار در آغاز مخلوط پیریدین-BSA (با حجم برابر از هر کدام) آماده شد. سپس به هر کدام از نمونه‌ها (۵۰ میکرولیتر نمونه) ۲۰ میکرولیتر مخلوط پیریدین-BSA اضافه شد.

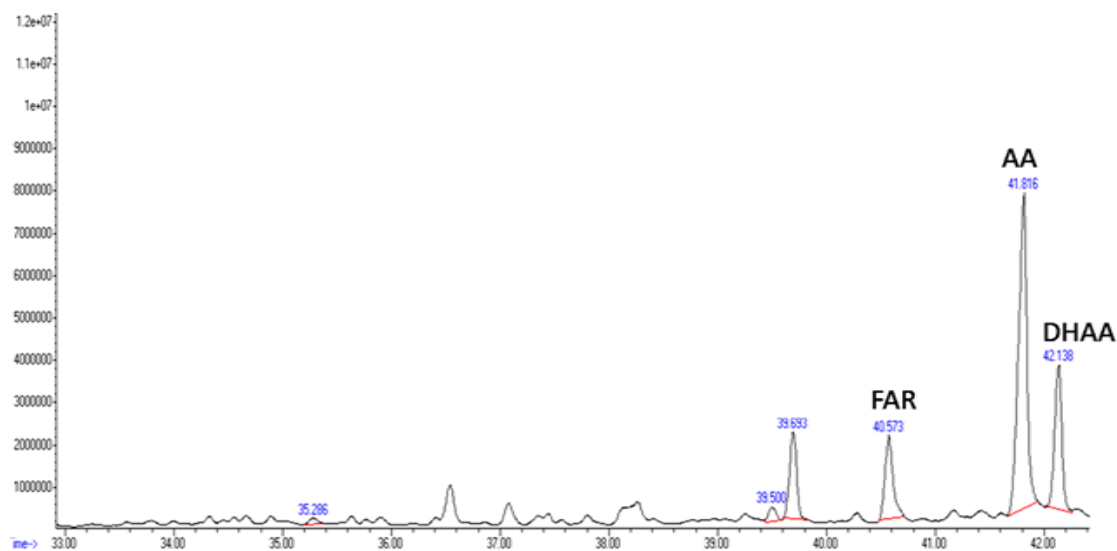
برنامه دمایی مورد استفاده به‌صورت ۱ دقیقه ۶۰ درجه سلسیوس، ۶۰ تا ۱۹۰ درجه سلسیوس به‌صورت ۳ درجه سلسیوس در دقیقه، ۱۹۰ تا ۲۳۵ به‌صورت ۲۰ درجه سلسیوس در هر دقیقه، ۲۳۵ تا ۳۰۰ به‌صورت ۳۰ درجه سلسیوس در هر دقیقه با زمان نگهداری نهایی ۴ دقیقه بود. از گاز هلیوم به عنوان گاز حامل و روش split برای تزریق نمونه‌ها (۲ میکرولیتر از هر نمونه) استفاده شد.

نتایج و بحث

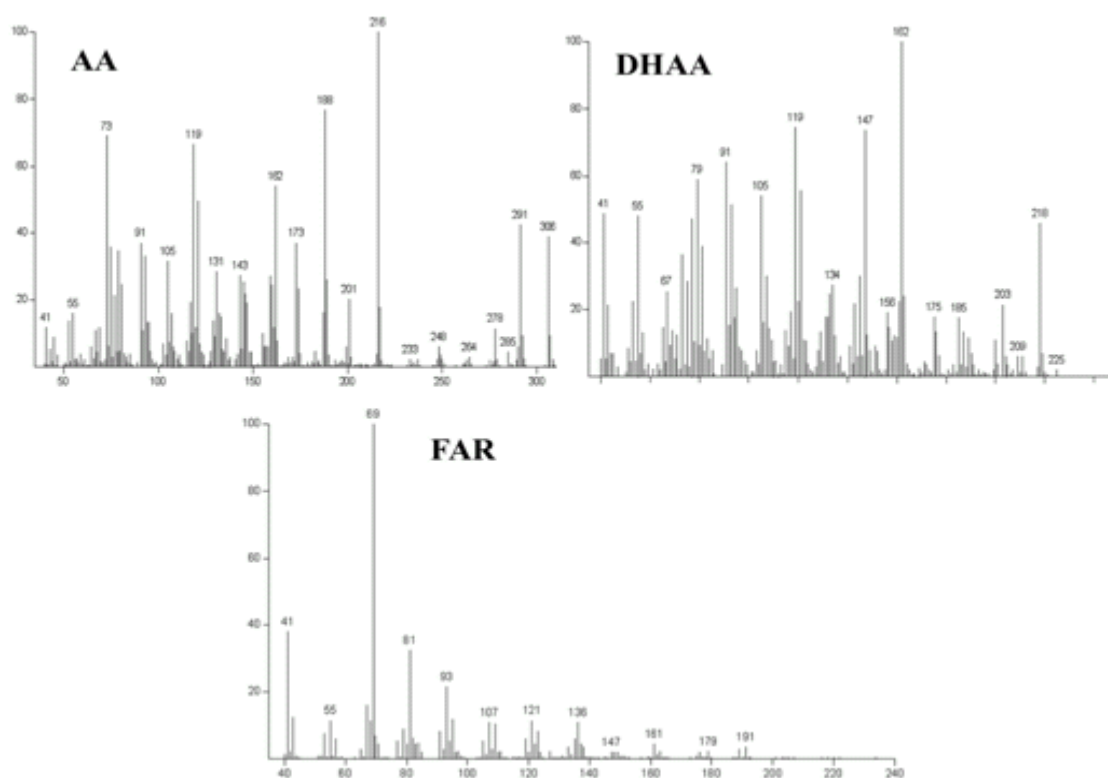
در این پژوهش بیان پنج عامل نسخه‌برداری و دو آنزیم *DBR2* و *OPR3* با استفاده از ناقل ویروسی pEAQ به همراه ژن *p19* بررسی شد. همان‌طور که در مسیر زیست‌ساخت آرتمیزینین دیده می‌شود، فرایند موردنظر تا تشکیل دو سوخت‌وسازگر آرتمیزینیک

آرتمیزینین به‌شمار می‌آید، نقش کلیدی در تولید بالای ترکیب DHAA ایفا می‌کند (Rashidi Monfared *et al.*, 2001). نتایج بالا می‌تواند گویای این واقعیت باشد که بیان ژن یادشده در کموتایپ‌های وحشی بسیار کمتر از کموتایپ آنامد است.

عامل‌های یادشده و دخیل در این فرایند کمک شایانی می‌کند. در واقع دو کموتایپ دارای قابلیت متفاوت در بیان ژن‌های مسیر زیست‌ساختی هستند. آزمایش‌های پیشین نشان داد که بیان ژن *DBR2* که یک ژن کلیدی در تولید DHAA به‌عنوان بستره تولید



شکل ۲. رنگ نگار مربوط به سوخت‌وساز گره‌های FAR، AA و DHAA با استفاده از دستگاه GC-MS مدل GC Agilent 6890



شکل ۳. طیف جرمی سوخت‌وساز گره‌های FAR، AA و DHAA با استفاده از دستگاه GC-MS مدل GC Agilent 6890



شکل ۴. برگ‌های نفوذپذیری تدریجی شده گیاه *A. annua* با استفاده از روش پمپ خلأ که در محیط بسته با میزان رطوبت نسبی بالا نگهداری می‌شوند.

که عامل‌های نسخه‌برداری قادر بودند بیان هم‌زمان چندین ژن در مسیر را بالا ببرند و هرکدام بسترة لازم برای آنزیم بعدی را فراهم کنند. با توجه به اینکه برگ‌های نفوذپذیری تدریجی شده، اتصالی به گیاه اصلی ندارند و در شرایط تاریکی نگهداری می‌شدند در عمل قادر به نورساخت (فتوسنتز) نیستند که خود محدودیتی برای داشتن بسترة اولیه ایجاد می‌کند. ازسوی دیگر چنانچه بیان یک آنزیم پایین باشد، به‌طوری که آن آنزیم بسترة لازم برای آنزیمی که ما بیان آن را بالا برده‌ایم، فراهم نیورد، در عمل آنزیم موردنظر قادر به تولید محصول آن چنانی نیست. شاید دلیل پایین بودن محصول DHAA تولیدشده در برگ‌های گیاه آنامد در این آزمایش با استفاده از افزایش بیان ژن *DBR2* همین باشد.

افزایش بیان ژن *DBR2* در کموتایپ وحشی باعث افزایش میزان تولید DHAA (۲/۶۳ برابر) بالاتر از میزان کنترل شده بود که به لحاظ آماری نیز معنی‌دار بود. با توجه به اینکه در کموتایپ وحشی میزان تولید DHAA بسیار پایین است که به احتمال فراوان ناشی از کاهش بیان ژن *DBR2* است در این آزمایش با افزایش بیان این ژن میزان تولید DHAA بالا رفت. در رابطه با ژن *OPR3* این ژن دارای همسانی بسیار بالایی با ژن *DBR2* است (بیش از ۹۵ درصد). اما راه‌انداز آن با راه‌انداز ژن *DBR2* بسیار متفاوت است. به دلیل همسانی بسیار بالای این دو ژن، احتمال فعالیت همانندی آنها بالا است. اما به‌طور طبیعی با توجه به اینکه این دو ژن دو نوع راه‌انداز متفاوت

نتایج مربوط به بیان موقت ژن‌های همسانه‌شده در ناقل بیانی ویروسی pEAQ در دو کموتایپ وحشی و آنامد با استفاده از آزمون آماری t-test بررسی شد و نتایج به‌طور خلاصه در جدول ۲ آمده است. همان‌طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، تأثیر عامل‌های رونویسی در مقایسه با کنترل (ناقل بدون ژن) معنی‌دار بوده است. اما به‌طور جالب توجهی نتایج افزایش بیان ژن *DBR2* معنی‌دار نبود. میزان سوخت‌وسازگرهای تولیدشده در تیمارهای مختلف نسبت به کنترل بین ۱/۳ (*WRKY3-ANAMED*) تا ۳ برابر (*WRKY1-WILD TYPE1*) است. شاید یکی از دلایلی را که بتوان برای بالا نبودن زیاد سوخت‌وسازگرها در برگ‌های نفوذپذیری تدریجی در مقایسه با کنترل بیان کرد، مربوط به مکان تولید سوخت‌وسازگرهای یادشده است. همان‌طور که بیان شد، سوخت‌وسازگرها این مسیر زیست‌ساختی تنها در کرک‌های حلقوی گیاه تولید می‌شوند. با توجه به اینکه این محدودیت برای این یاخته‌های کرکی در مقایسه با کل یاخته‌های سطح برگ بسیار قابل ملاحظه است، نمی‌توان انتظار بالایی داشت. از سوی دیگر کرک‌های حلقوی سطح برگ حساس هستند به‌طور قطع به هنگام انجام فرایند بالا شاید شمار قابل توجهی از آنها از دست بروند، که نشان از کاهش محدودیت منبع برای پیش‌بیان سازه‌های یادشده در سطوح برگ‌ها که غیر قابل پرهیز می‌نماید، دارد.

اما شاید دلیل پایین بودن فرآورده ژن *DBR2* همسانه‌شده نسبت به عامل‌های نسخه‌برداری این باشد

آنها نقش داشته باشد همچون عامل کلیدی K_m یک آنزیم که توان آنزیم را نشان می‌دهد عامل مهم دیگر جایگاه قرارگیری آنزیم است. آنزیم *CYP71AV1* در غشاً شبکه اندوپلاسمی واقع شده است ولی ژن کلیدی *DBR2* در سیتوزول یاخته‌ای، شناور است. امروز مشخص شده است که میزان تأثیر در محتوای سوخت‌وسازی یک گیاه از طریق عامل‌های تنظیمی خیلی بیشتر از ژن‌های محدودکننده آن مسیر سوخت‌وسازی است. در واقع این بدین معنی است که تنظیم تعاونی گونه مسیره‌های سوخت‌وسازی تأثیر زیادی روی محتوای سوخت‌وسازی گیاهان دارد (Iwase et al., 2009).

Ma et al. (2009) با استفاده از روش نفوذپذیری تدریجی اگروباکتريوم پمپ خلأ عامل رونویسی *AaWRKY1* را در گیاه *A. annua* افزایش بیان دادند. سپس مشاهده کردند که بیان ژن *ADS*، *CYP71AV1* و *DBR2* به ترتیب نزدیک به ۷، ۳ و ۴ برابر افزایش پیدا کرد. در یک تحقیق که توسط Fiore et al. (2009) صورت پذیرفت آنان با استفاده از روش بیان موقت دو ژن *str1* و *tdc* را که در زیست‌ساخت ایندول ترپنوئیدها در گیاه *Catharanthus roseus* نقش دارند در این گیاه افزایش بیان دادند. سپس با استفاده از روش ایمونوبلات مشخص کردند که میزان بیان ژن‌های مربوطه بسیار بالا بود. همچنین Kim et al. (2010) ژن عامل رونویسی *IbMYB1* را در گیاه *sweet potato* به صورت موقت بیان کردند. نتایج آنان نشان داد که این ژن باعث افزایش آنتوسیانین‌ها در برگ سیب‌زمینی می‌شود. عامل‌های رونویسی دیگری نیز شناسایی شده است که در مسیر سوخت‌وسازی ترپنوئیدها نقش دارند برای مثال *GaWRKY1* نقش مهمی در تولید سسکویی‌ترین‌های گیاه پنبه دارد.

Mahjoub et al. (2009) عامل رونویسی *VvMYB5b* را در گیاه گوجه‌فرنگی بیان و مشاهده کردند این عامل رونویسی روی تولید سوخت‌وسازگرهای ثانویه مسیره‌های ترپنوئیدی و فنولیکی اثر داشت. از سوی دیگر عامل رونویسی *OS MYB4* در گیاه برنج نقش مهمی در تحمل به سرما دارد. به‌طوری که Vannini et al. (2006) نشان دادند که این عامل رونویسی

داشتند، با استفاده از بانک اطلاعاتی EST گیاه *A. annua* ویژه کرک‌ها مشخص شد که این ژن نیز در کرک‌ها بیان می‌شود، ولی کارکرد مشخصی برای آن گزارش نشده است. نتایج بیان موقت این ژن در برگ‌های گیاه آرتمیزیان نشان داد که هر چند میزان DHAA تولیدشده در مقایسه با گیاه کنترل بالا بود (در گیاه آنامد و وحشی) اما به لحاظ آماری معنی‌دار نیست.

به نظر می‌آید که دو عامل رونویسی *MYB1* و *WRKY1* جایگاه‌هایی در بالادست ژن‌های مسیر زیست‌ساخت آرتمیزینین دارند. به صورت جالب توجهی افزایش بیان دو عامل رونویسی *MYB1* و *WRKY1* باعث افزایش معنی‌دار میزان سوخت‌وسازگر DHAA (به ترتیب ۱/۴۲ و ۱/۵۶ برابر نسبت به کنترل) و همچنین باعث افزایش میزان سوخت‌وسازگر AA (به ترتیب ۱/۴۶ و ۳ برابر نسبت به کنترل) به صورت معنی‌دار در کموتایپ وحشی شدند. به نظر می‌رسد که این دو عامل رونویسی به احتمال دارای جایگاه‌های در بالا دست ژن *DBR2* و یا ژن‌های دیگر مسیر زیست‌ساخت آرتمیزینین باشند. البته افزایش بیان سه عامل رونویسی *MYB1*، *WRKY1* و *MYB2* باعث افزایش معنی‌دار سوخت‌وسازگر AA (به ترتیب ۱/۵۳، ۱/۳۸ و ۲/۷ برابر نسبت به کنترل) در کموتایپ آنامد نیز شده‌اند.

در واقع این عامل‌های رونویسی باعث افزایش بیان ژن‌های مسیر زیست‌ساخت آرتمیزینین شده‌اند. در بررسی پیشین نتایج تجزیه راه‌انداز ژن‌های دخیل در زیست‌ساخت آرتمیزینین نشان داد که این راه‌اندازها عناصر تنظیمی فراوانی برای اتصال به عامل‌های رونویسی متعلق به خانواده *WRKY* و *MYB* دارند (Ranjbar et al., 2014). بایستی توجه کرد که بین دو آنزیم کلیدی *CYP71AV1* و *DBR2* می‌تواند رقابت زیستی برای بستر آرتمیزینیک آلدئید وجود داشته باشد زیرا این دو آنزیم با استفاده از این بستره، دو ترکیب AA و DHAA را به وجود می‌آورند. چنانچه میزان بیان این دو ژن با هم تفاوت معنی‌داری داشته باشد، می‌تواند روی هدایت بیشتر بستره مشترک‌شان یعنی ترکیب آرتمیزینیک آلدئید تأثیر معنی‌داری بگذارد. اگرچه در مورد رقابت دو آنزیم با همدیگر می‌تواند عامل‌های دیگری افزون بر میزان بیان ژن‌های

در تحقیقات پیشین می‌توان نتیجه گرفت که افزایش بیان دو عامل رونویسی *MYB1* و *WRKY1* باعث افزایش معنی‌دار میزان سوخت‌وسازگر DHAA و همچنین باعث افزایش میزان سوخت‌وسازگر AA می‌شود. به نظر می‌رسد که این دو عامل رونویسی به احتمال جایگاه‌های در بالا دست ژن *DBR2* و یا ژن‌های دیگر مسیر زیست‌ساخت آرتیمیزینین داشته باشند. به یقین بررسی‌های بیشتر مولکولی و نیز توالی‌های بالادست برای اثبات این موضوع مورد نیاز خواهد بود.

می‌تواند ۲۵۴ ژن یعنی حدود ۲۲ درصد از کل ژن‌های دخیل در فرایندهای تنظیمی و انتقال پیام را کنترل کند. همچنین با افزایش بیان این عامل رونویسی نه تنها ژن‌های دخیل در فرایند تحمل و سازش به سرما تنظیم شد بلکه ژن‌های دخیل در تحمل به تنش‌های غیرزنده دیگر نیز کنترل شدند. در واقع فعالیت بسیاری از این ژن‌ها باعث تولید سوخت‌وسازگرهای ثانویه فراوانی می‌شوند که در تحمل به سرما نقش دارند. در حقیقت در مقایسه با عامل‌های رونویسی مورد بررسی

جدول ۲. نتایج بیان موقت عامل‌های رونویسی *WRKY* و *MYB* و ژن‌های *DBR2* و *OPR3* در کموتایپ‌های وحشی و آنامد برای سوخت‌وسازگرهای نهایی مرحله آنزیمی (AA و DHAA) مسیر زیست‌ساخت آرتیمیزینین با استفاده از روش نفوذپذیری تدریجی

اگر و باکتریوم

شماره	تیمارها	سوخت‌وسازگرها	سطح معنی‌داری*	نسبت تولید
۱	<i>DBR2</i> -ANAMED	DHAA	0.282	1.18
۲	<i>OPR3</i> - ANAMED	DHAA	0.166	1.18
۳	<i>MYB2</i> - ANAMED	DHAA	0.014	1.73
۴	<i>WRKY1</i> - ANAMED	DHAA	0.002	1.78
۵	<i>MYB1</i> - ANAMED	DHAA	0.003	2.22
۶	<i>WRKY2</i> - ANAMED	DHAA	0.000	1.53
۷	<i>WRKY3</i> - ANAMED	DHAA	0.003	1.3
۸	<i>MYB1</i> - ANAMED	AA	0.021	1.53
۹	<i>WRKY1</i> - ANAMED	AA	0.02	1.38
۱۰	<i>MYB2</i> - ANAMED	AA	0.034	2.7
۱۱	<i>MYB1</i> -WILD TYPE	AA	0.036	1.46
۱۲	<i>WRKY1</i> - WILD TYPE	AA	0.000	3.00
۱۳	<i>DBR2</i> - WILD TYPE	DHAA	0.002	2.63
۱۴	<i>MYB1</i> -WILD TYPE	DHAA	0.033	1.42
۱۵	<i>WRKY1</i> - WILD TYPE	DHAA	0.0085	1.56

* اعداد بیشتر از ۰/۰۵ بیانگر نبود تفاوت معنی‌دار برای آزمون t است.

کشور در زمینه حمایت مالی این پروژه در قالب طرح شماره ۹۰۰۰۲۲۷۱ تشکر و قدردانی می‌گردد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران

REFERENCES

- Borrone, J.W., Meerow, A.W., Kuhn, D.N., Whitlock, B.A. & Schnell, R.J. (2007). The potential of the *WRKY* gene family for phylogenetic reconstruction: An example from the Malvaceae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 44, 1141-1154.
- Bouwmeester, H.J., Wallaart, T.E., Janssen, M.H., van Loo, B., Jansen, B.J., Posthumus, M.A., Broun, P., Liu, Y., Queen, E., Schwarz, Y., Lleba, M. & Leibman, A.M. (2006). Importance of transcription factors in the regulation of plant secondary metabolism and their relevance to the control of terpenoid accumulation. *Phytochem Rev*, 5, 27-38.
- Bouwmeester, H.J., Wallaart, T.E., Janssen, M.H., van Loo, B., Jansen, B.J., Posthumus, M.A., Schmidt, C.O., De Kraker, J.W., Konig, W.A. & Franssen, M.C. (1999). Amorpho-4, 11-diene synthase catalyses the first probable step in artemisinin biosynthesis. *Phytochemistry*, 52, 843-854.

4. Capell, T. & Christou, P. (2004). Progress in plant metabolic engineering. *Current Opinion in Biotechnology*, 15, 148-154.
5. Covello, P.S., Teoh, K.H., Polichuk, D.R., Reed, D.R. & Nowak, G. (2007). Functional genomics and the biosynthesis of artemisinin. *Phytochemistry*, 68, 1864-1871.
6. Iwase, A., Matsui, K & Ohme-Takagi, M. (2009). Manipulation of plant metabolic pathways by transcription factors. *Plant Biotechnology*, 26, 29-38.
7. Kim, C.Y., Ahn, Y.O., Kim, S.H., Kim, Y.H., Lee, H.S., Catanach, A.S., Jacobs, J.M., Conner, A.J. & Kwak S.S. (2010). The sweet potato *IbMYB1* gene as a potential visible marker for sweet potato intragenic vector system. *Physiologia Plantarum*, 139, 229-240.
8. Lommen, W.J., Schenk, E., Bouwmeester, H.J. & Verstappen, F.W. (2006). Trichome dynamics and artemisinin accumulation during development and senescence of *Artemisia annua* leaves. *Planta Med.*, 72, 336-345.
9. Ma, Dongming., Gaobin, Pu., Caiyan, Lei., Lanqing, Ma., Huahong, W., Yanwu, G., Jianlin, C., Zhigao, D., Hong, W., Guofeng, L., Hechun, Y. & Benye, L. (2009). Isolation and Characterization of AaWRKY1, an *Artemisia annua* Transcription Factor that Regulates the Amorpha-4, 11-diene Synthase Gene, a Key Gene of Artemisinin Biosynthesis. *Plant Cell Physiology*, 50, 2146-2161.
10. Mahjoub, A., Hernould, M., Joubé, J., Decendit, A., Mars, M., Barrieu, F., Hamdi, S. & Delrot, S. (2009). Overexpression of a grapevine R2R3-MYB factor in tomato affects vegetative development, flower morphology and flavonoid and terpenoid metabolism. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47, 551-561.
11. Olofsson, L., Engström, A., Lundgren, A. & Brodelius, P.E. (2011). Relative expression of genes of terpene metabolism in different tissues of *Artemisia annua* L. *BMC Plant Biology*, 45, 1-12.
12. Olsson, M.E., Olofsson, L.M., Lindahl, A.L., Lundgren, A., Brodelius, M. & Brodelius, P. E. (2009). Localization of enzymes of artemisinin biosynthesis to the apical cells of glandular secretory trichomes of *Artemisia annua* L. *Phytochemistry*, 70, 1123-1128.
13. Petroni, K., Falasca, G., Calvenzani, V., Allegra, D., Stolfi, C., Fabrizi, L., Altamura, M.M. & Tonelli, C. (2008). The *AtMYB11* gene from *Arabidopsis* is expressed in meristematic cells and modulates growth in planta and organogenesis *in vitro*. *Journal of Experimental Botany*, 59, 1201-1213.
14. Ranjabar, M., Naghavi, M.R. & Alizadeh, H. (2014). Comparative analysis of ADS gene promoter in seven *Artemisia* species. *Journal of Genetics*, 93. (in Press)
15. Rashidi Monfared, S., Naghavi, M.R., Yazdi samadi, B., Alizadeh, H. & Soltanlou, H. (2011). Study of expression regulation of the key gene ADS of artemisinin biosynthesis pathway in different Iranian *Artemisia annua* genotypes. *Iranian Journal of Field Crop Science*, 42(2), 409-419.
16. Sainsbury, F., Thuenemann, E.C. & Lomonosoff, G.P. (2009). pEAQ: versatile expression vectors for easy and quick transient expression of heterologous proteins in plants. *J Plant Biotechnol*, 7, 682-693.
17. Teoh, K.H., Polichuk, D.R., Reed, D.W. & Covello, P.S. (2009). Molecular cloning of an aldehyde dehydrogenase implicated in artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua*. *Botany*, 87, 635-642.
18. Vannini, C., Iriti, M., Bracale, M., Locatelli, F., Faoro, F., Croce, P., Pirona, R., Di Maro, A., Coraggio, I. & Genga, A. (2006). The ectopic expression of the rice *Osmyb4* gene in *Arabidopsis* increases tolerance to abiotic, environmental and biotic stresses. *Physiology and Molecular Plant Pathology*, 69, 26-42.
19. Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P. & Baulcombe, D. (2003). An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the *p19* protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J*, 33, 949-956.
20. Wallaart, T.E., Bouwmeester, H.J., Hille, J., Poppinga, L. & Majjers, N.C. (2001). Amorpha-4,11-diene synthase: cloning and functional expression of a key enzyme in the biosynthetic pathway of the novel antimalarial drug artemisinin. *Planta*, 212, 460-465.
21. Wang, J.W., Zheng, L.P., Zhang, B. & Zou, T. (2009). Stimulation of artemisinin synthesis by combined cerebroside and nitric oxide elicitation in *Artemisia annua* hairy roots. *Appl Microbiol Biotechnol*, 85, 285-292.
22. Weathers, P.J., Bunk, G. & McCoy, M.C. (1997). Effects of gibberellic acid on hairy root cultures of *Artemisia annua*: growth and artemisinin production. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 41, 47-53.
23. White, N.J. (2004). Anti-malarial drug resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, 113, 1084-1092.
24. Wray, G., Matthew, A., Hahn, W. Abouheif, E., Balhoff, J.P., Pizer M., Rockman, M.V. & Romano, L.A. (2003). The Evolution of Transcriptional Regulation in Eukaryotes. *Molecular Biology Evolution*, 20, 1377-1419.
25. Yanhui, C., Xiaoyuan, Y., Kun, H., Meihua, L., Jigang, L., Zhaofeng, G., Zhiqiang, L., Yunfei, Z., Xiaoxiao, W., Xiaoming, Q., Yunping, S., Li, Z., Xiaohui, D., Jingchu, L., Xing-Wang, Chen, D., Gu Hongya, Z. & Li-Jia, Q. (2006). The MYB transcription factor superfamily of *Arabidopsis*: expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family. *Plant Molecular Biology*, 60, 107-124.

Transient expression of transcription factors belonging to WRKY and MYB family and two enzymes DBR2 and OPR3 in two *Artemisia annua* chemotypes (ANAMED and Iranian wild type) in order to increase the artemisinin production

**Sajad Rashidi Monfared¹, Mohammad Reza Naghavi^{2*}, Bahman Yazdi Samadi³,
Hooshang Alizadeh⁴, Key Yang⁵, Anneli Lundgren⁶ and Peter E Brodelious⁷**

1. Post Graduate Student, University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj and Assistant Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2, 3, 4. Professors and Assistant Professor, University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

5, 6, 7. School of Natural Sciences, Linnaeus University, Kalmar, Sweden

(Received: Sep. 15, 2014 - Accepted: Apr. 14, 2015)

ABSTRACT

Artemisia annua is an annual herb native to Asia most probably China produce one of the most important sesquiterpene namely artemisinin which has antimalarial and anticancer activity. Three transcription factors belonging to *WRKY* family, two transcription factors belonging to *MYB* family and two enzymes DBR2 and OPR3 were isolated from *A. annua* leaves and first inserted into pJET1.2 vector then sub cloned into cowpea mosaic virus (CPMV) based viral vector (pEAQ-HT). The genes were transiently expressed in *A. annua* young leaves of two different chemotypes ANAMED and Iranian wild type under the control of a constitutive cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter as vacuum infiltration. An agroinfiltration method was carried out for transient expression of different genes. The analysis of metabolites by GC-MS method showed that the transcription factors which have expressed transiently, could effect on the rate of DHAA and AA metabolites. The results show that the TFs (*WRKY* and *MYB*) are involved in artemisinin biosynthesis pathway.

Keywords: artemisinin, GC-MS, transcription factors, transient expression.