

الگوی بیان ژن‌های کدکننده بیوستتر سسکوئی‌ترپن‌ها در گونه‌های مختلف آرتیمیزیا

Expression profiling of sesquiterpenes encoding genes in different *Artemisia* species

سارا رئیسی^۱، محمدرضا نقوی^{۱*}، علی‌رضا طالعی^۱، حسن سلطانلو^۲، مجتبی رنجبر^۳

۱- به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استادان، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج،
ایران

۲- استادیار، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، گرگان، ایران

۳- استادیار، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران

Raeisi S¹, Naghavi MR¹, Taleei AL¹, Soltanloo H², Ranjbar M³

1-MS Student, Professors, University College of Agriculture and Natural
Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

2-Assistant Professor, Gorgan University of Agriculture Sciences and Natural
Resources

3-Assistant professor, Amol University of Special Modern Technologies

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mnaghavi@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۳/۲/۱۳ - تاریخ پذیرش: ۹۴/۲/۱۵)

چکیده

گیاهان دارویی از زمان‌های دور نقش مهمی در طب سنتی داشته‌اند. متابولیت‌های ثانویه تولید شده توسط گیاهان، کاربردهای فراوانی در علم پزشکی، داروسازی و صنعت دارند. جنس آرتیمیزیا به دلیل تولید سسکوئی‌ترپن آرتیمیزینین و بسیاری دیگر از ترکیبات مفید حائز اهمیت است. سسکوئی‌ترپن‌های مختلف توسط آنزیم‌های ترپن سنتاز از پیش ماده مشترک فارنسیل دی‌فسفات حاصل تولید می‌شوند. در این مطالعه هفت گونه آرتیمیزیای بومی ایران کشت شدند. نمونه‌گیری از بافت گل‌ها در مرحله به گل رفتن گیاهان در سه تکرار زیستی انجام گرفت و بیان نسبی یک پرنیل ترنسفراز (فارنسیل دی‌فسفات) و دو سسکوئی‌ترپن سنتاز (بتاکاریوفیلین سنتاز، بتافارنسن سنتاز) توسط Real-time PCR مورد بررسی قرار گرفت و گونه *Artemisia annua* به‌عنوان گونه مرجع در نظر گرفته شد و سایر گونه‌ها نسبت به آن مقایسه شدند. همچنین روش GC-MS برای اندازه‌گیری میزان ترکیبات تولید شده نهایی توسط هر یک از ترپن سنتازها به کار گرفته شد. نتایج نشان داد که داده‌های حاصل از بررسی بیان ترپن سنتازها با داده‌های به دست آمده از GC-MS تا اندازه‌ای هم‌خوانی داشت. گونه *A. scoparia* بیش‌ترین سطح رونویسی برای ترپن سنتازهای مورد مطالعه را نشان داد. به‌علاوه نتایج حاصل از GC-MS بالاترین میزان تولید بتاکاریوفیلین سنتاز و بتافارنسن سنتاز را در این گونه نشان داد. بر اساس نتایج این تحقیق می‌توان بیان کرد که مسیرهای بیوستتزی سسکوئی‌ترپن‌ها توسط سسکوئی‌ترپن سنتازهای اختصاصی همان مسیر تنظیم می‌شود.

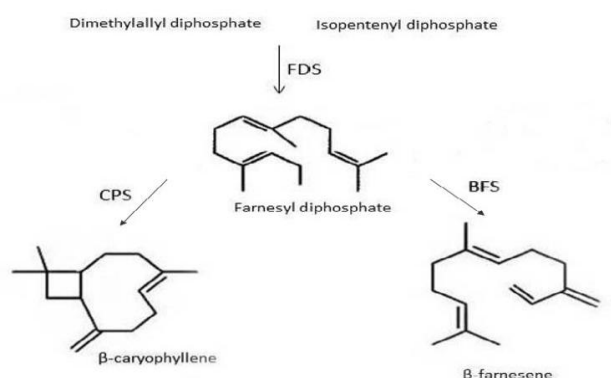
واژه‌های کلیدی

آرتیمیزیا
آرتیمیزینین
ترپن سنتاز
متابولیت‌های ثانویه

مقدمه

اهمیت گیاهان دارویی به علت وجود ترکیباتی از قبیل فیر، ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها، ویتامین‌ها و متابولیت‌های اولیه و ثانویه می‌باشد که دارای نقش دفاعی در برابر میکروب‌ها، قارچ‌ها و شماری از بیماری‌ها هستند (Fan et al. 2007; Liu et al. 2008). گیاه آرتمیزیای نیز دارای مقدار قابل توجهی منوترپن، سسکویی‌ترپن، ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها و غیره می‌باشد (Ferreira et al. 2010). آرتمیزیای (*Artemisia sp.*) از خانواده گل ستارگان، در ایران دارای ۳۵ گونه می‌باشد (Abad et al. 2012) و گونه *A. annua* اصلی‌ترین منبع تولید آرتمیزیین در حال حاضر می‌باشد. اولین مطالعه برای تجزیه اسانس در گونه *A. annua* به سال ۱۹۱۷ بازمی‌گردد (Asahina et al. 1917). در سال‌های اخیر علاوه بر گونه *A. annua* مقادیری آرتمیزیین در گونه‌های دیگری از این جنس گیاهی یافت شد که از این بین می‌توان به *A. cina* (Aryanti et al. 2001)، *A. sieberi* (Arab et al. 2006)، *A. absinthium* (Zia et al. 2007) و *A. indica* (Mannan et al. 2008) اشاره کرد. به دلیل اهمیت گونه‌های تولیدکننده آرتمیزیین، هفت گونه بومی ایران که موضوع بسیاری از مطالعات اخیر بوده‌اند، در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفتند.

ترپن‌ها مهم‌ترین گروه متابولیت‌های ثانویه در گیاهان محسوب می‌شوند. تنوع بالای این ترکیبات به دلیل فراوانی آنزیم‌های تولیدکننده آن‌ها یعنی ترپن‌سنتازها و همچنین توانایی این کاتالیزورها در تشکیل محصولات متفاوت چند گانه از یک پیش ماده مشترک (فارنسیل دی‌فسفات^۱) است (Bick et al. 2003). این پیش‌ماده مشترک توسط آنزیم فارنسیل دی‌فسفات سنتاز^۲ (FDS) حاصل می‌شود (شکل ۱). تحقیقات نشان داده که ترپن سنتازهای مختلف بر سر استفاده از این پیش‌ماده با هم در رقابت هستند (Olofsson et al. 2011). به عنوان یکی از راه‌های افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان می‌توان به مهندسی تنظیمی مسیرهای بیوستنزی اشاره کرد، لازمه این مهم شناخت ژن‌های دخیل در مسیر بیوستنزی و میزان بیان آنها در ژنوتیپ‌های مختلف می‌باشد. شناخت آنزیم‌های دخیل در مسیرهای بیوستنزی



شکل ۱- مسیر تولید ترکیبات و نقش فارنسیل دی‌فسفات (FDS) به عنوان پیش ماده مشترک ترپن سنتازها (CPS و BFS)

ترپن‌ها و همچنین آگاهی از نحوه عملکرد ژن‌های مرتبط با این آنزیم‌ها می‌تواند ما را به سوی شناخت مسیرهای انشعابی و ترکیبات تولیدی در هر یک از این مسیرها سوق دهد. بتاکاریوفیلین سسکویی‌ترپنی است که توسط آنزیم بتاکاریوفیلین سنتاز^۳ (CPS) از پیش‌ماده FDP به وجود می‌آید. این ترکیب و مشتقات آن دارای خاصیت ضد التهاب (Martin et al. 1993; Zheng et al. 1992; Kubo et al. 1996)، ضد سرطان (Tambe et al. 1996)، بی‌حس کننده موضعی، بازدارنده زخم‌های مخاط معده، ضدباکتری و آنتی‌اکسیدان می‌باشند (Kubo et al. 1996; Legault and Pichette 2007) و همچنین می‌توانند در سیستم دفاعی گیاه نقش داشته باشند (Ulubelen et al. 1994) همچنین بتافارنسنین ترکیبی است که در گیاهان و همچنین در جانوران تولید می‌شود. این ترکیب به عنوان ترکیبی نیمه شیمیایی در حشرات و گیاهان مورد استفاده قرار می‌گیرد (Picaud et al. 2005).

در سال‌های اخیر تلاش‌های بسیاری برای افزایش میزان متابولیت‌های ثانویه انجام گرفته‌است (Sekar and Kandavel 2010). از این رو تلاش برای شناخت منابع طبیعی برای استخراج این ترکیبات با ارزش و جداسازی آن‌ها می‌تواند از برنامه‌های آینده محققین باشد. هدف از این بررسی شناسایی دو سسکویی-ترپن مهم و نیز بررسی بیان نسبی ژن‌های اختصاصی کدکننده بیوستنز آن‌ها (سسکویی‌ترپن سنتازهای CPS، بتافارنسنین سنتاز

¹ Farnesyl diphosphate

² Farnesyl pyrophosphate synthase

³ β -caryophyllene synthase

میکرولیتر آنزیم Taq پلی مراز، یک میکرولیتر dNTP، ۲ میکرولیتر بافر و ۱/۲ میکرولیتر $MgCl_2$ و آب دو بار تقطیر بوده است.

جدول ۱- هفت گونه آرتمیزیای مورد مطالعه و محل جمع‌آوری آن‌ها

نام گونه	استان	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی	ارتفاع
<i>A. absinthium</i>	اردبیل	۳۸۲۶۰۷۷	۴۸، ۴۸۳۴۵۱	۱۴۸۷
<i>A. annua</i>	گلستان	۳۷۲۳۵۵	۱۲، ۵۵۴۷۴۹	۴۸۱
<i>A. diffusa</i>	سمنان	۳۶۴۲۴۳	۳۰، ۵۵۱۵۴۵	۱۶۴۶
<i>A. scoparia</i>	مازندران	۳۶۰۹۲۲	۳۶، ۵۲۱۵۳۰	۱۰۴۷
<i>A. spicigera</i>	گلستان	۳۶۱۱۱۵	۳۰، ۵۱۴۷۲۳	۲۰۹۶
<i>A. sieberi</i>	تهران	۳۵۲۱۱۱	۱۸، ۵۲۰۰۲۳	۱۰۴۴
<i>A. vulgaris</i>	گلستان	۳۷۲۳۴۶	۴۲، ۵۵۴۵۵۱	۴۲۸

شرایط دمایی برای تکثیر، ۱۸۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، سپس ۲۸ چرخه شامل ۴۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و ۴۰ ثانیه در دمای ۷۲ سانتی‌گراد و در پایان یک چرخه ۳۰۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. نتیجه حاصل از این واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بر روی ژل آگارز یک درصد بررسی شد.

واکنش Real-time PCR با استفاده از دستگاه iQ5 (BIO-RASAD) صورت گرفت. حجم هر واکنش شامل ۱۰ میکرولیتر SYBR Bio Pars (GUASNR) 2X، یک میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای پیش‌رو و پس‌رو (غلظت ۱۰ پیکومول)، ۵ میکرولیتر cDNA (با غلظت ۳۰۰ نانوگرم در میکرولیتر) و ۳ میکرولیتر آب عاری از RNase بود. طراحی آغازگرها توسط نرم‌افزار Primer3 و Oligo Analyzer انجام گرفت. آغازگر مربوط به ژن مرجع 18S rRNA بر اساس (Zang et al. 2008) انتخاب شد (جدول ۲).

(BFS^۱) توسط (real-time PCR) در هفت گونه آرتمیزیای بومی ایران می‌باشد. مطالعات فیتوشیمیایی اغلب بر روی اندام‌های هوایی این گیاه (برگ، ساقه و گل) انجام گرفته‌است (Brown et al. 2003) و از آنجا که بیشترین میزان تولید ترکیب آرتمیزینین در اغلب گونه‌های این گیاه در مرحله گلدهی مشاهده شده است (Mannan et al. 2010)، هدف این مطالعه بررسی بیان ژن‌ها و تولید ترکیبات در مرحله گل‌دهی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه هفت گونه آرتمیزیای بومی ایران (شامل *A. Annua*، *A. absinthium*، *A. diffusa*، *A. scoparia*، *A. sieberi spicigera* و *A. vulgaris*) از پنج استان کشور جمع‌آوری شدند (جدول ۱). بذور با هیپوکلریت سدیم ۲۰ درصد ضدعفونی و سپس سه بار با آب مقطر شستشو داده شدند، و به مدت دو هفته با شدت نور ۳۰۰۰ لوکس و هشت ساعت تاریکی در پتری دیش قرار داده شدند. پس از آن بذور جوانه‌زده به گلدان‌های پلاستیکی کوچک منتقل شدند و در ادامه گلدان‌ها به مدت ۲۱ روز در شرایط دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۵۵ درصد، شدت نوری ۵۰۰۰ لوکس و هشت ساعت تاریکی در اتاقک رشد نگهداری و سپس به گلدان‌های بزرگ‌تر منتقل شدند و تا مرحله گلدهی در شرایط دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۵۵ درصد، شدت نوری ۷۰۰۰ لوکس و هشت ساعت تاریکی در اتاقک رشد نگهداری شدند.

نمونه‌گیری از گیاهان در زمان به گل رفتن گیاه و از قسمت گل-های جوان و جوانه‌های برگی پایین گل در سه تکرار زیستی انجام گرفت. استخراج RNA توسط کیت RNasy Plant Mini Kit (کیاژن، آمریکا) و سنتز cDNA به وسیله کیت RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis K1622 (فرمتاز، آلمان) صورت گرفت. برای اطمینان از cDNA سنتز شده، با استفاده از ژن مرجع 18S- rRNA بر روی همه cDNAها واکنش زنجیره‌ای پلیمرز انجام گرفت. حجم هر واکنش ۲۵ میکرولیتری PCR شامل ۱/۵ میکرولیتر cDNA، یک میکرومتر از هر کدام از آغازگرهای پیش‌رو و پس‌رو (غلظت ۱۰ پیکومول)، یک

¹ β -farnesene synthase

جدول ۲- توالی آغازگرهای مورد استفاده در Real-time PCR

نام آغازگر	توالی آغازگر رفت (5'→3')	توالی آغازگر برگشت (3'→5')	طول قطعه (bp)	دمای ذوب (سانتی‌گراد)
FDS	CTGCCCTTGGTTGGTGTATT	ATTCTCGGGACATGGTTACG	169	60
CPS	GAGGCATTGCGTTACATTCC	CCACCACCTGGAACTTCG	135	60
BFS	ATGAAGCGGCATTTATGAGG	CCTCATCGTGGGATGTTTCT	222	60
18s rRNA	GCAACAAACCCCGACTTCTG	TGCGATCCGTCGAGTTATCA	110	60

نتایج و بحث

بررسی بیان نسبی ژن پرنیل ترنسفرز FDS در گل گونه‌های مورد مطالعه در مقایسه با *A. annua* (شکل ۲)، نشان می‌دهد که سه گونه *A. scoparia*، *A. sieberi* و *A. spicigera* بیان بالاتری نسبت به *A. annua* داشته‌اند و سه گونه دیگر (*A. absinthium*، *A. diffusa* و *A. vulgaris*) میزان بیان کمتری نسبت به گونه مرجع از خود نشان داده‌اند. بیشترین و کمترین بیان ژن این آنزیم به ترتیب به دو گونه *A. sieberi* با ۳/۸۶ برابر بیان بیشتر و *A. vulgaris* با ۹/۴۹- برابر بیان کمتر نسبت به گونه مرجع اختصاص دارد.

مقایسه بیان ژن کد کننده آنزیم CPS که تبدیل FDP را به بتاکاریوفیلین بر عهده دارد (Cai et al. 2000) و ژن کد کننده آنزیم BFS که کدکننده مسیر تولید بتافارنسنین از پیش ماده اصلی FDP می‌باشد (Picaud et al. 2005) نشان می‌دهد که گونه *A. scoparia* تنها گونه‌ای است که برای هر دو ژن بیان بالاتری را نسبت به گونه مرجع داشته است (شکل ۳). *A. spicigera* میزان بیان بیشتری از BFS را داشته و سایر گونه‌ها برای هر دو ژن سطح بیان پایین‌تری را در مقایسه با گونه مرجع داشته‌اند. همانطور که مشاهده می‌شود بیشترین و کمترین میزان بیان ژن CPS به ترتیب مربوط به دو گونه *A. scoparia* (۳۶/۲۸) و *A. vulgaris* (۱۰/۷۴-) می‌باشد. دو گونه *A. scoparia* و *A. sieberi* نیز با (۳/۳) و (۱۴/۲۲-) به ترتیب بالاترین و پایین‌ترین میزان بیان را در مورد BFS به خود اختصاص داده‌اند.

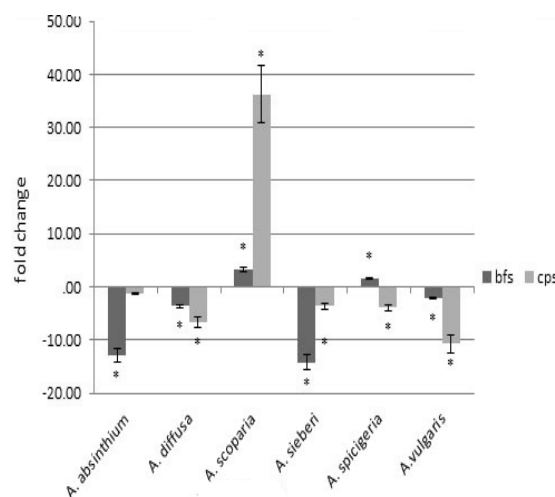
HP-5MS داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار REST 2002 و بر اساس روش $\Delta\Delta C_t$ تجزیه و تحلیل شدند (Pfaffl et al. 2002). از آنجا که تا کنون اغلب مطالعات در جنس آرتیمیزیا بر روی گونه *A. annua* انجام گرفته شده‌است، در این مطالعه این گونه به عنوان مبنا در نظر گرفته شد و سایر گونه‌ها از نظر میزان بیان نسبی ژن-های مورد مطالعه با گونه *A. annua* مقایسه شدند.

تجزیه اسانس توسط روش GC-MS صورت گرفت. برای این منظور ابتدا ۲۰۰ میلی گرم از نمونه‌های خشک شده به همراه چهار بید داخل تیوب شیشه‌ای ریخته شد و به هر تیوب دو میلی لیتر هگزان اضافه و تیوب‌ها به مدت دو دقیقه ورتکس شدند. تیوب‌ها به مدت چهار ساعت در دمای اتاق قرار گرفته و سپس نمونه‌ها فیلتر و آماده تزریق به دستگاه GC-MS شدند (Munoz- Bertomeu et al. 2006). تجزیه اسانس به وسیله دستگاه (Agilent Technologies 7890A) با یک MSD (۵۹۷۵) و ستون به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میلی متر و ضخامت لایه ۰/۲۵ میکرومتر انجام شد. تزریق در حالت شکافته با دمای ورودی ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. برنامه دمایی آون به این ترتیب بود: دمای ابتدایی ۶۰ درجه سانتی‌گراد و توقف در این دما به مدت سه دقیقه، افزایش دما تا ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد با گرادیان دمایی سه درجه سانتی‌گراد در دقیقه، توقف در این دما به مدت یک دقیقه، افزایش دما تا ۲۶۰ درجه سانتی‌گراد با شیب گرادیان مشابه مرحله قبل و توقف در این دما به مدت ۱۰ دقیقه. از گاز هلیوم با سرعت جریان یک میلی لیتر در دقیقه و متوسط سرعت یک سانتی متر در ثانیه به عنوان گاز حامل استفاده شد. به علاوه دمای منبع یونیزاسیون ۲۳۰ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد.

سنتازها می‌تواند سبب سنتز آرتیمیزینین شود (Chen et al. 2000). بنابراین تنها بیان ژن‌های اختصاصی کدکننده مسیر بیوستز یک سسکویی‌ترین بر میزان تولید نهایی محصول اثرگذار است. به عنوان مثال در صورت افزایش سطح بیان ژن کدکننده آمورفا ۴،۱۱-داین سنتاز^۲ (ADS) تولید آرتیمیزینین افزایش می‌یابد. این ژن به طور اختصاصی بیوستز آرتیمیزینین را کد می‌کند و عملاً در رقابت با سایر ترین سنتاز نمی‌باشد (Yin et al. 2008).

همچنین گزارش‌ها نشان داده که ترین سنتازهایی از جمله CPS، BFS و GAS در مراحل اولیه رشد و در برگ‌های جوان بیان بالاتری نسبت به سایر مراحل رشدی دارند (Cheng et al. 2007; Olofsson et al. 2011). ژن CPS در اکثر بافت‌های گیاه طی مراحل رشد اولیه بیان می‌شود و در بافت بالغ در پاسخ به قارچ تحریک می‌شود. بنابراین یک نقش دفاعی را برای این ژن را در گیاه می‌توان در نظر گرفت (Cai et al. 2002). لازم به ذکر است که گذر از مرحله اولیه رشدی میزان بیان این ژن را کاهش می‌دهد (Wang et al. 2009) و در نتیجه با به گل رفتن گیاه بیان این ژن کاهش می‌یابد.

جدول ۳، میزان سسکویی‌ترین‌های مورد مطالعه توسط GC-MS را نشان می‌دهد. بیشترین میزان تولید بتاکاریوفیلین در بافت گل گونه *A. scoparia* مشاهده شد. همچنین داده‌های حاصل از بررسی بیان ژن، نیز نشان داد که این گونه بیشترین سطح رونویسی ژن آنزیم CPS را نیز به خود اختصاص داده‌است. به همین ترتیب *A. annua* که بالاترین میزان بیان را پس از *A. scoparia* نشان داد، از نظر تولید این ترکیب ثانویه نیز در مرتبه دوم قرار گرفت. در بافت گل دو گونه *A. diffusa* و *A. vulgaris* تولید ترکیب بتاکاریوفیلین شناسایی نشده است. بیشترین میزان تولید بتافارنسنین در گل *A. scoparia* مشاهده شد که همچنین بیان بیشتری از ژن مربوطه را داشت. مقادیری از وجود این ترکیب در گونه‌های *A. annua* و *A. spicigera* نیز ثبت شده است. نوع و میزان ترکیبات ثانویه تولید شده در کموتایپ‌های مختلف آرتیمیزیا متنوع می‌باشد زیرا علاوه بر عوامل ژنی، عوامل محیطی از جمله نور، دما و pH نیز بر تولید ترکیبات ثانویه در گیاهان اثرگذار است (Goren et al. 2001; Covello 2008).



شکل ۳- میزان بیان نسبی دو ژن بتاکاریوفیلین سنتاز (CPS) و بتافارنسنین سنتاز (BFS) در بافت گل شش گونه آرتیمیزیا. گونه *A. annua* به عنوان مبنا در نظر گرفته شده است و سایر گونه‌ها از نظر میزان بیان نسبی ژن‌های مورد مطالعه با این گونه مقایسه شده‌اند. ستاره بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد می‌باشد.

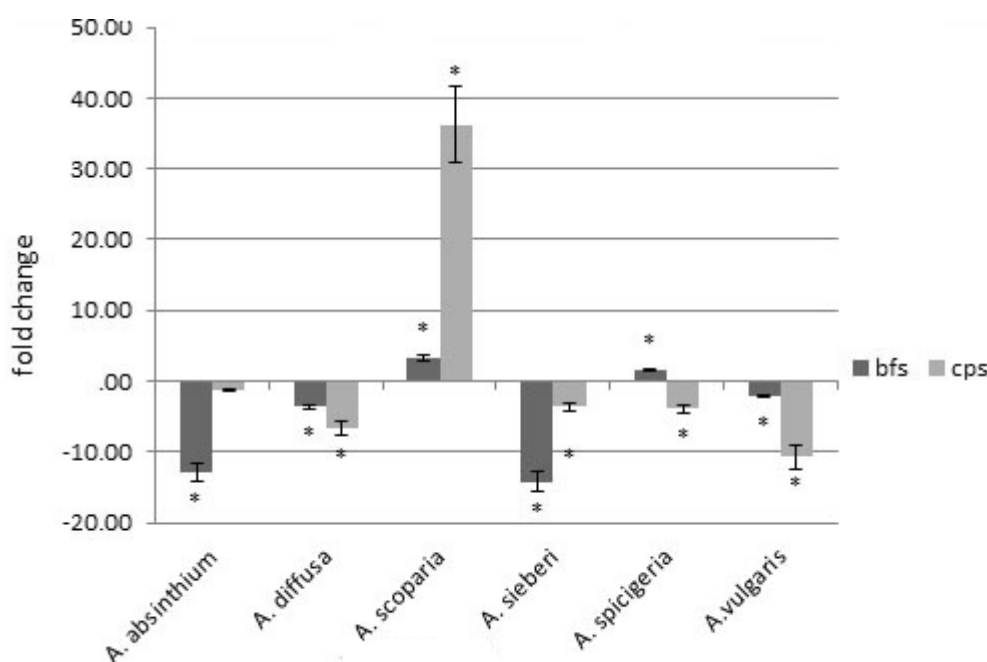
FDS آنزیمی است که در تبدیل ایزوپنتیل دی‌فسفات و دی‌متیل ایل دی‌فسفات به FDP نقش ایفا می‌کند. FDP سوسترای اصلی تمامی ترین سنتازها را فراهم می‌کند. در سال‌های اخیر بررسی سطح رونویسی ژن‌های دخیل در سنتز ترین‌ها از جمله FDS و^۱ HMGR بسیار مورد توجه بوده‌است. با افزایش بیان این پرنیل ترنسفرازها میزان تولید آرتیمیزینین نیز تا چندین برابر افزایش می‌یابد (Chen et al. 2000; Aquil et al. 2009; Jing et al. 2009). لازم به ذکر است که عملکرد تولید هر سسکویی‌ترین از جمله آرتیمیزینین از این پیش ماده مشترک تحت تاثیر بیان ژن‌های سایر سسکویی‌ترین سنتازها قرار دارد و تولید بیشتر این سوسترا الزاماً به تولید بیشتر سسکویی‌ترین مربوطه منتج نمی‌شود (Wang et al. 2011). به عبارت دیگر افزایش بیان FDS می‌تواند تولید نهایی را به سایر مسیرهای بیوستزی هدایت کند. می‌توان به گزارش Liao et al. (2009) اشاره کرد که نتایج مشابهی را در خصوص بیان بالاتر آنزیم HMGR از یک طرف و تولید پایین‌تر آرتیمیزینین از طرف دیگر ارائه دادند. همچنین گزارش شده که تشدید بیان پرنیل ترنسفراز HMGR در توتون منجر به ۱۰ برابر شدن تجمع استرول شده و استفاده از بازدارنده‌های استرول

² Amorpha-4,11-diene synthase

¹ 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase

جدول ۳- میزان ترکیبات شناسایی شده مورد نظر در بافت گل هفت گونه آرتمیزیای مورد مطالعه (برحسب درصد)

A.	A.	A.	A.	A.	A.	A.	
<i>vulgaris</i>	<i>spicigera</i>	<i>sieberi</i>	<i>scoparia</i>	<i>diffusa</i>	<i>absinthium</i>	<i>Annua</i>	
۰	۰/۷۶	۰/۳	۵/۹۵	۰	۱/۱۹	۱/۱۵	بتاکاریوفیلین
۰	۱/۱۵	۰	۴/۱۳	۰	۰	۱/۷۲	بتافارنسنین



شکل ۳- میزان بیان نسبی دو ژن بتاکاریوفیلین سنتاز (CPS) و بتافارنسنین سنتاز (BFS) در بافت گل شش گونه آرتمیزیا. گونه *A. annua* به عنوان مبنا در نظر گرفته شده است و سایر گونه‌ها از نظر میزان بیان نسبی ژن‌های مورد مطالعه با این گونه مقایسه شده‌اند. ستاره بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد می‌باشد.

مد نظر قرار گیرد. برای نمونه اگر هدف به دست آوردن گیاهی با تولید بیشتر آرتمیزینین باشد، علاوه بر ژن‌های اختصاصی کدکننده مسیر بیوستنز آرتمیزینین (ADS)، بررسی هم‌زمان بیان ژن سایر آنزیم‌هایی که بیوستنز را در سایر مسیرهای تولیدی کد می‌کنند نیز حائز اهمیت می‌باشد. همچنین تلاش برای یافتن راه‌هایی برای کاهش فعالیت آنزیم‌های ناخواسته و در نتیجه افزایش بیان ژن آنزیم‌های مورد نظر نیز دارای اهمیت می‌باشد.

گزارش شده که تغییرات دمایی مناطق مرطوب هندوستان بر ترکیبات تشکیل‌دهنده روغن گونه *A. annua* اثرگذار بوده‌است (Bagchi et al. 2003). همچنین مسیرهای بیوستنزی ترکیبات ثانویه بسیار پیچیده می‌باشد و هر یک توسط دسته‌ای از آنزیم‌های مختلف کاتالیز می‌شود. بنابراین نمی‌توان بیان کرد که بیان ژن‌های کدکننده بیوستنز یک ترکیب به طور قطع بر کاهش یا افزایش تولید ترکیب نهایی اثر دارد.

بنابراین بررسی اثر متقابل چند آنزیم کدکننده مسیرهای مختلف بیوستنزی بر تولید یک ترکیب خاص می‌تواند در مطالعات آینده

سپاسگزاری

بدین وسیله از صندوق حمایت از پژوهشگران و فن‌آوران کشور در خصوص حمایت مالی این پروژه در قالب طرح شماره ۹۰۰۰۲۲۷۱ تشکر و قدردانی می‌گردد. همچنین نویسندگان بر

خود لازم می‌دانند که از پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران به پاس فراهم آوردن شرایط و امکانات لازم تشکر و قدردانی نمایند.

منابع

- Abad MJ, Bedoya LM, Apaza L, Bermejo P (2012) The *Artemisia L.* genus: A review of bioactive essential oils. *Molecules* 17: 2542-2566.
- Aquil S, Husaini AM, Abdin MZ, Rather GM (2009) Overexpression of the HMG-CoA reductase gene leads to enhanced artemisinin biosynthesis in transgenic *Artemisia annua* plants. *Planta Medica* 75: 1453-1458.
- Aryanti, Bintang M, Ermayanti TM, Mariska I (2001) Production of antileukemic agent in untransformed and transformed root cultures of *Artemisia Cina*. *Annales Bogorienses* 8:11-16.
- Arab HA, Rahbari S, Rassouli A, Moslemi MH, Khosravirad FDA (2006) Determination of artemisinin in *Artemisia sieberi* and anticoccidial effects of the plant extract in broiler chickens. *Tropical Animal Health and Production* 38:497-503.
- Asahina Y and Yoshitomi E (1917) Essential oil of *Artemisia annua* L. I. *Yakugaku Zasshi* press. Pp 489.
- Bagchi GD, Haider F, Dwivedi PD, Singh A, Naqvi AA (2003) Essential oil constituents of *Artemisia annua* during different growth periods at monsoon conditions of Subtropical North Indian plains. *Journal of Essential Oil Research* 15:248-250.
- Bick JA and Lange BM (2003) Metabolic cross talk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis: Unidirectional transport of intermediates across the chloroplast envelope membrane. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 415: 146-154.
- Brown GD, Liang GY, Sy LK (2003) Terpenoids from the seeds of *Artemisia annua*. *Phytochemistry* 64: 303-323.
- Cai Y, Jia JW, Crock J, Lin ZX, Chen XY, Croteau R (2002) A cDNA clone for b-caryophyllene synthase from *Artemisia annua*. *Phytochemistry* 61: 523- 529.
- Chen DH, Ye HC, Li GF (2000) Expression of a chimeric farnesyl diphosphate synthase gene in *Artemisia annua* L. transgenic plants via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Plant Science* 155: 179-185.
- Cheng AX, Xiang CY, Li JX, Yang CQ, Hu WL, Wang LJ, Lou YG, Chen XY (2007) The rice (E)-b-caryophyllene synthase (OsTPS3) accounts for the major inducible volatile sesquiterpenes. *Phytochemistry* 68: 1632-1641.
- Covello PS (2008) Making artemisinin. *Phytochemistry* 69:2881-2885.
- Fan J, Ding X, Gu W (2007) Radical-scavenging proanthocyanidins from sea buckthorn seed. *Food Chemistry* 102: 168-177.
- Ferreira FS, Devanand L, Luthria DL, Sasaki T, Heyerick A (2010) Flavonoids from *Artemisia annua* L.

as Antioxidants and their totential synergism with Artemisinin against malaria and cancer. *Molecules* 15: 3135-3170.

Goren N, Demirci B, Baser KHC (2001) Composition of the essential oils of *Anacetum* spp. from Turkey. *Flavour and Fragrance Journal* 16: 191-194.

Jing F, Zhang L, Li M, Tang Y, Wang Y, Wang Y, Wang Q, Pan Q, Wang G, Tang K (2009) Absciscic acid (ABA) treatment increases artemisinin content in *Artemisia annua* by enhancing the expression of genes in artemisinin biosynthetic pathway. *Biologia* 64: 319-323.

Jing F, Zhang L, Li M, Tang Y, Wang Y, Wang Y, Wang Q, Pan Q, Wang G, Tang K (2009) Absciscic acid (ABA) treatment increases artemisinin content in *Artemisia annua* by enhancing the expression of genes in artemisinin biosynthetic pathway. *Biologia* 64: 319-323.

Kubo I, Chaudhuri SK, Kubo Y, Sanchez Y, Ogura T, Saito T, Ishikawa H, Haraguchi H (1996) Cytotoxic and antioxidative sesquiterpenoids from *Heterotheca inuloides*. *Planta Medica* 62: 427- 430.

Legault J and Pichette A (2007) Potentiating effect of β -caryophyllene on anticancer activity of α -humulene, isocaryophyllene and paclitaxel. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 59: 1643-1647.

Liao P, Zhou W, Zhang L, Wang J, Yan XM, Zhang Y, Zhang R, Li L, Zhou G, Kai G (2009) Molecular cloning, characterization and expression analysis of a new gene encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase from *Salvia miltiorrhiza*. *Acta Physiologiae Plantarum* 31: 565-572.

Liu H, Qiu N, Ding H, Yao R (2008) Polyphenols contents and antioxidant capacity of 68 Chinese herbals suitable for medicinal or food uses. *Food Research International* 41: 363-370.

Mannan A, Shaheen N, Arshad W, Qureshi RA, Zia M, Mirza B (2008) Hairy roots induction and artemisinin analysis in *Artemisia dubia* and *Artemisia indica*. *African Journal of Biotechnology* 7:3288-3292.

Mannan A, Ahmed I, Arshad W, Asim MF, Qureshi RA, Hussain I, Mirza B (2010) Survey of artemisinin production by diverse *Artemisia* species in northern Pakistan. *Malaria Journal* 9: 310-318. doi: 10.1186/1475-2875-9-310

Martin S, Padilla E, Icete MA, Galvez J, Jimenez J, Zarzuelo Z (1993) Anti-inflammatory activity of the essential oil of *Bupleurum fruitescens*. *Planta Medica* 59: 533-536.

Munoz-Bertomeu J, Arrillaga I, Ros R, Segura J (2006) Up-regulation of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase enhances production of essential oils in

transgenic Spike lavender. *Plant Physiology* 142: 890-900.

Olofsson L, Engstrom A, Lundgren A, Brodelius PE (2011) Relative expression of genes of terpene metabolism in different tissues of *Artemisia annua* L. *BMC Plant Biology* 11: 45.

Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L (2002) Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research* 30:1-10.

Picaud S, Brodelius M, Brodelius PE (2005) Expression, purification and characterization of recombinant (E)-b-farnesene synthase from *Artemisia annua*. *Phytochemistry* 66: 961-967.

Ryden AM, Ruyter-Spira C, Quax WJ, Osada H, Muranaka T, Kayser O, Boumeester H (2010) The molecular cloning of dihydroartemisinic aldehyde reductase and its implication in artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua*. *Planta Medica* 76: 1778-1783.

Sekar S and Kandavel D (2010) Interaction of plant growth promoting rhizobacteria (pgpr) and endophytes with medicinal plants-new avenues for phytochemicals. *Journal of Phytology* 2: 91-100.

Tambe Y, Tsujiuchi H, Honda G, Ikeshiro Y, Tanaka S (1996) Gastric cytoprotection of the non-steroidal anti-inflammatory sesquiterpene, B-caryophyllene. *Planta Medica* 62:469-470.

Ulubelen A, Topcu, G, Eris C (1994) Terpenoids from *Salvia sclarea*. *Phytochemistry* 36: 971-974.

Wang R, Peng S, Zeng R, Ding L, Xu Z (2009) Cloning, expression and wounding induction of B-caryophyllene synthase gene from *Mikania micrantha* H.B.K. and allelopathic potential of b-caryophyllene. *Allelopathy Journal* 24: 35-44.

Wang Y, Jing F, Yu S, Chen Y, Wang T, Liu P, Wang G, Sun X, Tang K (2011) Co-overexpression of the HMGR and FPS genes enhances artemisinin content in *Artemisia annua* L. *Journal of Medicinal Plants Research* 5: 3396-3403.

Yin L, Zhao C, Huang Y, Yang R, Qingping AZ (2008) Abiotic stress-induced expression of artemisinin biosynthesis genes in *Artemisia annua* L. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology* 14:001-005.

Zeng Q, Zhao C, Yin L, Yang R, Zeng X, Huang Y, Feng L, Yang X (2008) Cloning of artemisinin biosynthetic cDNAs and novel ESTs and quantification of low temperature-induced gene overexpression. *Science China Life Science* 51(3): 232-44.

Zheng GQ, Kenney PM, Lam LK (1992) Sesquiterpenes from clove (*Eugenia caryophyllata*) as potential anticarcinogenic agents. *Journal of Natural Products* 55: 999-1003.

Zia M, Abdul M, Chaudhary MF (2007) Effect of growth regulators and amino acids on artemisinin production in the callus of *Artemisia absinthium*. *Pakistan Journal of Botany* 39: 799-805.

Expression profiling of sesquiterpenes encoding genes in different *Artemisia* species

Raeisi S¹, Naghavi MR^{*1}, Taleei AL¹, Soltanloo H², Ranjbar M³

1. MS Student, Professors, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

2. Assistant Professor, Gorgan University of Agriculture Sciences and Natural Resources

3. Assistant professor, Amol University of Special Modern Technologies

* Corresponding Author, Email: mnaghavi@ut.ac.ir

ABSTRACT

Medicinal plants have had important roles in traditional medicine since ancient times. Secondary metabolites produced in plants have many applications in medicine, pharmacology and industry. The genus *Artemisia* is very important due to the production of sesquiterpene Artemisinin and many other compounds. Various sesquiterpenes production is catalyzed from central intermediate farnesyl diphosphate, by sesquiterpene enzymes. In this study seven *Artemisia* species local to Iran were planted. Flower tissues were sampled in flowering phase, in three biological replications. The relative expression of one prenyl transferase (Farnesyl diphosphate synthase) and two sesquiterpene synthases (beta-caryophyllene synthase and beta-farnesene synthase) was studied by Real-time PCR. *Artemisia annua* was considered as the reference species. Besides, gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was applied to investigate the end products produced by each terpene synthases. The results showed that the expression of terpene synthase genes is consistent with their products obtained in GC-MS. The maximum level of expression for terpene synthase-encoding genes was achieved for *A. scoparia*. Moreover, the results from GC-MS indicated the highest amount of production of beta-caryophyllene and beta-farnesene in this species. It can be concluded that the biosynthesis pathways of sesquiterpenes may be regulated by its specific sesquiterpene synthase.

Key Words

Artemisia, Artemisinin, Secondary metabolites, Terpene synthase