

آنالیز بیان نسبی چهار ترپن سنتاز در گونه‌های آرتمیسیا

Relative expression analysis of four terpene synthase in *Artemisia* species

مجتبی رنجبر^{۱*}، محمد رضا نقوی^۲، هوشنگ علیزاده^۳، حسن سلطانلو^۴، عباسعلی زالی^۵، رحیم تقی زاد فرید^۶

۱-۵، ۳، ۲، ۱- به ترتیب دانشجوی دکتری، استاد، استادیار، استاد پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

۴- استادیار دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۶- کارشناس ارشد، موسسه گیاهان دارویی

Ranjbar M^{*1}, Naghavi MR², Alizadeh H³, Soltanloo H⁴, Zali A⁵, Taghizad Farid R⁶

1,2,3,5. PhD Student, Professor, Assistant Professor and Professor, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran.

4. Assistant Professor, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural

6. MSc, Institute of Medicinal Plants.

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

(تاریخ دریافت: ۹۱/۱/۱۹ - تاریخ پذیرش: ۹۱/۷/۴)

چکیده

خواص دارویی آرتمیسیا مربوط به اسانس‌های فرار آن بوده که شامل طیف وسیعی از مواد شیمیایی فعال از قبیل منوترپن‌ها، سسکوئین‌ترپن‌ها و تری‌ترپن‌ها است. از ترپن‌های مهم می‌توان بتا آمیرین، بتا کاریوفیلین، لینالول و بتا پنین را نام برد که به عنوان داروی ضد سرطان، ضد درد، ضد میکروب، آنتی‌اکسیدان و ضد التهاب بکار می‌رود. در این مطالعه، میزان بیان نسبی چهار ژن بتا آمیرین سنتاز، بتا کاریوفیلین سنتاز، لینالول سنتاز و بتا پنین سنتاز در ۸ گونه آرتمیسیا به وسیله واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی مورد بررسی شد. در این تحقیق از ژن 18S rRNA به عنوان ژن کنترل استفاده شد. بیشترین و کمترین سطح بیان بتا آمیرین سنتاز، بتا کاریوفیلین سنتاز، لینالول سنتاز و پنین سنتاز نسبت به گونه *A. annua* به ترتیب در مرحله گلدهی (۱/۶۲) گونه *A. scoparia* و مرحله گیاهچه ای (۵۰/۸۵-) گونه *A. sieberi*، مرحله گلدهی (۵۶/۲۸) گونه *A. campestris* و مرحله گلدهی (۱۰/۷۴-) گونه *A. vulgaris*، مرحله غنچه دهی (۱۵/۸۶) گونه *A. scoparia* و مرحله غنچه دهی (۲۰-) گونه *A. sieberi*، مرحله غنچه دهی (۵۳/۵۷) گونه *A. campestris* و مرحله غنچه دهی (۲۳/۴۹-) گونه *A. diffusa* مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی

آرتمیسیا پنین،

بیان ژن،

سسکوئین‌ترپن،

واکنش زنجیره ای در زمان واقعی

مقدمه

خصوصیات دارویی مشاهده شده در گیاهان معطر مربوط به ترکیبات موجود در آنها از قبیل انواع ترپن‌ها، فلاونوئیدها و پلی فنل‌ها می‌باشد (Criag 1999; Ravizza et al. 2008). در سال‌های اخیر، اسانس فرار تعداد زیادی از گیاهان معطر استخراج شده و بررسی‌ها نشان داده که این ترکیبات دارای اثرات ضدسرطانی، ضد درد، ضد التهاب و غیره می‌باشند (Surh Paik et al. 2005; 2003). بنابراین اسانس‌های فرار این گیاهان می‌تواند یک جایگزین مناسب برای داروهای شیمیایی به محسوب شوند (Dincalci et al. 2005). از جمله گیاهان معطر که توجه زیادی را به خود جلب کرده، جنس آرتمیزیا از خانواده گل مرکبان است. اهمیت این جنس به خاطر وجود یک سسکوئی ترپن به نام آرتمیزینین بوده که در درمان مالاریا استفاده می‌شود (Bosmam and Mendis 2007). علاوه بر آرتمیزینین این جنس دارای ترپن‌های دیگری است که تعدادی از آنزیم‌های تولید کننده آنها توسط محققان شناسایی و کلون شده است (Kirby et al. 2008). از جمله این ترپن‌ها، بتا آمیرین تری ترپنوئیدهای ۵ حلقه‌ای هستند که توسط آنزیم بتا آمیرین سنتاز از پیش ماده ۳ و ۲ اکسیدواسکوالن به وجود می‌آید. مطالعات قبلی نشان داد که این تری ترپنوئید دارای خصوصیت ضدالتهابی، ضد درد، محافظت کننده و ضد آلرژی می‌باشد (Otuki et al. 2005; Holanda Pinto et al. 2008; Soldi et al. 2008). بتا کاریوفیلین یکی از سسکوئی ترپن‌ها است که توسط آنزیم بتا کاریوفیلین سنتاز از پیش ماده فارنسیل دی فسفات به وجود می‌آید. این ترکیب و مشتقات آن دارای خاصیت ضد التهاب، ضد سرطان، بی حس کننده موضعی، بازدارنده زخم‌های مخاط معده، ضد باکتری و آنتی آکسیدان می‌باشد، همچنین می‌تواند در سیستم دفاعی گیاه نقش داشته باشد (Kubo et al. 1996; Wadhams et al. 1999; Legault and Pichette 2007). لینالول و پننن جزء منوترپن‌های می‌باشند که توسط آنزیم لینالول سنتاز و پننن سنتاز از پیش ماده گرانیل دی فسفات به وجود می‌آیند این دو ترکیب دارای خاصیت آرام بخش، ضد میکروب، آنتی آکسیدان، ضد ویروس برونشیت و القاکننده آپوپتوز می‌باشد (Sugawara et al. 1998; leite et al. 2007; Mercier et al. 2010). با توجه به مطالب ذکر شده هدف

ما در این تحقیق بررسی بیان نسبی ۴ ژن بتا کاریوفیلین سنتاز، بتا آمیرین سنتاز، لینالول سنتاز و پننن سنتاز در ۸ گونه *A. annua*، *A. sieberi*، *A. diffusa*، *A. absinthium*، *A. campestris* و *A. vulgaris* و *spicigeria* در سه مرحله گیاهچه‌ای، غنچه‌دهی و گل‌دهی می‌باشد. نمونه برداری در مرحله گیاهچه‌ای از برگ، مرحله غنچه‌دهی از غنچه و مرحله گل‌دهی از گل صورت گرفته است. به دلیل اینکه اغلب مطالعات انجام شده در جنس آرتمیزیا بر روی گونه *A. annua* می‌باشد، در این تحقیق گونه مذکور به عنوان گونه مرجع در نظر گرفته و گونه‌های دیگر از نظر میزان بیان نسبی این چهار ژن در سه بافت با گونه *A. annua* مقایسه شدند.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق هشت گونه آرتمیزیا از پنج استان جمع‌آوری و مشخصات نمونه‌ها در جدول ۱ آمده است. بذور ۸ گونه ابتدا با هیپوکلریت سدیم ۲۰ درصد ضدعفونی شده و در ادامه سه بار با آب مقطر شستشو داده، سپس بذور هر گونه به مدت دو هفته با شدت نور ۱۰۰۰ لوکس و هشت ساعت تاریکی در پتری دیش قرار داده شده در ادامه گیاهچه‌ها را در گلدان کشت و به اتافک رشد گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه تهران با شرایط دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۵۵ درصد، شدت نوری ۵۰۰۰ لوکس و ۸ ساعت تاریکی منتقل شد. نمونه‌گیری از برگ گیاهچه‌ها، غنچه و گل گیاهان با سه تکرار زیستی انجام گرفت. RNA با استفاده از کیت RNasy Plant Mini Kit شرکت کیت (Qiagene) استخراج شد. ساخت cDNA به کمک کیت RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis K1622 شرکت فرمنتاز طبق پروتکل زیرانجام گرفت. یک میکروگرم RNA را با یک میکرولیتر آغازگر OligodT مخلوط کرده و به کمک آب Nuclease free حجم آن را به ۱۲ میکرولیتر رسانده و به مدت ۵ دقیقه در ۶۵ درجه قرار می‌دهیم. تیوب‌ها را بر روی یخ قرار داده و در ادامه به آن چهار میکرولیتر بافر، یک واحد RNase inhibitor ، یک میلی‌مولار dNTP و ۲۰ واحد آنزیم نسخه برداری معکوس اضافه کرده و تیوب‌ها را به مدت یک ساعت در ۴۵ درجه و بعد از آن به مدت ۵ دقیقه در ۷۰ درجه قرار می‌دهیم و در نهایت

غنچه دهی میزان بیان کمتر و در مرحله گلدهی میزان بیان بیشتری داشتند. گونه *A. campestris* در مرحله گیاهچه‌ای میزان بیان کمتر و در مراحل غنچه و گل میزان بیان بالاتری داشتند. بطور کلی در مطالعه ژن بتا آمیرین سنتاز بیشترین میزان بیان مربوط به مرحله گلدهی (۱/۶۲) در گونه *A. scoparia* بوده و کمترین میزان بیان مربوط به مرحله گیاهچه‌ای (۵۰/۸۵-) در گونه *A. sieberi* می‌باشد (شکل ۱). Meesapyodsuk et al. (2006) با بررسی بیان ژن بتا آمیرین سنتازها در پنج اندام گونه *Saponaria vaccaria* مشاهده کردند، این ژن اغلب در برگ بیان می‌شود. بررسی اثر تیمار متیل جاسمونات بر میزان بیان ژن بتا آمیرین سنتاز در گونه *Medicago truncatula* بیان کرده، این محرک سبب افزایش بیان ۵۰ برابری این ژن شده و حداکثر بیان در ۲۴ ساعت بعد از تیمار مشاهده شد که این نتایج نشان‌دهنده تاثیر متیل جاسمونات (Suzuki et al. 2005). آنالیز بیان ژن بتا کاربوفیلین سنتاز نشان داد، گونه‌های *A. sieberi*، *A. absinthium* و *A. vulgaris* در تمام مراحل مورد بررسی میزان بیان کمتری نسبت به گونه *A. annua* داشتند. در مقابل سه گونه قبلی، گونه های *A. scoparia*، *A. campestris* و *A. spicigeria* میزان بیان بالاتری در تمام مراحل نمونه‌گیری نسبت به گونه *A. annua* داشتند. گونه *A. diffusa* در مراحل گیاهچه‌ای و غنچه‌دهی میزان بیان کمتر و در مرحله گلدهی میزان بیان بیشتری را نسبت به گونه *A. annua* داشته است. در آنالیز بیان ژن بتا کاربوفیلین سنتاز بیشترین و کمترین میزان بیان نسبت به گونه *A. annua* به ترتیب در مرحله گلدهی (۵۶/۲۸) گونه *A. campestris* و مرحله گلدهی (۱۰/۷۴-) گونه *A. vulgaris* مشاهده شد (شکل ۱). Cheng et al. (2007) گزارش دادند تیمار متیل جاسمونات بر روی برنج سبب افزایش بیان ژن بتا کاربوفیلین شده و این افزایش بیان باعث جذب بیشتر زنبور پارازیتوئید می‌شود، بنابراین ژن موردنظر در مکانیسم دفاعی گیاه برنج نقش دارد. مطالعات انجام شده بر روی *A. annua* مشخص کرد، که بیشترین بیان ژن بتا کاربوفیلین سنتاز در اپیدرم ساقه مشاهده شده و همچنین تیمار محرک‌های قارچی نیز سبب افزایش بیان این ژن می‌شود (Cai et al. 2002). Olofsson et al. (2011) گزارش دادند برگ‌های جوان و غنچه

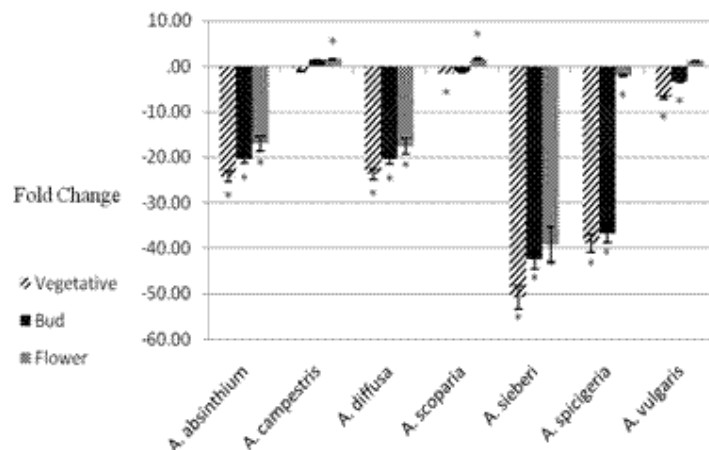
cDNA ساخته شده در دمای ۲۰- درجه نگهداری می‌شود. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز در زمان واقعی (Quantitative real-time PCR) در دستگاه آی سایکلر (icycler) شرکت بیوراد انجام شد. آغازگرهای ژن‌های بتا آمیرین سنتاز، بتا کاربوفیلین سنتاز، لینالول سنتاز و بتا پنین سنتاز به عنوان ژن مورد بررسی و آغازگر ژن 18SrRNA به عنوان ژن مرجع با استفاده از نرم افزار ایترنیتی پرایمر ۳ (http://www.embnet.sk/cgi-bin/primer3_www.cgi) طراحی شد (جدول ۲). برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز در زمان واقعی در ابتدا cDNA ساخته شده در مرحله قبل با رقت ۲۰ برابر به عنوان الگو تهیه شد. هر واکنش PCR شامل ۱۰ میکرولیتر 2X SYBR Bio Pars (GUASNR)، یک میکرولیتر آغازگرهای پیش‌رو و پس‌رو (غلظت ۱۰ پیکومول)، ۵ میکرولیتر cDNA و ۳ میکرولیتر آب عاری از RNase بود. شرایط دمایی برای تکثیر PCR، ۱۸۰ ثانیه ۹۵ درجه سپس ۳۵ چرخه ۱۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه، ۱۰ ثانیه در دمای ۶۰ درجه و ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه بود. سپس داده‌ها با استفاده از نرم افزار REST 2002 (Pfaffl et al. 2002) بر اساس مدل ریاضی زیر تجزیه و تحلیل شدند.

$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta\text{CP}_{\text{target}}(\text{control} - \text{sample})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta\text{CP}_{\text{ref}}(\text{control} - \text{sample})}}$$

R بیانگر اختلاف بیان ژن‌ها در دو نمونه مورد مقایسه است، که فاقد واحد و صرفاً میزان چند برابری بیان ژن‌ها را می‌رساند. E بیانگر کارایی تکثیر است. زمانی که کارایی تکثیر ۱۰۰ درصد باشد، بدین معنی است که تعداد کپی‌ها در هر چرخه دو برابر می‌شود.

نتایج و بحث

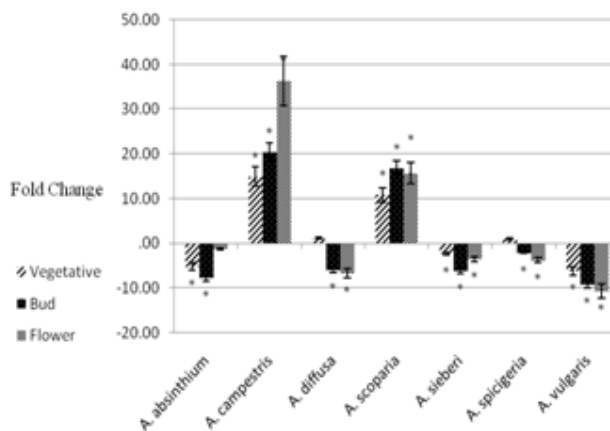
نتایج ژن بتا آمیرین سنتاز نشان داد گونه‌های *A. absinthium*، *A. sieberi*، *A. diffusa* و *A. spicigeria* در تمام مراحل نمونه‌گیری میزان بیان کمتری نسبت به گونه *A. annua* داشته در حالی که گونه‌های *A. scoparia* و *A. vulgaris* در مراحل گیاهچه‌ای و



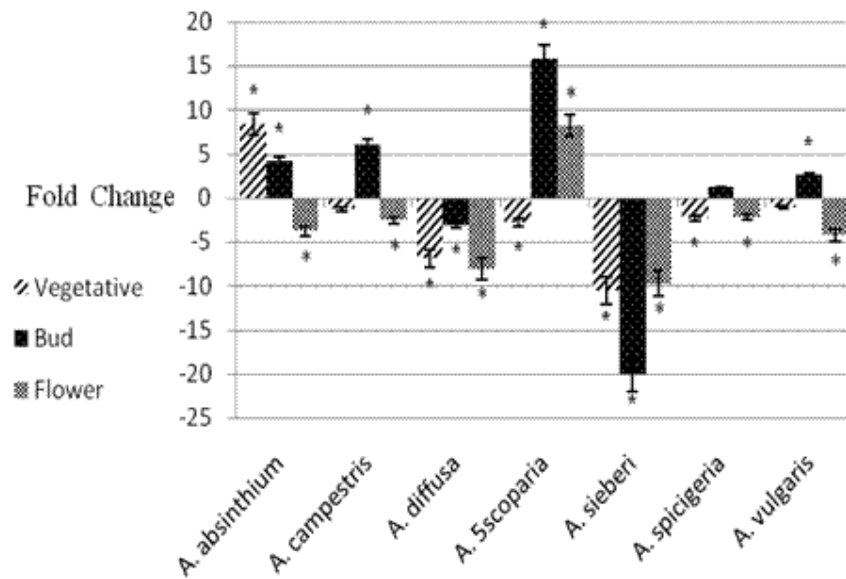
شکل ۱- بیان نسبی ژن بتا آمیرین سنتاز در گونه‌های *A. absinthium*, *A. campestris*, *A. diffusa*, *A. scoparia*, *A. sieberi*, *A. spicigera*, *A. vulgaris* نسبت به گونه *A. annua* در بافت‌های برگ، غنچه و گل.

جدول ۱- نام گونه‌ها و محل جمع‌آوری آنها

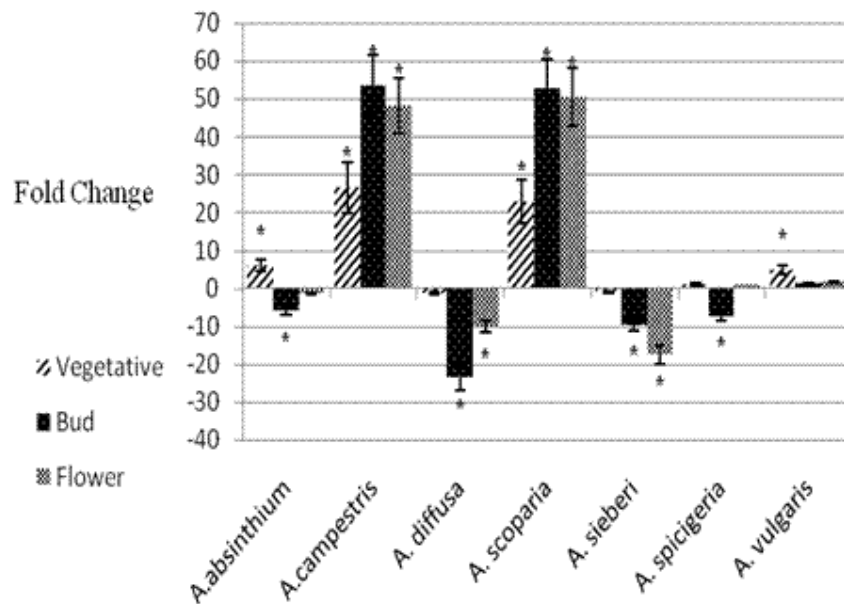
نام گونه	استان	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی	ارتفاع
<i>A. annua</i>	گلستان	۳۷۲۳۵۵,۲	۵۵۴۷۴۹,۲	۴۸۱
<i>A. sieberi</i>	تهران	۳۵۲۱۱۱,۲	۵۲۰۰۳۲,۳	۱۰۴۴
<i>A. vulgaris</i>	گلستان	۳۷۲۳۴۶,۷	۵۵۴۵۵۱,۶	۴۲۸
<i>A. absinthium</i>	اردبیل	۳۸۲۶۰,۷	۴۸۳۴۵۱,۸	۱۴۸۷
<i>A. diffusa</i>	سمنان	۳۶۴۲۴۳,۴	۵۵۱۵۴۵,۵	۱۶۴۶
<i>A. spicigera</i>	گلستان	۳۶۱۱۱۵,۳	۵۱۴۷۲۳,۵	۲۰۹۶
<i>A. campestris</i>	اردبیل	۳۶۱۲۲۹,۱	۵۳۵۵۲۷,۳	۱۷۳۱
<i>A. scoparia</i>	مازندران	۳۶۰۹۲۲,۶	۵۲۱۵۳۰,۶	۱۰۴۷



شکل ۲- بیان نسبی ژن بتا کاریوفیلین سنتاز در گونه‌های *A. absinthium*, *A. campestris*, *A. diffusa*, *A. scoparia*, *A. sieberi*, *A. spicigera*, *A. vulgaris* نسبت به گونه *A. annua* در بافت‌های برگ، غنچه و گل.



شکل ۳- بیان نسبی ژن لاینالول سنتاز در گونه‌های *A. absinthium*, *A. campestris*, *A. diffusa*, *A. scoparia*, *A. sieberi*, *A. spicigera*, *A. vulgaris* نسبت به گونه *A. annua* در بافت‌های برگ، غنچه و گل.



شکل ۴- بیان نسبی ژن بتا پنین سنتاز در گونه‌های *A. absinthium*, *A. campestris*, *A. diffusa*, *A. scoparia*, *A. sieberi*, *A. spicigera*, *A. vulgaris* نسبت به گونه *A. annua* در بافت‌های برگ، غنچه و گل.

جدول ۲- آغازگرهای مورد استفاده در واکنش زنجیره ای پلیمرز در زمان واقعی

نام آغازگر	توالی آغازگر	طول تکثیر
Linalool-F	5'-AGGCTCTTGGCTTTCGACTAC-3'	۱۲۳
Linalool-R	5'-GCATTCCCACAACATCTTCG-3'	
Penine-F	5'-GGCGTGGCAGGATTTATG-3'	۱۲۷
Penine-R	5'-CCTGATGATCGGAGCAATTC-3'	
Amyrin-F	5'-ATGGAGGTTGGGGAGAAAGC-3'	۱۳۴
Amyrin-R	5'-ATCTCTCTCCGCTGTCGAG-3'	
Caryophyllene-F	5'-GAGGCATTGCGTTACATTCC-3'	۱۳۵
Caryophyllene-R	5'-CCACCACCTGGAAACTTCG-3'	
18S rRNA-F	5'-GCAACAAACCCCGACTTCTG-3'	۱۱۰
18S rRNA-R	5'-TGCGATCCGTCGAGTTATCA-3'	

حداکثر بیان لینالول سنتاز در همه شیموتایپ‌ها بعد از ۲۴ ساعت از تیمار متیل جاسمونات مشاهده کردند. مقایسه بیان نسبی ژن آلفا پنین سنتاز در سه مرحله نمونه‌گیری نشان می‌دهد که گونه‌های *A. sieberi* و *A. diffusa* بیان کمتر و گونه‌های *scoparia*، *A. vulgaris* و *A. campestris* بیان بالاتری را نسبت به گونه *A. annua* نشان دادند. در بررسی این ژن بیشترین بیان مربوط به مرحله غنچه (۵۳/۵۷) گونه *A. campestris* بوده و در مقابل کمترین بیان مربوط به مرحله غنچه (۲۳/۴۹) گونه *A. diffusa* می‌باشد (شکل ۱). بررسی‌ها و مطالعات در درخت صنوبر اذعان کرده حمله و القاء زخم بر روی این درختان سبب افزایش بیان ژن ترین سنتازها می‌شود، بنابراین افزایش بیان ژن آلفا پنین سنتاز می‌تواند یکی از عوامل مهم در سیستم دفاعی مستقیم گیاه محسوب شود (Mckay et al. 2006). Lu et al. (2002) بیان بالای از ژن بتا پنین را در برگهای جوان گیاهچه‌های ۱۴ روزه گونه *A. annua* گزارش دادند و بیان کردند ایجاد زخم بر روی برگها گونه *A. annua* سبب افزایش بیان ژن بتا پنین سنتاز می‌شود. با بررسی بیان نسبی ژن های مورد مطالعه در این تحقیق به نظر می‌رسد که گونه مورد استفاده و زمان استخراج از مهمترین عوامل دخیل در استحصال ترکیبات معطر آرتمی‌با محسوب می‌شود به طوری که در استخراج بتا آمیرین گونه *A. annua* مهمترین کاندید در نظر گرفته می‌شود. همچنین برای

ها نسبت به برگهای پیر بیان بالاتری از ژن بتا کاربوفیلین سنتاز را در گونه *A. annua* داشتند. آنالیز بیان ژن لینالول سنتاز نشان داد، گونه‌های *A. sieberi* و *A. diffusa* در تمام مراحل نمونه‌گیری بیان کمتری را نسبت به گونه *A. annua* در حالیکه گونه‌های *A. vulgaris*، *A. campestris* و *A. spicigeria* در مراحل گیاهچه‌ای و گلدهی میزان بیان کمتر و در مرحله غنچه دهی میزان بیان بیشتری را نشان دادند. گونه *A. absinthium* در مراحل گیاهچه‌ای و غنچه‌دهی بیان بیشتر و در مرحله گلدهی بیان کمتری داشته، همچنین گونه *A. scoparia* در مراحل غنچه و گل‌دهی دارای بیان بیشتر و در مرحله گیاهچه‌ای بیان کمتری داشته و در مجموع بیشترین و کمترین بیان ژن لینالول سنتاز به ترتیب در مرحله غنچه‌دهی (۱۵/۸۶) گونه *A. scoparia* و مرحله غنچه‌دهی (۲۰-) گونه *A. sieberi* مشاهده شد (شکل ۱). در مطالعات قبلی انجام شده در مورد بیان کمی ژن لینالول سنتاز در گونه *A. annua* مشخص کرده که بیشترین بیان در اندام برگ وجود دارد و نیز ایجاد زخم روی گیاهچه‌ها سبب افزایش بیان ژن لینالول سنتاز شده بنابراین این ژن ممکن است در سیستم دفاعی گیاه در اثر حمله پاتوژن‌ها و حشرات نقش داشته باشد (Jia et al. 1999). (Pandelo et al. 2011) با آنالیز بیان نیمه کمی ژن لینالول سنتاز در چند شیموتایپ های *Lippia alba* گزارش دادند برگهای جوان گره چهارم دارای بیشترین بیان بوده و

انتخاب شده اند. در نهایت برای بتابنین تمام مراحل نمونه گیری بخصوص غنچه دهی در دو گونه *A.campestris* و *A. scoparia* بهترین مرحله استخراج می‌باشند.

لینالول مرحله رویشی *A.absinthium* و غنچه دهی *A.scoparia* و استخراج بتا کاربوفیلین مرحله گلدهی *A.campestris* و *A. scoparia* و مرحله گلدهی *A.spicigeria* مناسبترین مرحله استخراج

منابع

- Belletti N, Kamdem SS, Tabanelli G, Lanciotti R, Gardini F (2010) Modeling of combined effects of citral, linalool and β -pinene used against *Saccharomyces cerevisiae* in citrus-based beverages subjected to a mild heat treatment. *International Journal of Food Microbiology* 136: 283-289.
- Bosman A, Mendis KN (2007) A major transition in malaria treatment: The adoption and deployment of artemisinin-based combination therapies. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 77:193-197.
- 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.
- 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.
- Craig WJ (1999) Health-promoting properties of common herbs. *American Journal of Clinical Nutrition* 70: 491S-499S.
- Dincalci M, Steward W, Gescher A (2005) Use of cancer chemopreventive phytochemicals as antineoplastic agents. *Lancet Oncology* 6: 899-904.
- Holanda Pinto SA, Pinto LMS, Cunha GMA, Chaves MH, Santos FA, Rao VS (2008) Anti-inflammatory effect of a, b-Amyrin, a pentacyclic triterpene from *Protium heptaphyllum* in rat model of acute periodontitis. *Inflammopharmacology* 16: 48-52.
- Jia JW, Crock J, Lu S, Croteau R, Chen XY (1999) (3R)-Linalool Synthase from *Artemisia annua* L.: cDNA Isolation, Characterization, and Wound Induction. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 372:143-149.
- Kirby J, Romanini D, Paradise EM, Keasling JD (2008) Engineering triterpene production in *Saccharomyces cerevisiae* – b-amyrin synthase from *Artemisia annua*. *Federation of European Biochemical Societies Journal* 275: 1852-1859.
- 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, 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.
- Leite AM, Lima EDO, Souza EL, Diniz MFF M, Trajano VN, Medeiros IA (2007) Inhibitory effect of β -pinene, α -pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria. *Revista Brasileira de Ciencias Farmaceuticas* 43:121-126.
- Lu S, Xu R, Jia JW, Pang J, Matsuda SPT, Chen XY (2002) Cloning and Functional Characterization of a Pinene Synthase from *Artemisia annua* That Shows a Circadian Pattern of Expression. *Plant Physiology* 130: 477-486.
- McKay AB, Godard KA, Toudefallah M, Martin DM, Alfaro R, King J, Bohlmann J, Plant AL (2006) Wound-Induced Terpene Synthase Gene Expression in Sitka Spruce That Exhibit Resistance or Susceptibility to Attack by the White Pine Weevil. *Plant Physiology* 140: 1009-1021.
- Meesapyodsuk D, Balsevich J, Reed DW, Covello PS (2006) Saponin Biosynthesis in *Saponaria vaccaria*. cDNAs Encoding b-Amyrin Synthase and a Triterpene Carboxylic Acid Glucosyltransferase. *Plant Physiology* 143: 959-969.
- Mercier B, Prost J, Prost M (2009) The Essential Oil of Turpentine and its Major Volatile Fraction (α - and β -Pinenes): A Review. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health* 22:331-324.
- 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.
- Otuki MF, Ferreira J, Vieira-Lima F, Silva CM, Malheiros A, Muller LA, Cani GS, Santos ARS, Yunes RA, Calixto JBJ (2005) Antinociceptive Properties of Mixture of alpha-amyrin and beta-amyrin Triterpenes: Evidence for Participation of Protein Kinase C and Protein Kinase A Pathways. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 313: 310-318.
- Paik SY, Kho KH, Beak SM, Paek SH, Kim JA (2005) The essential oils from *Zanthoxylum schinifolium pericarp* induce apoptosis of HepG2 human hepatoma cells through increased production of reactive oxygen species. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 28: 802-807.
- Pandelo D, Melo D, Singulani J, Guedes F, Machado M, Coelho C, Viccini L, Santos MO (2012) Oil production at different stages of leaf development in *Lippia alba*. *Revista Brasileira de Farmacognosia. Brazilian Journal of Pharmacognosy* 22: 497-501.
- 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.

Ravizza R, Gariboldi MB, Molteni R, Monti E (2008) Linalool, a plant-derived monoterpene alcohol, reverses doxorubicin resistance in human breast adenocarcinoma cells. *Oncology Reports* 20: 625-630.

Soldi C, Pizzolatti MG, Luiz AP, Marcon R, Meotti FC, Miotob A, Santos RS (2008) Synthetic derivatives of the a- and b-amyrin triterpenes and their antinociceptive properties. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 16: 3377-3386.

Surh YJ (2003) Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature* 3: 768-780.

Suzuki H, Naoumkina MS, Aziz N, Huhman G, Sumner L, Mendes JW, Dixon R (2005) Methyl jasmonate and

yeast elicitor induce differential transcriptional and metabolic re-programming in cell suspension cultures of the model legume *Medicago truncatula*. *Planta* 220: 696-707.

Wadhams LJ, Birkett MA, Powell W, Woodcock CM (1999) Aphids, predators and parasitoids. *Novartis Foundation Symposium* 223: 67-73.

Yoshiaki Sugawara Y, Hara C, Tamura K, Fujii T, Nakamura KI, Masujima T, Aoki T (1998) Sedative effect on humans of inhalation of essential oil of linalool: Sensory evaluation and physiological measurements using optically active linalools. *Analytica Chimica Acta* 365: 293-299.