

الگوی بیان سه ترپن سنتاز در هفت گونه آرتمیزیای بومی ایران

فاطمه پیراسته بروجنی^۱، محمدرضا نقوی^{۲*}، علیرضا عباسی^۳، حسن سلطانلو^۴، مجتبی رنجبر^۵ و سارا ریسی^۶

۱، ۶ دانشجویان کارشناسی ارشد، ۲، ۳، ۵ به ترتیب استاد، استادیار و دانشجوی سابق دکتری گروه زراعت و اصلاح نباتات پردیس کشاورزی و منابع

طبیعی، دانشگاه تهران، ۴، استادیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

(تاریخ دریافت: ۹۲/۶/۴ - تاریخ تصویب: ۹۲/۱۰/۴)

Expression Pattern of Three Terpene Synthase in Seven Artemisia Species Native of Iran

F. PIRASTEH BOROUJENI¹, M.R. NAGHAVI^{2*}, A. ABBASI³, H. SOLTANLOO⁴,
M. RANJBAR⁵, AND S. RAEISI⁶

1, 6, M.Sc. Students, 2, 3, 5, Professor, Assistant Professor, Former Ph.D. student, Department of Agronomy and Plant Breeding, University of Tehran, Iran, 4, Assistant Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

(Received: Aug. 26, 2013 - Accepted: Dec. 25, 2013)

Abstract

Artemisia genus is known as one of the most important medical plants. Different types of terpenoids produce in the genus. Artemisinin, a sesquiterpene with antimalarial and anticancer properties, and tritenpenes, squalene and β -amyryn, are important medicinal compounds which are produced by Artemisia species. Since farnesyl diphosphate is the precursor of all tri- and sesquiterpenes, expression of farnesyl diphosphate synthase (*FDS*), squalene synthase (*SQS*) and β -amyryn synthase in three developmental stages are studied in seven Artemisia species native of Iran by real-time PCR. Furthermore, artemisinin content was determined by HPLC. Our results showed *A. annua* has maximum artemisinin content in budding stage and *A. diffusa* and *A. spicigeria* have minimum artemisinin content in vegetative stage. In this manner expression of *FDS* has no difference between the species and although its effective role in biosynthesis of artemisinin, it is not useful to manipulate for increase of artemisinin. Also lower expression of *SQS* means we will have higher artemisinin but the revers is not true. Also *A. scoparia* in flowering stage is the best source to access of squalene and β -amyryn.

Keywords: Artemisinin, squalene, β -amyryn, Gene expression, Developmental stage

چکیده

جنس آرتمیسیا به عنوان یکی از مهمترین گیاهان دارویی شناخته شده است. انواع مختلفی از ترپنوئیدها در این جنس تولید می‌گردد. آرتمیزینین، سسکوئیدی ترپنی با خاصیت ضد مالاریای و ضد سرطانی و تری ترپن‌های اسکوالن و بتامیرین از ترکیبات دارویی مهمی هستند که توسط گونه‌های آرتمیسیا تولید می‌شوند. از آنجا که فARNسیل دی فسفات تمام تری ترپن‌ها و سسکوئیدی ترپن‌ها است، بیان ژن فARNسیل دی فسفات سنتاز (*FDS*) به همراه اسکوالن سنتاز (*SQS*) و بتامیرین سنتاز (*BAS*) در هفت گونه آرتمیزیای بومی ایران در سه مرحله رشدی مختلف با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی مورد بررسی قرار گرفت. همچنین میزان ترکیب آرتمیزینین توسط روش HPLC اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد از بین گونه‌های مورد مطالعه، گونه *Artemisia annua* در مرحله جوانه‌های گل بیشترین میزان آرتمیزینین و گونه *A. diffusa* و *A. spicigeria* در مرحله رویشی کمترین میزان این ترکیب را دارند. همچنین بیان ژن *FDS* در این گونه‌ها تفاوت قابل توجهی نداشته و با وجود نقش مؤثر آن در مسیر بیوسنتزی آرتمیزینین دستکاری آن برای دستیابی به آرتمیزینین بیشتر، مناسب نیست. به علاوه هرچه بیان ژن *SQS* پایین‌تر باشد به میزان بالاتری از آرتمیزینین دست پیدا خواهیم کرد اما عکس آن صادق نیست. همچنین بافت گل گونه *A. scoparia* بهترین منبع دستیابی به ترکیبات اسکوالن و بتامیرین شناسایی شد.

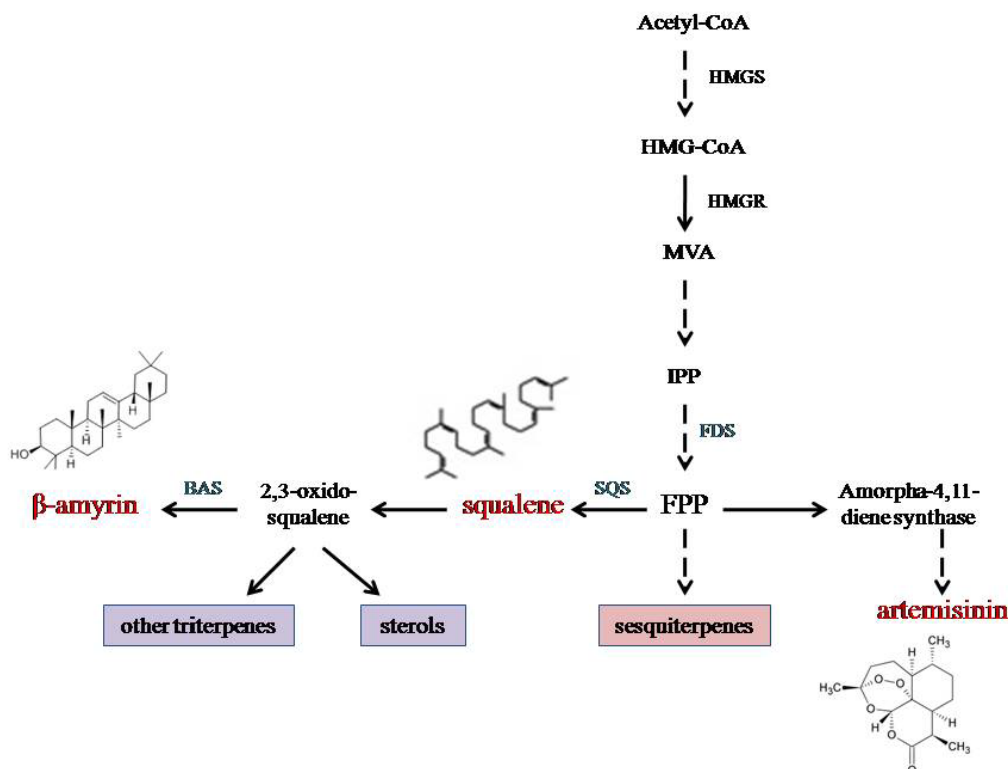
واژه‌های کلیدی: آرتمیزینین، اسکوالن، بتامیرین، بیان ژن، مرحله رشدی

(2006). ویژگی منحصر به فرد آرتیمیزینین در تخریب سلول‌های سرطانی بدون آسیب به سلول‌های مجاور است. این قابلیت به دلیل وجود پل اندوپراکسیدی در ساختمان این ترکیب به وجود آمده است و حضور همین پل فعالیت آن را علیه انگل‌های مالاریا ممکن می‌کند (Paik *et al.*, 2006; Bustos *et al.*, 1994). آرتیمیزینین به مقدار بسیار ناچیزی در گیاه *A. annua* ساخته می‌شود و تولید مصنوعی آن نیز پیچیده بوده و هزینه بالایی دارد (Enserink *et al.*, 2005) و بنابراین هیچ راهی مقرون به صرفه‌تر از استخراج این ماده از گیاه نیست (Webster and Lehnert, 1994). چندین مونوترپن و سسکویی‌ترین سنتاز در *A. annua* بیان می‌شوند و میزان تولید آن‌ها در بافت‌های مختلف گیاه متفاوت است. تمامی این مونوترپن‌ها و سسکویی‌ترین‌ها برای یک پیش‌ماده مشترک - فارنسیل دی فسفات (FDP) - که خود پیش‌ماده آرتیمیزینین است، رقابت می‌کنند. در نتیجه، فعالیت سسکویی‌ترین سینتازهای مختلف بر محصول آرتیمیزینین در گیاه مؤثر است. فارنسیل دی فسفات جهت ساخت اسکوالن نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد. اسکوالن، خود پیش‌ماده استرول‌ها و تری‌ترین‌ها است (Olofsson *et al.*, 2011). شکل ۱ مسیر بیوسنتزی آرتیمیزینین و دیگر ترین سنتازها را در *A. annua* نشان می‌دهد.

مقدمه

گونه‌های متعلق به جنس آرتیمیزیا (خانواده کاسنی) از مهمترین گیاهان دارویی در جهان هستند. در ایران دومین پوشش گیاهی بعد از گون متعلق به این جنس است و ۳۵ گونه گیاهی را شامل می‌شود (Abad *et al.*, 2012). اخیراً *Artemisia annua* به دلیل تولید بعضی از مونوترپن‌ها و سسکویی‌ترین‌ها مخصوصاً آرتیمیزینین و ترکیبات فنولی، بیش از پیش مورد توجه قرار گرفته است. امروزه آرتیمیزینین به طور گسترده‌ای برای درمان مالاریا مورد استفاده قرار می‌گیرد (Ferreira *et al.*, 2010; Bosman and Mendis, 2007). سازمان جهانی بهداشت آمار مبتلایان به این بیماری را در سال ۲۰۰۸، ۲۴۷ میلیون نفر در جهان گزارش کرده است (WHO, 2010). در ایران نیز هنوز ده تا پانزده هزار مورد بیماری در سال عمدتاً از استان‌های سیستان و بلوچستان، هرمزگان و کرمان گزارش می‌شود (Edrissian, 2006).

گزارشات مختلفی نشان داده است که آرتیمیزینین و مشتقات آن علاوه بر درمان مالاریا، در درمان بیماری‌های مختلفی از جمله انواع سرطان، مخصوصاً سرطان خون، هیپاتیت B و سالک به کار می‌رود (Lai and Singh, 2006; Efferth *et al.*, 2001; Romero *et al.*,



شکل ۱- مسیر بیوسنتزی آرتمیزینین. FDS: فارنسیل دی فسفات سنتاز، SQS: اسکوالن سنتاز، BAS: بتاآمیرین سنتاز، FPP: فارنسیل دی فسفات

حفاظتی در گیاه میزبان به عنوان ضد میکروب (Wallace, 2004) و دافع حشرات (Taylor, 2004) دارند. همچنین اثر ساپونین های گیاهی به عنوان ضد گرفتگی عروق مورد توجه قرار گرفته است (Jesch and Carr, 2006).

Rashidi Monfared (۲۰۱۲) به مقایسه بیان نسبی ژن های اسکوالن سنتاز و بتاآمیرین سنتاز در کموتایپ های وحشی *A. annua* ایران پرداخته است و Ranjbar (۲۰۱۲) بیان نسبی ژن های *HMGR*، *Amorfa* -۱۱،۴-داین سنتاز (*ADS*)، بتا کاریوفیلین سنتاز (*CPS*)، لینالول سنتاز (*LS*) و بتاپنین سنتاز (*BPS*)، که همگی در مسیر بیوسنتز آرتمیزینین دخیل هستند، در هشت گونه آرتمیزیای بومی ایران را مورد بررسی قرار داد. Sarvastani (۲۰۱۲) به منظور شناخت مکانیسم تنظیم بیان ژن آرتمیزینیک آلدئید ریداکتاز (*DBR2*) جداسازی و شناسایی پروموتور این ژن را به انجام رساند. همچنین Elefsen و همکاران (۲۰۱۱) به مقایسه بیان نسبی ژن های اسکوالن سنتاز و فارنسیل دی فسفات سنتاز در بافت های مختلف گونه *A. annua* پرداختند. بنابراین تاکنون بررسی بیان نسبی ژن های اسکوالن سنتاز و بتاآمیرین سنتاز که از ژن های مؤثر در مسیر بیوسنتز آرتمیزین، در شاخه های فرعی مسیر هستند در گونه های مختلف آرتمیزیا صورت نگرفته است.

علاوه بر آرتمیزینین تری ترپن ها و سسکوئی ترپن های دیگری در جنس آرتمیزیا تولید می شود که دارای کاربردهای دارویی و صنعتی هستند. اسکوالن یک تری ترپن خطی می باشد که دارای فعالیت ضد سرطانی و آنتی اکسیدانی است (Smith, 2009; Kelly, 1999). همچنین در ناقل های *gene transfection* مورد استفاده قرار می گیرد که در مقابل ناقل های لیپوزومی و پلیمری سمیت کمتری نشان می دهد (Hung *et al.*, 2005; Kwon *et al.*, 2008). به علاوه به عنوان نانوامولسیون غیرسمی و پایدار در دارورسانی^۱ و ساخت واکسن ها به کار می رود (Fox, 2009). بتاآمیرین نیز یک تری ترپن پنج حلقه ای و از محصولات اسکوالن است. این ترکیب اثرات ضد التهاب، ضد دردهای عصبی و ضد آلرژی نشان می دهد (Holanda Pinto *et al.*, 2008; Otuki *et al.*, 2005; Soldi *et al.*, 2008). فعالیت آنزیم های اکسیداتیو مانند سیتوکروم P450 مونواکسیژناز و گلیکوسیل ترنسفرز، بتاآمیرین را به انواع ساپونین های تری ترپنی در گونه های مختلف گیاهی تبدیل می کند (Vincken *et al.*, 2007; Connolly and Hill, 2007; Suzuki *et al.*, 2002).

است. بذور هر گونه پس از ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم ۲۰ درصد، به مدت دو هفته با شدت نور ۱۰۰۰ لوکس و ۱۶ ساعت روشنایی در پتری دیش قرار داده شد. سپس گیاهچه‌ها در گلدان کشت گردید و به اتافک رشد گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه تهران با شرایط دمایی ۲۵ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۵۵ درصد، شدت نوری ۵۰۰۰ لوکس و ۱۶ ساعت روشنایی منتقل شد. نمونه‌گیری از برگ گیاهچه‌ها، غنچه و گل گیاهان با سه تکرار زیستی انجام گرفت.

با توجه به مطالب فوق و اهمیت ترکیبات آرتمیزینین، اسکوالن و بتا‌میرین، به‌منظور درک بهتر وجود رقابت بین ترپن سنتازهای سیتوزولی و متابولیت آرتمیزینین، بیان ژن‌های مؤثر در تولید این ترکیبات به همراه اندازه‌گیری محتوای آرتمیزینین در گونه‌های مختلف آرتمیزیا را مورد بررسی قرار داده تا گونه‌های مناسب از نظر این ترکیبات را شناسایی کنیم.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در این تحقیق بذور هفت گونه آرتمیزیا از پنج استان کشور جمع‌آوری گردید که مشخصات آن‌ها در جدول ۱ آمده

جدول ۱- نام گونه‌ها و مشخصات محل جمع‌آوری آن‌ها

نام گونه	استان	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی	ارتفاع از سطح دریا (متر)
<i>A. annua</i>	گلستان	۳۷ ۲۳ ۵۵/۲	۲/۴۹ ۴۷ ۵۵	۴۸۱
<i>A. sieberi</i>	تهران	۳۵ ۲۱ ۱۱/۲	۳/۳۲ ۰۰ ۵۲	۱۰۴۴
<i>A. vulgaris</i>	گلستان	۳۷ ۲۳ ۴۶/۷	۶/۵۱ ۴۵ ۵۵	۴۲۸
<i>A. absinthium</i>	اردبیل	۳۸ ۲۶ ۰۷	۸/۵۱ ۳۴ ۴۸	۱۴۸۷
<i>A. diffusa</i>	سمنان	۳۶ ۴۲ ۴۳/۴	۵۵ ۱۵ ۴۵/۵	۱۶۴۶
<i>A. spicigera</i>	گلستان	۳۶ ۱۱ ۱۵/۳	۵۱ ۴۷ ۲۳/۵	۲۰۹۶
<i>A. scoparia</i>	مازندران	۳۶ ۰۹ ۲۲/۶	۵۲ ۱۵ ۳۰/۶	۱۰۴۷

میکرولیتر cDNA و ۳ میکرولیتر آب بود. برنامه دستگاه، شامل مرحله اول: ۱۸۰ ثانیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد، مرحله دوم: ۱۰ ثانیه دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۱۰ ثانیه دمای ۵۹ درجه سانتی‌گراد و ۳۰ ثانیه دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به تعداد ۳۵ چرخه بود. آغازگرهای ژن‌های بتا‌میرین سنتاز (*BAS*)، فارنسیل‌دی‌فسفات سنتاز (*FDS*)، اسکوالن سنتاز (*SQS*) به‌عنوان ژن‌های مورد بررسی و آغازگر ژن 18s rRNA به‌عنوان ژن خانه‌دار، با استفاده از نرم‌افزار اینترنتی Primer3 طراحی شدند (جدول ۲). سپس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار REST 2002 (Pfaffl et al., 2002) بر اساس مدل ریاضی زیر تجزیه و تحلیل شدند:

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

R بیانگر اختلاف بیان ژن‌ها در دو نمونه مورد مقایسه است، که فاقد واحد بوده و میزان چند برابر شدن بیان ژن‌ها را می‌رساند و E بیانگر کارایی تکثیر است. زمانی که کارایی تکثیر ۱۰۰ درصد باشد، به این معنی است که تعداد کپی‌ها در

بررسی بیان ژن‌ها

از نمونه‌های گیاهی استخراج RNA با استفاده از کیت RNasy Plant Mini Kit بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده صورت گرفت و برای ساخت cDNA از کیت RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis K1622 شرکت فرمنتاز به شرح زیر استفاده شد: یک میکروگرم RNA با یک میکرولیتر آغازگر OligodT مخلوط گردید و حجم آن به کمک آب عاری از نوکلئاز به ۱۲ میکرولیتر رسانده سپس به مدت ۵ دقیقه در ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در ادامه به تیوب‌ها چهار میکرولیتر بافر، یک میکرولیتر RNase inhibitor، دو میکرولیتر dNTP و یک میکرولیتر آنزیم نسخه‌برداری معکوس اضافه گردید و به مدت یک ساعت در ۴۵ درجه سانتی‌گراد و بعد از آن به مدت ۵ دقیقه در ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی در دستگاه icycler شرکت BioRad انجام گرفت. هر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شامل ۱۰ میکرولیتر SYBR Bio Pars (GUASNR)، 2X یک میکرولیتر آغازگرهای پیش‌رو و پس‌رو (غلظت ۱۰ پیکومول)، ۵

هر چرخه دو برابر می شود. بر روی گونه *A. annua* انجام شده است، در این تحقیق به دلیل آن که تاکنون بیشتر پژوهش‌های صورت گرفته گونه مرجع *A. annua* انتخاب شد.

جدول ۲- آغازگرهای طراحی شده برای واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی

نام آغازگر	توالی آغازگر	طول تکثیر (bp)
FDS-F FDS-R	5'-CTGCCCTTGGTTGGTATT-3' 5'-ATTCTCGGGACATGGTTACG-3'	169
SQS-F SQS-R	5'-TCGCGCTCTTGATACTGTTG-3' 5'-ATGAAAGGCGATCAGAATGG-3'	173
BAS-F BAS-R	5'- ATGGAGGTTGGGGAGAAAGC-3' 5'- ATCTCTCTCCGCCTGTCGAG-3'	134
18S rRNA-F 18S rRNA-R	5'-GCAACAAACCCCGACTTCTG-3' 5'-TGCGATCCGTCGAGTTATCA-3'	110

استفاده از آزمون مقایسه میانگین دانکن صورت گرفت.

اندازه‌گیری میزان آرتمیزیین

(۱) ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت‌های رویشی (برگ)، غنچه و گل نمونه‌های خشک‌شده وزن و ۲۰ میلی‌لیتر پترولوم اتر به آن‌ها اضافه شد. نمونه‌ها سه ساعت بر روی شیکر و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در حمام اولتراسونیک قرار گرفتند. محلول شناور را به یک بالن ۵۰ میلی‌لیتری منتقل کرده و به کمک دستگاه خشک‌کن در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تبخیر حلال انجام گرفت. سپس بقایا در پنج میلی‌لیتر استونیتریل مجدداً حل شده و توسط فیلتر نایلونی ۰/۴۵ میکرولیتر فیلتر شدند. در نهایت نمونه‌ها به ویال‌های HPLC منتقل و مقدار ۲۰ میکرولیتر به دستگاه تزریق شد. (۲) برای اندازه‌گیری آرتمیزیین از طول موج ۲۱۰ نانومتر، ستون C18 (125×4mm)، دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و فاز متحرک استونیتریل-اسیداستیک ۱/۰٪ (۶۰:۴۰ حجم/حجم) استفاده شد. سرعت جریان دستگاه یک میلی‌لیتر در دقیقه در نظر گرفته شد. جهت رسم منحنی استاندارد از غلظت‌های ۵، ۷، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آرتمیزیین استفاده شد (Gao-Bin et al., 2009) و میزان آرتمیزیین براساس میلی‌گرم در گرم ماده خشک از معادله زیر محاسبه گردید (Guo et al., 2010):

$$\text{میزان آرتمیزیین (میلی‌گرم در گرم ماده خشک)} = \frac{\text{میزان آرتمیزیین (میلی‌گرم)} \times \text{حجم نمونه تزریق شده} \times \text{حجم کل}}{\text{وزن نمونه} \times 1000}$$

همچنین مقایسه میزان آرتمیزیین در مراحل رویشی مختلف در قالب یک طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار با

نتایج و بحث

نتایج اندازه‌گیری آرتمیزیین در هفت گونه بومی ایران نشان داد اختلاف زیادی بین این گونه‌ها و مراحل رشدی مختلف به لحاظ قابلیت تولید این ترکیب وجود دارد. به طوری که مقدار آرتمیزیین بین ۰/۵۵ تا ۵/۲۵ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک گیاه متغیر بود. بیشترین میزان این ترکیب در بافت جوانه‌های گل گونه *A. annua* وجود دارد و گونه *A. diffusa* و *A. spicigeria* در مرحله رویشی کمترین میزان این ترکیب را دارند. بعد از گونه *A. annua* بافت جوانه‌های گل گونه *A. Vulgaris* بیشترین میزان این ترکیب را دارا است. اما در گونه‌های *A. absinthium*، *A. diffusa*، *A. sieberi* و *A. spicigeria* بیشترین مقدار آرتمیزیین در مرحله گلدهی دیده می‌شود و تنها گونه‌ای که بیشترین میزان آرتمیزیین را در بافت رویشی خود دارد، گونه *A. scoparia* است (شکل ۲).

بنابراین همان‌طور که پژوهش‌های مختلف (Ferriera 1995; Olofsson et al., 2011; Singh et al., 1998) نشان داده اند بهترین منبع استخراج این ترکیب غنچه‌های گونه *A. annua* است. اما اگر میزان آرتمیزیین را تنها در مرحله رویشی بین گونه‌های مورد مطالعه مقایسه کنیم، پس از گونه *A. scoparia* گونه *A. annua* بیشترین مقدار این ترکیب را در برگ‌های خود تولید می‌کند و در مقایسه بین جوانه‌های گل این گونه‌ها بالاترین مقدار آرتمیزیین پس از گونه *A. annua* مربوط به گونه

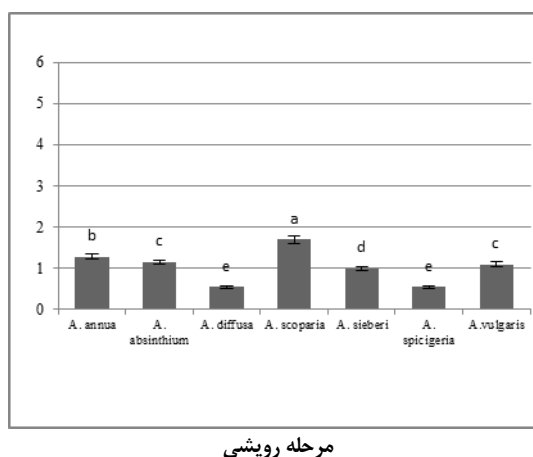
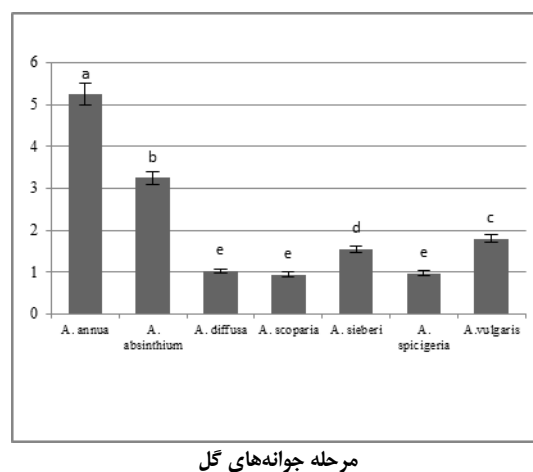
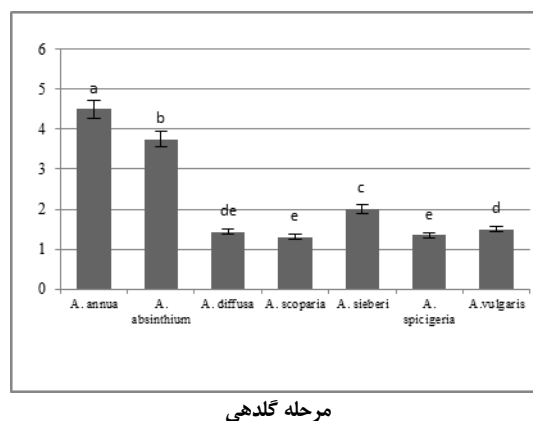
جوانه‌های گل و گلدهی (میلی‌گرم بر گرم وزن خشک گیاه). حروف a تا e گروه‌بندی بر اساس روش مقایسه میانگین دانکن را نشان می‌دهد.

همچنین با توجه به این که فرانسیل‌دی‌فسفات پیش‌ماده تمام استرول‌ها، سسکویی‌ترین‌ها و مونوترپن‌ها است (Chappell et al., 1995)، تجزیه بیان‌ژن فرانسیل‌دی‌فسفات سنتاز (*FDS*) در گونه‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد بین میزان بیان‌ژن *FDS* در مراحل رشدی و گونه‌های مختلف اختلاف زیادی وجود ندارد. به غیر از بافت برگ در *A. spicigeria* و *A. diffusa*، جوانه‌های گل در *A. sieberi* که بیان این ژن نسبت به *A. annua* بیشتر است و گل‌ها در *A. vulgaris* که بیان این ژن نسبت به *A. annua* کمتر است (شکل ۳). این در حالی است که محتوای آرتیمیزینین در این هفت گونه کاملاً متفاوت است و همان‌طور که Rashidi Monfared (۲۰۱۲) با مقایسه بین کموتایپ‌های مختلف *A. annua* بیان کرده است، اگر محقق به دنبال افزایش تولید آرتیمیزینین است افزایش بیان *FDS* که از ژن‌های بالادستی مسیر سنتز آرتیمیزینین است، نمی‌تواند موجب دستیابی بیشتر به این ترکیب شود. البته این ژن نقش مهمی در تولید آرتیمیزینین دارد به طوری که انتقال ژن *FDS* در موارد مختلفی باعث افزایش آرتیمیزینین شده است (Chen et al., 2000; Ram et al., 2010).

نتایج تجزیه بیان ژن *SQS* نشان داد عموماً بافت‌ها و گونه‌هایی که بیان این ژن در آن‌ها نسبت به *A. annua* به‌طور معنی‌داری کمتر بوده است، محتوای آرتیمیزینین بیشتری داشته‌اند اما عکس آن صدق نمی‌کند به طوری که بافت گل در گونه *A. scoparia* که میزان بیان این ژن در آن بیش از *A. annua* بوده است میزان آرتیمیزینین چندان پایینی نسبت به دیگر بافت‌ها و گونه‌ها نشان نمی‌دهد (شکل ۲ و ۴). بنابراین به دلیل آن که اسکوالن سنتاز با آنزیم کلیدی دخیل در مسیر بیوسنتز آرتیمیزینین یعنی *ADS* برای پیش‌ماده مشترک فرانسیل‌دی‌فسفات رقابت می‌کنند، هرچه میزان بیان *SQS* پایین‌تر باشد، آرتیمیزینین بیشتری خواهیم داشت. این مطلب مطابق با نتیجه‌ای است که Wang و همکاران (۲۰۱۲) به‌دست آورده‌اند. آن‌ها با خاموشی این ژن توانستند مقدار آرتیمیزینین را ۲۳/۲-۲۱/۵ درصد در واحد وزن خشک گیاه افزایش دهند. از سوی دیگر نمی‌توان بیان کرد هرچه بیان این آنزیم بالاتر باشد، لزوماً مقدار آرتیمیزینین در گیاه پایین‌تر است.

با توجه به این که میزان بیان‌ژن‌های *SQS* و *BAS* تنها در مرحله گلدهی گونه *A. scoparia* بیشتر از *A. annua*

A. absinthium و پس از آن *A. vulgaris* است و به همین ترتیب زمانی که میزان این ترکیب را در مرحله گلدهی بین گونه‌های مذکور مورد مقایسه قرار دهیم، بیشترین مقدار آرتیمیزینین در گل‌های گونه *A. annua* و پس از آن در بافت گل‌های گونه *A. absinthium* دیده می‌شود.

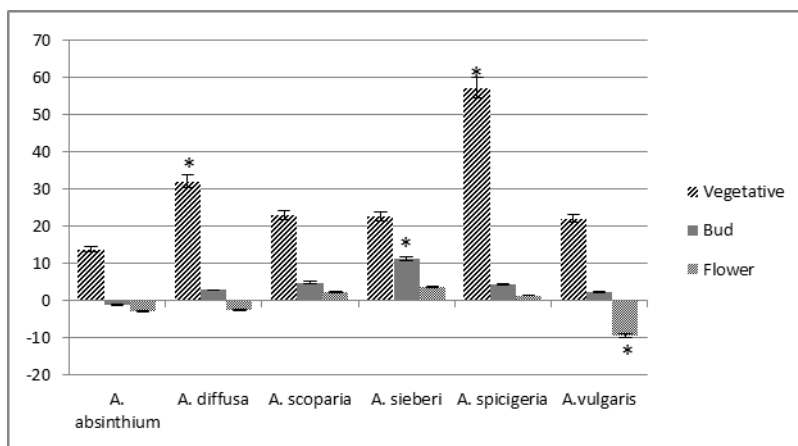


شکل ۲- مقایسه میزان آرتیمیزینین به تفکیک مراحل رویشی،

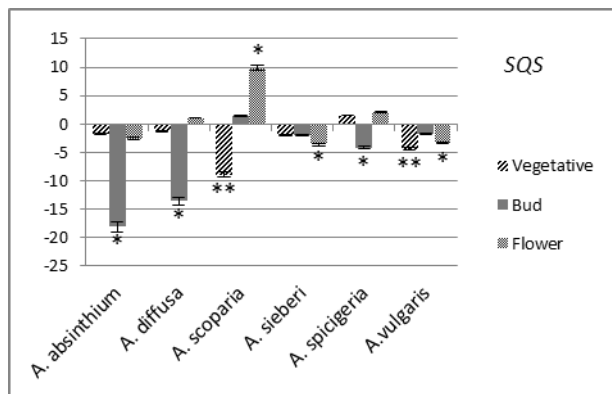
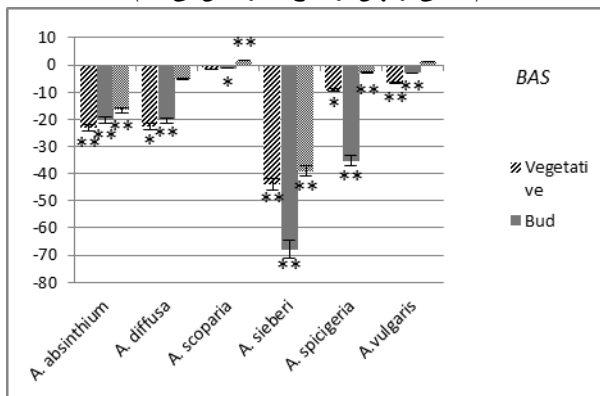
جدول ۳- مقایسه بیان ژن‌های SQS و BAS در بافت جوانه‌های گل و گل نسبت به برگ در *A. annua* (B/L بیان ژن در مرحله جوانه‌های گل نسبت به مرحله رویشی و F/L بیان ژن در مرحله گلدهی نسبت به مرحله رویشی را نشان می‌دهد).

Gene	B/L	F/L
SQS	-2.75	16.5
BAS	-3.21	-14.38

است و بافت گل در *A. annua* نیز نسبت به دیگر بافت‌ها بیان بالاتری از SQS نشان می‌دهد، بهترین منبع استخراج ترکیبات اسکوالن و بتاآمیرین بافت گل گونه *A. scoparia* و پس از آن گونه *A. annua* پیشنهاد می‌شود. با مقایسه بیان این دو ژن در مراحل رشدی مختلف *A. annua* مشخص می‌شود بافت گل برای استخراج ترکیب اسکوالن مناسب‌تر است و بافت برگ منبع بهتری برای دستیابی به بتاآمیرین می‌باشد (جدول ۳).



شکل ۳- بیان ژن FDS در بافت‌های رویشی، جوانه‌های گل و گل در شش گونه آرتیمیزیا نسبت به گونه *A. annua* (* معنی‌دار بودن در سطح ۵٪ را نشان می‌دهد).



شکل ۴- بیان ژن‌های *SQS* و *BAS* در مراحل رویشی، جوانه‌های گل و گل در شش گونه آرتمیسیا نسبت به گونه *A. Annuua*.
 (* معنی‌دار بودن در سطح ۵٪ و ** معنی‌دار بودن در سطح ۱٪ را نشان می‌دهد).

REFERENCES

- Abad MJ, Bedoya LM, Luis A, Bermejo P (2012) The *Artemisia* L. Genus: A Review of Bioactive Essential Oils. *Molecules*. 17: 2542-2566.
- Bosman A, Mendis KN (2007) A major transition in malaria treatment: The adoption and deployment of artemisinin-based combination therapies. *Am J Trop Med Hyg*. 77: 193-197.
- Bustos MD, Gay F, Diquet B (1994) In-vitro tests on Philippine isolates of *Plasmodium falciparum* against four standard antimalarials and four qinghaosu derivatives. *Bulletin of the World Health Organization*. 72: 729-735.
- Carr TP, Jesch ED (2006) Food components that reduce cholesterol absorption. *Adv Food Nutr Res*. 51: 165-204.
- 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.
- Chappell J, Wolf F, Proulx J, Cuellar R, Saunders C (1995) Is the reaction catalyzed by 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase a rate-limiting step for isoprenoid biosynthesis in plants?. *Plant Physiol*. 109: 1337-1343.
- Connolly JD, Hill RA (2007) Triterpenoids. *Nat Prod Rep*. 24: 465-486.
- Edrissian GhH (2006) Malaria in Iran: Past and Present Situation. *Iranian J Parasitol*. 1: 1-14.
- Efferth T, Dunstan H, Sauerbrey A, Miyachi H, Chitambar CR (2001) The antimalarial artesunate is also active against cancer. *Int J Oncol*. 18: 767-773.
- Enserink M (2005) Infectious diseases. Source of new hope against malaria is in short supply. *Science*. 5706: 33.
- Ferreira JFS, Simon JE, and Janick J (1995) Developmental studies of *Artemisia annua*: flowering and artemisinin production under greenhouse and field conditions. *Planta Med*. 61: 167-170.
- Ferreira FS, Devanand L, Luthria DL, Sasaki T. and Heyerick A (2010) Flavonoids from *Artemisia annua* L. as Antioxidants and Their Potential Synergism with Artemisinin against Malaria and Cancer. *Molecules*. 15: 3135-3170.
- Fox CB (2009) Squalene Emulsions for Parenteral Vaccine and Drug Delivery. *Molecules*. 14: 3286-3312.
- Gao-Bin P, Dong-Ming M, Jian-Lin C, Lan-Qing M, Hong W, Guo-Feng L, He-Chun Y, Liu BY (2009) Salicylic acid activates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. *Plant Cell Reports*. 28: 1127-1135.
- Holanda Pinto S.A, Pinto L. M. S, Cunha G. M. A, Chaves M. H, Santos F. A, Rao V. S (2008) Anti-inflammatory effect of a, b-Amyrin, a pentacyclitriterpene from *Protiumheptaphyllum* in rat model of acute periodontitis. *Inflammopharmacology* 16: 48-52.
- Hung CF, Hwang TL, Chang CC, Fang JY (2005) Physicochemical characterization and genetransfection efficiency of lipid emulsions with various co-emulsifiers. *Int. J. Pharm*. 289: 197-208.
- Kelly GS (1999) Squalene and its potential clinical uses. *Alter. Med. Rev*. 4: 29-36.
- Kwon SM, Nam HY, Nam T, Park K, Lee S, Kim K, Kwon IC, Kim J, Kang D, Park JH, Jeong SY (2008) In vivo time-dependent gene expression of cationic lipid-based emulsions as a stable and biocompatible non-viral gene carrier. *J. Control. Rel*. 128: 89-97.
- Lai H, Singh NP (2006) Oral artemisinin prevents and delays the development of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced breast cancer in the rat. *Cancer Letters*. 231: 43-48.
- Otuki MF, Ferreira J, Vieira-Lima F, Silva CM, Malheiros A, Muller LA, Cani GS, Santos A.R.S, Yunes RA, Calixto J.B.J (2005) Antinociceptive Properties of Mixture of Amyrin and -Amyrin Triterpenes: Evidence for Participation of Protein Kinase C and Protein Kinase A Pathways. *Pharmacol.*

- Exp. Ther. 313: 310-318.
- Olofsson L, Engström A, Lundgren A, Brodelius PE (2011) Relative expression of genes of terpene metabolism in different tissues of *Artemisia annua* L. *BMC Plant Biology*. 45: 1-12.
- Paik IH, Xie S, Shapiro TA, Labonte T, NarducciSarjeant AA, Baege AC, Posner GH (2006) Second generation, orally active, antimalarial, artemisinin-derived trioxanedimers with high stability, efficacy, and anticancer activity. *Journal of Medicinal Chemistry*. 49: 2731-2734.
- 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.
- Ram M, Khan MA, Jha PS, Kiran U, Ahmad MM, Javed S, Abdin MZ (2010) HMG-CoA reductase limits artemisinin biosynthesis and accumulation in *Artemisia annua* L. plants. *Acta Physiologica Plant*. 32: 859-866.
- Ranjbar M (1391) characterization and study of some mono- and sesquiterpene in some species of *Artemisia*. PhD Dissertation, University of Tehran.
- Rashidi Monfared S (1391) Study of role genes involved in Artemisinin biosynthesis in different chemotypes of *Artemisia annua* of Iran. PhD Dissertation, University of Tehran.
- Romero MR., Serrano MA., Vallejo M, Efferth T, Alvarez M, Marin JJ (2006) Antiviral effect of artemisinin from *Artemisia annua* against a model member of the Flaviviridae family, the Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV). *Planta Med*. 72: 1169-1174.
- Sarvestani R (1391) Isolation and characterization of DBR2 promoter from *Artemisia annua*. M.S Dissertation, University of Tehran.
- Singh A, Vishwakarma RA, Husain A (1988) Evaluation of *Artemisia annua* Strains for Higher Artemisinin Production. *Planta Med*. 54: 475-476.
- Smith TJ (2000) Squalene Potential chemopreventive agent. *Expert Opin. Investig. Drugs*. 9: 1841-1848.
- Soldi C, Pizzolatti MG, Luiz AP, Marcon R, Meotti FC, Miotob A, Santos RS (2008) Synthetic derivatives of the a- and b-amyrrin triterpenes and their antinociceptive properties. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 16: 3377-3386.
- Suzuki H, Achnine L, Xu R, Matsuda SP, Dixon RA (2002) A genomics approach to the early stages of triterpenesaponin biosynthesis in *Medicago truncatula*. *Plant J*. 32: 1033-1048.
- Taylor WG, Fields PG, Sutherland DH (2004) Insecticidal components from field pea extracts: soyasaponins and lysolecithins. *J Agric Food Chem*. 52: 7484-7490.
- Vincken JP, Heng L, de Groot A, Gruppen H (2007) Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry*. 68: 275-297.
- Wallace RJ (2004) Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. *Proc Nutr Soc*. 63: 621-629.
- Wang H, Song Y, Shen H, Liu Y, Li Z, Wang H, Chen J, Liu B, Ye H (2012) Effect of Antisense Squalene Synthase Gene Expression on the Increase of Artemisinin Content in *Artemisia annua*. *Agricultural and Biological Sciences, Transgenic Plants - Advances and Limitations*. book edited by Yelda Özden Çiftçi, ISBN 978-953-51-0181-9, Published: March 7
- Webster hk, lehnert EK (1994) chemistry of artemisinin: an overview. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 88: 27-29.