**Crop Biotech.**
Autumn and Winter (2013) 5: 23-31

**مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی**
سال سوم، شماره پنجم، پائیز و زمستان ۱۳۹۲ (۳۱- ۲۳)

# 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 رییسی[۶]**
۱، ۶ دانشجویان کارشناسی ارشد، ۲، ۳، ۵ به‌ترتیب 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 BOROUJENI[1], M.R. NAGHAVI[2]*, A. ABBASI[3], H. SOLTANLOO[4], M. RANJBAR[5], AND S. RAEISI[6]**
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 )

**چکیده**

جنس آرتمیزیا به‌عنوان یکی از مهمترین گیاهان دارویی شناخته شده است. انواع مختلفی از ترپنوئیدها در این جنس تولید می‌گردد. آرتمیزینین، سسکویی‌ترپنی با خاصیت ضدمالاریای و ضدسرطانی و تری‌ترپن‌های اسکوالن و بتاآمیرین از ترکیبات دارویی مهمی هستند که توسط گونه‌های آرتمیزیا تولید می‌شوند. از آنجا که فارنسیل‌دی‌فسفات پیش‌ماده تمام تری‌ترپن‌ها و سسکویی‌ترپن‌ها است، بیان ژن فارنسیل‌دی‌فسفات‌سنتاز (*FDS*) به همراه اسکوالن سنتاز (*SQS*) و بتاآمیرین سنتاز (*BAS*) در هفت گونه آرتمیزیای بومی ایران در سه مرحله رشدی مختلف با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز 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 بتاآمیرین شناسایی شد.

**واژه‌های کلیدی:** آرتمیزینین، اسکوالن، بتاآمیرین، بیان‌ژن، مرحله رشدی

**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-amyrin, 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-amyrin 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-amyrin.

**Keywords:** Artemisinin, squalene, β-amyrin,Gene expression, Developmental stage

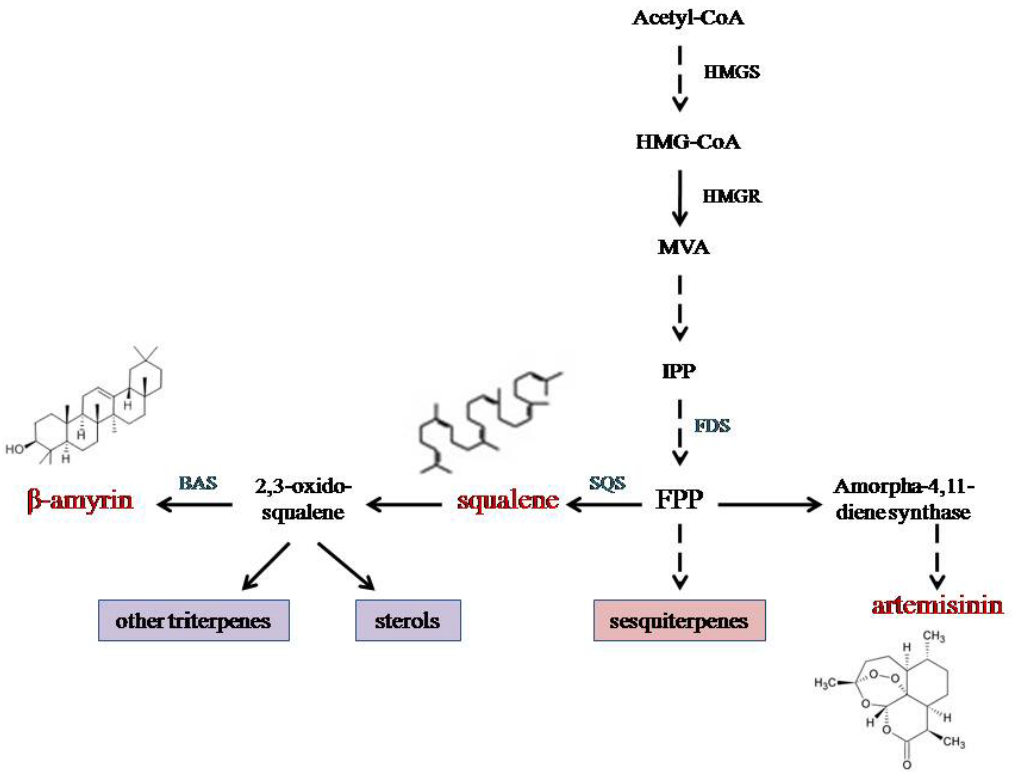
* نویسنده مسئول: محمدرضا نقوی
E-mail: mnaghavi@ut.ac.ir

## مقدمه

گونه‌های متعلق به جنس آرتمیزیا (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 می شود (Abad *et al.*, 2012). اخیراً *Artemisia annua* به‌دلیل تولید بعضی از مونوترپن‌ها و سسکویی‌ترپن‌ها مخصوصاً آرتمیزینین و ترکیبات فنولی، بیش از پیش مورد توجه قرار گرفته است. امروزه آرتمیزینین به‌طور 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 می شود (Edrissian. 2006).

گزارشات مختلفی نشان داده است که آرتمیزینین و مشتقات آن علاوه بر درمان مالاریا، در درمان بیماری‌های مختلفی از جمله انواع سرطان، مخصوصاً سرطان خون، هپاتیت B و سالک به‌کار می‌رود (Lai and Singh, 2006; Efferth *et al.*, 2001; Romero *et al.*, 2006). ویژگی منحصر به فرد آرتمیزینین در تخریب سلول‌های سرطانی بدون آسیب به سلول‌های مجاور است. این قابلیت به‌دلیل وجود پل اندوپراکسیدی در ساختمان این ترکیب به‌وجود آمده است و حضور همین پل فعالیت آن را علیه انگل‌های مالاریا ممکن می‌کند (Paik *et al.*, 2006; Bustos *et al.*, 1994). آرتمیزینین 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 سسکویی‌ترپن سنتاز در *A. annua* بیان می‌شوند و میزان تولید آن‌ها در بافت‌های مختلف گیاه متفاوت است. تمامی این مونوترپن‌ها و سسکویی‌ترپن‌ها برای یک پیش‌ماده مشترک – فارنسیل دی فسفات (FDP) – که خود پیش‌ماده آرتمیزینین است، رقابت می‌کنند. در نتیجه، فعالیت سسکویی‌ترپن سینتازهای مختلف بر محصول آرتمیزینین در گیاه مؤثر است. فارنسیل‌دی‌فسفات جهت ساخت اسکوالن نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد. اسکوالن، خود پیش‌ماده استرول‌ها و تری‌ترپن‌ها است (Olofsson *et al.*, 2011). شکل ۱ مسیر بیوسنتزی آرتمیزینین و دیگر ترپن سنتازها را در *A. annua* نشان می‌دهد.




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

علاوه بر آرتمیزینین تری‌ترپن‌ها و سسکویی‌ترپن‌های دیگری در جنس آرتمیزیا تولید می‌شود که دارای کاربردهای دارویی و صنعتی هستند. اسکوالن یک تری‌ترپن خطی می باشد که دارای فعالیت ضدسرطانی و آنتی‌اکسیدانی است (Smith. 2009; Kelly. 1999). همچنین در ناقل‌های gene transfection مورد استفاده قرار می‌گیرد که در مقابل ناقل‌های لیپوزومی و پلیمری سمیت کمتری نشان می‌دهد (Hung *et al.*, 2005; Kwon *e al.*, 2008). به علاوه به‌عنوان نانوامولسیون غیرسمی و پایدار در دارورسانی[1] و ساخت واکسن‌ها به‌کار می‌رود (Fox. 2009). بتاآمیرین نیز یک تری‌ترپن پنج‌حلقه‌ای و از محصولات اسکوالن است. این ترکیب اثرات ضدالتهاب، ضد دردهای عصبی و ضدآلرژی نشان می‌دهد (Holanda Pinto *et al.*, 2008; Otuki *et al.*, 2005; Soldi *et al.*, 2008). فعالیت آنزیم‌های اکسیداتیو مانند سیتوکروم P450 مونواکسیژناز و گلیکوسیل ترنسفراز، بتاآمیرین را به انواع ساپونین‌های تری‌ترپنی در گونه‌های مختلف گیاهی تبدیل می‌کند (Vincken *et al.*, 2007; Connolly and Hill. 2007; Suzuki *et al.*, 2002). ساپونین‌ها اثر حفاظتی در گیاه میزبان به‌عنوان ضدمیکروب (Wallace. 2004) و دافع حشرات (Taylor. 2004) دارند. همچنین اثر ساپونین‌های گیاهی به‌عنوان ضدگرفتگی عروق مورد توجه قرار گرفته است (Jesch and Carr, 2006).

Rashidi Monfared (۲۰۱۲) به مقایسه بیان نسبی ژن‌های اسکوالن سنتاز و بتاآمیرین سنتاز در کموتایپ‌های وحشی *A. annua* ایران پرداخته است و Ranjbar (۲۰۱۲) بیان نسبی ژن‌های *HMGR*، آمورفا- ۱۱،۴-داین سنتاز (*ADS*)، بتا کاریوفیلن 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) به‌منظور شناخت مکانیسم تنظیم بیان ژن آرتمیزینیک آلدهید ریداکتاز (*DBR2*) جداسازی و شناسایی پروموتر این ژن را به انجام رساند. همچنین Elefsen و همکاران (۲۰۱۱) به مقایسه بیان نسبی ژن‌های اسکوالن سنتاز و فارنسیل‌دی‌فسفات سنتاز در بافت‌های مختلف گونه *A. annua* پرداختند. بنابراین تاکنون بررسی بیان نسبی ژن‌های اسکوالن سنتاز و بتاآمیرین سنتاز که از ژن‌های مؤثر در مسیر بیوسنتز آرتمیزین، در شاخه‌های فرعی مسیر هستند در گونه‌های مختلف آرتمیزیا صورت نگرفته است.

1. Drug Delivery

با توجه به مطالب فوق و اهمیت ترکیبات آرتمیزینین، اسکوالن و بتاآمیرین، 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 است. بذور هر گونه پس از ضدعفونی با هیپوکلریت‌سدیم ۲۰ درصد، به‌مدت 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 اتاقک 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.

جدول ۱- نام گونه‌ها و مشخصات محل جمع‌آوری آن‌ها

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

### 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 ۱۲میکرولیتر 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 میکرولیترdNTP و یک میکرولیتر آنزیم نسخه‌برداری معکوس اضافه گردید و به‌مدت یک ساعت در ۴۵ درجه سانتی‌گراد و بعد از آن به‌مدت ۵ دقیقه در ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در زمان واقعی در دستگاه icycler شرکت BioRad انجام گرفت. هر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شامل ۱۰ میکرولیتر SYBR Bio Pars (GUASNR), 2X، یک میکرولیتر آغازگرهای پیش‌رو و پس‌رو (غلظت ۱۰ پیکومول)، ۵ 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 بتاآمیرین 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 (جدول۲). سپس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار REST 2002، (Pfaffl *et al.*, 2002) بر اساس مدل ریاضی زیر تجزیه و تحلیل شدند:

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

R بیانگر اختلاف بیان ژن‌ها در دو نمونه مورد مقایسه است، که فاقد واحد بوده و میزان چند برابرشدن 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

هر چرخه دو برابر می شود.

به‌دلیل آن که تاکنون بیشتر پژوهش‌های صورت گرفته بر روی گونه *A. annua* انجام شده است، در این تحقیق گونه مرجع *A. annua* انتخاب شد.

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

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

**اندازه‌گیری میزان آرتمیزینین**

۱) ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت‌های رویشی (برگ)، غنچه و گل نمونه‌های خشک‌شده وزن و ۲۰ میلی‌لیتر پترولئوم اتر به آن‌ها اضافه شد. نمونه‌ها سه ساعت بر روی شیکر و سپس به‌مدت 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 آرتمیزینین از طول موج ۲۱۰ نانومتر، ستون C18 (125×4mm)، دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و فاز متحرک استونیتریل-اسیداستیک ۰/۱٪ (۶۰:۴۰ حجم/حجم) استفاده شد. سرعت جریان دستگاه یک میلی‌لیتر در دقیقه درنظر گرفته شد. جهت رسم منحنی استاندارد از غلظت‌های ۵، ۷، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آرتمیزینین استفاده شد (Gao-Bin *et al.*, 2009) و میزان آرتمیزینین براساس میلی‌گرم در گرم ماده‌خشک از معادله زیر محاسبه گردید (Guoet *et al.*, 2010):

= میزان آرتمیزینین (میلی‌گرم در گرم ماده خشک)

میزان آرتمیزینین (میلی‌گرم)/ حجم نمونه تزریق‌شده × حجم کل/ وزن نمونه × ۱۰۰۰

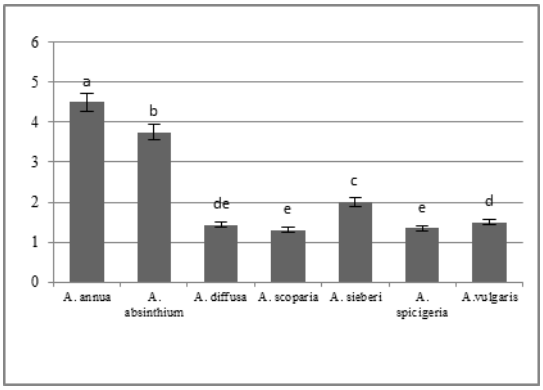
همچنین مقایسه میزان آرتمیزینین در مراحل رویشی مختلف در قالب یک طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار با استفاده از آزمون مقایسه میانگین دانکن صورت گرفت.

## نتایج و بحث

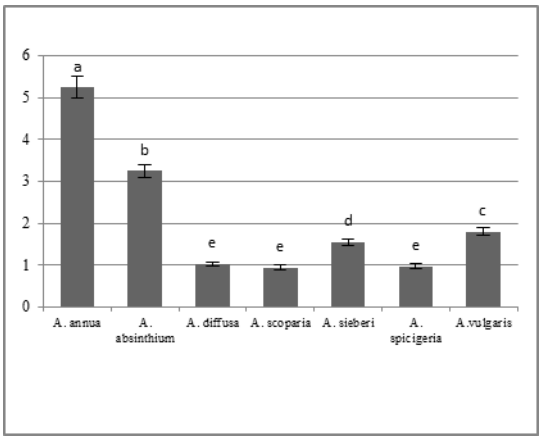
نتایج اندازه‌گیری آرتمیزینین در هفت گونه بومی ایران نشان داد اختلاف زیادی بین این گونه‌ها و مراحل رشدی مختلف به لحاظ قابلیت تولید این ترکیب وجود دارد. به‌طوری که مقدار آرتمیزینین بین ۰/۵۵ تا ۵/۲۵ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک گیاه متغیر بود. بیشترین میزان این ترکیب در بافت جوانه‌های گل گونه *A. annua* وجود 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. absenthium*، *A. diffusa*، *A. sieberi* و *A. spicigeria* بیشترین مقدار آرتمیزینین در مرحله گلدهی دیده می‌شود و تنها گونه‌ای که بیشترین میزان آرتمیزینین را در بافت رویشی خود دارد، گونه *A. scoparia* است (شکل۲).

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 آرتمیزینین 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 آرتمیزینین پس از گونه *A. annua* مربوط به گونه

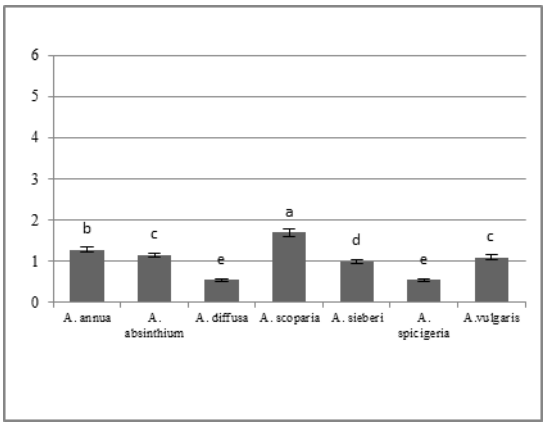
*A. absinthium* و پس از آن *A. vulgaris* است و به همین ترتیب زمانی که میزان این ترکیب را در مرحله گلدهی بین گونه‌های مذکور مورد مقایسه قرار دهیم، بیشترین مقدار آرتمیزینین در گل‌های گونه *A. annua* و پس از آن در بافت گل‌های گونه *A. absinthium* دیده می‌شود.




**مرحله گلدهی**




**مرحله جوانه‌های گل**




**مرحله رویشی**

شکل ۲- مقایسه میزان آرتمیزینین به تفکیک مراحل رویشی، جوانه‌های گل و گلدهی (میلی‌گرم بر گرم وزن‌خشک گیاه). حروف a تا e گروه‌بندی بر اساس روش مقایسه میانگین دانکن را نشان می‌دهد.

همچنین با توجه به این که فارنسیل‌دی‌فسفات پیش‌ماده تمام استرول‌ها، سسکویی‌ترپن‌ها و مونوترپن‌ها است (Chappell *et al.*, 1995)، تجزیه بیان‌ژن فارنسیل‌دی فسفات 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 برگی در *A. diffusa* و *A. spicigeria*، 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 آرتمیزینین 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 آرتمیزینین است افزایش بیان *FDS* که از ژن‌های بالادستی مسیر سنتز آرتمیزینین است، نمی‌تواند موجب دستیابی بیشتر به این ترکیب شود. البته این ژن نقش مهمی در تولید آرتمیزینین دارد به‌طوری‌که انتقال ژن *FDS* در موارد مختلفی باعث افزایش آرتمیزینین شده است (Chen *et al.*, 2000; Ram *et al.*, 2010).

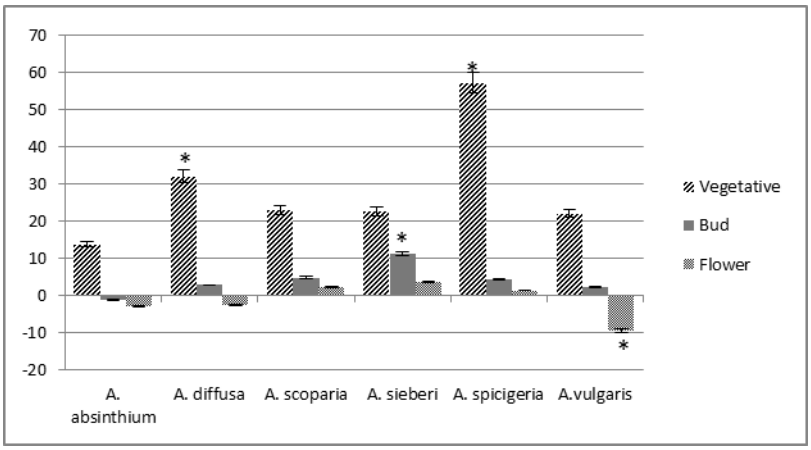
نتایج تجزیه بیان ژن *SQS* نشان داد عموماً بافت‌ها و گونه هایی که بیان این ژن در آن‌ها نسبت به *A. annua* به‌طور معنی‌داری کمتر بوده است، محتوای آرتمیزینین بیشتری داشته‌اند اما عکس آن صدق نمی‌کند به‌طوری‌که بافت گل در گونه *A. scoparia* که میزان بیان این ژن در آن بیش از *A. annua* بوده است میزان آرتمیزینین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

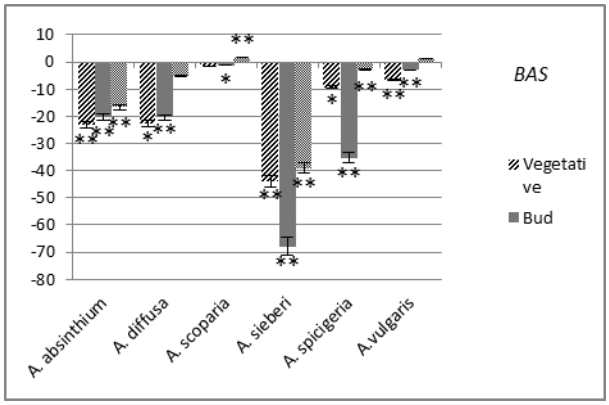
است و بافت گل در *A. annua* نیز نسبت به دیگر بافت‌ها بیان بالاتری از *SQS* نشان می‌دهد، بهترین منبع استخراج ترکیبات اسکوالن و بتاآمیرین بافت گل گونه *A. scoparia* و پس از آن‌گونه *A. annua* پیشنهاد می‌شود. با مقایسه بیان این دو ژن در مراحل رشدی مختلف *A. annua* مشخص می‌شود بافت گل برای استخراج ترکیب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

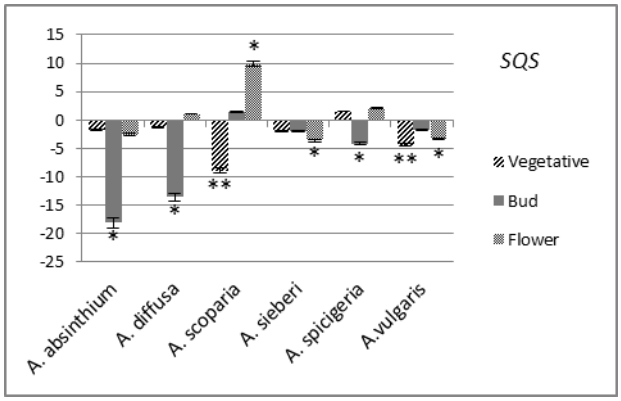
جدول ۳- مقایسه بیان ژن‌های *SQS* و *BAS* در بافت جوانه‌های گل و گل نسبت به برگ در *A.annua*. (B/L بیان‌ژن در مرحله جوانه‌های گل نسبت به مرحله رویشی و F/L بیان‌ژن در مرحله گلدهی نسبت به مرحله رویشی را نشان می‌دهد.)

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




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



شکل۴- بیان‌ژن‌های *SQS* و *BAS* در مراحل رویشی، جوانه‌های گل و گل در شش گونه آرتمیزیا نسبت به گونه *A. Annua*
(* 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 an timalarials 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 farnesyldiphosphate 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 an timalarial 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, andJanick 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 pentacyclictriterpene 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 emulsionas 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 7,12dimethylbenz[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 -AmyrinTriterpenes: 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, orallyactive, antimalarial, artemisinin-derived trioxanedimers with high stability, efficacy, and anticanceractivity. 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. ActaPhysiol 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-amyrintriterpenes 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 Medicagotruncatula. Plant J. 32: 1033-1048.

Taylor WG, Fields PG, Sutherland DH (2004) Insecticidalcomponents from field pea extracts: soyasaponinsandlysolecithins. 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 plantsecondary metabolites. ProcNutrSoc. 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 anuua. Agricultural and Biological Sciences, Transgenic Plants - Advances and Limitations. book edited by YeldaÖzdenÇiftçi, ISBN 978-953-51-0181-9, Published: March 7

Webster hk, lehnert EK (1994) chemistery of artmisinin: an overview. Trans R Soc Trop Med Hyg. 88: 27-29.