

بررسی بیان ژن‌های *ADS*، *DBR2* و *SQS* در پنج گونه مختلف درمنه (*Artemisia*)

کاظم یاری‌زاده، رامین حسینی * و مونا مقدمی

گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران

چکیده

آرتمیزینین یک متابولیت ثانویه با خاصیت دارویی ضد مالاریایی است. علاوه بر فعالیت ضد مالاریایی در مقابل طیف وسیعی از سرطان‌ها نظیر: لوسمی انسانی، سرطان سینه، سرطان کولون و کارسینوما مؤثر است. این ماده همچنین خواص ضد هپاتیت B، ضد ایدز دارد و از فعالیت ضد انگل *Lieshmania* و *Schistosoma* برخوردار است. این ماده توسط گونه‌های مختلف جنس *Artemisia* (درمنه) ساخته می‌شود و برای نخستین بار در *A. annua* مشاهده گردید. در مطالعه حاضر، الگوی بیان ژن‌های مرتبط با بیوسنتز آرتمیزینین یعنی ژن‌های *ADS*، *DBR2* و *SQS* در پنج گونه مختلف جنس *Artemisia* (*A. dracuncululus*، *A. annua*، *A. absinthium*، *A. sieberi* و *A. vulgaris*) مطالعه شد. استخراج RNA کل و ساخت cDNA از نمونه‌های برگ گیاهان درون شیشه‌ای دو ماهه انجام شد. برای مطالعه بیان ژن‌های مورد نظر از واکنش sqRT-PCR و از ژن *Actin* به عنوان شاهد استفاده شد. همچنین محصولات PCR روی ژل آگاروز ۱ درصد (وزنی/حجمی) بارگذاری شدند. کمی‌سازی شدت باندها با نرم‌افزار Image J و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام شد. نتایج نشان داد که الگوی بیان ژن‌های مورد مطالعه در این پنج گونه متفاوت بود به طوری که در *A. vulgaris*، *A. dracuncululus* و *A. annua* بیشترین بیان مربوط به ژن *SQS* بود. در *A. sieberi* و *A. absinthium* بالاترین سطح بیان ژن به *ADS* تعلق داشت. الگوی متفاوت بیان می‌تواند دلیلی بر تفاوت محتوای آرتمیزینین در این گونه‌ها باشد.

واژه‌های کلیدی: آرتمیزینین، درمنه، بیان ژن، آمورفا-۴ و ۱۱-دی ان سینتاز، اسکوالن سینتاز

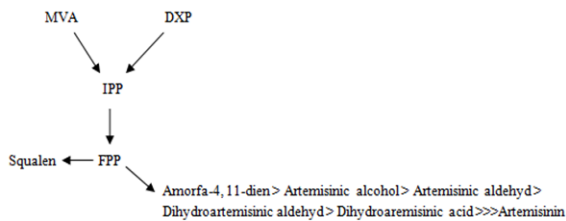
مقدمه

A. annua (Qinghao) از تیره Asteraceae کشف شد (Feng et al., 2009). عملکرد مهارتی آرتمیزینین در برابر انگل عامل مالاریا یعنی *Plasmodium phalsiparum* به علت مهارت فعالیت Ca^{2+} ATPase شبکه سارکو/

آرتمیزینین یک مولکول سزکوئی‌ترین لاکتون پراکسید است که خواص ضد مالاریایی آن نخستین بار توسط پژوهشگران چینی در سال ۱۹۷۰ در گیاه دارویی

* نگارنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: t.hosseini@eng.ikiu.ac.ir شماره تماس: ۰۲۸۳۳۹۰۱۱۶۰

Schramek؛Guo *et al.*, 2010؛Teoh *et al.*, 2006)
et al., 2010)



شکل ۱- ارتباط مسیرهای موالونات و داکسی گزیلولوز فسفات و مسیر ساخت اسکوالن با مسیر ساخت آرتیمیزینین. از دو مسیر داکسی گزیلولوز فسفات (DXP) و موالونات (MVA) پیش ساز آرتیمیزینین یعنی فارنسیل دی فسفات (FPP) ساخته می شود که این مولکول در دو مسیر مجزا برای ساخت اسکوالن و آرتیمیزینین مورد استفاده قرار می گیرد (Schramek *et al.*, 2010).

از زمانی که اهمیت آرتیمیزینین در مقابل انگل مالاریا کشف شد، پژوهش‌های زیادی در زمینه افزایش محتوای آرتیمیزینین در گیاه و یافتن گونه‌های جدید حاوی مقدار بالای آرتیمیزینین انجام شد. آرتیمیزینین در برگ‌ها، ساقه‌های سبز کوچک، گل‌ها و بذرها تجمع می‌یابد (Jha *et al.*, 2011). کرک‌های غده‌ای ترش‌چی (GST) *A. annua* روی این اندام‌ها به عنوان محل ساخت آرتیمیزینین به شمار می‌روند (Teoh *et al.*, 2006). Guo و همکاران (۲۰۱۰)، اثر سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات را بر بیان ژن‌های مرتبط با مسیر ساخت آرتیمیزینین در *A. annua* مطالعه و گزارش کردند که سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات میزان رونوشت mRNA مربوط به ژن *ADS* را نسبت به شاهد افزایش داد. این در حالی بود که دو ژن سیتوزولی ساخت ترپن‌ها یعنی فارنسیل دی فسفات سینتاز (*FDS*) و *SQS* نسبت به تیمارها پاسخی از خود نشان ندادند. Rai و همکاران (۲۰۱۱) بیان *ADS*، سیتوکروم P450 اکسیدو

اندوپلاسمی و تغییر در ساختار غشای سیتوپلاسمی انگل‌های درون گلبول‌های قرمز است (Eckstein- Ludwig *et al.*, 2003).

آرتیمیزینین علاوه بر خاصیت ضد مالاریایی، در برابر طیف وسیعی از سرطان‌ها مانند لوسمی انسانی و سرطان کولون و سینه مؤثر است (Lei *et al.*, 2011). همچنین فعالیت ضد ویروسی و ضد انگل‌هایی نظیر *Leishmania* و *Schistosoma* نیز دارد (Utzinger *et al.*, 2007). Jha *et al.*, 2011) فارنسیل دی فسفات (FPP) پیش ساز سزکوئی‌ترپن‌ها از جمله آرتیمیزینین است. آنزیم ایزوپنتیل دی فسفات سینتاز بیوستتاز فارنسیل دی فسفات را از ایزوپنتیل دی فسفات (IPP) کاتالیز می‌کند. در گیاهان عالی دو مسیر مجزا برای بیوستتاز ایزوپنتیل دی فسفات وجود دارد؛ مسیر سیتوزولی موالونات (MVA) و مسیر پلاستییدی داکسی گزیلولوز دی فسفات (DXP) (Covello, 2008؛ Covello *et al.*, 2007). مرحله کلیدی در بیوستتاز آرتیمیزینین تبدیل فارنزیل دی فسفات به آمورفا-۱۱و۴-دی ان است که توسط آنزیم آمورفا-۱۱و۴-دی ان سینتاز (ADS) کاتالیز می‌شود. سیتوکروم P450 هیدروکسیلاز (CYP71AV1) آمورفا-۱۱و۴-دی ان را به آرتیمیزینیک الکل تبدیل می‌کند. این آنزیم همچنین آرتیمیزینیک الکل را به آرتیمیزینیک آلدهید و در ادامه به آرتیمیزینیک اسید اکسید می‌کند. دی هیدرو آرتیمیزینیک اسید از آرتیمیزینیک آلدهید در دو مرحله ایجاد می‌شود. این دو مرحله توسط آنزیم‌های آرتیمیزینیک آلدهید ردوکتاز (DBR2) و آلدهید دهیدروژناز ۱ (ALDH1) انجام می‌شود. در نهایت، تبدیل دی هیدرو آرتیمیزینیک اسید به آرتیمیزینین طی واکنش‌های غیر آنزیمی صورت می‌گیرد (شکل ۱)

یعنی *ADS* مربوط به مسیر ساخت آرتیمیزینین و *SQS* مربوط به مسیر ساخت استرول‌ها و تولید آرتیمیزینین می‌تواند در شناسایی علت تفاوت میزان تولید آرتیمیزینین در گونه‌های مختلف قابل مطالعه باشد. در این مطالعه الگوی بیان سه ژن (*ADS*، *DBR2* و *SQS*) مرتبط با ساخت آرتیمیزینین در بافت برگ پنج گونه: *A. dracunculus*، *A. annua*، *A. absinthium*، *A. sieberi* و *A. vulgaris* با هدف بررسی ارتباط بین بیان این ژن‌ها و میزان تولید آرتیمیزینین مطالعه شد.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی: محیط پایه MS و آگار از شرکت Duchefa هلند خریداری شد. کلرید جیوه از Merck آلمان و الکل اتیلیک از شرکت بیدستان، ایران تهیه شد.

مواد گیاهی و شرایط کشت: بذرهای پنج گونه *Artemisia* (*A. annua*، *A. absinthium*، *A. dracunculus*، *A. sieberi* و *A. vulgaris*) از مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع، کرج تهیه شد. پیش از ضدعفونی شدن، جهت شکستن خواب بذرها، بذرها به مدت دو هفته در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. ضدعفونی در شرایط کاملاً استریل انجام شد. بذرها ابتدا به مدت ۳ ثانیه در الکل ۹۶ درصد (حجمی) غوطه‌ور و سپس با استفاده از آب مقطر استریل به مدت ۵ دقیقه شستشو شدند. سپس، به مدت ۵ دقیقه در محلول کلرید جیوه ۰/۱ درصد حاوی یک قطره تویین ۸۰ غوطه‌ور و پس از آن سه مرتبه با آب مقطر استریل هر مرتبه به مدت ۵ دقیقه شستشو شدند (Sujatha et al., 2013). برای کشت بذرها از محیط کشت MS

ردوکتاز (*CPR*) و سیتوکروم P450 مونواکسیژناز (*CYP450*) را در مراحل جوانه زنی و گل دهی گونه *A. annua* را در گیاهان تیمار شده با اشعه UV-C و گیاهان شاهد مطالعه کردند. آنها مشاهده کردند که بیان همه ژن‌های مورد نظر در پاسخ به اشعه UV-C در هر دو مرحله گل دهی و جوانه زنی افزایش یافت.

اگرچه *A. annua* اصلی‌ترین منبع آرتیمیزینین است، سایر گونه‌های *Artemisia* نیز حاوی آرتیمیزینین هستند و برای یافتن گونه‌ای با بالاترین محتوای آرتیمیزینین مورد مطالعه قرار می‌گیرند. وجود آرتیمیزینین در گونه‌های دیگر از جمله: *A. cina*، *A. apiacea*، *A. absinthium*، *A. sieberi*، *A. lancea*، *A. indica*، *A. dubia* تأیید شده است (Aryanti et al., 2001؛ Arab et al., 2006؛ Hsu, 2006؛ Mannan et al., 2007؛ Zia et al., 2008). از ۱۷ گونه *Artemisia* بررسی شده توسط Mannan و همکاران (۲۰۱۰)، ۱۶ گونه حاوی آرتیمیزینین و تنها گونه *A. desertorum* فاقد آن بود. Hosseini و همکاران (۲۰۱۲) بر اساس وجود ژن *amf1(ADS)* گونه‌های *A. aucheri* و *A. chammaemelifolia* را به عنوان دو گونه مستعد تولید آرتیمیزینین معرفی کردند. در مطالعات انجام شده بیان متفاوت ژن‌های مسیر ساخت آرتیمیزینین در بافت‌های مختلف و مراحل مختلف رشد گیاه *A. annua* گزارش شده است (Olofsson et al., 2011؛ Nair et al., 2013). مطالعه بیان ژن‌های مسیر ساخت آرتیمیزینین شیوه مؤثری برای مطالعه عملکرد این ژن‌ها است. ارتباط بین بیان ژن‌های کلیدی دو مسیر ساخت استرول‌ها و ساخت آرتیمیزینین با مطالعه بیان این ژن‌ها قابل بررسی است. ارتباط بین الگوی بیان دو ژن کلیدی

Thermo Scientific، آمریکا) اندازه‌گیری شد. برای یکسان‌سازی غلظت RNA نمونه‌ها، مقدار ۱۰ میکروگرم از RNA استخراج شده با افزودن آب مقطر استریل فاقد RNase به حجم ۱۰ میکرولیتر رسانده شد. به این ترتیب، ۱۰ میکرولیتر محلول شاهد با غلظت ۱ میکروگرم/میکرولیتر تهیه شد. برای حذف آلودگی‌های ژنومی از آنزیم DNase I (فرمنتاز) استفاده شد. مقدار ۱ میکرولیتر از این آنزیم در ۱۰ میکرولیتر از محلول شاهد با غلظت ۱۰ میکروگرم/میکرولیتر اضافه شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. برای حصول اطمینان از حذف DNA، نمونه‌ها با واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) و با استفاده از ژل آگاروز ۱/۵ درصد (وزنی/حجمی) بررسی شدند.

واکنش sqRT-PCR واکنش sqRT-PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر حاوی ۲۰ پیکو مول پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱) نواحی کد کننده ژن‌های مورد نظر انجام شد. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر قابل برنامه‌ریزی (مدل TC512، شرکت TECHNE، آلمان) بر اساس شاخص‌های دمایی زیر انجام شد:

واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳ دقیقه، سپس ۲۸ چرخه به صورت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد، مدت ۱ دقیقه در دمای ۵۸ درجه سانتیگراد برای Actin و SQS، مدت ۱ دقیقه در دمای ۶۱ درجه سانتیگراد برای DBR2، مدت ۱ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد برای ADS و ۲۰ ثانیه در ۷۰ درجه سانتیگراد برای تکثیر و مدت ۱۰ دقیقه برای تکثیر نهایی استفاده شد. ژن Actin به عنوان شاهد داخلی استفاده شد. واکنش‌ها در سه تکرار انجام شدند.

(Murashige and Skoog, 1962) حاوی ۳ درصد سوکروز استفاده شد. اسیدیته محیط کشت با دستگاه pH سنج (مدل C860، شرکت Consort، بلژیک) معادل ۵/۷ تنظیم شد. برای جامدسازی محیط کشت MS، از آگار (Duchefa، هلند) به مقدار ۷ گرم در لیتر و برای استریل کردن محیط کشت از اتوکلاو (مدل H+P، شرکت Vavioclav، آلمان) با دمای ۱۲۰ درجه سانتیگراد و فشار ۱۲۱ بار به مدت ۲۰ دقیقه استفاده شد. محیط کشت MS، زیر دستگاه لامینار ایرفلو (مدل Aircyt، شرکت Flufrance، فرانسه) در شیشه‌های کشت ۲۸۰ میلی‌لیتری، به میزان ۲۵ میلی‌لیتر در هر شیشه، توزیع و بذره‌های ضد عفونی شده، به تعداد ۳ عدد بذر در هر شیشه کشت و در اتاقک رشد (شرکت گروک، ایران) با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

استخراج RNA کل: استخراج RNA از برگ گیاهان دو ماهه با روش Heidari و همکاران (۲۰۱۱) انجام شد. پیش از شروع کار، هاون‌ها در آون با دمای ۱۲۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲ ساعت استریل شدند. سایر وسایل و مواد مورد استفاده، از جمله تیوب‌ها، سرسپلرها، محلول‌ها و آب مقطر دو بار و هر بار در دمای ۱۲۰ درجه سانتیگراد و فشار ۱۲۱ بار اتوکلاو شدند. برای بررسی کیفیت RNA از ژل آگاروز ۱/۵ درصد استفاده شد. مقدار ۴ میکرولیتر از محلول RNA استخراج شده روی ژل بارگذاری شد. عکسبرداری از ژل با استفاده از دستگاه مستندساز ژل (مدل VL 500، شرکت UVP، آمریکا) انجام شد. غلظت RNA با استفاده از دستگاه نانو دراپ (مدل 2000C، شرکت

منظور مقایسه میزان بیان ژن با نرم‌افزار Image J نسخه ۱/۶ و تحلیل آماری داده‌ها با نرم‌افزار آماری SAS نسخه ۱/۹ و بر اساس آزمون دانکن انجام شد.

کمی‌سازی و تحلیل آماری: محصولات PCR با الکتروفورز روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد (وزنی/حجمی) بارگذاری شدند. کمی‌سازی شدت باندها به

جدول ۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده در واکنش PCR

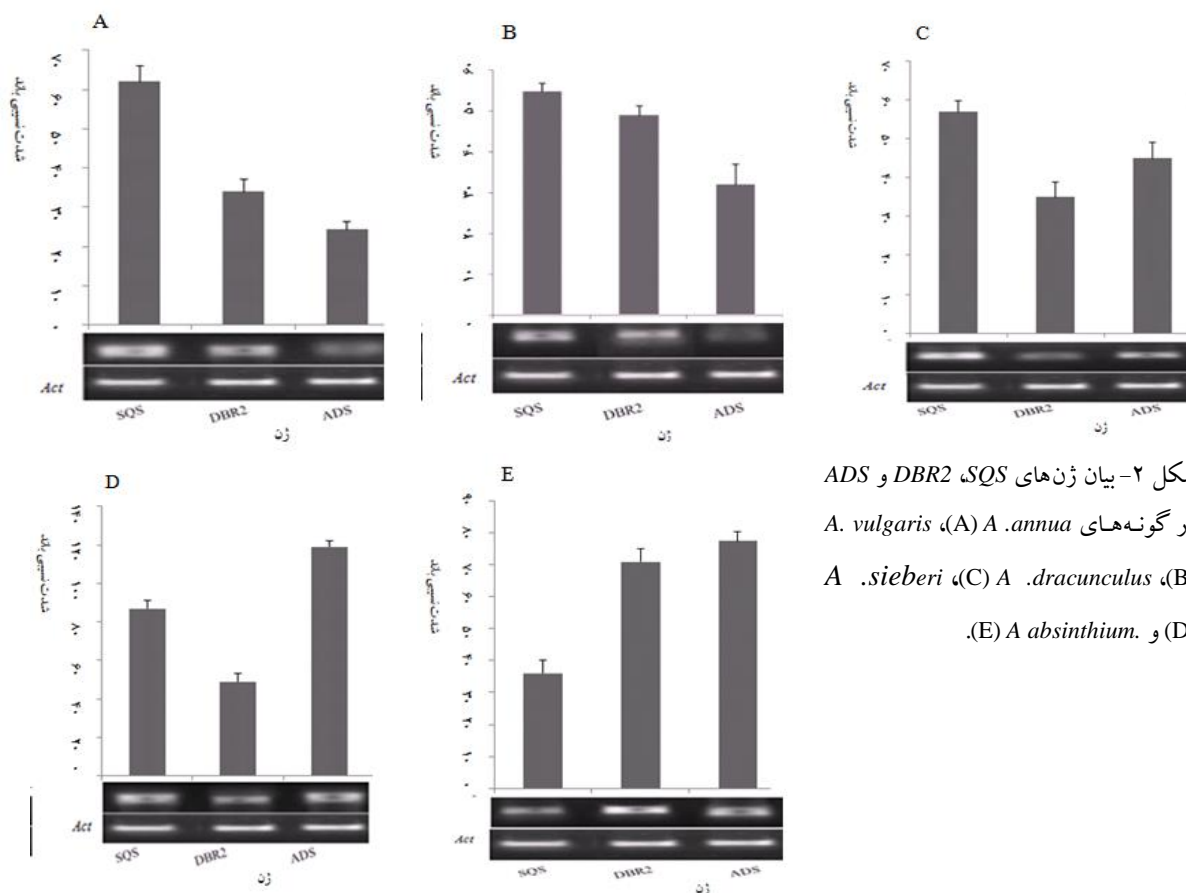
ژن	توالی آغازگر (5'→3')
<i>SQS</i>	رفت TTTGAAAGCAGTATTGAAACAC
	برگشت CAGACAGCATCACGAAGC
<i>DBR2</i>	رفت CATCAACAAGCAAGCCCATTTC
	برگشت GCGATAGTCTTCAACCACCTC
<i>ADS</i>	رفت GAAGTAGAAGATGTGTGGAAAG
	برگشت TCATAGGATAAACGAGTAGAGAC
<i>Actin</i>	رفت TTCCACACGCCATCCTTC
	برگشت GCTCCTGCTCATAGTCAAG

نتایج

الگوی بیان ژن‌های *ADS*، *SQS* و *DBR2* در پنج گونه مختلف مورد نظر با روش نیمه کمی انجام شد که از ژن *Actin* به عنوان شاهد داخلی استفاده شد. ژن‌های مرتبط با مسیر ساخت آرتمیزینین در هر پنج گونه بیان شدند. این ژن‌ها الگوهای متفاوتی از نظر سطح بیان را نشان دادند. بررسی بیان ژن نشان داد که در *A. annua* ژن *SQS* سطح بیان بیشتری نسبت به دو ژن دیگر داشت. همچنین، بیان ژن *DBR2* بیشتر از *ADS* بود (شکل ۲-۲). در *A. vulgaris* بیشترین سطح بیان ژن مربوط به *SQS* بود و *DBR2* و *ADS* در رده‌های بعدی قرار داشتند (شکل ۲-۲). در *A. dracunculus* مشابه *A. annua* و *A. vulgaris* بیشترین سطح بیان ژن متعلق به ژن *SQS* بود. در این گونه، *ADS* سطح بیان بیشتری نسبت به

DBR2 از خود نشان داد (شکل ۲-۲).

در *A. sieberi* بیان ژن *ADS* نسبت به دو ژن دیگر بیشتر بود و پس از آن *SQS* و *DBR2* سطوح بعدی بیان ژن را به خود اختصاص دادند (شکل ۲-۲). گونه *A. absinthium* مشابه *A. sieberi* بیان *ADS* بیشتری نسبت به دو ژن دیگر داشت. در این گونه، برخلاف *A. sieberi* کمترین بیان ژن را *SQS* داشت (شکل ۲-۲). بیان ژن *ADS* در *A. sieberi* بیشتر از سایر گونه‌ها بود و پس از آن به ترتیب *A. absinthium*، *A. dracunculus*، *A. annua* و *A. vulgaris* در رده‌های بعدی از نظر سطح بیان این ژن قرار داشتند. ژن *DBR2* در *A. absinthium* بیشترین و در *A. vulgaris* و *A. dracunculus* کمترین بیان را داشت. *SQS* در *A. sieberi* بیشترین و در *A. absinthium* کمترین سطح بیان را نشان داد.



شکل ۲- بیان ژن‌های SQS، DBR2 و ADS در گونه‌های *A. annua* (A)، *A. vulgaris* (B)، *A. dracunculoides* (C)، *A. sieberi* (D) و *A. absinthium* (E).

پیش ساز مشترک استفاده می‌کنند که همان فارنسیل دی فسفات است. به بیان دیگر، آنزیم اسکوالن سنتاز یک رقیب سرسخت برای استفاده از فارنسیل دی فسفات در بافت‌های تولیدکننده آرتیمیزین است (Guo *et al.*, 2010).

در مطالعه حاضر، بیان ژن‌های *ADS*، *DBR2* و *SQS* در پنج گونه مختلف جنس *Artemisia* مطالعه شد. تاکنون چند مطالعه در ارتباط با بیان ژن‌های مسیر بیوسنتز آرتیمیزین انجام شده است. Yina و همکاران (۲۰۱۲) اثر سالیسیلیک اسید و الیگو ساکارید کیتوزان را بر بیان ژن‌های مسیر بیوسنتز آرتیمیزین مطالعه کردند. آنها نشان دادند که کیتوزان سطح بیان ژن‌های

بحث

ژن‌های *ADS* و *DBR2* دو ژن مهم در مسیر بیوسنتز آرتیمیزین به شمار می‌روند این ژن‌ها به ترتیب آنزیم‌های آمورفا-۴ و ۱۱-دی آن سنتاز و آرتیمیزینیک (Olofsson *et al.*, ۱۱(۱۳) ردوکتاز را کد می‌کنند (Olofsson *et al.*, 2011). ژن *SQS* یکی از ژن‌های کلیدی در مسیر بیوسنتز استرول‌ها است که آنزیم کلیدی این مسیر را کد می‌کند. اهمیت *SQS* در ارتباط با بیوسنتز آرتیمیزین این است که مهار یا کاهش عملکرد آن و جلوگیری از بیان آن تولید آرتیمیزین را در گیاه افزایش می‌دهد. علت این رخداد آن است که آنزیم اسکوالن سنتاز و آمورفا-۴ و ۱۱-دی آن از یک

بنابراین، این آنزیم با آنزیم *ADS* برای دریافت فARNسیل دی فسفات رقابت می‌کند. ورود بیشتر این ماده به هر کدام از مسیرها می‌تواند به افزایش تولید ماده نهایی آن مسیر منجر شود. هنگامی که آنزیم *SQS* مهار می‌شود مقدار بیشتری فARNسیل دی فسفات در اختیار مسیر بیوسنتز آرتیمیزینین قرار خواهد گرفت که در نتیجه آرتیمیزینین بیشتری تولید خواهد شد (Feng et al., 2009؛ Song et al., 2012). در گونه *A. annua* که بیشترین تولید آرتیمیزینین در آن گزارش شده است برخلاف انتظار، بیان ژن *SQS* بیش از *ADS* مشاهده شد، در حالی که انتظار می‌رفت بیان ژن *ADS* بالاتر باشد. در *A. dracuncululus* روند مشابهی مشاهده شد، در حالی که این گونه یکی دیگر از گونه‌های با تولید بالای آرتیمیزینین گزارش شده است (Mannan et al., 2010). به نظر می‌رسد در گونه‌های با تولید بالای آرتیمیزینین رقابت بین دو ژن کلیدی حایز اهمیت است اما نمی‌توان انتظار داشت که گونه‌های با تولید بالاتر آرتیمیزینین، بیان بالاتر *ADS* و *DBR2* و بیان پایین‌تر *SQS* داشته باشند. مطالعه الگوی بیان *A. sieberi* نیز می‌تواند مؤید این مطلب باشد. در این گونه سطح بیان *ADS* بیش از *SQS* مشاهده شد این در حالی است که این گونه از گونه‌های دارای مقدار اندک آرتیمیزینین است (Mannan et al., 2010). همچنین بالاترین سطح بیان هر دو ژن *ADS* و *SQS* متعلق به این گونه بود. گونه‌های مختلف *Artemisia* محتوای آرتیمیزینین متفاوتی دارند (Mannan et al., 2010)، اگرچه الگوی متفاوت بیان ژن می‌تواند دلیل محتوای متفاوت آرتیمیزینین در این گونه‌ها باشد، ارتباط بین بیان ژن‌های مطالعه شده به ویژه الگوی بیان دو ژن رقیب یعنی *ADS*

و *TTG1* و سالیسیلیک اسید بیان ژن *ADS* را افزایش می‌دهد. Lei و همکاران (۲۰۱۱) اثر ترکیبات مختلف کیتوزان را بر بیان ژن‌های مرتبط با ساخت آرتیمیزینین مطالعه کردند. آنها گزارش دادند که بیان ژن‌های *DBR2* و *ADS* تحت تیمار کیتوزان با الگوی متفاوتی افزایش نشان داد.

ژن‌های مربوط به مسیر ساخت آرتیمیزینین در بافت‌های مختلف الگوهای متفاوتی نشان می‌دهند. Olofsson و همکاران (۲۰۱۱) گزارش دادند که چهار ژن از مسیر ساخت آرتیمیزینین شامل ژن‌های *ADS*، *CYP71AV1*، *DBR2* و *ALDH1* در غنچه‌های گل و برگ‌های جوان بیان بیشتری نسبت به بافت‌های دیگر نظیر: برگ‌های پیر، ساقه‌ها، ریشه‌ها و کشت ریشه‌های مویین از خود نشان دادند. همچنین ژن مربوط به آنزیم دی هیدرو آرتیمیزینیک آلدئید ردوکتاز (*RED1*) بیشترین سطح بیان را در بافت ریشه‌های مویین داشت.

در مطالعه حاضر، نتایج نشان داد که در گونه‌های مختلف مطالعه شده، ژن‌های کلیدی مرتبط با مسیر ساخت آرتیمیزینین الگوهای بیان متفاوتی دارند. بررسی بیان ژن نشان داد که در *A. annua*، *A. vulgaris* و *A. dracuncululus* ژن *SQS* نسبت به ژن‌های *ADS* و *DBR2* بیان بالاتری داشت، در حالی که در *A. sieberi* و *A. absinthium* سطح بیان ژن *ADS* بیشتر از سایر ژن‌ها بود. در *A. annua* و *A. vulgaris* سطح بیان ژن *ADS* از *DBR2* و *SQS* پایین‌تر بود. در *A. sieberi* و *A. dracuncululus* ژن *DBR2* نسبت به دو ژن دیگر کمترین سطح بیان را داشت. اسکوالن سینتاز (*SQS*) آنزیم کلیدی در مسیر بیوسنتز استروئول‌ها است که فARNسیل دی فسفات را به اسکوالن تبدیل می‌کند.

مشخصی بین محتوای آرتیمیزینین و بیان دو ژن کلیدی
ADS و *SQS* مشاهده نشد.

و *SQS* و محتوای آرتیمیزینین در گونه‌های مختلف
 درمنه نیاز به مطالعات بیشتر دارد.

جمع‌بندی

الگوی بیان ژن‌های *ADS*، *DBR2* و *SQS* در پنج
 گونه *Artemisia* مطالعه شده متفاوت بود. الگوی
 متفاوت بیان این ژن‌ها در این گونه‌ها می‌تواند دلیلی بر
 تفاوت سطوح محتوای آرتیمیزینین باشد. ارتباط

سپاسگزاری

نگارندگان از گروه بیوتکنولوژی کشاورزی
 دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره) به خاطر حمایت
 مالی پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌نمایند.

منابع

- Arab, H. A., Rahbari, S., Rassouli, A., Moslemi, M. H. and Khosravirad, F. D. A. (2006) Determination of artemisinin in *Artemisia sieberi* and anticoccidial effects of the plant extract in broiler chickens. *Tropical Animal Health Production* 38(10): 497-503.
- Aryanti, Bitney, M., Ermayanti, T. M. and Mariska, I. (2001) Production of antileukemic agent in untransformed and transformed root cultures of *Artemisia cina*. *Annales Bogorienses* 8(1): 11-16.
- Covello, S. P. (2008) Making artemisinin. *Phytochemistry* 69 (17): 2881-2885.
- Covello, S. P., Teoh, H. K., Polichuk, R. D., Reed, W. D. and Nowak, G. (2007) Functional genomics and the biosynthesis of artemisinin. *Phytochemistry* 68(14): 1864-1871.
- Eckstein-Ludwig, U., Webb, R. J., Goethem, I. D. A., East, J. M., Lee, A. G., Kimura, M., O'Neill, P. M., Bray, P. G., Ward, S. A. and Krishna, S. (2003) Artemisinin target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. *Nature* 424(6951): 957-961.
- Feng, L. L., Yang, R. Y., Yang, X. Q., Zeng, X. M., Lu, W. J. and Zeng, Q. P. (2009) Synergistic re-channeling of mevalonate pathway for enhanced artemisinin production in transgenic *Artemisia annua*. *Plant Science* 177(1): 57-67.
- Guo, X. X., Yang, X. Q., Yang, R. Y. and Zeng, Q. P. (2010) Salicylic acid and methyl jasmonate but not Rose Bengal enhances artemisinin production through invoking burst of endogenous singlet oxygen. *Plant Science* 178(4): 390-397.
- Heidari, R., Haddad, R. and Garoosi, G. (2011) Rapid and efficient isolation of high quality nucleic acids from plant tissues rich in polyphenols and polysaccharides. *Molecular Biotechnology* 49(2): 129-137.
- Hosseini, R., Yazdani, N. and Garoosi, G. (2012) The presence of amorpho-4, 11-diene synthase, a key enzyme in artemisinin production in ten *Artemisia* species. *Daru Pharmaceutical Journal* 19(5): 332-337.
- Hsu, E. (2006) The history of qing hao in the Chinese materia medica. *Tropical Medicine* 100(6): 505-508.
- Jha, P., Ram, M., Khan, M. A., Kiran, U. and Abdin, M. Z. (2011) Impact of organic manure and chemical fertilizers on artemisinin content and yield in *Artemisia annua* L.. *Industrial Crops and Products* 33(2): 296-301.
- Lei, C., Ma, D., Pu, G., Qiu, X., Du, Z., Hong, W., Li, G., Ye, H. and Liu, B. (2011) Foliar application of chitosan activates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L.. *Industrial Crops and Products*

- 33(1): 176-182.
- Mannan, A., Shaheen, N., Arshad, W., Qureshi, R. A., Zia, M. and Mirza, B. (2008) Hairy roots induction and artemisinin analysis in *Artemisia dubia* and *Artemisia indica*. African Journal Biotechnology 7(18): 3288-3292.
- Mannan, A., Waheed, A., Muhammad, F. A., Rizwana, A. Q., Izhar, H. and Bushra, M. (2010) Survey of artemisinin production by diverse *Artemisia* species in northern Pakistan. Malaria Journal 9: 310.
- Murashige, T. and Skoog, B. (1962). A revise and medium for rapid growth bioassay with tobacco tissue cultures. Plants Physiology 51(17): 473-497.
- Nair, P., Misra, A., Singh, A., Shukla, K. A., Gupta, M. M., Gupta, K. A., Gupta, V., Khanuja, P. S. S. and Shasany, K. A. (2013) Differentially expressed genes during contrasting growth stages of *Artemisia annua* for artemisinin content. Plos One 8(4): e60375.
- Olofsson, L., Engstrom, A., Lundgren, A. and Brodelius, P. E. (2011) Relative expression of genes of terpene metabolism in different tissues of *Artemisia annua* L.. BMC Plant Biology 11: 45.
- Rai, R., Meena, P. R., Smita, S. S., Shukla, A, Rai, K. S. and Pandey-Rai, S. (2011) UV-B and UV-C pre-treatments induce physiological changes and artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L., an antimalarial plant. Journal of Photochemistry and Photobiology 105(3): 216-225.
- Schramek, N., Wang, H., Römisch-Marg, W., Keil, B., Radykewicz, T, Winzenhörlein, B., Beerhues, L., Bacher, A., Rohdich, F., Gershenzon, J., Liu, B. and Eisenreich, W. (2010) Artemisinin biosynthesis in growing plants of *Artemisia annua*. A 13CO₂ study. Phytochemistry 71(2-3): 179-187.
- Song, Y., Shen, H., Liu, Y., Li, Z., Wang, H., Chen, J. and Ye, H. (2012) Effect of antisense squalene synthase gene expression on the increase of artemisinin content in *Artemisia annua*. Transgenic Plants Advances and Limitations (68)19: 397-405.
- Sujatha, G., Zdravkovic, S., Korac, D., Alic, C., Flaminic, G. and Ranjitha, D. K. (2013) High-efficiency *Agrobacterium rhizogenes*-mediated genetic transformation in *Artemisia vulgaris*: hairy root production and essential oil analysis. Industrial Crops and Products 44: 643-652.
- Teoh, H. K., Polichuk, R. D., Reed, W. D., Nowak, G. and Covello, S. P. (2006) *Artemisia annua* L. (Asteraceae) trichome specific cDNAs reveal CYP71AV1, a cytochrome P450 with a key role in the biosynthesis of the antimalarial sesquiterpene lactone artemisinin. FEBS Letters 580(5): 1411-1416.
- Utzinger, J., Xiao, S. H., Tanner, M. and Keiser, J. (2007) Artemisinin for schistosomiasis and beyond. Current Opinion in Investigational Drugs 8(2): 105-116.
- Yina, H., Kjaera, A., Frettéc, C .X., Dub, Y., Christensenc, P. L., Jensen, M. and Grevsena, K. (2012) Chitosan oligosaccharide and salicylic acid up-regulate gene expression differently in relation to the biosynthesis of artemisinin in *Artemisia annua* L.. Process Biochemistry 47(11): 1995-1962.
- Zia, M., Abdul, M. and Chaudhary, M. F. (2007) Effect of growth regulators and amino acids on artemisinin production in the callus of *Artemisia absinthium*. Pakiatan Journal of Botany 39(2): 799-805.

A survey on the expression of *ADS*, *DBR2* and *SQS* genes in five *Artemisia* species

Kazem Yarizadeh, Ramin Hosseini * and Mona Moghadami

Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Engineering and Technology, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran

Abstract

Artemisinin is a secondary metabolite with antimalarial properties. In addition to this, it has activities against a wide variety of cancers such as human leukemia, breast and colon cancer, and carcinomas. It has also shown anti hepatitis B, anti-HIV, anti-leishmanial and anti-schistosomiac activities. This compound is produced by many species of the genus *Artemisia*, and for the first time it was detected in *A. annua*. In this study, the expression patterns of *ADS*, *DBR2* and *SQS* genes were investigated in five species include *A. annua*, *A. dracunculus*, *A. vulgaris*, *A. absinthium*, and *A. sieberi*. Extraction of total RNA and production of cDNA were from the two-month-old plant leaves. Semi-quantitative RT-PCR was performed to analyse the gene expression of these genes and actin gene was used as the internal control. Also, PCR products were loaded on the agarose gel (1 % w/v). Quantification of band density was carried out using Imag J software and data analysis was conducted using the SAS software. Results showed that expression pattern of the studied genes were different, so that a higher transcript level of *SQS* gene was observed in *A. vulgaris*, *A. dracunculus* and *A. annua*. Transcript level of *ADS* was higher than other genes in *A. sieberi* and *A. absinthium*. Different expression patterns of these genes can be interpreted as potentially different artemisinin contents in these species.

Key words: Artemisinin, *Artemisia*, Gene expression, Amorpha-4,11-diene synthase, Squalene synthase

* Corresponding Author: r.hosseini@eng.ikiu.ac.ir