

بررسی سطح بیان ژن‌های *hdr fds* و *idi* در اندام‌های هوایی گیاه *Artemisia diffusa* و ارتباط آن‌ها با میزان برخی از ترپنوئیدهای تولیدی

فرزاد علائی مقدم^۱، محمدرضا نقوی^{۲*} و عبدالهادی حسین‌زاده^۳

۱، ۲ و ۳. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، استاد گروه بیوتکنولوژی و دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات،

پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۹/۴ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۶/۹)

چکیده

به دلیل اهمیت ترکیبات ترپنی در زندگی انسان، بررسی رابطه بین آن‌ها و ژن‌های دخیل ضروری است. این ضرورت از نظر کشف ژن‌های مهم در تولید این مواد است. در میان گیاهان حاوی ترپن، جنس آرتمیسیا اهمیت زیادی دارد. در این بررسی، ژن‌های *hdr* و *fds* و *idi* در سه بافت برگ، گل و غنچه از گیاه *Artemisia diffusa* ارزیابی شدند. این بررسی با استفاده از مقایسه داده‌های حاصل از PCR در زمان واقعی ژن‌ها با داده‌های حاصل از GC-MS ترپن‌ها انجام گرفته است. نتایج این بررسی نشان داد که به احتمال در تولید بعضی از ترپن‌ها در بافت‌های خاص، ژن‌های نام‌برده تأثیر محدودکننده دارند. چنان‌که ژن *idi* برای 1,8- cineole و germacrene-D در غنچه تأثیر محدودکننده را نشان داد. از سوی دیگر، جدای از اینکه این ژن‌ها نقش مهمی در ترکیب (سنتز) ترپن‌ها دارند، در مورد دیگر ترکیبات ترپنی، به احتمال ژن‌های پایین‌دست‌تر مانند ترپن سنتازها این وظیفه محدودکنندگی در تولید به عهده دارند. به طوری که در تولید ماده beta-farnesene در هیچ‌یک از گل، برگ و غنچه ژن *fds* نقش محدودکننده را نشان نداد. عامل دیگری که بر نقش ژن‌های نام‌برده در تولید ترپن‌های موردنظر اثر می‌گذارد وجود تنظیم در سطح پس از رونویسی است که در این بررسی به آن پرداخته نشده است.

واژه‌های کلیدی: آرتمیسیا، ترپن‌ها، PCR در زمان واقعی، GC-MS.

مقدمه

جنس *Artemisia* از خانواده Asteraceae است. در این جنس گیاهان علفی و بوته‌ای با توان تحمل بالا در مناطق خشک و نیمه‌خشک مناطق معتدل دو نیمکره شمالی و جنوبی پراکنده هستند. این جنس به وجود ترکیب‌هایی مانند ترپن‌ها در اسانس‌شان معروف است. در این جنس بیش از پانصد گونه شناسایی شده است که در قاره‌های آسیا، اروپا و آمریکای شمالی می‌رویند (Abad et al., 2012). در میان گونه‌های مختلف این

جنس، گونه *Artemisia diffusa* قرار دارد. این گونه همانند دیگر گونه‌های آرتمیسیا در نقاط مختلف یافت می‌شود. در ایران، این گونه در استان‌های سمنان، خراسان و گلستان گزارش شده است. این گیاه گل‌های ریزی دارد که توسط باد گرده‌افشانی می‌شود. ترپن‌ها بخش مهمی از اسانس این گیاه را تشکیل می‌دهند. در ادامه این گیاه از نظر فعالیت سه ژن در مسیر ساخت ترپن‌ها بررسی می‌شود.

fds: ژنی از خانواده prenyl transferase (PTs)

Botella Pavi'a (Munoz-Bertomea *et al.*, 2006) *et al.* (2004) با بیش بیانی *hdr* در گیاه آرتمیزیبا نشان داد که این ژن نقش مهمی را در تنظیم ترپنوئیدهای ساخته شده در پلاستید ایفا می کند. همچنین این گروه نشان دادند که سطح بیان *hdr* در جریان فرآیند deetiolation (سبز شدن گیاهچه سفید نور ندیده) گیاهچه های *Arabidopsis* به شدت افزایش داشت که همراه با این افزایش، افزایش تولید سبزینه (کلروفیل) و کارتنوئید مشاهده شد (Botella Pavi'a *et al.*, 2004; Botella *et al.*, 2004). میزان زیادی EST (Expressed sequence tag) مربوط به *hdr* را در کرک (trichome) های گیاه نعنای (که مملو از ترپن ها است) مشاهده کردند (Botella *et al.*, 2004).

idi: وظیفه تبدیل برگشت پذیر ماده IDP را به DMADP (این دو ماده همپا یا ایزومر یکدیگر هستند) در هر دو مسیر MEP و موالونات (MVA) بر عهده دارد (Page *et al.*, 2004; Olofsson *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2012). در پژوهشی با خاموشی ژن *idi* در گیاه *Nicotiana benthamiana*، برگ های سفید لکه دار، بافت پلاستید آسیب دیده و همچنین به میزان ۸۰ درصد کاهش سطح رنگدانه ها را در مقایسه با شاهد مشاهده کردند. همچنین با خاموشی این ژن در گیاه یادشده مشاهده شد که میزان سبزینه و کارتنوئید بالاتر از سطحی بود که با خاموشی ژن های *hdr* و *hds* ایجاد شده بود (Page *et al.*, 2004).

همان طور که عنوان شد ژن های مورد بررسی که در تولید پیش ماده های ترپن ها نقش دارند، می توانند بر میزان تولید این مواد اثر بگذارند، به منظور بررسی میزان تأثیر آن ها در تولید ترپن ها در گیاه *A. diffusa* که منبع خوبی از این مواد است و می تواند اطلاعات سودمندی را در اختیار علوم کاربردی مانند زیست فناوری (بیوتکنولوژی) قرار دهد، این پژوهش انجام شده است.

است که در پایین دست مسیر موالونات قرار دارد و با اتصال دو عدد IDP^۱ به یک عدد DMADP^۲ ماده Farnesyl diphosphate (FDP) را تولید می کند که پیش ماده سسکوئی ترپن ها است (Wen & Yu, 2011). Zeng *et al.* (2013) در آزمایشی روی سه رقم ریحان به این نتیجه رسیدند که نسبت مونوترپن کل به سسکوئی ترپن کل که توسط هر رقم تولید شد رابطه ضعیفی را با نسبت فعالیت مونوترپن سنتازها به سسکوئی ترپن سنتازها داشت و همچنین نسبت فعالیت *gds*^۳ (آنزیم سازنده پیش ساز مونوترپن ها از IDI و DMADP) به *fds* نیز با نسبت ترپن های تولیدی همخوانی نشان نداد. آنان اظهار کردند، هنگامی جریان واکنش در مسیر ترپن ها افزایش می یابد، *gds* و *fds* ممکن است درجه ای از کنترل را در سطح پیش ماده که به طور مستقیم به سمت آنزیم های مونو و سسکوئی ترپن سنتازها می رود اعمال کنند، اما به میزان زیاد در تولید ترپن های تولیدی اثرگذار نیستند. البته این پیش فرض در صورتی درست است که مسیرهای مونو و سسکوئی ترپن ها به طور کامل مستقل نباشند (Zeng *et al.*, 2013).

hdr^۴: آنزیم تولیدی توسط این ژن مرحله پایانی تولید پیش ماده های پایه یعنی IDP و DMADP را در مسیر MEP^۵ کاتالیز می کند و نقش اصلی را در تولید پیش سازهای وابسته به مسیر MEP برای ساخت (سنتز) ایزوپروپونوئیدهای پلاستییدی بازی می کند (Munoz-Bertomea *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2009). Bertomea *et al.* (2006) در آزمایشی با افزودن ایلستور متیل جاسمونات به یاخته های نوعی کاج (*Picea abies*) مشاهده کردند که سطح بیان ژن *hdr* نزدیک به دو برابر حالت شاهد بود که در نتیجه آن مونوترپن هایی تولید شدند که در نمونه های شاهد حضور نداشتند که عبارت بودند از: a-pinene, myrcene و limonene, camphene, b-pinene

6. Isopentenyl diphosphate isomerase
7. Hydroxy-2-methyl-2-butenyl 4-diphosphate synthase

1. Isopentenyl diphosphate
2. Dimethylallyl pyrophosphate/diphosphate
3. Geranyl diphosphate synthase
4. Hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphatereductase
5. 2-c-methyl-erythritol 4- phosphate

مواد و روش‌ها

کاشت گیاه

بذر *A. diffusa* از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تهیه و برای کاشت در شرایط کنترل‌شده گلخانه به کار گرفته شد. بذرهای گیاه به منظور کشت در آغاز با هیپوکلریت سدیم ۲۰ درصد تیمار و آنگاه سه مرتبه با آب مقطر شستشو داده شد. سپس بذرهای ضدعفونی‌شده به مدت چهارده روز در شدت نور ۳۰۰۰ لوکس و دوره نوری هشت ساعت تاریکی و شانزده ساعت روشنایی در پتری دیش‌های حاوی کاغذ صافی مرطوب قرار داده شد. بذرها پس از جوانه‌زدن به گلدان‌های پلاستیکی کوچک منتقل و روی آن‌ها درپوش پلاستیکی شفاف به منظور حفظ رطوبت قرار داده شد در ادامه گلدان‌ها به مدت بیست‌ویک روز در شرایط دمایی ۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت ۵۵ درصد، شدت نوری ۵۰۰۰ لوکس و دوره نوری هشت ساعت تاریکی و شانزده ساعت روشنایی در اتاقک رشد نگهداری شد. سپس گیاهچه‌ها به گلدان‌های بزرگ منتقل و تا مرحله گلدهی در شرایط دمایی ۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت ۵۵ درصد، شدت نوری ۷۰۰۰ و دوره نوری هشت ساعت تاریکی و شانزده ساعت روشنایی نگهداری شد.

استخراج و تجزیه اسانس

نمونه‌ها از سه بافت برگ، غنچه و گل این‌گونه در زمان گلدهی پس از خشک کردن نمونه‌ها گرفته شد. نمونه‌ها به منظور استخراج اسانس، خرد و به همراه چهار مهره فلزی به درون لوله شیشه‌ای ریخته و پس از اضافه کردن میزانی هگزان با هم مخلوط (ورتکس)

شدند. نمونه‌ها پس از مخلوط شدن به مدت چهار ساعت در دمای اتاق قرار گرفته و آنگاه پالایش (فیلتر) شدند که در این حالت نمونه‌ها برای تزریق به دستگاه GC-MS آماده بودند (Munoz-Bertomea et al., 2006). به منظور تجزیه اسانس از دستگاه Agilent Technologies 7890A با یک MSD (۵۹۷۵) و ستون HP-5MS به طول ۳۰ متر و قطر درونی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه ۰/۲۵ میکرومتر استفاده شد. تزریق به دستگاه در حالت شکافته (split) با دمای ورودی ۲۵۰ درجه سلسیوس انجام شد. برنامه دمایی آن به این ترتیب بود؛ دمای آغازین ۶۰ درجه سلسیوس، توقف در این دما به مدت سه دقیقه سپس افزایش دما تا ۱۵۰ درجه سلسیوس با گرادیان دمایی ۳ درجه سلسیوس در دقیقه، توقف در این دما به مدت ۱ دقیقه، سپس افزایش دما تا ۲۶۰ درجه سلسیوس با شیب گرادیان همسان مرحله پیش و توقف در این دما به مدت ده دقیقه. از گاز هلیوم با سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه و متوسط سرعت ۱ سانتی‌متر در ثانیه به‌عنوان گاز حامل استفاده شد. دمای منبع یونیزه کردن (یونیزاسیون) ۲۳۰ درجه سلسیوس بود.

طراحی آغازگرها

18s rRNA به‌عنوان ژن مرجع و آغازگر مربوط به آن بر اساس کار Zeng et al. (2008) انتخاب شد. برای ژن‌های *idi* (Accession number: U36376.1) و *fds* (DQ666334.1)، *hdr* (GQ119345.1) آغازگر با استفاده از نرم‌افزار Primer3 طراحی و آنگاه با استفاده از نرم‌افزار Primer BLAST آزمون شد. توالی آغازگرها به همراه طول قطعه ایجادی در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱. توالی آغازگرهای forward و reverse ژن‌های مورد بررسی به همراه طول قطعه‌های افزایش یافته

Table 1. sequences of forward and reverse primers of evaluated genes and their corresponding amplified length

gene	Access no.	Forward primer	Reverse primer	Amplified length
<i>fds</i>	U36376.1	5'-CTGCCCTTGGTGGTGTATT-3'	5'-ATTCTCGGGACATGGTTACG-3'	169
<i>hdr</i>	GQ119345.1	5'-AATTCCTCATGGCGTCTTG-3'	5'-ATTATGCCTGGACACCTTCG-3'	170
<i>idi</i>	DQ666334.1	5'-GGGCGAACATGAACTTGATT-3'	5'-CAGCTTGAGACCCTCCTCAC-3'	154

RNasyPlantMiniKit شرکت کیازن و برابر دستور کار شرکت سازنده انجام گرفت. ساخت cDNA با استفاده از دستور کار کیت FirstStrandcDNASynthesisK1622RevertAidTM

ساخت cDNA و بررسی بیان ژن با استفاده از PCR

در زمان واقعی

نمونه‌گیری از برگ، غنچه و گل گیاهان با سه تکرار زیستی و استخراج RNA با استفاده از کیت

واقعی با استفاده از نرم‌افزار Rest© (version 2) برای انجام PCR زمان واقعی از دستگاه iCycler شرکت BioRad و از رنگ Quantitect SYBER I شرکت Qiagen به‌عنوان رنگ درخشنده (فلورسانس) برای ارزیابی کمی استفاده شد. نتایج میانگین ct ژن‌ها در جدول ۲ نمایش داده شده است.

نتایج و بحث

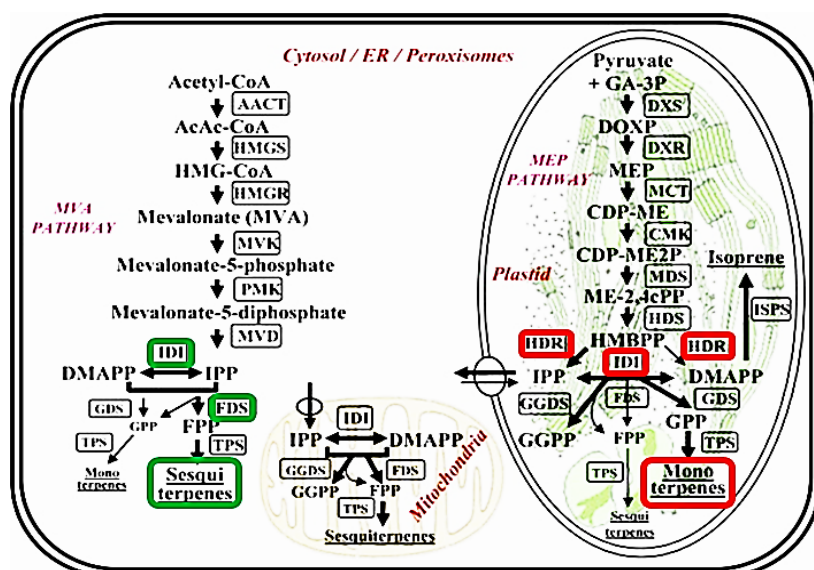
از بین ترپین‌های موجود در این گیاه تعداد ده عدد که شامل هفت مونوترپین و سه سسکوئی‌ترین می‌شود، بررسی شده است. بررسی انجام‌گرفته به این صورت است که محتوای تک‌تک مونوترپین‌ها با میزان بیان ژن‌های *hdr* و *idi* مقایسه شده و در طرف دیگر محتوای تک‌تک سسکوئی‌ترین‌ها در مقایسه با میزان بیان ژن‌های *fds* و *idi* نیز بررسی شده است (شکل ۱).

جدول ۲. جدول میانگین ct ژن‌های موردبررسی در PCR در زمان واقعی

Gene/tissue	Leaf	bloom	Flower
<i>fds</i>	27.51	24.51	24.98
<i>idi</i>	24.59	25.96	25.84
<i>hdr</i>	28.91	28.02	28.26
<i>rRNA 18S</i>	16.92	15.41	15.29

استخراج نتایج

در پایان، داده‌های مربوط به دستگاه PCR در زمان



شکل ۱. ژن‌های موردبررسی در مسیرهای MVA و MEP (Nagegowda, 2010)

Figure 1. Evaluated genes in MVA and MEP pathways (Nagegowda, 2010)

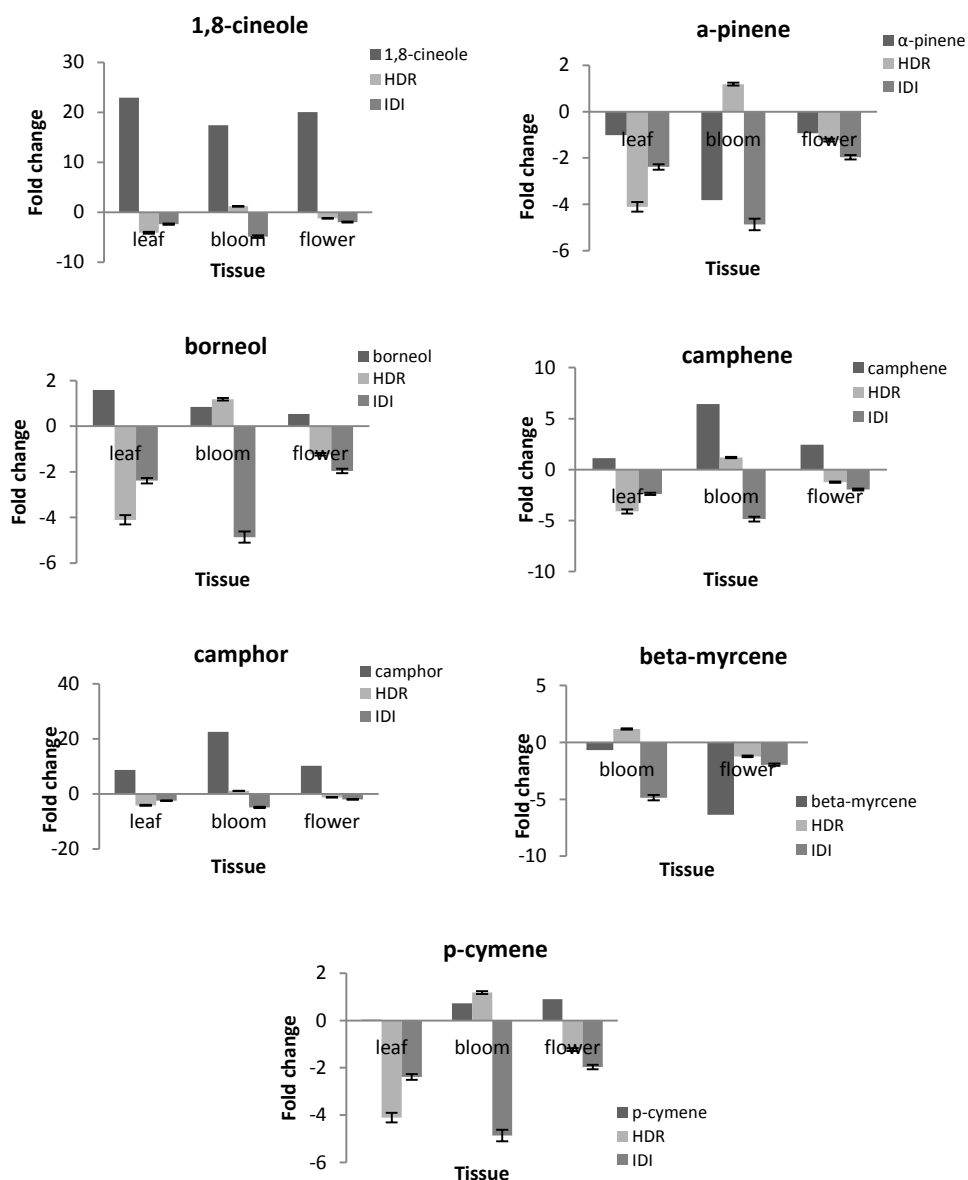
بیشتر ولی ماده تولیدی با اختلاف اندکی بیشتر از برگ است که می‌تواند مسئله تخصیص منابع پیش ماده‌ها را مطرح کند که صرف تولید ماده دیگری شده است (شکل ۲). در پژوهشی با خاموشی ژن *idi* در گیاه *N. benthamiana*، برگ‌های سفید لکه‌دار، ساختار پلاستید آسیب‌دیده و به میزان ۸۰ درصد کاهش سطح رنگ‌دانه‌ها در مقایسه با شاهد مشاهده شد (Page et al., 2004). همچنین مشاهده شد که

a-pinene؛ یک مونوترپین است. در برگ بیان *hdr* کمتر از غنچه ولی بیان *idi* بیشتر از غنچه است و ماده تولیدی نیز بیشتر است، که می‌تواند به نقش پرنرنگ‌تر *idi* در برابر *hdr* در تولید ماده یادشده اشاره کند. در غنچه *hdr* بیان بالاتری از گل و بیان *idi* کمتر از گل بود و ماده تولیدی کمتر از گل بود که مانند مورد پیشین از نقش *idi* در تولید ماده حمایت می‌کند. در گل این‌گونه در مقایسه با برگ بیان هر دو ژن

برگ باشد که می‌تواند به نقش ژن‌های پایین‌دستی اشاره داشته باشد (شکل ۲). در پژوهشی سطح پروتئین HDR در گیاه علف تال (*Arabidopsis thaliana*) با وجود حضورش در بافت‌های مختلف، بیشترین میزان را در بافت‌های جوان داشت. Wang *et al.* (2007) اظهار کردند که اختلاف بین سطح mRNA و پروتئین HDR در اندام‌های مختلف به‌احتمال به دلیل تنظیم‌های پس از رونویسی است و اینکه بیان *hdr* ممکن است وابسته به مرحله‌ی نموی باشد (Wang *et al.*, 2007).

میزان سبزینه و کارتنوئید (هر دو مشتقات تریپنی هستند) بالاتر از سطحی است که با خاموشی ژن‌های *hdr* و *hds* ایجاد شده بود (Page *et al.*, 2004).

1,8-cineole (مونوترپن)؛ بیان ژن *hdr* در غنچه از دو بافت دیگر یعنی برگ و گل بیشتر و ژن *idi* برعکس، از دو بافت دیگر کمتر است و ماده‌ی تولیدی نیز در غنچه از گل و برگ کمتر است. که اشاره دارد که عامل محدودکنندگی تولید ماده در غنچه‌ی ژن *hdr* نیست و ژن یادشده می‌تواند *idi* باشد. در گل باوجود بالا بودن بیان دو ژن یادشده، ماده‌ی تولیدی کمتر از



شکل ۲. مقایسه محتوای برخی مونوترپن‌ها و سطح بیان ژن‌های *idi* و *hdr* در بافت‌های برگ، گل و غنچه *A. diffusa*.
Figure 2. the comparison among some monoterpenes and expression level of genes *idi* and *hdr* in leaf, blossom and flower tissues of *A. diffusa*

کمتر است که در اینجا برعکس، نقش *idi* به نظر برجسته‌تر است. در گل بیان هر دو ژن بیشتر از برگ است و ماده تولیدی نیز بیشتر است که منطقی به نظر می‌رسد و می‌تواند به نقش ضعیف ژن‌های پایین‌دستی اشاره کند که به عبارت دقیق‌تر می‌توان گفت که ژن‌های پایین‌دستی نقش محدودکننده را ندارند (شکل ۲).

beta-caryophyllene (سسکوئی‌ترین)، در گل در مقایسه با غنچه، همراه با افزایش بیان دو ژن، میزان ماده موردنظر نیز افزایش یافته است. که در اینجا می‌توان به نقش پررنگ‌تر ژن‌های *idi* و *fds* در برابر ژن‌های پایین‌دستی‌تر مانند ترین سنتازها اشاره کرد (شکل ۳). در بررسی دیگری، Zare Mehrjerdi et al. (2013) با القای الیستورهای متیل جاسمونات و 2-isopentenyladenine بر گیاه *A. annua* ارتباطی بین سطح آرتمیزینین (نوعی سسکوئی‌ترین) و سطح بیان *fds* مشاهده نشد. در این بررسی محتوای آرتمیزینین افزایش تولید را نشان داد ولی ارتباط معنی‌داری را با سطح بیان *fds* نداشت (Zare Mehrjerdi et al., 2013).

beta-farnescene (سسکوئی‌ترین)، در گل نسبت به غنچه میزان بیان ژن‌ها بیشتر ولی میزان ماده تولیدی در غنچه بیشتر از گل است نتایجی مانند این می‌تواند به‌طور روشن به نقش برجسته‌تر ژن‌های پایین‌دستی در برابر ژن‌های موردبررسی اشاره کند که باوجود بالا بودن بیان ژن‌های *idi* و *fds* میزان تولید پایین‌تر ماده را در مقایسه با بافت دیگر شاهد هستیم (شکل ۳).

germacrene-D (سسکوئی‌ترین)، به‌طور عادی با بیشتر بودن بیان این دو ژن در گل نسبت به غنچه، ماده تولیدی نیز در گل بیشتر از غنچه است. که در حالت کلی این موردی قابل‌انتظار است که با افزایش دو ژن، ماده موردنظر نیز افزایش یابد. این نتایج می‌تواند به اثر محدودکنندگی بیشتر ژن‌های موردبررسی در برابر ژن‌های پایین‌دستی‌تر در تولید ماده موردنظر اشاره کند (شکل ۳). Iijima et al. (2004) پژوهشی بر روی سه رقم ریحان انجام دادند که رابطه ضعیفی بین سطح رونویسی و فعالیت آنزیمی

Borneol (مونوترپن)، در برگ بیان *hdr* کمتر از غنچه و *idi* بیشتر از آن است و ماده تولیدی نیز بیشتر از غنچه است که در نتیجه به‌احتمال نقش ژن *idi* در تولید ماده بر نقش *hdr* برتری دارد. در غنچه در مقایسه با گل *idi* کمتر ولی *hdr* بیشتر و ماده تولیدی نیز بیشتر است که در این مورد به نظر می‌رسد نقش ژن *hdr* برجسته‌تر از *idi* است. در گل در مقایسه با برگ، هر دو ژن بیان بیشتری داشته ولی ماده تولیدی در برگ بیشتر است که می‌تواند اشاره‌ای باشد بر نقش ژن‌های پایین‌دستی و مسئله تخصیص پیش ماده‌ها که توسط این ژن‌های پایین‌دستی اعمال می‌شود، که منجر به بروز چنین نتایجی شده است (شکل ۲).

Camphene (مونوترپن)، در برگ بیان *hdr* کمتر و بیان *idi* بیشتر از غنچه و ماده تولیدی کمتر از آن است که می‌تواند به دلیل برجسته‌تر بودن نقش *hdr* باشد. در غنچه بیان *hdr* بیشتر از گل و بیان *idi* کمتر از آن است و ماده تولیدی بیشتر از گل است که این نتیجه نیز از نتیجه پیشین در مورد برگ حمایت می‌کند که *hdr* ژنی برجسته‌تر در تولید این ماده است. در گل بیان هر دو ژن در مقایسه با برگ بیشتر است و ماده تولیدی در گل بیشتر از برگ است که به نظر منطقی می‌آید. این نتایج نشان از نقش کنترل‌کنندگی به نسبت برجسته‌تر ژنی مانند *hdr* در برابر ژن‌های پایین‌دستی دارد (شکل ۲).

Camphor (مونوترپن)، در برگ نسبت به غنچه بیان *hdr* کمتر و بیان *idi* بیشتر و ماده تولیدی کمتر است که به نقش قوی‌تر *hdr* در تولید ماده اشاره دارد. از سوی دیگر در غنچه در مقایسه با گل، ژن *hdr* بیان بالاتر و ژن *idi* بیان کمتری دارد و ماده تولیدی در غنچه بیشتر از گل است که بار دیگر بر نقش پررنگ‌تر *hdr* در برابر *idi* اشاره دارد. در گل بیان *hdr* و *idi* بیشتر از برگ است و ماده تولیدی در گل بیشتر از برگ است که نتیجه‌ای منطقی است (شکل ۲).

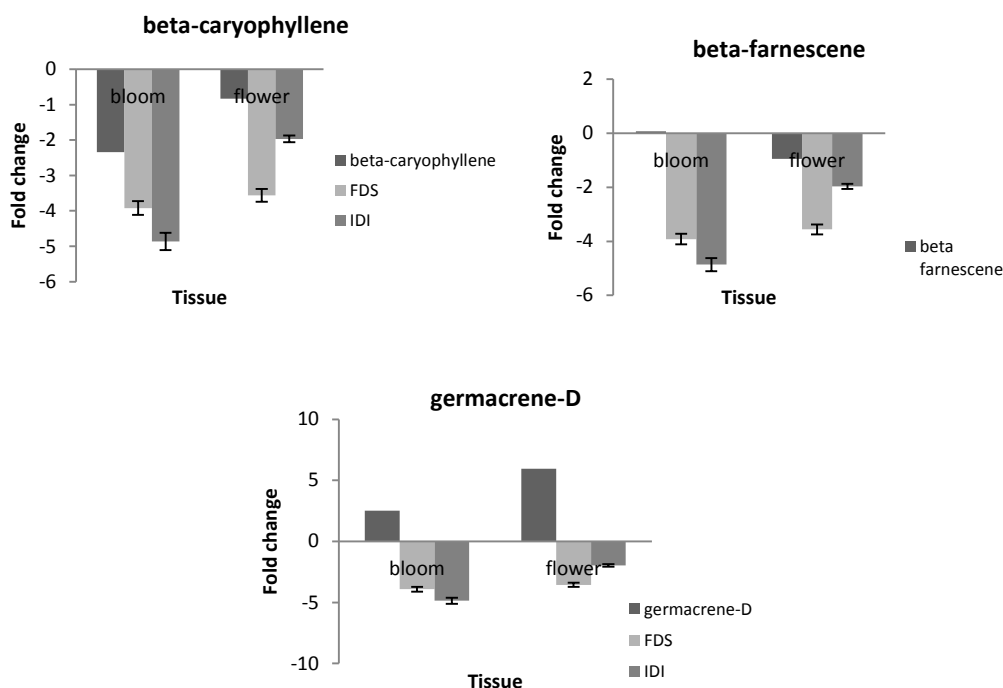
p-cymene (مونوترپن)، در برگ کمتر از غنچه و *idi* بیشتر از آن است و ماده تولیدی کمتر است که بار دیگر نقش *hdr* را از نظر محدودکنندگی تولید ماده برجسته می‌کند، در غنچه در مقایسه با گل، *hdr* بیشتر و *idi* کمتر و همچنین ماده تولیدی

بافت‌های مختلف، کدام‌یک از ژن‌ها برای کدام مواد نقش محدودکننده را داشته و به احتمال با دست‌کاری آن ژن بتوان میزان ماده تولیدی را افزایش داد، جدول ۳ ارائه شده است؛ اما نکته قابل‌توجه این است که با توجه به اینکه در این بررسی ژن‌های بیشتری به‌ویژه ژن‌های *TPSs* بررسی نشده‌اند، نتایج قطعی نبوده و احتمالی است (جدول ۳). در جدول پایین واژه *yes* نشان‌دهنده محدودکننده بودن آن ژن در بافت موردنظر و برای ترپن موردنظر است و واژه *no* نشان از محدودکننده نبودن آن ژن است.

لازم به یادآوری است که در این مقایسه‌ها منظور از محدودکننده بودن ژن و یا اثرگذار بودن آن، در آن سطحی از تولید ماده یادشده است که مقایسه شده، برای مثال یک ژن تا حدی از تولید یک ماده می‌تواند نقشی منفی و یا محدودکننده نداشته باشد و پس از گذر از آستانه‌ای از تولید، آن ژن می‌تواند نقش محدودکننده و یا تأثیر بازخوردی (فیدبک) را در تولید آن ماده بازی کند.

ژن‌های *gds*، *fds* و *TPSs*^۱ را مشاهده کردند که این مورد می‌تواند نقش تنظیم پس از رونویسی را مطرح کند (Iijima et al., 2004). میزان ترپن تولیدی کل، رابطه خوبی با سطح کلی فعالیت *TPSs* داشت ولی نه با ژن‌های *gds* و *fds* (Iijima et al., 2004). در میان آن سه رقم برای مثال در برگ رقم *SD* در حدود میزان ترپن کل سه برابر رقم *SW* بود و سطح فعالیت *TPSs* بین این دو رقم نزدیک به نسبت ۱:۳ بود. همین‌طور برگ‌های *SD* حدود ۷/۴ برابر ترپن بیشتری از رقم *EMX* داشتند و نسبت میزان فعالیت *TPSs* نیز در این دو رقم به همین صورت بود. از سوی دیگر برگ‌های *SW* و *SD* سطوح همسانی از فعالیت آنزیم‌های پرنیل‌ترنسفرآز (*gds* و *fds*) را داشتند درحالی‌که *SD* سه برابر ترپن بیشتری داشت (Iijima et al., 2004).

با توجه به بررسی اخیر و مقایسه بین میزان بیان ژن‌ها و مواد تولیدی متناظر آن‌ها در بافت‌ها و اندام‌های مختلف می‌توان نتایج را به این صورت که در



شکل ۳. مقایسه محتوای برخی سسکوئنی‌ترین‌ها و سطح بیان ژن‌های *idi* و *fds* در بافت‌های برگ، غنچه و گل *A. diffusa*
Figure 3. the comparison among some sesquiterpenes and expression level of genes *idi* and *fds* in leaf, blossom and flower tissues of *A. diffusa*

جدول ۳. تأثیر احتمالی محدودکنندگی ژن‌ها در تولید ترپن‌ها در *A. diffusa*Table 3. the probable restricting effect of genes in terpene synthesis in *A. diffusa*

<i>A. diffusa</i> Compounds	Leaf			Bloom			Flower		
	fds	hdr	idi	fds	hdr	idi	fds	hdr	idi
beta-caryophyllene	-	-	-	yes	-	yes	yes	-	yes
beta-farnesene	-	-	-	no	-	no	no	-	no
germacrene-D	-	-	-	yes	-	yes	yes	-	yes
1,8-cineole	-	no	no	-	no	yes	-	yes (reverse) ¹	no
a-pinene	-	no	yes	-	yes (reverse)	yes	-	no	yes
beta-myrcene	-	-	-	-	yes	no	-	yes	no
borneol	-	yes (reverse)	no	-	no	no	-	no	yes (reverse)
camphene	-	yes	no	-	yes	yes (reverse)	-	yes	no
camphor	-	yes	no	-	yes	yes (reverse)	-	yes	no
p-cymene	-	yes	no	-	no	no	-	no	yes

۱. Reverse به معنی این است که رابطه برعکس بین ژن و ماده موردنظر وجود دارد.

1. Reverse means that there is an inverse relationship between the gen and the corresponding compound.

نتیجه‌گیری کلی

افزایش و یا کاهش این ژن‌ها را نمی‌توان به‌طور قطع به تغییرپذیری‌های سطح ترپن موردنظر ربط داد. از سوی دیگر در مورد برخی گیاهان، انتقال ترپن‌ها از ریشه به بخش هوایی مشاهده شده است که می‌تواند نسبت بیان ژن‌های مربوط به ترپن‌ها را با میزان موجود این مواد در این بخش‌های هوایی گمراه‌کننده نشان دهد؛ ضمن اینکه در مورد مسیرهای MEP و MVA این مسئله قابل توجه است که تبادل پیش ماده‌ها بین این دو مسیر در گیاهان مختلف مشاهده شده است، که اگر این تبادل در این گیاه رخ داده باشد نسبت بین ژن‌ها و ترپن‌های تولیدی را باز هم پیچیده‌تر می‌کند. بنابراین در کل، با توجه به مواردی که اشاره شد، نتایج گزارش شده در این مقاله قطعی نبوده و نتایج با احتمال بیان شده است.

همان‌طور که نتایج نشان داد، ژن‌های مورد ارزیابی در مورد بعضی ترکیب‌ها تأثیر محدودکننده داشتند، ولی در مورد باقی این ترکیب‌ها به احتمال این ژن‌های TPSs بودند که غلبه بیشتر و در نتیجه تأثیر محدودکنندگی را داشتند. ژن‌های موردبررسی نقش حیاتی را در تأمین پیش ماده‌ها و تعیین نسبت آن‌ها (مانند *idi*) دارند، اما در مورد بعضی از ترپن‌ها به احتمال تأثیر محدودکنندگی ژن‌های TPSs، تأثیر محدودکنندگی ژن‌های یادشده را به‌عنوان عامل محدودکننده کم‌رنگ کرده است. نکته دیگری که می‌تواند نتایج را به‌طور کامل درست نشان ندهد، مربوط به این واقعیت است که ژن‌های موردبررسی در سطح پس از رونویسی تنظیم می‌شوند و بنابراین

REFERENCES

1. Abad, M.J., Miguel Bedoya, L., Apaza, L. & Bermejo, P. (2012). The *Artemisia L.* genus: A review of bioactive essential oils. *Molecules*, 17, 2542-2566.
2. Botella-Pavi'a, P., Besumbes, O., Phillips, M.A., Carretero-Paulet, L., Boronat, A. & Rodri'guez-Concepcio'n, M. (2004). Regulation of carotenoid biosynthesis in plants: evidence for a key role of hydroxylmethylbutenyl diphosphate reductase in controlling the supply of plastidial isoprenoid precursors, *The Plant Journal*, 40, 188-199.
3. Cheng, A.X., Lou, Y.G., Mao, Y.B., Lu, S., Wang, L.J. & Chen, X.Y. (2007). Plant terpenoids: Biosynthesis and ecological functions. *Journal of Integrative Plant Biology*, 49(2), 179-186.
4. Huang, J. Z., Cheng, T.C., Wen, P.J., Hsieh, M.H., & Chen, F.C. (2009). Molecular characterization of the *Oncidium* orchid *hdr* gene encoding 1 hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate reductase, the last step of the methylerythritol phosphate pathway. *Plant Cell Reports.*, 28, 1475-1486
5. Iijima, Y., Davidovich-Rikanati, R., Fridman, E., Gang, D.R., Bar, E., Lewinsohn, E. & Pichersky, E. (2004). The biochemical and molecular basis for the divergent patterns in the biosynthesis of terpenes and phenylpropenes in the peltate glands of three cultivars of basil, *Plant Physiology*, 136, 3724-3736.
6. Ma, Y., Yuan, L., Wu, B., Li, X., Chen, S. & Lu, S. (2012). Genome-wide identification and characterization of novel genes involved in terpenoid biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza*, *Journal of Experimental Botany*. 63, 2809-2823.

7. Munoz-Bertomeu, J., Arrillaga, I., Ros, R. & Segura, J. (2006). Up-regulation of 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphatesynthase enhances production of essential oils in transgenic Spike lavender. *Plant Physiology* 142, 890-900.
8. Nagegowda, D.A. (2010). Plant volatile terpenoid metabolism: Biosynthetic genes, transcriptional regulation and sub-cellular compartmentalization, *FEBS Letters*, 584, 2965-2973.
9. Olofsson, L., Engström, A., Lundgren, A. & Brodelius, P. E. (2011). Relative expression of genes of terpene metabolism in different tissues of *Artemisia annua L*, *BMC Plant Biology*, 11, 45.
10. Pfaffl, M.W., Horgan, G.W. & 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(9), e36-e36.
11. Page, J.E., Hause, G., Raschke, M., Gao, W., Schmidt, J., Zenk, M.H. & Kutchan, T.M. (2004). Functional analysis of the final steps of the 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate (DXP) Pathway to isoprenoids in plants using virus-induced gene silencing. *Plant Physiology* 134, 1401-1413.
12. Phillips, M.A., Walter, M.H., Ralph, S.G., Dabrowska, P., Luck, K., Uro, E.M., Boland, W., Strack, D., Rodriguez-Concepcion, M., Bohlmann, J. & Gershenzon, J. (2007). Functional identification and differential expression of 1-deoxy D-xylulose 5-phosphate synthase in induced terpenoid resin formation of Norway spruce (*Picea abies*), *Plant Molecular Biology*, 65, 243-257.
13. Wang, Q., Pi Y., Hou, R., Jiang, K., Huang, Z., Hsieh, M. & Sun, X. (2007). Molecular cloning and characterization of 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate reductase (CaHDR) from *Camptotheca acuminata* and its functional identification in *Escherichia coli*; *BMB Reports*, 29, 112-118.
14. Wen, W. & Yu, R. (2011). Artemisinin biosynthesis and its regulatory enzymes: Progress and perspective, *Pharmacogn Review*, 5(10), 189.
15. Zare Mehrjerdi, M., Bihamta, M.R., Omidi, M., Naghavi, M.R., Soltanloo, H. & Ranjbar, M. (2013). Effects of exogenous methyl jasmonate and 2-isopentenyladenine on artemisinin production and gene expression in *Artemisia annua*, *Turkish Journal of Botany* 37, 499-505.
16. Zeng, Q., Zhao, C., Yin, L., Yang, R., Zeng, X., Huang, Y., Feng, L. & Yang, X. (2008). Cloning of artemisinin biosynthetic cDNAs and novel ESTs and quantification of low temperature-induced gene over-expression. *Science China C Life Science*, 51(3), 232-4.

Expression levels of *hdr*, *fds* and *idi* genes in aerial organs of *Artemisia diffusa* and their relationships with some terpene contents

Farzad Alaeimoghadam¹, Mohamad Reza Naghavi^{2*} and Abdolhadi Hosseinzadeh³

1, 2, 3. Former M.Sc. Student of Agriculture Biotechnology, Professor of Agriculture Biotechnology and Associate Professor, Department of Agronomy, University College of Agriculture & Natural Resources of University of Tehran, Karaj, Iran

(Received: Nov. 25, 2015 - Accepted: Aug. 31, 2015)

ABSTRACT

In view of the importance of terpene in human's life, analyzing the relationship between them and the involved genes are of crucial necessity. The necessity is for exploring influential genes. Among different plants containing terpene, *Artemisia* is included. In this study, several genes *Farnesyl diphosphate synthase (fds)*, *Hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate reductase (hdr)* and *Isopentenyl diphosphate isomerase (idi)* in pathways 2-c-methyl-erythritol 4-phosphate (MEP) and Mevalonate (MVA) were analyzed in comparison to some monoterpene and sesquiterpene content in three tissues namely leaf, bud and flower of *Artemisia diffusa*. This study was conducted to compare RT-PCR data of genes with data from terpene GC-MS results. Results showed that it seemed for certain terpenes production in certain tissues, the above genes had limiting function (as *idi* in bud for 1,8-cineole and germacrene-D). These genes play important roles in terpene production and for some other terpenes, probably, other downstream genes such as terpene synthase had this limiting role (about beta-farnescene, for example, genes *idi* and *fds* had no limiting role in none of tissues mentioned above). Another point which casts doubt on *fds*, *hdr* and *idi* functions in terpene production is post-transcriptional regulation of these genes, the factor which was not evaluated in this study.

Keywords: *Artemisia*, GC-MS, Real-Time PCR, terpenes.