DOI: http://dx.doi.org/10.22092/ijrfpbgr.2015.12219

دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۲۲، شماره ۲، صفحه ۲۰۰-۱۹۲ (۱۳۹۳)

بررسی رابطه بیان ژن‌های اصلی مسیر MEP و میزان تولید مونوترپن‌ها در *Artemisia annua*

رزگار سیدرحمانی[۱]، محمدرضا نقوی*[۲]، ولی‌اله محمدی[۳] و مجتبی رنجبر[۴]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

۲*- نویسنده مسئول مکاتبات، استاد، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

پست الکترونیک: mnaghavi@ut.ac.ir

۳- دانشیار، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

۴- استادیار، دانشکده بیوتکنولوژی دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین، آمل

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۶/۳۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۹/۱۲

چکیده

جنس *Artemisia* از خانواده *Asteraceae* دارای ۳۴ گونه در ایران است که حاوی ترکیبات با ارزش دارویی هستند. مهمترین کاربرد آرتمیزیا در درمان مالاریا می‌باشد. این گیاه علاوه بر آرتمیزنین، دارای ترکیبات ثانویه دیگری نظیر پلی‌فنول‌ها، ترپن‌ها، فیتواستروئیدها و الکالوئیدها می‌باشد. مسیر MEP (۲-C- متیل-D- اریتریتول ۴- فسفات) یک مسیر کلروپلاستی بوده که مونوترپن‌ها از این مسیر تولید می‌شوند. این مسیر تنها در گیاهان فتوسنتزکننده و بعضی باکتری‌ها وجود دارد. در این تحقیق میزان تولید ترکیبات مونوترپن از مسیر MEP با بیان سه ژن اصلی این مسیر (*DXS, DXR, HDR*) در سه بافت برگ، غنچه و گل مورد مقایسه قرار گرفت. ترکیبات مونوترپن توسط دستگاه GC/MS شناسایی شده و بیان ژن‌ها به‌روش PCR زمان واقعی مطالعه شد. تعداد شش ترکیب مونوترپن α-pinene، Camphene، β-Myrcene، 1,8-Cineole، Artemisia ketone و Camphor حاصل تجزیه با GC/MS در برگ، غنچه و گل به‌ترتیب ۶۰/۸، ۵۴ و ۷۸/۷۶ درصد از عصاره را به خود اختصاص دادند. از بین این ترکیبات نیز Artemisia ketone و Camphor میزان بالاتری داشتند. بیان ژن *DXS* در غنچه و گل ۳ برابر برگ بود. همچنین، ژن *DXR* بیشترین میزان بیان را در گل نشان داد و بیان ژن *HDR* در برگ ۳ برابر گل و تقریبا مشابه غنچه بود.

واژه‌های کلیدی: *Artemisia annua*، مونوترپن‌ها، مسیر MEP، PCR در زمان واقعی، GC/MS.

مقدمه

درمنه (*Artemisia*) به خانواده (Compositae Asteraceae) تعلق دارد که یکی از خانواده‌های مهم گیاهی و دارای ۱۰۰۰ جنس و ۲۰۰۰۰ گونه می‌باشد. در این خانواده *Artemisia* نیز در زیر خانواده Anthemideae قرار می‌گیرد که خود شامل ۵۰۰ گونه می‌باشد و این گونه‌ها عمدتاً در آسیا، اروپا و آمریکای شمالی یافت می‌شوند. از این ۵۰۰ گونه ۳۵ گونه در ایران وجود دارد (Rechinger, 1986). گونه‌های مختلف آرتمیزیا دارای مصارف دارویی، بهداشتی و آرایشی می‌باشند که اهمیت این گونه گیاهی را نشان می‌دهد. آرتمیزیا یکی از منابع تولیدکننده ترپنوئیدهای گیاهیست. ترپنوئیدها ترکیبات ثانویه‌ای هستند که در

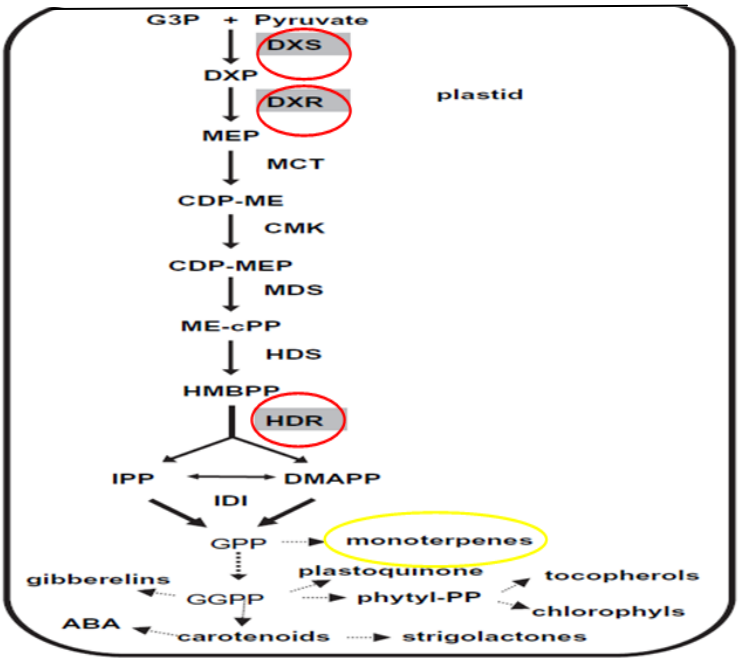
حفاظت گیاهان در برابر آفات گیاهخوار و بیماری‌ها، جلب گرده‌افشان‌ها و حشرات پراکنده‌کننده بذر نقش دارند (Ferreira *et al*., 2010). همچنین نقش مهمی را در ساختار غشا (استرول و هاپانوئید)، واکنش‌های اکسایشی (زنجیره جانبی یوبی کوئنین، مناکوئین، پلاستوکوئینین و فیلاکوئینونن)، بازداری نوری و حفاظت نوری (کاراتینوئید و زنجیره جانبی کلروفیل‌ها) و تنظیم رشد و نمو (هورمون‌ها و مواد تغییردهنده پروتئین‌ها) برعهده دارند (Phillipson *et al*., 2007). مونوترپن‌ها از اجزای اصلی اسانس می‌باشند که دارای خواص ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی، دردنشان و آنتی‌توموری بوده و بر روی دستگاه قلبی- عروقی و سیستم اعصاب مرکزی تأثیر می‌گذارند (Junior *et al*., 2010). ترپنوئیدها ترکیبات گیاهی با گروه‌های متنوع ساختاری بوده که با وجود داشتن ساختار و عملکرد پیچیده، پلیمر ساده‌ای از واحدهای ایزوپرن پنج‌کربنه و ایزوپنتنیل‌دی‌فسفات (IPP) می‌باشند (Sauret-Gueto *et al*., 2006).

گیاهان دارای دو مسیر ترپنوئید هستند که در چگونگی تولید واحدهای پنج کربنه با هم اختلاف دارند؛ مسیر کلاسیک موالونیک اسید (MVA) و مسیر ۲-C- متیل-D- اریتریتول ۴- فسفات (MEP) (Lichtenthaler, 1999; Jain *et al*., 2001). این دو مسیر نه تنها در محل انجام و مواد اولیه، بلکه در محصولات نهایی نیز با هم اختلاف دارند. مسیر MVA با منابع IPP سیتوسولی آغاز می‌شود و به‌وسیله آنزیم ایزوپنتیل دی‌فسفات ایزومراز (IDI) به دی متیل‌الیل‌دی‌فسفات (DMAPP) برای ساخت ترکیبات سسکوئی و تری‌ترپن‌ها تبدیل می‌شود، در حالی که مسیر پلاستیدی MEP، ترکیبات IPI و DMAPP را برای مونو، دی و تری‌ترپن‌ها فراهم می‌کند (شکل۱) (Lange *et al*., 2000). در اولین مرحله از این مسیر، ۱- دئوکسی D- اگزالولوس ۵- فسفات (DXP) از پیروات و دی‌گلیسرآلدئید ۳- فسفات تشکیل می‌شود که این مرحله به وسیله ۱- دئوکسی D- اگزالولوس ۵- فسفات سنتاز (DXS) انجام می‌شود. تبدیل DXP به MEP با آنزیم ۱- دئوکسی D- اگزالولوس ۵- فسفات ردوکتوایزومراز (*DXR*) صورت می‌گیرد. در ضمن *DXR* نقش تعیین‌کننده‌ای در هدایت میان واسطه‌ها به سمت مسیرهای IPP و DMAPP دارد (Carretero-Paulet *et al*., 2002). تعدادی از مطالعات نشان داده اند که *DXR* نقش مهمتری را در مسیر MEP نسبت به *DXS* دارد (Estevez *et al*.,2000; Carretero-Paulet *et al*., 2001). تحقیقات نشان داده است که افزایش بیان *DXR* در گیاه تراریخت نعناع (*Mentha piperita*) منجر به افزایش تولید مونوترپن‌ها در بافت برگ شده و همچنین خاموشی جزئی ژن *DXS* در گیاه تراریخت نعناع منجر به کاهش تجمع تعدادی از ترپن‌ها می‌گردد (Mahmoud & Croteau, 2001). بنابراین مسیرMEP به‌عنوان یک مسیر امیدبخش برای طراحی ترکیبات دارویی، مواد معطر، آنتی‌اکسیدان‌ها و هورمون‌ها مطرح شده است (Rodriguez -Concepcion, 2001). اهداف این پژوهش عبارت بودند از: ۱) شناسایی ترکیبات اصلی مونوترپن تولید شده در سه بافت برگ، غنچه و گل از مسیر MEP در آرتمیزیا آنوا و ۲) تعیین رابطه میزان بیان ژن‌های اصلی این مسیر با میزان تولید مونوترپن‌های اصلی در بافت‌های مذکور.

مواد و روش‌ها

۱- کاشت گیاه

این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. پس از ضدعفونی بذرهای آرتمیزیا با هیپوکلرید سدیم ۲۰٪ و ۳ بار شستشو با آب مقطر، به‌مدت ۲ هفته با شدت نور ۳۰۰۰ لوکس و ۸ ساعت تاریکی در پتری‌دیش قرار داده شدند. بذرهای جوانه زده را به گلدان‌های پلاستیکی کوچک انتقال داده و در ادامه این گلدان‌ها ابتدا به‌مدت ۲۱ روز و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۵۵٪ و شدت نور ۵۰۰۰ لوکس و هشت ساعت تاریکی قرار گرفتند و بعد گیاهچه‌ها با همان شرایط و تنها تغییر شدت نور به‌میزان ۷۰۰۰ لوکس در اتاقک رشد نگهداری شدند.



شکل ۱- مسیر شماتیک **MEP** و تولید مونوترپن‌ها از این مسیر

DXS: ۱- دئوکسی– D- زیلولوس ۵- فسفات سنتاز، *DXR*: ۱- دئوکسی – D- زیلولوس ۵- فسفات ردوکتاز، *HDR*: ۱- دئوکسی – D- زیلولوس ۵- فسفات ردوکتوایزومراز، monoterpenes: مونوترپن‌ها

۲- استخراج و تجزیه اسانس

از ۳ بافت برگ، غنچه و گل استخراج و تجزیه اسانس انجام شد. نمونه‌ها به‌مدت ۲ روز در آون خشک شدند. استخراج نمونه‌ها با هگزان انجام شد. بر روی نمونه‌های خشک شده از بافت‌های مذکور در تیوپ‌های جداگانه، هگزان اضافه شد و بعد از ورتکس کردن و نگه‌داری ۴ ساعته تیوپ‌ها در دمای اتاق، نمونه‌ها فیلتر شدند. برای تجزیه اسانس از دستگاه (Agilent Technologies 7890A) با یک MSD (۵۹۷۵) و ستون HP-5MS به‌طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میکرومتر استفاه شد. تزریق نمونه به دستگاه در حالت اسپلیت و با دمای ورودی ۲۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد. برنامه دمایی آون به‌ترتیب زیر بود؛ دمای اولیه ۶۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳ دقیقه، افزایش دما تا ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد با گرادیان دمایی ۳ درجه سانتی‌گراد در دقیقه و توقف در این دما به‌مدت یک دقیقه، افزایش دما تا ۲۶۰ درجه سانتی‌گراد با همان شیب گرادیان دمایی ۳ درجه سانتی‌گراد در دقیقه و توقف در این دما به‌مدت ۱۰ دقیقه. از گاز هلیوم به‌عنوان گاز حامل با سرعت جریان یک میلی‌متر در دقیقه و متوسط سرعت یک سانتی‌متر در ثانیه استفاده شد. همچنین دمای یونیزاسیون ۲۳۰ درجه سانتی‌گراد بود.

۳- استخراج RNA

از ۳ بافت برگ، غنچه و گل با ۳ تکرار زیستی به‌کمک کیت RNasy Plant Mini Kit شرکت سیناژن و طبق دستورالعمل شرکت سازنده، RNA استخراج شد. برای بررسی کیفیت RNA استخراج شده از آگارز ۱٪ و برای تعیین کمیت از دستگاه نانودراپ استفاده شد.

۴- ساخت cDNA

مقدار سه میکروگرم RNA همراه با یک میکروگرم آغازگر الیگو dT را در یک تیوپ ریخته و با آب دبس (بدون نوکلئاز) به حجم ۱۲ میکرولیتر رسانده شد و به‌مدت پنج دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس تیوپ‌ها به روی یخ

منتقل شده و چهار میکرولیتر بافر ساخت cDNA، یک میکرولیتر RNase inhibitor، دو میکرولیتر dNTP و یک میکرولیتر آنزیم نسخه‌برداری معکوس اضافه شد. تیوب‌ها به‌مدت یک ساعت در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد و بعد به‌مدت پنج دقیقه در دمای ۷۰ درجه قرار داده شدند. پس از طی این مراحل cDNA ساخته شده به‌دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد برای نگهداری منتقل شد.

۵- طراحی آغازگر و RT-PCR

به‌منظور طراحی آغازگر برای ۳ ژن *DXS*، *DXR* و *HDR* از نرم‌افزار primer 3 استفاده شد. توالی پرایمرهای طراحی شده در جدول ۱-۱ نشان داده شده است. عواملی مانند دمای اتصال نزدیک ۶۰ درجه سانتی‌گراد، درصد CG بالای ۵۰ درصد و حضور C یا G در انتهای ´۳ و طراحی از ناحیه ´۳ ژن در طراحی آغازگر مورد توجه قرار گرفت و برای ساخت سفارش داده شد. همچنین، آغازگر مربوط به ژن مرجع 18S rRNA بر اساس روش Zeng و همکاران (۲۰۰۸) انتخاب شد.

جدول ۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده برای ژن‌های *DXS*، *DXR* و *HDR*

ژن	توالی آغازگر مستقیم (**Forward**)	توالی آغازگر معکوس (**Reverse**)	طول قطعه تکثیری
DXS	5'- TGAAGCATTGATTGCAGAGG -3'	5'- GCAAATGTAACCGCATGTTG -3'	۱۶۹
HDR	5'-AATTCTCCATGGCGTCTTTG-3'	5'-ATTATGCCTGGACACCTTCG-3'	۱۷۰
DXR	5'- GGTTGCTCGTCATCCAGATT -3'	5'- CGCAAGAGGAAGAACAAAGG -3'	۱۵۴

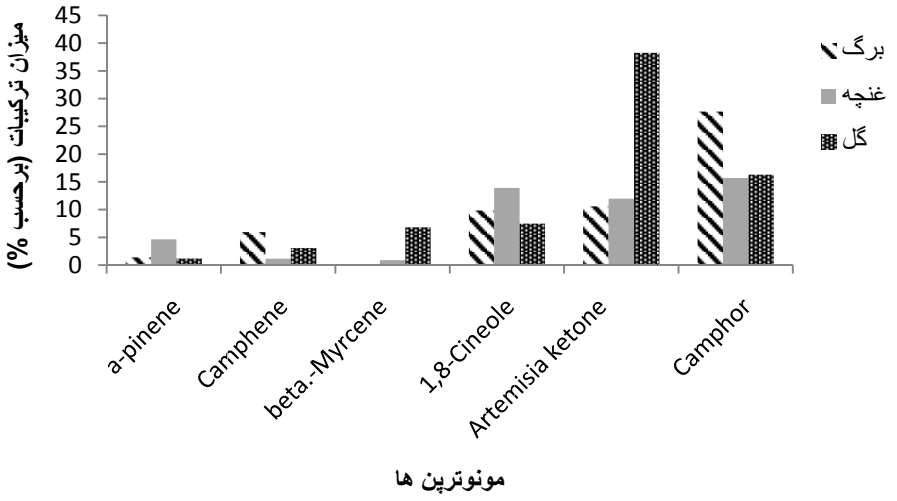
۶- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در زمان واقعی

برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در زمان واقعی از روش سایبرگرین استفاده شد که با استفاده از دستگاه (BIO-RAD) در آزمایشگاه علوم کشاورزی گرگان انجام شد. در هر واکنش مواد شامل: ۶ میکرولیتر آب دوبار تقطیرشده، ۱ میکرولیتر از هرکدام از آغازگرهای مستقیم و معکوس (۱۰pmol)، ۲ میکرولیتر cDNA (۱:۲۰رقیق شده) و ۱۰ میکرولیتر سایبرگرین مورد استفاده قرار گرفت. دو چرخه PCR به‌کار رفت، به این ترتیب که چرخه اول با یک تکرار و یک مرحله با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و زمان ۱۸۰ ثانیه و چرخه دوم با ۳۵ تکرار و ۳ مرحله شامل دمای ۹۵ درجه به‌مدت ۱۰ ثانیه، دمای ۵۷ درجه به‌مدت ۱۰ ثانیه و دمای ۷۲ درجه به‌مدت ۳۰ ثانیه انجام شد.

نتایج

۱- تجزیه عصاره با GC/MS

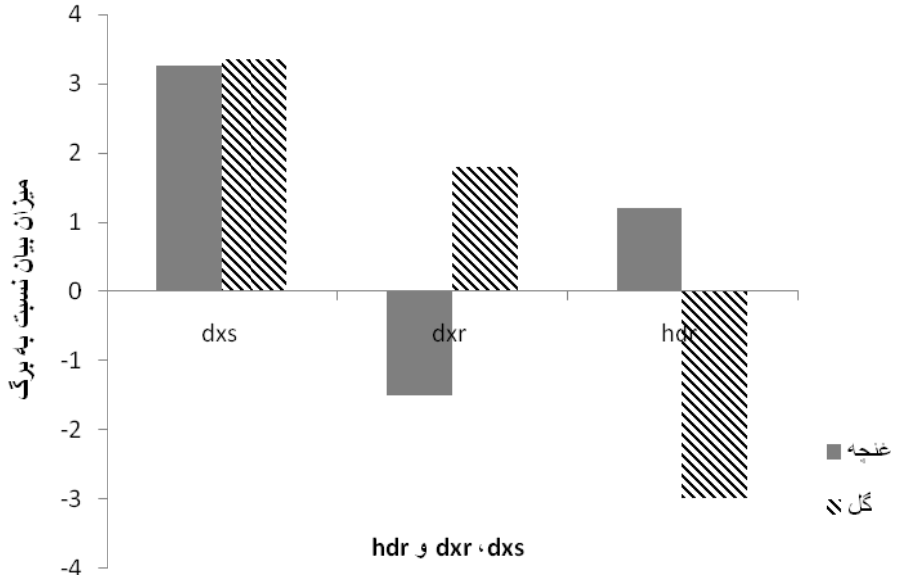
تعداد ۴۶ ترکیب ترپنوئید شامل مونوترپن‌ها و سسکوئی‌ترپن در بافت‌های برگ غنچه و گل شناسایی شد. با توجه به این واقعیت که تمامی مونوترپن‌ها از طریق مسیر MEP تولید می‌شوند، درصد مونوترپن‌ها در عصاره بررسی شد. مونوترپن‌ها نسبت به سایر ترکیبات ترپنوئیدی سهم بشتری داشتند، به‌طوری که از ۴۹ ترکیب شناسایی شده، ۲۶ ترکیب را مونوترپن‌ها تشکیل دادند و از بین این ترکیبات مونوترپن، ۶ ترکیب α-pinene، Camphene، beta-Myrcene، Cineole-۱,۸ و Artemisia ketone در برگ، غنچه و گل به‌ترتیب ۶۰/۸۰، ۵۴ و ۷۸/۷۶ درصد عصاره را به خود اختصاص دادند (شکل۲).



شکل ۲- درصد اصلی‌ترین مونوترپن‌های تشکیل‌دهنده اسانس گیاه *Artemisia annua*

۲- PCR در زمان واقعی

بررسی بیان سه ژن اصلی مسیر MEP یعنی *DXS*، *DXR* و *HDR* در سه بافت برگ، غنچه و گل نشان داد که بیان ژن *DXS* در غنچه و گل نسبت به برگ بیش از ۳ برابر بود. اما ژن‌های *DXR* و *HDR* الگوی بیان متفاوتی را نشان دادند، به‌طوری که بیان ژن *DXR* در گل حدود ۲ برابر بیشتر از برگ بود اما بیان آن در غنچه نسبت به برگ کاهش پیدا کرده بود. ژن *HDR* بر خلاف *DXR* در غنچه اندکی افزایش نسبت به برگ داشت و در گل ۳ برابر کاهش بیان را نسبت به برگ نشان داد (شکل۳)



شکل ۳- مقایسه بیان ژن‌های *DXS*، *DXR* و *HDR* در غنچه و گل نسبت به برگ

بحث

اخیراً متخصصان دارو و درمان بر مطالعه خواص بیولوژیکی گیاهان و کشف ترکیبات ضد میکروبی طبیعی متمرکز شده‌اند (Lima *et al*., 2005). ترکیب α-pinene یکی از ترکیبات مونوترپن می‌باشد که بر روی رشد باکتری‌های گرم‌مثبت اثر منفی دارد (Leite *et al*., 2007). ویژگی فعالیت بازداری فسفولیپاز و استراز α-pinene خصوصاً در ارتباط با *Cryptococcus neoformans* شناخته شده است (Silva *et al*., 2012). بیشترین میزان α-pinene در غنچه تولید شد که با بیان ژن‌های *DXS* و *HDR* که در غنچه بیان بالایی را داشتند، همخوانی دارد. ترکیب Camphene یکی از مونوترپن‌های حلقوی است که در آب نامحلول ولی در حلال‌های آلی محلول می‌باشد که از ایزومریزاسیون α- pinene ساخته می‌شود. این ماده یک ترکیب معطر می‌باشد که به‌عنوان افزودنی در ساخت مواد آرایشی و بهداشتی کاربرد دارد. ترکیب Camphone دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی قدرتمندی می‌باشد و توانایی پاکسازی رادیکال‌های آزاد مختلف از قبیل هیدروکسیل و سوپراکسید را دارد (Liu *et al*., 2008). میزان Camphone در برگ و گل بیشتر بود که با بیان ژن *DXR* که در برگ و گل بیان بالایی دارد، هماهنگ بود، اما به‌نظر می‌رسد که با بیان ژن *HDR* در تضاد باشد. ترکیب Myrcene یکی دیگر از ترکیبات با ارزش مونوترپنی می‌باشد که دارای رایحه دلپذیر بوده و در ساخت مواد خوشبوکننده استفاده می‌شود. این ترکیب در برگ شناسایی نشد و مقدار آن در غنچه ناچیز بود اما در گل حدود ۸٪ عصاره را به‌خود اختصاص داد و با بیان ژن *DXR* هماهنگی بیشتری داشت. چون بیان این ژن در گل بالاتر از برگ و غنچه بود. ترکیب ۱،۸-Cineole یک منوترپن حلقوی فرار و یک ترکیب خوشبو با مزه تند می‌باشد که کاربردهای خوشبوکننده و دارویی فراوانی دارد (Lana *et al*., 2006.). ترکیب ۱،۸-Cineole اثر بازدارندگی قوی روی α-TNF و IL-1 و تولید سایتوکین‌ها دارد که در کاهش بروز حساسیت به‌کار می‌رود (Juergens *et al*., 2004). میزان اندازه‌گیری شده این ترکیب در هر سه بافت نسبتاً بالا بود و در غنچه درصد آن اندکی بیشتر از برگ و گل بود. ترکیب artemisia ketone همراه با camphor اصلی‌ترین ترکیب عصاره را تشکیل داد. artemisia ketone در برگ و غنچه هرکدام ۱۰٪ و در گل ۳۸٪ عصاره را به‌خود اختصاص داد و همانند beta-myrcine مقدار این ترکیب نیز با *DXR* هماهنگی داشت، زیرا در گل بیان *DXR* از برگ و غنچه بالاتر بود. اما ترکیب camphor برخلاف beta-myrcine در برگ بیشتر بود. این نتایج با یافته‌های Bhakuni و همکاران (۲۰۰۱) که میزان ترکیبات ثانویه در گونه *Artemisia anuua* را در کشورهای مختلف گزارش کردند، هماهنگ است. به‌طوری که در گزارش آنها نیز مونوترپن‌ها درصد بیشتر عصاره را خود اختصاص دادند و artemisia ketone و camphor ترکیب اصلی عصاره را تشکیل دادند و بعد از آنها cineoleها قرار داشتند که در کشورهای مختلف با توجه به شرایط آب و هوایی میزان آنها در عصاره تغییرات قابل توجهی را نشان می‌دادند. در تحقیقی Verdian-rizi (2008)، درصد ترکیبات ثانویه *Artemisia anuua* را در ایران با کروماتوگرافی گازی و اسکتومتری جرمی در ۳ مرحله قبل از گل‌دهی، گل‌دهی و بعد از گل‌دهی اندازه‌گیری کرده و نشان داد که بیشترین ترکیبات به‌ترتیب مربوط به camphor، camphene، artemisia ketone و α-pinene بود که همانند نتایج این آزمایش باز camphor در مرحله قبل از گل‌دهی دارای بیشترین مقدار بوده و artemisia ketone در مرحله بعد از گل‌دهی بیشتر از مرحله قبل از گل‌دهی بود. در ارتباط با بیان ژن‌های این مسیر نیز نتایج تحقیق حاضر با نتایج (Olofsson *et al*., 2011) همخوانی دارد. در بررسی‌های Olofsson و همکاران (۲۰۱۱) سه آنزیم اصلی مسیر MEP به‌روش PCR زمان واقعی در گونه *Artemisia annua* مطالعه شد و مشاهده کردند که بیان *DXS* در جوانه گل و قسمت‌های جوان ۷-۸ برابر برگ‌های پیر گیاه بود که با نتایج این آزمایش که بیان این ژن در غنچه و گل بیش از ۳ برابر برگ بود، مطابقت دارد. همچنین، در گزارش آنها *DXR* اندکی افزایش بیان را در

جوانه گل نشان داد که باز در این آزمایش نیز نتیجه مشابهی بدست آمد و بیشترین بیان *DXR* مربوط به گل بود. به‌همین ترتیب آنها گزارش کردند که بیان *HDR* در برگ‌های پیر ۳۰-۱۰ برابر بیشتر از قسمت‌های جوان گیاه بود که با نتیجه این آزمایش که بیان *HDR* در برگ بیش از ۳ برابر گل بود کاملاً همخوانی دارد. اگرچه در بافت‌های مختلف نقش ژن‌های کلیدی این مسیر متفاوت است، اما به‌نظر می‌رسد که *DXR* نقش مهمتری را در این مسیر بر عهده داشته باشد و می‌تواند به‌عنوان یک ژن کاندیدا برای دست‌کاری‌های ژنتیکی برای افزایش تولید مونوترپن‌ها مطرح باشد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از مسئولان محترم صندوق حمایت از پژوهشگران و فن‌آوران کشور در خصوص حمایت مالی این پروژه در قالب طرح شماره ۹۰۰۰۲۲۷۱ تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع مورد استفاده

– Bhakuni, R., Jain, D., Sharma, R., and Kumar, S., 2001. Secondary metabolites of *Artemisia annua* and their biological activity. Current Science, 80: 35-48.
– Carretero-Paulet, L., Ahumada, I., Cunillera, N., Rodriguez-Concepcion, M., Ferrer, A., Boronat, A. and Campos, N., 2002. Expression and molecular analysis of the Arabidopsis *DXR* gene encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, the first committed enzyme of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway. Plant Physiology, 129: 1581–1591.
– Estevez, J.M., Cantero, A., Romero, C., Kawaide, H., Jimenez, L.F., Kuzuyama, T., Seto, H., Kamiya, Y., and Leon, P., 2000. Analysis of the expression of *CLA1*, a gene that encodes the 1-deoxyxylulose 5-phosphate synthase of the 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway in *Arabidopsis*. Plant Physiology, 124: 95-103.
– Ferreira, F.S., Devanand, L., Luthria, D.L., 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.
– Jain, R., Sharma, R., and Kumar, S., 2001. Secondary metabolites of *Artemisia annua* and their biological activity. Current Science, 80: 1-10.
– Juergens, U., Engelena, T., Racke, K., Stober, M., Gillissen, A., and Vetter H., 2004. Inhibitory activity of 1,8-cineol (eucalyptol) on cytokine production in cultured human lymphocytes and monocytes. Pulmonary Pharmacology & Therapeutics. 17: 281–287.
– Lana, E., Rocha, K., Kozhevnikov, I., and Gusevskaya, E., 2006. Synthesis of 1,8-cineole and 1,4-cineole by isomerization of terpineol catalyzed by heteropoly acid. J Mol. Catal. A Chem., 259: 99–102
– Lange, B.M., Rujan. T., Martin, W., and Croteau, R., 2000. Isoprenoid biosynthesis: the evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 97: 13172-13177.
– Leite. A., Lima, E., Souza, E., Melo, Diniz M., Trajano, V., and Medeiros, I., 2007. Inhibitory effect of β-pinene, α-pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 43: 121- 126.
– Lichtenthaler, H.K., 1999. The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. Annu. Plant Biol., 50: 47-65.
– Lima, I.O., Oliveira, R.A.G., Lima, E.O., Souza, E.L., Farias, N.P., and Navarro, D.F., 2005. Inhibitory action of some phytochemicals on yeasts potentially causing of opportunistic infections. Revista Brasileira de Ciencias Farmaceuticas, 41: 199-203.
– Liu, H., Qiu, N., Ding, H., and Yao, R., 2008. Polyphenols contents and antioxidant capacity of 68 Chinese herbals suitable for medicinal or food uses. Food Research International, 41: 363-370.
– Mahmoud, S., and Croteau, R.B., 2001. Metabolic engineering of essential oil yield and composition in mint by alternating expression of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase and menthofuran synthase. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98: 8915–8920.
– Olofsson, L., Engström, A., Lundgren, A., and Brodelius, P., 2011. Relative expression of genes of terpene metabolism in different tissues of *Artemisia annua* L. BMC Plant Biology, 11: 45-56.
– Phillipson, J. D., 2007. Phytochemistry and pharmacognosy. Phytochemistry, 68: 2960–2972.
– Quintans-Junior, L.J., Guimarães, A. G., and Araujo, B.E.S., 2010. Carvacrol, -borneol and citral reduce convulsant activity in rodents. *African Journal of Biotechnology*, 39: 6566–6572.

accumulation of key enzymes of the methylerythritol phosphate pathway in *Arabidopsis*. Plant Physiology, 141: 75–84.
– Silva, A., Lopes, P., Azevedo, M., Machado-Costa, D., Alviano, C., and Alviano, D., 2012. Biological activities of α-Pinene and β-Pinene Enantiomers. Molecules, 17: 6305-6316.
– Verdian-rizi, M., 2008. Variation in the essential oil composition of *Artemisia annua* L. of different growth stages cultivated in Iran. African Journal of Plant Science, 2: 16-18.
– Zeng, Q., Zhao, C., Yin L., Yang, R., Zeng, X., Huang, Y., Feng, L., and Yang, X., 2008. Cloning of artemisinin biosynthetic cDNAs and novel ESTs and quantification of low temperature-induced gene overexpression. Sci. China C Life Sci., 51:232-44.
– Rechinger, K.H., 1986. Flora Iranica, No. 158. Akademische Druck-u. Verlagsanstalt, Graz.
– Rodriguez-Concepcion, M., Ahumada, I., Diez-Juez, E., Sauret-Gueto, S., Lois L.M., Carretero-Paulet, L., Campos, N., and Boronat, A., 2001. 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase and plastid isoprenoid biosynthesis during tomato fruit ripening. Plant J, 27: 213-222.
– Rodriguez-Concepcion. M., and Boronat, A., 2002. Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. Plant Physiology, 130: 1079–1089.
– Sauret-Gueto, S., Botella-Pavia, P., Flores-Perez, U., Martinez- Garcia, J.F., San Roman, C., Leon, P., Boronat, A., and Rodriguez-Concepcion, M., 2006. Plastid cues posttranscriptionally regulate the

Relationship between expression of main MEP pathway genes and monoterpenes contents in *Artemisia annua*

R. SeyedRahmani[1], M.R. Naghavi[*2], V. Mohammadi[3] and M. Ranjbar[4]

1- M.Sc., Agricultural & Natural Resources College, University of Tehran, Karaj, I.R.Iran
2*- Corresponding author, Prof., Agricultural & Natural Resources College, University of Tehran. Karaj, I.R.Iran, Email: mnaghavi@ut.ac.ir
3- Assoc. Prof., Agricultural & Natural Resources College, University of Tehran. Karaj, I.R.Iran,
4- Assist. Prof., Faculty of Biotechnology, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, I.R.Iran

Received: 22.09.2013 Accepted: 03.12.2014

Abstract

Artemisia genus from Asteraceae family has 34 species in Iran with valuable medicinal compounds. The most important use of *Artemisia* has been the treatment of malaria in traditional Chinese medicine. In addition to artemisinin, it produces also other secondary metabolites such as polyphenols, terpenes, phytosterols and alkaloids. MEP (2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway) pathway is a chloroplastic pathway by which monoterpenes are produced. It exists only in photosynthesis plants and some bacteria. In this study, monoterpene compounds produced by MEP pathway in three kinds of tissues including leaf, bud and flower were compared with the expression of three genes in the pathway (*DXS*, *DXR*, *HDR*). Monoterpene compounds were measured by GC/MS and genes expression was evaluated by Real-Time PCR. Six Monoterpene compounds including α-pinene, Camphene, β-Myrcene, 1,8-Cineole, Artemisia ketone and Camphor detected by GC/MS analysis on leaf, bud and flower extracts, with 60.8, 54 and 78.76 percent of extract, respectively. Artemisia ketone and Camphor had higher levels compared to other compounds. *DXS* expression in leaves was three times higher than that of buds and flowers. *DXR* showed the highest expression in flowers. Expression of *HDR* in leaves or buds was three times higher than that of flowers. Comparing the results of gene expression and GC/MS suggested that DXR plays more important role in producing monoterpene compounds and might be a candidate gene for genetic engineering.

Keywords: *Artemisia annua,* GC/MS, monoterpenes, MEP phathway, real time PCR.