

Comparison of Expression Pattern of Some Artemisinin Biosynthesis Related Genes and Phytochemical Profile in *Artemisia fragrans* and *Artemisia annua* Species

Bitā Jamshidi

Ph.D. Student, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Kermanshah Branch, Islamic Azad University, Kermanshah, Iran. E-mail address: bita.alimer@epu.edu.iq

Alireza Etminan 

*Corresponding author. Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Kermanshah Branch, Islamic Azad University, Kermanshah, Iran. E-mail address: alietminan55@yahoo.com

Alimehras Mehrabi

Assistant Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Kermanshah Branch, Islamic Azad University, Kermanshah, Iran. E-mail address: alimehrasmehrabi@yahoo.com

Alireza Pour-Aboughadareh 

Assistant Professor, Seed and Plant Improvement Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. E-mail address: a.poraboghadareh@gmail.com and a.poraboghadareh@edu.ikiu.ac.ir

Lia Shoostari

Department of Plant Breeding and Biotechnology, Kermanshah Branch, Islamic Azad University, Kermanshah, Iran. E-mail address: Lia.shoostari@iau.ac.ir

Abstract

Objective

So far, around 500 species of *Artemisia* have been found in different regions of the world, and among them 34 species are endemic to Iran. It has been evidenced that Artemisinin is one of the medicinal compounds found in *Artemisia* that has various medical properties, especially antimalarial. The main objective of the present study was to comprise phytochemical profile and expression pattern of some genes related to artemisinin biosynthesis pathway in *A. fragrans* and *A. annua* species.

Materials and methods

In the present study, the accumulated artemisinin content in *A. fragrans* and *A. annua* species were detected using the high-performance liquid chromatography (HPLC) technique. Moreover, phytochemical compounds in leave tissue were identified using the gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) technique. The gene expression patterns for some artemisinin biosynthesis related genes including *4FPSF*, *DBR2*, *HMGR1*, *HMGR2*, *WIRKY*, *ADS*, *DXS*, and

SQS were comprised in two studied species. In each species, association between artemisinin content and the relative expression of investigated genes were determined through correlation analysis. All statistical analysis was performed based on three replication using R software.

Results

Based on obtained results, there was observed a significant difference between two *Artemisia* species in terms of artemisinin content, and the highest content was recorded for *A. fragrans*. Using GC-MS analysis, in general 26 and 20 phytochemical compounds were identified in *A. fragrans* and *A. annua* species, respectively. Among identified compounds, eight compounds were similar in both species. Moreover, some compounds such as Comphor, 1,8-Cineole, 4-Terpineol, and Pinocarvone were most important. According to the gene expression analysis, the highest relative expression of *4FPSF*, *ADS*, and *DXS* genes were recorded in *A. annua*, while the highest numbers of transcripts for *SQS*, *HMGR1*, *HMGR2*, *DRB2*, and *WIRKY* genes were estimated in *A. fragrans*. The results of correlation analysis for both species showed that artemisinin content significantly and positively correlated with the expression of *ADS*, *DBR2*, *DXS*, and *HMGR1* genes. However, in *A. annua* species, the *SQS* gene was not expressed and there was no correlation between these genes and artemisinin content.

Conclusions

In general, the obtained results revealed a significant difference between two studied *Artemisia* species in terms of the artemisinin content and other phytochemical compounds. Furthermore, our results indicated that *A. fragrans* could be used as an ideal source for extract artemisinin and other compounds. Hence, conducting other supplementary studies on this species is recommended.

Keywords: Secondary metabolites, artemisinin, HPLC, phytochemical compounds, transcriptome.

Paper Type: Research Paper.

Citation: Jamshid B, Etminan A, Mehrabi A, Pour-Aboughadareh A, Shooshtari L (2023) Comparison of expression pattern of some artemisinin biosynthesis related genes and phytochemical profile in *Artemisia fragrans* and *Artemisia annua* species. *Agricultural Biotechnology Journal* 15 (4), 125-144.

Agricultural Biotechnology Journal 15 (4), 125-144.

DOI: 10.22103/jab.2023.22086.1508

Received: August 27, 2023.

Received in revised form: October 21, 2023.

Accepted: October 22, 2023.

Published online: December 30, 2023.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.



© the authors

مقایسه الگوی بیان ژن‌های مرتبط با سنتز آرتمیزینین و پروفایل فیتوشیمیایی در گونه‌های

Artemisia annua و *Artemisia fragrans*

بی‌تا جمشیدی

دانشجوی دکتر، گروه بیوتکنولوژی و بهنژادی گیاهی، واحد کرمانشاه، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمانشاه، ایران. رایانامه:

bita.alimer@epu.edu.iq

 علیرضا اطمینان


*نویسنده مسئول: دانشیار، گروه بیوتکنولوژی و بهنژادی گیاهی، واحد کرمانشاه، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمانشاه، ایران. رایانامه:

alietminan55@yahoo.com

علی‌مهراس مهربابی

استادیار، گروه بیوتکنولوژی و بهنژادی گیاهی، واحد کرمانشاه، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمانشاه، ایران. رایانامه:

alimehrasmehrabai@yahoo.com

 علیرضا پورابوقداره

استادیار، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران. رایانامه:

a.poraboghdashareh@gmail.com و a.poraboghdashareh@edu.iku.ac.ir

لیا شوشتاری

استادیار، گروه بیوتکنولوژی و بهنژادی گیاهی، واحد کرمانشاه، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمانشاه، ایران. رایانامه

Lia.shooshtari@iau.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۶/۰۵ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۲/۰۷/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۷/۳۰

چکیده

هدف: تاکنون ۵۰۰ گونه از جنس آرتمیزییا در سراسر جهان یافت شده است که ۳۴ گونه بومی ایران می‌باشد. گونه‌های مشخص شده است که آرتمیزینین یکی از مهم‌ترین ترکیبات دارویی موجود در آرتمیزییا می‌باشد که دارای خواص دارویی فراوانی است. هدف از این پژوهش مقایسه پروفایل فیتوشیمیایی دو گونه *Artemisia fragrans* و *A. annua* و الگوی بیان برخی از ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز آرتمیزینین بود.

مواد و روش‌ها: میزان آرتمیزینین سنتز شده در دو گونه *A. fragrans* و *A. annua* با استفاده از تکنیک HPLC و پروفایل ترکیبات فیتوشیمیایی آنها با استفاده از روش GC-MS شناسایی شد. الگوی بیان ژن‌های مرتبط با بیوسنتز آرتمیزینین شامل

میزان تولید آرتیمیزینین و بیان نسبی هر یک از ژن‌های بررسی شده در دو گونه به صورت جداگانه بررسی شد. ارتباط بین *SQS* و *DXS*, *ADS*, *WIRKY*, *HMGR2*, *HMGR1*, *DBR2*, *AFPSF* در دو گونه مورد مقایسه قرار گرفت. ارتباط بین میزان تولید آرتیمیزینین و بیان نسبی هر یک از ژن‌های بررسی شده در دو گونه به صورت جداگانه بررسی شد. **نتایج:** با توجه به نتایج به دست آمده، اختلاف معنی‌داری از نظر میزان آرتیمیزینین استخراج شده بین دو گونه مشاهده شد و بیشترین مقدار مربوط به گونه *A. fragrans* بود. بررسی نتایج به دست آمده از تجزیه GC-MS نشان داد در مجموع ۲۶ و ۲۰ ترکیب فیتو شیمیایی به ترتیب در دو گونه *A. fragrans* و *A. annua* شناسایی شد که در بین آن‌ها ۸ ترکیب در بین دو گونه مشترک بود. ترکیباتی مانند کامفور، ۱-۸-سینئول، ۴-تریپتئول و پینوکاروون از مهم‌ترین ترکیبات شناسایی شده مشترک در هر دو گونه بودند. بررسی الگوی بیان ژن‌های مرتبط با بیوسنتز آرتیمیزینین نشان داد میزان بیان نسبی ژن‌های *ADS* و *DXS* در گونه *A. annua* نسبت به *A. fragrans* بیشتر بود، در حالیکه از نظر ژن‌های *SQS*, *HMGR1*, *HMGR2*, *DBR2* و *WIRKY* گونه *A. fragrans* دارای تعداد رونوشت بالاتری نسبت به *A. annua* بود. بر اساس نتایج حاصل از تجزیه همبستگی، در هر دو گونه بین مقدار آرتیمیزینین و بیان ژن‌های *ADS*, *DBR2*, *DXS* و *HMGR1* همبستگی مثبت و معنی‌داری مشاهده شد. با این حال، در گونه *A. annua* ژن *SQS* بیان نشد و رابطه‌ای بین این ژن و مقدار آرتیمیزینین وجود نداشت.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این پژوهش بیانگر وجود اختلاف معنی‌داری بین دو گونه آرتیمیزینین از نظر مقدار تولید آرتیمیزینین و سایر ترکیبات فیتو شیمیایی بود. علاوه بر این، با توجه به یافته‌های به دست آمده مشخص شد گونه *A. fragrans* می‌تواند به عنوان یک گونه مطلوب برای استخراج آرتیمیزینین و سایر متابولیت‌های ثانویه مورد استفاده قرار گیرد. از این رو انجام سایر مطالعات تکمیلی بر روی این گونه قابل توصیه می‌باشد.

کلیدواژه‌ها: متابولیت‌های ثانویه، آرتیمیزینین، HPLC، ترکیبات فیتوشیمیایی، ترنسکریپتوم.

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: جمشیدی بیتا، اطمینان علیرضا، مهرابی علی مهرا، پورابوقدره علیرضا، شوشتری لیا (۱۴۰۲) مقایسه الگوی بیان ژن‌های مرتبط با سنتز آرتیمیزینین و پروفایل فیتوشیمیایی در گونه‌های *Artemisia fragrans* و *Artemisia annua* مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، ۱۵(۴)، ۱۲۵-۱۴۴.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.



© the authors

فرآورده‌های طبیعی استخراج شده از گیاهان دارویی یک منبع اصلی جهت تهیه و توسعه ترکیبات دارویی می‌باشند. امروزه شیوع انواع بیماری‌ها از یک سو و عوارض ناشی از استفاده بیش از حد از داروهای شیمیایی از سوی دیگر سبب افزایش پذیرش داروهای گیاهی شده است. قدیمی‌ترین اطلاعات استفاده از گیاهان به عنوان دارو از سومریان و مصریان مربوط به حدود ۱۵۵۰ سال تا ۳ هزار سال پیش از میلاد مسیح می‌باشد (Han et al. 2014). ترکیبات طبیعی یا به عبارت دیگر متابولیت‌های ثانویه را می‌توان به عنوان ترکیبات راهنما برای طراحی منطقی داروهای جدید، توسعه الگو برداری از سنتز آنها و کشف اثرات درمانی جدید مورد استفاده قرار داد. یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی شناخته شده آرتمیزیان می‌باشد که در درمان طیف وسیعی از بیماری‌های انگلی و ویروسی به ویژه مالاریا نقش مؤثری دارد. از نقطه نظر گیاه‌شناسی، آرتمیزیان گیاهی از شاخه Plantae و راسته Asterales می‌باشد. در زبان فارسی به این گیاه درمنه، افسنتین و برنجان سف نیز گفته می‌شود. گونه‌های موجود در این جنس دارای فرم رویشی علفی یا خشبی، یکساله و یا حتی چند ساله می‌باشند. سیستم ریشه‌ای آنها راست ریشه با ساقه مستقیم و دارای برگ‌های متناوب، غالباً با بریدگی‌های گوناگون است. گل‌ها به صورت گل‌های کناری در کپه‌های ناجور جنس ماده یا ماده عقیم، گل‌های طبقی (لوله‌ای) نر ماده یا به ندرت ماده یا نر عقیم، عموماً ماده یا به تخمدان تقلیل یافته و از نظر عمل نر با لوله‌ای یا به ندرت لوله‌ای-نخی شکل، غالباً زرد یا به ندرت سبز مایل به قرمز می‌باشند (Mozafarian 1989). بر اساس منابع موجود تا کنون بین ۳۰۰ تا ۵۰۰ گونه از این جنس در نواحی مختلف دنیا از جمله استرالیا، آمریکای شمالی، آفریقای شمالی، بخش‌هایی از اروپا و به طور عمده در آسیا شناسایی شده است. با این حال، مشخص شده است که گونه‌های مختلف این جنس در آب و هوای معتدل در هر دو نیمکره رشد کرده ولی عمده زیستگاه‌های آنها در نواحی خشک و نیمه‌خشک بیشتر پراکنده هستند (Watson 2002). بر اساس مطالعات انجام شده مشخص شده است که ۳۳ گونه از جنس آرتمیزیان در نواحی مختلف ایران پراکنده هستند که به عنوان گونه‌های بومی ایران شناخته شده هستند (Hamidi et al. 2018). آرتمیزیان مهم‌ترین متابولیت ثانویه موجود در گونه‌های آرتمیزیان است که یک لاکتون سزکویی‌ترین اندوپراکسید می‌باشد. در واقع این متابولیت فعالیت‌های مؤثری بر علیه نژادهای مختلف پلاسمودیوم دارد و به دلیل مقاومت بالای این نژادها به داروهای شیمیایی ضد مالاریا همچون کلروکوئین و سولفادوکسین، آرتمیزیان به طور چشمگیری مورد توجه قرار گرفته است (Sharafi et al. 2006). در سال‌های اخیر پیشرفت در ابزارهای بیوتکنولوژی سبب شده است تا اطلاعات دقیقی در رابطه با تنظیم مولکولی بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی فراهم شود. در رابطه با آرتمیزیان، از مهم‌ترین ژن‌های کلیدی مؤثر در مسیر بیوسنتز آن می‌توان به آمورفا ۴ و ۱۱ دی ان سینتاز (AMS)، فارنسیل دی‌فسفات سینتاز (FPS) و اسکوالن سینتاز (SQS) اشاره نمود (Matsushita et al. 1996; Liu et al. 2003). مشابه سایر ترپنوئیدها، آرتمیزیان از ایزوپنتیل دی‌فسفات (IPP) مشتق می‌شود. به طور کلی بیوسنتز IPP از طریق دو مسیر وابسته به موالونات (MVA) در پلاستیدها و مستقل از موالونات (MEP) در سیتوسول صورت می‌گیرد. ثابت شده است که مسیر MVA نقش کلیدی در سنتز و تجمع آرتمیزیان دارد (Mohadjerani et al. 2020). در مسیر MVA، نخستین مرحله

از سنتز آرتمیزینین تبدیل فارن سیل دی فسفات (FDP) به آمورفا-۴،۱۱-دی‌ان با استفاده از کاتالیزور آمورفا-۴،۱۱-دی‌ان سنتز (ADS) است (Kim et al. 2008). مسیرهای تولید استرول و سسکوئی ترپن FDP به طور همزمان تنظیم می شوند. تولید سسکوئی ترپن به سسکوی ترپن سیکلاز (SQC) وابسته است، در حالی که در مسیر دیگر (تولید استرول) اسکوالن سنتاز (SQS) نقش کلیدی ایفا می کند. به عبارت دیگر، با کاهش تولید استرول، تولید آرتمیزینین افزایش می یابد و بالعکس. مشخص شده است سنتز آرتمیزینین متأثر از عوامل مختلفی مانند اندام‌های گیاهی و سلولی، فیتوهورمون‌ها، مسیرهای سیگنال دهنده و شرایط محیطی می باشد (Nguyen et al. 2011). علاوه بر این، تنظیم بیان ژن‌های مختلف درگیر در مسیرهای تولید آرتمیزینین نیز بر سنتز آن تأثیرگذار هستند. به عنوان مثال، (Olofsson et al. 2011) و (Wang et al. 2009) گزارش کردند که ژن‌های مختلف سسکوی ترپن سنتز ممکن است اثر منفی بر مقدار آرتمیزینین تولید شده در نتیجه رقابت برای FDP سوبسترا داشته باشند. از این رو، بررسی بیان ژن‌های مرتبط با بیوسنتز آرتمیزینین می تواند دانش ما را در مورد افزایش محتوای آرتمیزینین تکمیل کند. به طور کلی، بر اساس برخی از مطالعات گزارش شده است که بیوسنتز آرتمیزینین منحصر به گونه *A. annua* می باشد (Weathers et al. 2009; Wang et al. 2007; Wang et al. 2006; al. 2006)، در حالیکه در سال‌های اخیر ثابت شده است که سایر گونه‌های آرتمیزیا مانند *A. afftangutica*، *A. indica*، *A. dracunculus*، *A. vulgaris*، *A. parviflora*، *A. absinthium* و *roxburghiana* و دیگر گونه‌های جنس آرتمیزیا می توانند به عنوان منابعی برای تولید و استخراج آرتمیزینین مورد استفاده قرار گیرند. به علاوه، مطالعات و بررسی‌های به عمل آمده در اواخر دهه ۸۰ میلادی روشن نمود که مکانیسم‌های مولکولی در زمره مهم‌ترین فرایندهای ژنتیکی (مشتمل بر همانندسازی DNA، رونویسی، ترجمه و حتی نحوه تنظیم ژن‌ها) هستند (Barazandeh et al. 2016a; Safaei et al. 2022). ماده ژنتیکی (DNA) یک سلول از تعداد زیادی ژن تشکیل شده است که هیچ گاه همه به طور همزمان بیان نمی شوند و در هر لحظه فقط تعداد کمی از آنها بیان شده و پروتئین یا آنزیم مورد نیاز سلول را تولید می نمایند (Barazandeh et al. 2016b). محیطی که موجود در آن رشد می کند مشخص می کند که آیا ژن بیان شود و یا این که نیازی به فرآورده آن نیست و باید غیرفعال و یا خاموش شود (Bordbar et al. 2022; Jafari Ahmadabadi et al. 2023). ساز و کار بیان ژن اولین بار در باکتری *E. coli* کشف شد (Masoudzadeh et al. 2021; Mohamadipoor et al. 2020). ژن‌های یوکاریوتی بیان‌شان تحت کنترل موقت و چندبعدی است. در هر یک از انواع بافت‌ها تنها یک مجموعه نسبتاً کوچک از تمام ژنوم بیان می شود و نیز بیان ژن‌ها به مرحله نمو بستگی دارد (Masoudzadeh et al. 2020). بنابراین، بیان ژن در یوکاریوت‌ها برای هر بافت اختصاصی است. همچنین مقدار محصولات ژن که در همان بافت و نیز در سایر بافت‌هایی که آن محصول را می سازند، ساخته شده سبب تنظیم بیان آن ژن می شود (Shokri et al. 2021; Mohammadabadi et al. 2023). یکی از اقدامات اساسی در بهنژادی ملکولی مطالعه ژن‌ها و پروتئین‌های مرتبط با صفات مهم و مطالعه آنها در سطح سلولی یا کروموزومی است (Shahsavari et al. 2022; Mohammadinejad et al. 2022). لذا، هدف از اجرای این

پژوهش مقایسه پروفایل فیتوشیمیایی و الگوی بیان برخی از ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز آرتمیزینین در دو گونه *A. annua* و *A. fragrans* بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی مورد بررسی در این پژوهش شامل دو گونه *A. fragrans* و *A. annua* بود که بذور هر یک از آنها از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران (IBRC) به ترتیب با کد د ستر سی IBRC:P1000008 و IBRC:P1000099 تهیه شد. ابتدا بذور هر یک از گونه‌های مورد مطالعه با سدیم هیپوکلرید ۲۰ درصد به مدت ۲۰ دقیقه ضدعفونی شد و سپس با آب مقطر سه مرتبه شستشو صورت گرفت (Liu et al. 2008). در مرحله بعد، بذور ضدعفونی شده درون سینی‌های کشت پلاستیکی پر شده با پرلیت و پیت‌ماس کشت شدند. پس از انجام کاشت بذور، سینی‌های کاشت به درون اتاقک رشد با شرایط کنترل شده دمایی (۲۰ تا ۲۵ درجه سانتیگراد) و نور (دوره ۱۶/۸ تاریکی/روشنایی) منتقل شدند. پس از ۴۵ روز از کاشت بذور، گیاهچه‌ها به گلدان‌های پر شده از خاک و ماسه (نسبت ۱:۱) منتقل و تا زمان نمونه‌برداری تحت شرایط کنترل شده گلخانه نگهداری شدند. جهت تعیین میزان آرتمیزینین هر یک از گونه‌های مورد نظر از روش کروماتوگرافی با عملکرد بالا (HPLC) استفاده شد. برای این منظور ابتدا ۲ گرم از نمونه‌های برگ خشک شده پودر نموده و به آن‌ها ۵۰ میلی‌لیتر استونیتریل ۶۰ درصد افزوده شد و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم نگهداری شدند. در مرحله بعدی، عصاره‌های استخراج شده با استفاده از کاغذ صافی واتمن (Whatman 0.45 micron) تصفیه شدند. میزان آرتمیزینین با استفاده از دستگاه HPLC مدل DAD detector, Azura مجهز به ستون کربن ۱۸ (Eclipse-XBD-C18: 4.6 mm ID × 250 mm; USA) اندازه‌گیری شد. جریان حلال ۱ میلی‌لیتر در دقیقه تنظیم شد و از آب اسیدی شده با استونیتریل به عنوان فاز متحرک استفاده شد. برای هر تزریق از ۲۵ میکرولیتر عصاره استفاده شد. برای هر نمونه سه بار تزریق انجام و آشکار سازی در طول موج ۲۶۰ نانومتر انجام شد (Salehi et al. 2018). به منظور بررسی پروفایل فیتوشیمیایی گونه‌های مورد بررسی از سیستم کروماتوگرافی گازی طیف‌سنجی جرمی (GC-MS) استفاده شد. در این روش ابتدا ۰/۵ گرم برگ پودر شده توزین و به آن ۲۰ میلی‌لیتر متانول افزوده شد و نمونه‌ها به مدت دو روز بر روی شیکر در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از تهیه عصاره‌های گیاهی، محلول استخراج شده با استفاده از کاغذ صافی واتمن (Whatman No.1) تصفیه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس ترکیبات فیتو شیمیایی موجود در هر یک از گونه‌های بررسی شده با استفاده از دستگاه GC-MS مدل TRACEMS-TermoQuest-Finnigan با مشخصات ستون ۳۰ میلی‌متر ارتفاع، ۰/۲۵ میلی‌متر قطر و ضخامت لایه‌ای ۰/۲۵ نانومتر (DB-5 GC column) شناسایی شد. برنامه‌ریزی حرارتی به صورت ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و سپس ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۵ درجه سانتی‌گراد در دقیقه به همراه دمای محفظه تزریق و دتکتور ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. شناسایی ترکیبات فیتو شیمیایی موجود در عصاره با استفاده از درصد

تطبیق‌ها و کتابخانه‌های مؤسسه ملی استاندارد و فناوری (ویرایش نهم WILEY، کتابخانه NIST-08 MS، Gaithersburg، MD، ایالات متحده آمریکا) انجام شد. بررسی الگوی بیان ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز آرتمیزینین با استفاده از تکنیک qRT-PCR انجام شد. برای این منظور ابتدا نمونه‌برداری از بافت برگ گیاهچه‌های جوان انجام و بلافاصله در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استخراج RNA نگهداری شدند. استخراج RNA با استفاده از کیت استخراج شرکت DENAZIST ASIA انجام گرفت. واکنش سنتز cDNA نیز با استفاده از کیت EasyTM cDNA Synthesis Kit و مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده (پارتوس) صورت گرفت. برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز در زمان واقعی، از کیت-Sina SYBR Blue HS (2x) qPCR استفاده شد. در ابتدا به منظور تعیین کارایی هر جفت آغازگر در واکنش Real-Time PCR ترکیبی از تمامی تیمارها و تکرارهای cDNA سنتز شده، تهیه گردید و برای هر جفت آغازگر چندین ضریب رقت در نظر گرفته شد. پس از تعیین بهترین غلظت آغازگر و cDNA، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز در زمان واقعی با استفاده از دستگاه Rotor-Gene Q انجام شد. در جدول ۱ توالی آغازگرهای مورد استفاده ارائه شده است. حجم مخلوط واکنش ۱۲ μL و شامل SYBR Blue μL ، ۲ μL نمونه cDNA، ۰/۳ μL از هر یک از آغازگر پیش‌رو و پس‌رو و ۳/۴ μL آب عاری از RNase بود. پس از آماده نمودن مخلوط واکنش، واکنش qRT-PCR با شرایط دمایی ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و به دنبال آن ۴۰ تکرار با چرخه‌های ۱۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۲۰ ثانیه در دمای ۵۳ تا ۶۱ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و افزایش دما از ۶۵ تا ۹۵ درجه سانتی‌گراد هر ثانیه یک درجه انجام شد. پس از انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز، براساس دمای ذوب به دست آمده برای هر آغازگر میزان بیان نسبی ژن‌های مورد بررسی با استفاده از رابطه $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ محاسبه شد (Pfaffl 2001). پس از محاسبه داده‌های مربوط به میزان بیان نسبی ژن‌های مورد بررسی، تجزیه‌های آماری شامل تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن با استفاده از نرم افزار SPSS انجام شد. بررسی ضرایب همبستگی بین مقدار آرتمیزینین و بیان هر یک از ژن‌های مطالعه شده نیز با استفاده از بسته "CORIT" در محیط R صورت گرفت.

نتایج و بحث

نتایج به دست آمده از تجزیه کروماتوگرافی با عملکرد بالا (HPLC) در شکل ۱ نشان داده شده است. همان گونه که ملاحظه می‌شود مقدار آرتمیزینین در گونه *A. fragrans* نسبت به *A. annua* به طور معنی‌داری بیشتر بود (به ترتیب ۰/۴۷ و ۰/۲۷ میلی‌گرم در گرم ماده خشک). آرتمیزینین یک لاکتون سیکسکو ترپن شناخته شده در گونه‌های آرتمیزینین می‌باشد (Efferth et al. 2015). اگر چه در بسیاری از مطالعات انجام شده نشان داده شده است که بیشترین میزان آرتمیزینین در گونه *A. annua* یافت شده است (Zia et al. 2007; Czehowski et al. 2018; Benyagoub et al. 2020)، با این حال نتایج به دست آمده از این پژوهش با سایر نتایج گزارش شده مطابقت نشان نداد. ژن‌های زیادی در سنتز آرتمیزینین نقش دارند که تغییر بیان آنها

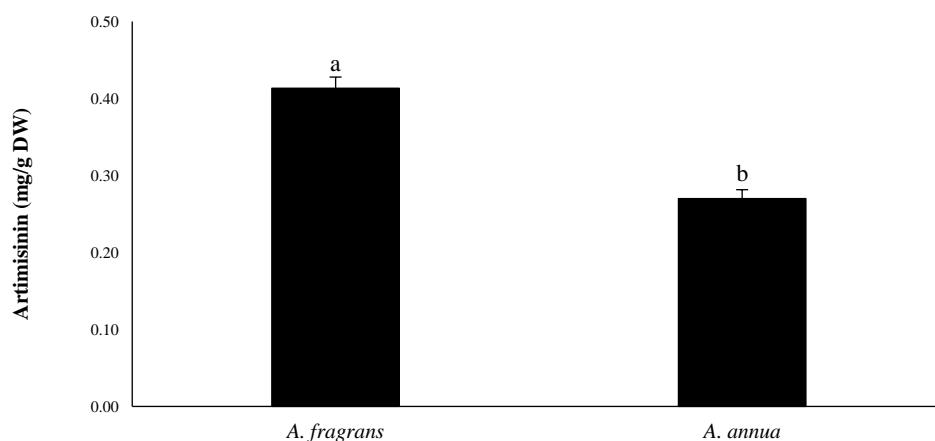
باعث افزایش یا کاهش مقدار آرتیمیزینین خواهد شد. با این حال، میزان این تغییر در بیان ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز آرتیمیزینین نیز به گونه و مراحل رشدی گیاه بستگی دارد (Numonov et al. 2019).

جدول ۱. توالی آغازگرهای مربوط به ژن‌های مرتبط با بیوسنتز آرتیمیزینین

Table 1. The sequences of primers for related genes to Artemisinin biosynthesis

Gene	Forward/Reverse	Sequence	Reference
ADS	F	GTCGAATGGGCTGTCTCTGC	Ghasemi et al. (2021)
	R	CCATCAATAACGGCCTTGG	
DBR2	F	CATCAACAAGCAAGCCCATTTC	Ghasemi et al. (2021)
	R	GCGATAGTCTTCAACCACCTC	
HMGR-1	F	GGTCAGGATCCGGCCAAAACATT	Arsenault et al. (2010)
	R	CCAGCCAACACCGAACCAGCAACT	
HMGR-2	F	TGCTGGTTCTCTTGGTGGAT	Salehi et al. (2018)
	R	CTCCAAGTGTGCCAACCTCT	
WIRKY	F	CAAGAAGTACCAAGACCGAATCC	Salehi et al. (2018b)
	R	GGAGATAACAGGTGGCGAATAGAC	
DXS	F	ATGGGTTGGCGGGATTAC	Arsenault et al. (2010)
	R	CCGTCAAGATTGGCAGTAGGTA	
4FPSF	F	GTATGATTGCTGCGAACGATGGA	Arsenault et al. (2010)
	R	CGGCGGTGAATAGACAATGAATAC	
SQS	F	TTTGAAAGCAGTATTGAAACAC	Ghasemi et al. (2021)
	R	CAGACAGCATCACGAAGC	
Actin	F	AGTGCTCCTGGTTAGTTGTC	Ghasemi et al. (2021)
	R	CTTGTTCCTCGTAATCTTCG	

به عنوان نمونه، در مطالعات مختلف بیشترین مقدار آرتیمیزینین در گونه‌های *A. annua* و به دنبال آن گونه‌های *A. marschalliana deserti* و *A. absinthium* به دست آمد. (Zia et al. 2007; Czehowski et al. 2018; Numonov et al. 2009). (Benyagoub et al. 2020). هفت گونه درمنه جمع‌آوری شده از مناطق مختلف تاجیکستان را مطالعه و گزارش کردند که مقدار آرتیمیزینین بین ۰/۰۷ تا ۰/۴۵ گرم در ماده خشک بین گونه‌های مختلف متغیر است. در مطالعه Salehi et al. (2018) نیز بیشترین میزان آرتیمیزینین در گونه *A. deserti* (۵/۱۳ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک) گزارش شده است. Salih et al. (2023) نشان دادند که عصاره برگ *A. judaica*، *A. sieberi* و *A. monosperma* به ترتیب حدود ۳/۰۱، ۲/۵ و ۱/۹ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک دارای آرتیمیزینین می‌باشند. با برر سی نتایج به دست آمده از این پژوهش و سایر مطالعات انجام شده می‌توان اظهار داشت سایر گونه‌های آرتیمیزینین می‌توانند به عنوان منبعی برای استخراج آرتیمیزینین مورد توجه و استفاده قرار گیرند. از نقطه نظر مراحل رویشی نیز گزارش شده است که، مقدار آرتیمیزینین استخراج شده از بافت برگ در گونه‌ای همچون *A. scoparia* بیشتر از *A. annua* می‌باشد. ولی، اگر آرتیمیزینین از غنچه استخراج شود گونه *a. annua* نسبت به *A. scoparia* محتوی بیشتری از این متابولیت را فراهم خواهد کرد. از اینرو علاوه بر زمینه ژنتیکی گیاه (گونه) توجه به شرایط محیطی و رشدی گیاه نیز برای استخراج متابولیت‌های ثانویه دارای اهمیت می‌باشد.



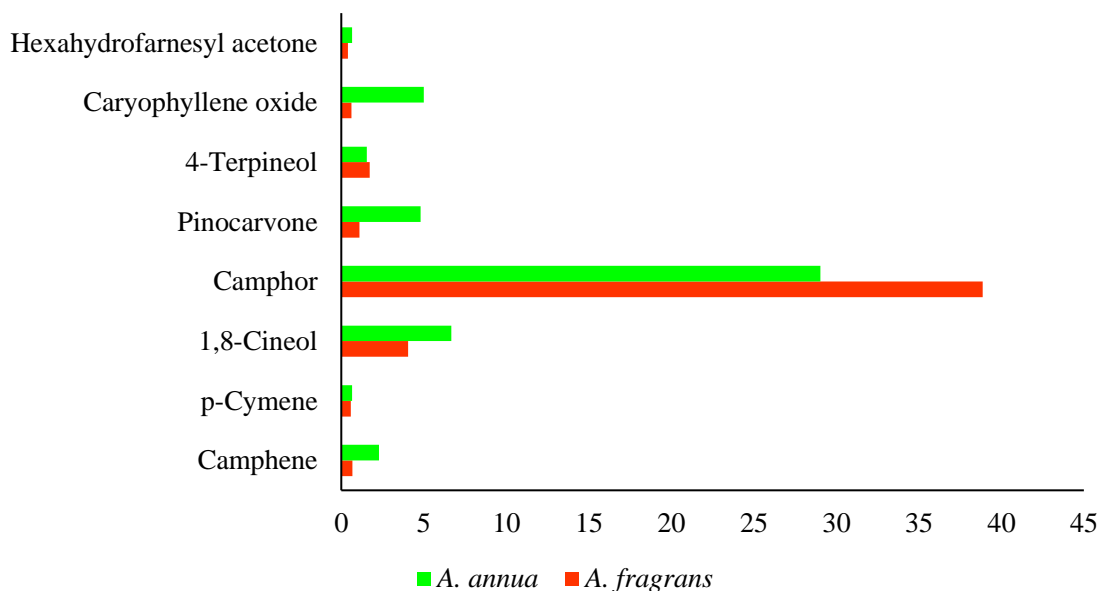
شکل ۱. میزان آرتیمیزین تعیین شده با استفاده از تکنیک HPLC در دو گونه *A. fragrans* و *A. annua*

حروف متفاوت در هر ستون بیانگر اختلاف معنی دار بین گونه‌ها در سطح احتمال ۰/۰۱ می‌باشند

Figure 1. Determined the artemisinin content in *A. fragrans* and *A. annua* species using HPLC technique. Different letters show significant differences among species at 0.01 the probability level

مقدار ترکیبات شناسایی شده در گونه مورد مطالعه در جدول ۱ ارائه شده است. همانطور که مشاهده می‌شود در مجموع ۳۸ ترکیب در دو گونه *A. fragrans* و *A. annua* شناسایی شد. با بررسی ترکیبات شناسایی شده مشخص شد ۸ ترکیب در هر دو گونه مشترک هستند (جدول ۱ و شکل ۲). ترکیبات مشترک موجود در دو گونه عبارت بودند از هیدروفارنسیل استون (Hydrofarnesyl acetone)، کاروفیلین اکسید (caryophyllene oxide)، ۴-تریپینول (4-Terpineol)، پینوکارون (Pinocarvone)، کامفور (Camphor)، ۱-۸-سینئول (1,8-Cineol)، پی-سیمن (p-Cymene) و کامفن (Camphene). مقایسه مقادیر ترکیبات مشترک در دو گونه مورد بررسی نشان داد گونه *A. annua* نسبت به گونه *A. fragrans* از نظر تمامی ترکیبات به جز کامفور و ۴-تریپینول دارای بیشترین مقادیر بود (شکل ۲). کامفور به عنوان یکی از مهم‌ترین پایه‌های صنعتی مورد استفاده قرار می‌گیرد. در واقع ترکیب شیمیایی این متابولیت دارای خاصیت ضد عفونی بالایی بوده و علاوه بر این دارای اثرات مفید همچون تسکین دهنده، کاهنده تب و افزایش عرق و ترشحات غدد فوق کلیه است. همچنین ترکیب ۱-۸-سینئول اثر میکروب‌کشی داشته و در فرمول گرد دندان، شربت اسپکتورانت و نیز درمان برونشیت مزمن به عنوان بی‌حس کننده مورد استفاده قرار می‌گیرد (Pashazanosi 2023). در گونه *A. fragrans* در مجموع ۲۶ ترکیب شناسایی شد و بیشترین مقادیر شناسایی شده مربوط به کامفور (Camphor)، بورتول (Borneol)، بتاتریپینول (β -Terpineol)، ۱-تریپینول (1-Terpineol)، ۴-اسپاتونول

(Spathulenol)، ۱-۸-سینئول (1,8-Cineole)، کریسانتئون (Chrysanthenone)، ترنس پیپریتول (Trans-Poperitol)،
 آلفا ترپینئول (α -Terpineol)، بورنیل استات (Bornyl acetate) و پیپریتون (Piperitone) بود.



شکل ۲. ترکیبات فیتوشیمیایی مشترک شناسایی شده در دو گونه *A. annua* و *A. fragrans* با استفاده از

تکنیک HPLC

Figure 2. Identified phytochemical compounds in *A. fragrans* and *A. annua* using HPLC technique

از مجموع ۲۰ ترکیب شناسایی شده در گونه *A. annua* ۱۱ ترکیب دارای بیشترین مقادیر بودند و به ترتیب عبارت بودند از: کامفور، بتاسلینن (B-Slinene)، ترنس پینوکاوئول (trans-Pinocarveol)، ۱-۸-سینئول، آلفا پینن (a-Pinene)، کاریوفیلن اکسید (Caryophyllene oxide)، پینوکاروون (Pinocarvone)، کامفن (Comphene)، ۴-ترپینئول، میرنتال (Myrtenal) و ایزو-آرومادندرن اپوکساید (Iso-Aromadendrene epoxide). به طور کلی نتایج به دست آمده در این پژوهش با سایر نتایج گزارش شده مطابقت نشان داد. به عنوان مثال Arvin and Firozeh (2022) گزارش کردند کامفور، پینوکارئول، بورنتول و ۱-۸-سینئول از مهمترین و اصلی ترین ترکیبات اسانس آرتمیزیای می باشند. در مطالعه Verdian-rizi et al. (2008) مشخص شد ترکیبات کامفور، ۱-۸-سینئول و اسپاتولنول جزء اصلی ترین ترکیبات هستند. نتایج تجزیه qRT-PCR از نظر ژن های مورد مطالعه در دو گونه *A. annua* و *A. fragrans* در شکل ۳ نشان داده شده است. با توجه به نتایج تجزیه واریانس، اختلاف معنی داری بین دو گونه از نظر میزان بیان نسبی ژن های ارزیابی شده مشاهده شد. از نظر ژن *4FPSF*، بیشترین میزان بیان مربوط به گونه *A. annua* بود (۱/۰۴ برابر بیشتر) (شکل ۳A).

جدول ۱. ترکیبات فیتوشیمیایی شناسایی شده در دو گونه آرتیمیزیا با استفاده از تکنیک GC-MS

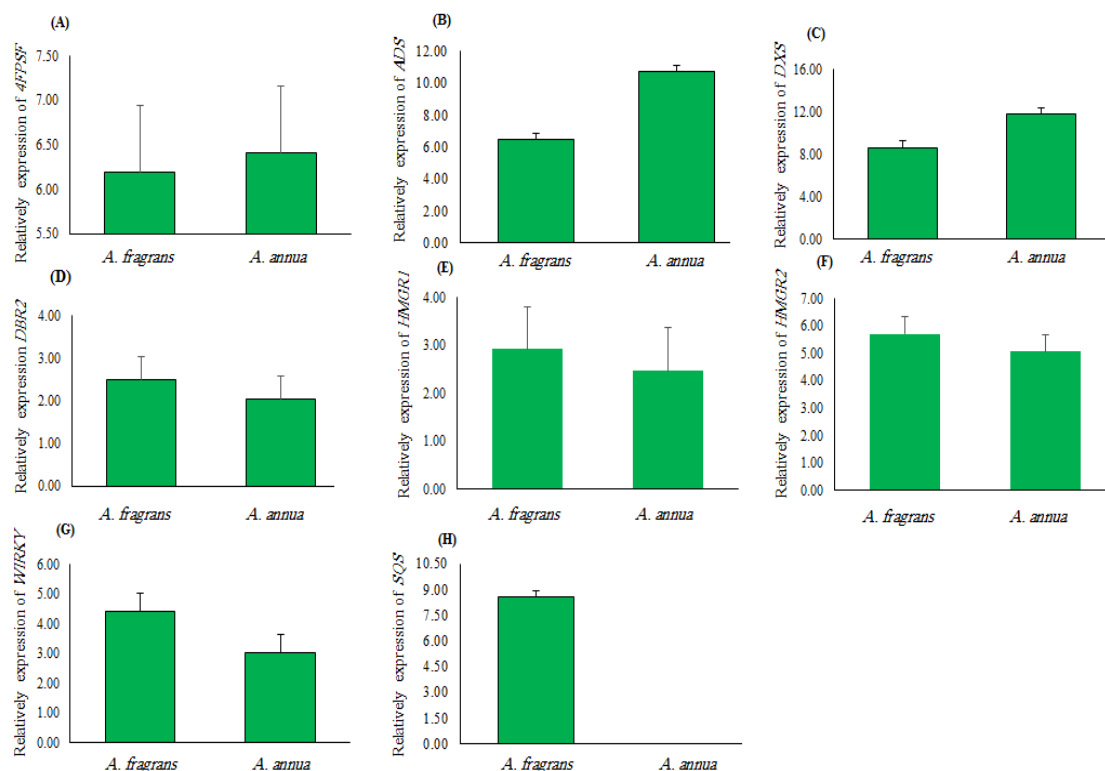
Table 1. Identified phytochemical compounds in two *Artemisia* species using GC-MS technique

No.	RT (min)	Compounds	Area (%)	
			<i>A. fragrans</i>	<i>A. annua</i>
1	4.14	α -thujene	-	-
2	4.31	α -Pinene	-	5.26
3	4.63	Camphene	0.67	2.28
4	4.69	Thuja-2,4(10)-diene	-	0.12
5	5.06	Sabinene	-	-
6	5.17	β -Pinene	-	0.44
7	5.3	β -Myrcene	-	-
8	5.41	dehydro-1,8-Cineole	0.71	-
9	5.98	α -Terpinene	0.33	-
10	6.2	p-Cymene	0.57	0.66
11	6.25	Limonene	-	-
12	6.38	1,8-Cineol	4.05	6.66
13	6.95	γ -Terpinene	0.56	-
14	7.34	Cis-Sabinene hydrate	0.54	-
15	8.05	Filifolone	0.4	-
16	8.16	Trans-Sabinene hydrate	0.8	-
17	8.22	cis-Thujone	-	-
18	8.26	α -thujone	-	-
19	8.51	trans-Thujone	-	-
20	8.63	Chrysanthenone	2.83	-
21	8.7	β -thujone	-	-
22	8.72	1-Terpeneol	4.59	-
23	8.78	α -Campholenal	-	0.24
24	9.12	Thujanol <neo-3->	-	-
25	9.35	trans-Pinocarveol	-	7.54
26	9.39	β -Terpineol	8.17	-
27	9.49	Camphor	38.86	29.04
28	9.79	Pinocarvone	1.1	4.81
29	10.03	Borneol	14.28	-
30	10.06	4-Terpeneol	1.73	1.54
31	10.64	Myrtenol	-	-
32	10.65	Myrtenal	-	1.21
33	10.67	α -Terpineol	2.91	-
34	11.03	Trans-Piperitol	3.12	-
35	12.08	Cis-Chrysanthenyl acetate	-	-
36	12.08	Carvotanacetone	-	-
37	12.24	Piperitone	1.07	-
38	12.83	Bornyl acetate	2.67	-
39	13.14	E-Anethole	-	-
40	15.39	β -Bourbonene	-	-

Table 1. Continued

No.	RT (min)	Compounds	Area (%)	
			<i>A. fragrans</i>	<i>A. annua</i>
41	16.02	Methyl eugenol	-	-
42	16.33	trans- Caryophyllene	-	-
43	17.06	(E)-β-Farnesene	-	-
44	17.86	Ar-Curcumene	-	-
45	17.88	Germacrene D	-	-
46	18.2	β-Selinene	-	27.87
47	18.34	Ledene	-	-
48	18.48	β-Bisabolene	-	-
49	18.75	δ-Cadinene	-	-
50	19.82	(E)-Nerolidol	-	-
51	20.08	Citronellyl butanoate	-	-
52	20.44	Caryophyllene oxide	0.61	4.99
53	20.46	Globulol	-	-
54	20.5	Spathulenol	4.74	-
55	20.66	Salvial-4(14)-en-1-one	0.49	-
56	20.95	Bornyl angelate	-	0.5
57	20.99	Ledol	-	-
58	21.11	Humulene epoxide II	-	-
59	21.48	Ledeneoxide II	-	-
60	21.65	Cadin-4-en-7-ol	-	0.74
61	21.77	Caryophylla-4(12),8(13)-dien-	-	0.73
62	21.82	α-epi-Cadinol	-	-
63	22.15	α-Cadinol	-	-
64	22.25	neo-Intermedeol	0.82	-
65	22.43	Eudesm-7(11)-en-4-ol	-	-
66	22.57	epoxide Aromadendrene	-	-
67	22.59	Iso-Aromadendrene epoxide	-	1.11
68	22.63	Isospathulenol	-	-
69	24.98	Diazinone	-	-
70	25.31	(2Z,6E)-Farnesyl acetate	-	-
71	25.95	Hexahydrofarnesyl acetone	0.4	0.65
72	27.35	Z-Spiroether	-	-
73	27.58	E-Spiroether	-	-
74	27.72	Methyl palmitate	-	-
75	28.63	Palmitic acid	-	0.58
76	30.94	Linoleic acid, methyl ester	-	-
77	31.07	Methyl linolenate	-	-
78	31.29	Phytol	-	-
79	32.05	oleic acid	0.87	-
80	32.07	9-Octadecenoic acid, (E)	-	-

علاوه بر این، میزان بیان نسبی ژن‌های *ADS* و *DXS* در گونه *A. annua* به ترتیب به میزان $1/66$ و $1/37$ برابر بیشتر از *A. fragrans* بود شکل‌های ۳B و ۳C). از نظر ژن‌های *DBR2*، *HMGR1*، *HMGR2* و *WIRKY* گونه *A. fragrans* دارای بیان نسبی بیشتری نسبت به گونه *A. annua* بود (به ترتیب $1/23$ ، $1/18$ ، $1/13$ و $1/48$ برابر بیشتر) (شکل‌های ۳D، ۳E، ۳F و ۳G). بیان ژن *SQS* در گونه *A. annua* صورت نگرفت ولی در گونه *A. fragrans* بعد از ژن *DXS* دارای بیشترین میزان بیان بود (شکل ۳H).



شکل ۳. بیان نسبی ژن‌های *4FPSF* (A)، *ADS* (B)، *DXS* (C)، *DBR2* (D)، *HMGR1* (E)، *HMGR2* (F)،

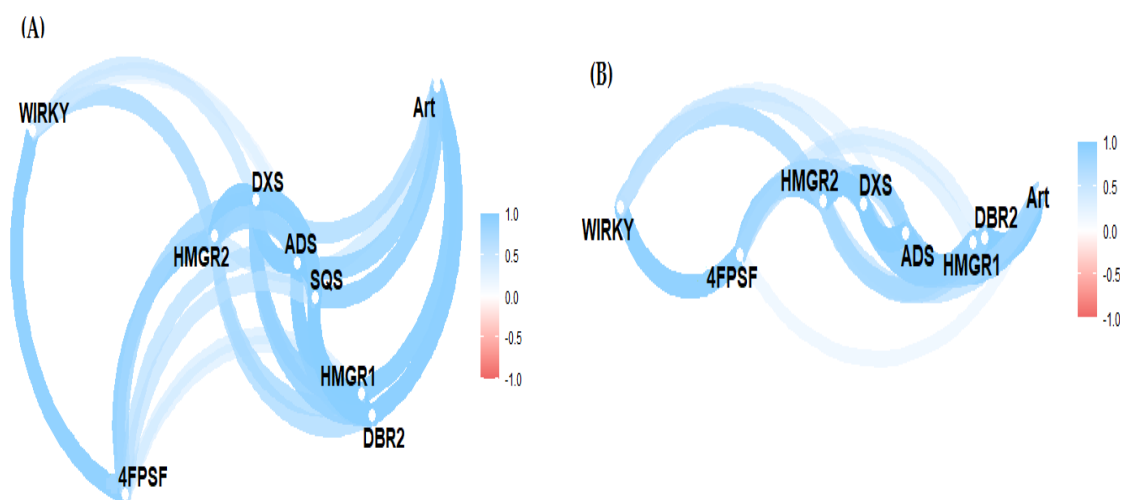
WIRKY (G) و *SQS* (H) در دو گونه *A. fragrans* و *A. annua*

Figure 3. Relative expression of (A) 4FPSF, (B) ADS, (C) DXS, (D) DBR2, (E) HMGR1, (F) HMGR2, (G) WIRKY, and (H) SQS genes in *A. fragrans* and *A. annua* species

ضرایب همبستگی بین میزان آرتمیزینین و بیان نسبی ژن‌های بررسی شده به صورت گرافیکی برای هر یک از گونه‌های *A. fragrans* و *A. annua* در شکل ۴ نشان داده شده است. در گونه *A. fragrans*، میزان آرتمیزینین با بیان ژن‌های *DBR2*، *HMGR1*، *SQS*، *ADS* و *DXS* رابطه مثبت و معنی‌داری داشت. بین بیان ژن‌های *WIRKY*، *4FPSF* و *HMGR2* نیز رابطه مثبت و معنی‌داری مشاهده شد. علاوه بر این، همبستگی بین بیان ژن‌های *DBR2*، *HMGR1*، *SQS*، *ADS* و *DXS*

مثبت و معنی‌دار بود (شکل ۴A). در گونه *A. annua*، میزان آرتمیزینین با بیان ژن‌های *DBR2*، *HMGR1* و *ADS* همبستگی مثبت و معنی‌دار داشت. همچنین مشابه گونه *A. fragrans*، رابطه بین بیان ژن‌های *WIRKY* و *4FPSF* مثبت و معنی‌دار بود. علاوه بر این، بین بیان ژن‌های *WIRKY* و *HMGR2* نیز رابطه مثبت و معنی‌داری مشاهده شد. بیان ژن *DBR2* تنها با بیان ژن‌های *ADS* و *HMGR1* مثبت و معنی‌دار بود (شکل ۴B). ژن‌های *DBR2* و *ADS* از مهم‌ترین ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز آرتمیزینین هستند و به ترتیب آنزیم‌های آرتمیزینیک ۱۱ (۱۳) ردوکتاز و آمورفا-۱۱و۴-دی ان سنتاز را کد می‌کنند (Olofsson et al. 2011). ژن *SQS* نیز از دیگر ژن‌های مهم در مسیر سنتز استرول‌ها بشمار می‌آید که آنزیم کلیدی این مسیر را کد می‌کند. بیان ژن *SQS* نقش مهمی در افزایش و کاهش سنتز و تجمع آرتمیزینین دارد. به عبارت دیگر در صورت کاهش بیان این ژن بیوسنتز آرتمیزینین افزایش خواهد یافت و علت این رخداد این است که آنزیم اسکوالن سنتاز و آمورفا-۱۱و۴-دی ان از یک پیش‌ساز مشترک بنام فارنسیل دی‌فیفات استفاده می‌کنند. در واقع، آنزیم اسکوالن سنتاز یک رقیب سرسخت برای استفاده از فارنسیل دی‌فسفات (FDF) در بافت‌های تولید کننده آرتمیزینین می‌باشد (Guo et al. 2010). لازم به ذکر است که برخی از ژن‌های دیگر در مسیر بیوسنتز آرتمیزینین نقش دارند که تماماً تشریح مساعی آن‌ها با یکدیگر و با ژن‌های *SQS*، *ADS* و *DBR2* می‌تواند با تغییر در تولید این متابولیت شود. به عنوان مثال ژن *HMGR* یک ژن کلیدی در مسیر *MVA* است و بیش بیان آن سبب کاهش تولید آرتمیزینین در گونه *A. annua* می‌شود. با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه مشخص شد بین میزان آرتمیزینین تولید شده در گونه *A. annua* و بیان ژن *HMGR2* رابطه مثبتی وجود ندارد که خود تأیید کننده گزارشات قبلی می‌باشد (Aquil et al. 2009; Alam et al. 2014). از طرف دیگر افزایش بیان ژن *HMGR* سبب افزایش تولید FDF شده که به نوبه خود باعث بالا رفتن تولید سایر سسکوی ترپن‌ها و استرول‌ها برای تولید ترپنوئیدهای دیگری به جز آرتمیزینین می‌شود (Ranjbar et al. 2015). ژن *ADS* اگرچه به طور اختصاصی بیوسنتز آرتمیزینین را کد می‌کند و تصور بر این است که افزایش بیان آن رابطه مستقیمی با افزایش بیوسنتز آرتمیزینین دارد، با این حال با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق علی‌رغم همبستگی مثبت این ژن با میزان آرتمیزینین در دو گونه و بیان بیشتر آن در گونه *A. annua*، سنتز آرتمیزینین در گونه *A. fragrans* بیشتر بود. همچنین در خصوص رابطه بین بیان ژن *SQS* با میزان آرتمیزینین نیز نتیجه‌ای متناقض با برخی از گزارشات موجود مشاهده شد، زیرا بیشترین مقدار بیان این ژن در گونه *A. fragrans* رخ داد و از طرف دیگر میزان بیوسنتز آرتمیزینین نیز در این گونه بیشتر از *A. annua* بود. در گونه *A. fragrans* رابطه بین بیان ژن *DBR2* و افزایش تولید آرتمیزینین قابل توجه بود و این گونه نسبت به *A. annua* دارای بیشترین میزان آرتمیزینین و بیان *DBR2* بود. به طور کلی به نظر می‌رسد در گونه‌هایی با تولید بالای آرتمیزینین رقابت بین ژن‌های کلیدی حائز اهمیت است ولی نمی‌توان اظهار داشت که گونه‌هایی با تولید بالاتر آرتمیزینین، بیان بالاتری از نظر ژن‌های کلیدی همچون *ADS* و *DBR2* و بیان پایین‌تر *SQS* داشته باشند (Mannan et al. 2010). گونه‌های آرتمیزیا دارای محتوای آرتمیزینین متفاوتی هستند. اگرچه الگوی متفاوت بیان ژن

می‌تواند دلیل تفاوت در مقدار آرتمیزینین باشد، ارتباط بین بیان ژن‌های مطالعه شده در این پژوهش و میزان سنتز آرتمیزینین در دو گونه *A. annua* و *A. fragrans* به مطالعات بیشتری نیاز دارد.



شکل ۴. همبستگی بین مقدار آرتمیزینین و بیان نسبی ژن‌های مرتبط با بیوسنتز آن در دو گونه *A. fragrans* (A) و *A. annua* (B)

Figure 4. Association between artemisinin content with the relative expression of its biosynthesis related genes in *A. fragrans* (A) and *A. annua* (B)

نتیجه‌گیری: الگوی بیان متفاوت در برخی از ژن‌های مرتبط با بیوسنتز آرتمیزینین در دو گونه *A. fragrans* و *A. annua* که بیانگر تفاوت سطوح بیوسنتز آرتمیزینین در این دو گونه بود. همچنین نتایج HPLC نشان داد میزان تولید آرتمیزینین در دو گونه مورد بررسی متفاوت و مقدار آن در *A. fragrans* بیشتر از *A. annua* بود. علاوه بر این با توجه به نتایج به دست آمده از GC-MS مشخص شد تعداد ترکیبات بیشتری در گونه *A. fragrans* نسبت به *A. annua* شناسایی شد. به طور کلی این نتایج بیانگر وجود پتانسیل قابل توجهی از گونه *A. fragrans* جهت استخراج آرتمیزینین و سایر متابولیت‌های ثانویه از این گونه می‌باشد.

سپاسگزاری: از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمانشاه به خاطر حمایت مالی / حمایت معنوی / همکاری در اجرای پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌شود.

منابع

- آروین پویا، فیروزه رعنا (۱۴۰۱) بررسی کیفیت، کمیت و فعالیت آنتی اکسیدانی مواد مؤثره اسانس دو گونه دارویی درمنه کپت داغی (*Artemisia kopetdaaghensis* Krasch.) و درمنه سیبریایی (*A. siberi* Besser.). فرایند و کارکرد گیاهی، ۵۰، ۱۹۹-۲۱۱.
- پاشازانو سی محمدباقر (۱۴۰۱) جداسازی و شناسایی ترکیبات شیمیایی روغن اسانسی دو گونه درمنه (آرتمیذا) در شمال ایران با استفاده از کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنج جرمی. شیمی کوانتومی و اسپکتروسکوپی، ۴۰، ۳۰-۱۷.
- جعفری احمدآبادی سید علی اصغر، عسکری‌همت حشمت‌اله، محمدآبادی محمدرضا (۱۴۰۲) تاثیر شاهدانه بر بیان ژن *DLKI* در بافت قلب بره‌های کرمانی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، ۱۱۵(۱)، ۲۱۷-۲۳۴.
- شکری سمیرا، خضری امین، محمدآبادی محمدرضا، خیرالدین حمید (۱۴۰۲) بررسی بیان ژن *MYH7* در بافت‌های ران، دست و راسته بره‌های پرواری نژاد کرمانی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، ۱۱۵(۲)، ۲۱۷-۲۳۶. شرفی ع، هاشمی‌سپه‌ی ه، کاظمی‌تبار ک (۱۳۸۵) مروری بر کشت بافت، باززایی و انتقال ژن به *Artemisia annua* L. فصلنامه گیاهان دارویی، ۲۰، ۱۰-۱.

References

- Alam P, Kamaluddin Khan MA, Mohammad A, et al. (2014) Enhanced artemisinin accumulation and metabolic profiling of transgenic *Artemisia annua* L. plants over-expressing by rate-limiting enzymes from isoprenoid pathway. *J Plant Interact* 9, 655–665.
- Aquil S, Husaini AM, Abdin MZ, Rather GM (2009) Overexpression of the HMG-CoA reductase gene leads to enhanced artemisinin biosynthesis in transgenic *Artemisia annua* plants. *Planta Med* 75, 1453–1458.
- Arsenault P, Vail DR, Wobbe KK, Weathers PJ (2010) Effect of sugars on artemisinin production in *Artemisia annua* L.: Transcription and metabolite measurements. *Molecules* 15, 2302–2318.
- Arvin P, Firouzeh R (2022) Study of quality, quantity and antioxidant activity of essential oils of two medicinal species of *Artemisia kopetdaghensis* Krasch. and *A. sieberi* Besser. *Plant Process Funct* 11, 199–212.
- Barazandeh A, Mohammadabadi MR, Ghaderi-Zefrehei M, Nezamabadipour H (2016a) Predicting CpG Islands and Their Relationship with Genomic Feature in Cattle by Hidden Markov Model Algorithm. *Iran J Appl Anim Sci* 6 (3), 571-579.
- Barazandeh A, Mohammadabadi MR, Ghaderi-Zefrehei M, Nezamabadipour H (2016b) Genome-wide analysis of CpG islands in some livestock genomes and their relationship with genomic features. *Czech J Anim Sci* 61, e487.

- Benyagoub E, Nabbou N, Dine A (2020) Antimicrobial effect of *Quercus robur* L. leaves selective extracts from the Mezi Mountain of Djeniène Bourezg (West of Algeria). *Curr Bioact Compd* 16, 1181–1190.
- Bordbar F, Mohammadabadi M, Jensen J, et al. (2022) Identification of candidate genes regulating carcass depth and hind leg circumference in simmental beef cattle using Illumina Bovine Beadchip and next-generation sequencing. *Animals* 12(9), e1103.
- Czechowski T, Larson TR, Catania TM, et al. (2018) Detailed phytochemical analysis of high- and low artemisinin-producing chemotypes of *Artemisia annua*. *Front Plant Sci* 9, e641.
- Efferth T, Zacchino S, Georgiev MI, et al. (2015) Nobel Prize for artemisinin brings phytotherapy into the spotlight. *Phytomedicine* 22, 1–3.
- Ghassemi G, Dehghan Nayeri F, Hosseini R (2021) The effects of chitosan nanoparticles on genes expression of artemisinin synthase in suspension culture of *Artemisia annua* L: A comparative study. *Int J Adv Biol Biomed Res* 2021, 214–227.
- Guo XX, Yang XQ, Yang RY, Zeng QP (2010) Salicylic acid and methyl jasmonate but not Rose Bengal enhance artemisinin production through invoking burst of endogenous singlet oxygen. *Plant Sci* 178, 390–397.
- Hamidi F, Karimzadeh G, Rashidi Monfared G, Salehi M (2018) Assessment of Iranian endemic *Artemisia khorassanica*: karyological, genome size, and gene expressions involved in artemisinin production, *Turk J Biol* 42, 322–333.
- Han J, Wang H, Lundgren A, Brodelius PE (2014) Effects of overexpression of *AaWRKY1* on artemisinin biosynthesis in transgenic *Artemisia annua* plants. *Phytochem* 102, 89–96.
- Jafari Ahmadabadi SAA, Askari-Hemmat H, Mohammadabadi M, et al. (2023) The effect of Cannabis seed on DLK1 gene expression in heart tissue of Kermani lambs. *Agric Biotechnol J* 15 (1), 217-234 (In Persian).
- Kim SH, Chang YJ, Kim SU (2008) Tissue specificity and developmental pattern of amorpha-4, 11-diene synthase (ADS) proved by promoter-driven GUS expression in the heterologous plant *Arabidopsis thaliana*. *Planta Med* 74, 188–193.
- Liu H, Qiu N, Ding H, Yao R (2008) Polyphenols contents and antioxidant capacity of 68 Chinese herbals suitable for medical or food uses, *Food Res Int* 41, 363–370.
- Liu Y, Ye HC, Wang H, Li GF (2003) Molecular cloning *Escherichia coli* expression and genomic organization of squalene synthase gene from *Artemisia annua*. *Acta Bot Sin* 45, 608–613.
- Mannan A, Ahmed I, Arshad W, Asim MF, Qureshi RA, Hussain I, Mirz B (2010) Survey of artemisinin production by diverse *Artemisia* species in northern Pakistan. *Malaria J* 9, 310.

- Masoudzadeh SH, Mohammadabadi MR, Khezri A, et al. (2020) *Dlk1* gene expression in different Tissues of lamb. Iran J Appl Anim Sci 10, 669-677.
- Matsushita Y, Kang W, Charlwood BV (1996) Cloning and analysis of a cDNA encoding farnesyl diphosphate synthase from *Artemisia annua*. Gene 172, 207–209.
- Mohadjerani M, Rasolizadeh A (2020) Evaluation of kinetic parameters of acetylcholinesterase from the bovine brain and its inhibition with *Mentha pulegium* L., extract. J Ilam Univ 27, 74–87.
- Mohamadipoor L, Mohammadabadi M, Amiri Z, et al. (2021) Signature selection analysis reveals candidate genes associated with production traits in Iranian sheep breeds. BMC Vet Res 17 (1), 1-9.
- Mohammadabadi M, Masoudzadeh SH, Khezri A, et al. (2021) Fennel (*Foeniculum vulgare*) seed powder increases Delta-Like Non-Canonical Notch Ligand 1 gene expression in testis, liver, and humeral muscle tissues of growing lambs. Heliyon 7 (12), e08542 .
- Mohammadinejad F, Mohammadabadi M, Roudbari Z, Sadkowski T (2022) Identification of Key Genes and Biological Pathways Associated with Skeletal Muscle Maturation and Hypertrophy in *Bos taurus*, *Ovis aries*, and *Sus scrofa*. Animals 12 (24), 3471.
- Mozafarian V (1989) Investigation and identification of *Artemisia* spp. in Iran. MSc thesis, Faculty of Natural Resources, Tehran University.
- Nguyen KT, Arsenault RR, Weathers PJ (2011) Trichomes + roots + ROS = artemisinin: regulating artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L., In Vitro Cell. Dev. Biol-Plant. 47, 329–338.
- Numonov S, Sharopov F, Salimov A, Sukhrobov P, et al. (2019) Assessment of artemisinin contents in selected *Artemisia* species from Tajikistan (central Asia), Medicines 6, e23.
- 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 Biol 11, 45–57.
- Pashazanosi M (2023) Solvent-free microwave extraction of essential oil of two artemisia species (*A. spicigera* and *A. chamaemelifolia*) from north of Iran. J Quant Chem Spect 40, 30–37.
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucl Acids Res 29, e45.
- Ranjbar M, Naghavi MR, Alizadeh H, Soltanloo H (2015) Expression of artemisinin biosynthesis genes in eight *Artemisia* species at three developmental stages. Ind Crop Prod 76, 836–843.
- Safaei SMH, Dadpasand M, Mohammadabadi M, et al. (2022) An *Origanum majorana* Leaf Diet Influences Myogenin Gene Expression, Performance, and Carcass Characteristics in Lambs. Animals 13 (1), e14.

- Salehi M, Karimzadeh G, Naghavi MR, et al. (2018b) Expression of artemisinin biosynthesis and trichome formation genes in five *Artemisia* species. *Ind Crop Prod* 112, 130–140.
- Salehi M, Karimzadeh G, Naghavi MR, et al. (2018a) Expression of key genes affecting artemisinin content in five *Artemisia* species, *Sci Rep* 8, 12659.
- Salih AM, Qahtan AA, Al-Qurainy F (2023) Phytochemicals identification and bioactive compounds estimation of *Artemisia* species grown in Saudia Arabia, *Metabolites* 13, e443.
- Shahsavari M, Mohammadabadi M, Khezri A, et al. (2022) Effect of Fennel (*Foeniculum Vulgare*) Seed Powder Consumption on Insulin-like Growth Factor 1 Gene Expression in the Liver Tissue of Growing Lambs. *Gene Express* 21 (2), 21-26.
- Sharafi A, Hashemi Sohi H, Kazemi Tabar K (2006) Overview on Tissue Culture, Regeneration and Gene Transformation to *Artemisia annua* L. *J Med Plants* 5, 1-10.
- Shokri S, Khezri A, Mohammadabadi M, Kheyroodin H (2023). The expression of MYH7 gene in femur, humeral muscle and back muscle tissues of fattening lambs of the Kermani breed. *Agric Biotechnol J* 15 (2), 217-236 (In Persian).
- Verdian-rizi MR, Sadat-Ibrahimi E, Hajiakhoondi A (2008) Chemical composition and antimicrobial activity of *Artemisia annua* L. essential oil from Iran. *J Med Plant* 7, 59-62.
- Wang H, Liu Y, Chong K, et al. (2007) Earlier flowering induced by over-expression of CO gene does not accompany increase of artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua*. *Plant Biol* 9, 442–446.
- Wang H, Ma C, Li Z, et al. (2009) Effects of exogenous methyl jasmonate on artemisinin biosynthesis and secondary metabolites in *Artemisia annua* L. *Ind Crops Prod* 31, 214–218.
- Watson LE (2002) Molecular phylogeny of subtribe *Artemisiinae* (Asteracea), including *Artemisia* and its allied and segregate genera. *BMC Evol Biol* 2, e17.
- Weathers PJ, Elkholy S, Wobbe KK (2006) Artemisinin: the biosynthetic pathway and its regulation in *Artemisia annua*, a terpenoid-rich species, *In Vitro Cell. Dev-Pl.* 42, 309–317.
- Zia M, Mannan A, Chaudhary MF (2007) Effect of growth regulators and amino acids on artemisinin production in the callus of *Artemisia absinthium*. *Pak J Bot* 39, 799–805.
- Akyol I, Comlekcioglu U, Kar B, et al. (2009) Cloning of a xylanase gene xyn2A from rumen fungus *Neocallimastix* sp. GMLF2 in *Escherichia coli* and its partial characterization. *Biologia* 64, 664–670.