

تنظیم بیان ژن کلیدی ADS در مسیر بیوستنز آرتیمیزینین
در ژنوتیپ‌های گونه *Artemisia annua* ایران

سجاد رشیدی منفرد^۱، محمدرضا نقوی^{۲*}، بهمن یزدی صمدی^۳، هوشنگ علیزاده^۴ و حسن سلطانلو^۵
^۱، ^۲، ^۳، ^۴، دانشجوی دکتری، استادان و استادیار پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
^۵، استادیار دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
 (تاریخ دریافت: ۸۹/۵/۳۰ - تاریخ تصویب: ۹۰/۱/۳۱)

چکیده

بیماری مالاریا به وسیله تک یاخته *Plasmodium falsiparum* ایجاد می‌شود. عامل بیماری به سلول‌های قرمز خون حمله کرده و آنها را تخریب می‌کند. امروزه مالاریا در بیش از یکصد کشور دنیا گزارش شده است. آرتیمیزینین سسکوئی تریپنی است که از طریق دو مسیر ایزوپرنوید و موالونات در گیاه *A. annua* ساخته می‌شود. آرتیمیزینین اکنون به عنوان یک داروی بسیار مؤثر و جدید کاربرد فراوانی پیدا کرده است. در این تحقیق شش ژنوتیپ *A. annua* از نواحی مختلف استان گلستان جمع آوری شد. راه‌انداز ژن (راه‌انداز) کلیدی آمورفا داین سنتاز (ADS) مسیر بیوستنز آرتیمیزینین با استفاده از پایگاه‌های اطلاعاتی عناصر تنظیمی PLANTcare، PLACE و TRANSFAC مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نتایج تجزیه راه‌انداز با استفاده از پایگاه‌های اطلاعاتی عناصر تنظیمی نشان داد که در راه‌انداز این ژن عناصر تنظیمی فراوانی برای پاسخ به تنش‌های غیرزیستی و هورمون‌های گیاهی وجود دارد. همچنین با استفاده از کتابخانه EST این گیاه دو عامل رونویسی محتمل شناسایی شد. سپس با کمک روش PCR زمان واقعی بیان ژن کلیدی (ADS) این مسیر و سه عامل رونویسی در ژنوتیپ‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که عامل رونویسی WRKY نقش مهمتری نسبت به دو عامل رونویسی دیگر در تنظیم بیان ژن ADS بازی می‌کند.

واژه‌های کلیدی: آرتیمیزینین، بیماری مالاریا، عوامل رونویسی، PCR زمان واقعی، *In silico*

مقدمه

مالاریا به عنوان یک مسئله مهم بهداشتی منطقه قلمداد می‌گردد. به رغم پنج دهه تلاش برای کنترل مالاریا در کشور، متأسفانه هنوز حدود ۱۰ تا ۱۵ هزار مورد بیماری در سال عمدتاً از استان‌های سیستان و بلوچستان، هرمزگان و بخش کمتر توسعه یافته (شهرستان‌های جنوب) کرمان گزارش می‌شود (Edrissian, 2006). برای مبارزه با این بیماری علاوه بر روش‌های پیشگیری، از داروهای مختلفی مانند Mefloquine، Atovaquone

بیماری مالاریا به وسیله تک یاخته *Plasmodium falsiparum* ایجاد می‌شود. عامل بیماری به سلول‌های قرمز خون حمله کرده و آنها را آلوده می‌کند. امروزه مالاریا در بیش از یکصد کشور دنیا گزارش شده است. در کشور ایران جمعیتی مشتمل بر ۲/۹ میلیون نفر (۴٪ کل جمعیت کشور) در جنوب شرقی ایران زندگی می‌کنند که شدیداً به مالاریا مبتلا بوده و هنوز هم

(FDP) ختم می‌شود، وجود دارد. این مسیر در همه یوکاریوت‌ها مشترک است. مطالعات نشان داده است که ترکیب آمورفا داین (AD) پیش ماده اولیه سنتز این مسیر است که به وسیله آنزیم آمورفا داین سنتز (ADS) ساخته می‌شود (Bouwmeester et al., 199). این ماده در این گیاه تجمع پیدا می‌کند و محل بیوسنتز آن کرکهای روی برگ‌ها (Trichomes) است و میزان تجمع آن با توجه به پتانسیل ژنتیکی گیاه و شرایط محیطی رشد گیاه متفاوت خواهد بود (Olsson et al., 2009). بررسی بیان ژن‌ها و عوامل رونویسی مرتبط در یک مسیر متابولیتی مشخص در شناسایی و چگونگی تنظیم بیان ژن‌های آن مسیر متابولیتی کمک شایانی می‌کند. در واقع فهم چگونگی عملکرد ژن‌ها به محقق برای دستکاری هرچه بهتر و هدفمندتر بیان ژن‌ها و در نهایت افزایش تولید فرآورده مورد نظر اطمینان بالاتری می‌دهد. برای بررسی چگونگی تنظیم بیان ژن‌ها امروزه از روش‌های *In Silico* استفاده فراوانی می‌شود (Souza et al., 2009; Wei-Min et al., 2005; Pujade-Renaud et al., 2005). در واقع عناصر تنظیمی مهمترین کلیدهای مولکولی دخیل در تنظیم رونویسی ژن‌ها هستند و نقش مهمی در فرایندهای مختلف درون سلولی مانند پاسخ به هورمون‌ها، تنش‌های زنده و غیرزنده و فرایندهای نموی دارند. از طرف دیگر بررسی بیان ژن‌ها در کنار تجزیه راه‌اندازها به محققین برای فهم بهتر تنظیم بیان ژن‌های مربوطه کمک فراوانی می‌کند. یکی از روش‌های بسیار دقیق برای بررسی بیان ژن‌ها PCR زمان واقعی است. PCR زمان واقعی در واقع همان PCR استاندارد است، ولی با این تفاوت که PCR زمان واقعی این امکان را فراهم آورده است که با دقت و سرعت بالایی در حین واکنش مقدار DNA ساخته شده را اندازه‌گیری کرد. یکی از روش‌های بسیار متداول برای مشخص کردن میزان محصولات تکثیری استفاده از رنگ‌های متصل شونده به DNA است که دارای قیمت مناسبی هستند و به راحتی قابل استفاده‌اند. پرکاربردترین رنگ درج شونده، SYBER Green I است. در این تحقیق با استفاده از عوامل رونویسی، انجام PCR زمان واقعی و بررسی‌های *In silico* تنظیم بیان ژن کلیدی آمورفا داین سنتز (ADS) بررسی گردید.

proguanil و Chloroquin استفاده می‌شود که داروهای بسیار گرانبه‌ای هستند. به علاوه گزارش‌های متعددی وجود دارد که تک یاخته عامل بیماری مقاومت‌هایی به این داروها نشان داده است به همین دلیل استفاده از داروهای جایگزین و ترکیبی لازم به نظر می‌رسد (Ridley, 2002; White, 2004; Kuhn et al., 2005). آرتیمیزینین اکنون به عنوان یک داروی بسیار مؤثر و جدید کاربرد فراوانی پیدا کرده است این دارو در گیاه *Artemisia annua* تولید می‌شود. گیاه *A. annua* گیاهی یک ساله بومی آسیا و به احتمال بسیار زیاد چین است. این گیاه از خانواده Asteraceae (compositae) است که دارای ۲۰۰ تا ۵۰۰ گونه یا زیر گونه و ۵ زیر جنس است (Ferreira et al., 1997). در ایران ۳۴ گونه از این گیاه وجود دارد که از لحاظ پراکنش، تراکم و پوشش از مهمترین جنس‌های گیاهی ایران پس از گون (Astragalus) می‌باشند به طوری که جامعه استپی درمنه-گون ۶۰٪ پوشش را به خود اختصاص داده است. بیش از ۱۶۰ ترکیب فلاونوئیدی از این جنس استخراج شده است (Podlech, 1997). بیشتر فعالیت‌ها روی ترکیبات ترپنی متمرکز بوده است چرا که دارای اثر فعال ضدانگلی هستند و توجه کمی به ترکیبات فنولیک شده است ولی اخیراً ترکیبات فنولی به دلیل اثرات ضد سرطانی و آنتیاکسیدانی توجه زیادی را معطوف خود نموده است (Olliaro et al., 2004). آرتیمیزینین اکنون به عنوان یک داروی ضد مالاریای خوب شناخته شده است. میزان تولید آرتیمیزینین در گونه‌های مختلف متفاوت است. و این مقدار بین ۰/۱ تا ۱/۵٪ است. مقدار این ماده به طور طبیعی در گیاه پایین است و به همین دلیل هزینه تمام شده برای فرآورده نهایی بالا خواهد بود. البته مطالعات زیادی برای سنتز شیمیایی این ماده صورت گرفته اما مشخص شد که تولید این ماده به این صورت مقرون به صرفه‌تر از استخراج آن از گیاه نیست (Wallaart et al., 2001).

آرتیمیزینین سسکوئنی ترپنی (sesquiterpene) است که از طریق دو مسیر ایزوپرنوئید (isoprenoid) و موالونات (mevalonate) در گیاه *A. annua* ساخته می‌شود. در این مسیر مواد حد واسط فراوانی که از استیل کوآنزیم A شروع شده و به فارنسیل دی‌فسفات

AY528931) از پایگاه اطلاعاتی NCBI به دست آمد (www.ncbi.nlm.nih.gov). لازم به ذکر است که این قطعه که به عنوان راه‌انداز شناسایی شده دارای 5'UTR نیز می‌باشد. سپس توالی مربوطه با استفاده از بانک‌های اطلاعاتی عناصر تنظیمی (Wingender TRANSFAC (Lescot et al., 2002) PLANTcare, et al., 1996) و PLACE (Higo et al., 1999) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. سپس با کمک اطلاعات حاصل از تجزیه راه‌انداز و اطلاعات مربوط به خانواده MYBها گیاه آرآبیدوپسیس با استفاده از برنامه NCBI BLASTN در کتابخانه توالی‌های EST گیاه *A. annua* دو عامل نسخه‌برداری محتمل شبیه خانواده توالی‌های MYB شناسایی شد. در نهایت توالی‌های EST دیگری که شباهت فراوانی به این عوامل نسخه‌برداری داشتند با استفاده از برنامه CAP3 (Huang et al., 1999) مجتمع شدند. هم‌ردیفی توالی‌ها با استفاده از برنامه Clustal W صورت گرفت همچنین با استفاده از برنامه MEGA4 (Tamura et al., 2007) درخت فیلوژنی توالی‌های مشابه ترسیم شد.

بررسی بیان ژن کلیدی و عوامل نسخه‌برداری در مسیر تولید آرتمیزینین

RNA با استفاده از کیت (RNasy Plant Mini Kit) استخراج شد و cDNA با استفاده از پروتکل زیر: ۱۱ میکرولیتر RNA، ۱/۵ میکرولیتر آغازگر OligodT، ۴ میکرولیتر 5x buffer، ۱ میکرولیتر آنزیم نسخه‌برداری معکوس سپس قرار دادن تیوپ‌ها در دمای ۷۰ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه و در نهایت قرار دادن تیوپ‌ها در دمای ۴۰ درجه سلسیوس در دستگاه MasterMix به مدت یک ساعت، سنتز شد. بررسی میزان بیان ژن کلیدی ADS و سه عامل نسخه‌برداری در ژنوتیپ‌های مختلف *A. annua* بومی ایران با استفاده از روش PCR زمان واقعی بر اساس پروتکل زیر صورت گرفت: 2X, SYBR Bio Pars (GUASNR) ۱۰، ۱۰ میکرولیتر، آغازگرها هر کدام ۱ میکرولیتر (غلظت ۱۰ پیکومول)، cDNA ۵ میکرولیتر و آب ۵ میکرولیتر در دستگاه BioRad 3600 با استفاده از برنامه، سیکل اول: ۹۴ درجه سلسیوس ۴ دقیقه، سیکل دوم: ۹۴

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها

در این تحقیق شش ژنوتیپ مختلف *Artemisia annua* از نواحی مختلف استان گلستان جمع‌آوری شد. مشخصات نمونه‌ها در جدول ۱ آمده است. سپس بذور حاصله از هر گیاه در گلدان کشت و در اتاقک‌های رشد گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه تهران قرار داده شدند و در دمای ۲۳ درجه سلسیوس، رطوبت ۵۵ درصد، شدت نوری ۵۰۰ لوکس و ۸ ساعت تاریکی رشد داده شد. هنگامی که بذور کشت شده به مرحله گیاهچه رسیدند (۹۰ روزه) از برگ‌های هر کدام به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم برگ تازه در دو تکرار زیستی با ازت مایع پودر شد.

جدول ۱- مشخصات محل جمع‌آوری ۶ ژنوتیپ

A. annua از نواحی مختلف استان گلستان

شماره	محل جمع‌آوری	ارتفاع از سطح دریا (متر)	طول جغرافیا	عرض جغرافیا
۱	هرانده	۱۵۴۳	۲۲/۶° ۳۷'	۴۹/۳° ۳۲'
۲	ازاد شهر	۴۷۸	۲۰° ۲۷'	۵۹/۷° ۱۶'
۳	گنبد	۶۸	۱۷° ۵۰/۴'	۳۷° ۱۸'
۴	مراوه تپه	۲۲۳	۳۷° ۳۴/۹'	۴۲° ۵۵/۴'
۵	چناری	۶۵۰	۲۲/۷° ۳۷'	۵۳° ۵۶/۹'
۶	آشخانه	۷۶۷	۳۲° ۳۲/۴'	۵۴° ۳۱/۵'

شناسایی عوامل نسخه‌برداری دخیل در بیوسنتز آرتمیزینین

عوامل نسخه‌برداری فراوانی که در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه نقش دارند، شناسایی شده‌اند. یک عامل نسخه‌برداری می‌تواند به طور همزمان چندین ژن مرتبط در یک مسیر متابولیتی را تنظیم کند. در این تحقیق از عامل رونویسی AaWRKY1 که قبلاً از گیاه *A. annua* جداسازی شده (Dongming et al., 2009)، و تأثیر آن روی بیوسنتز آرتمیزینین مشخص شده بود استفاده شد. دو عامل نسخه‌برداری دیگری که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفتند عوامل نسخه‌برداری Myb-like1 و Myb-like2 بودند. برای شناسایی عامل نسخه‌برداری Myb-like1 و Myb-like2 ابتدا راه‌انداز ژن ADS که یکی از ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتز آرتمیزینین است (با شماره دسترسی

(Pfaffl, et al., 2002) بر اساس مدل ریاضی زیر تجزیه و تحلیل شدند:

$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta C_{\text{Ptarget}}(\text{control-sample})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta C_{\text{Pref}}(\text{control-sample})}}$$

R: بیانگر اختلاف بیان ژن‌ها در دو نمونه مورد مقایسه است، که فاقد واحد و صرفاً میزان چند برابری بیان ژن‌ها را می‌رساند.

E: بیانگر کارایی تکثیر است. زمانی که کارایی تکثیر ۱۰۰ درصد باشد، به این معنی است که تعداد کپی‌ها در هر چرخه دو برابر می‌شود.

سلسیوس ۳۰ ثانیه، ۵۸ درجه سلسیوس ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سلسیوس ۳۰ ثانیه به تعداد ۳۵ چرخه در سه تکرار آزمایشی انجام شد. آغازگرهای اختصاصی برای هر کدام از این ژن‌ها با استفاده از برنامه‌های PerlPrimer (Marshall, 2004) و Oligo (Rychlik, 2007) طراحی شدند. برای انجام PCR زمان واقعی از دستگاه iCycler شرکت BioRad و از رنگ I SYBER Quantitect Green به عنوان رنگ فلورسانس برای ارزیابی کمی و از ژن 18SrRNA به عنوان ژن خانه‌دار^۱ استفاده شد. سپس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار REST 2002

1. Houskeeping gene

جدول ۲- آغازگرهای طراحی شده برای ژن‌های کلیدی و عوامل نسخه‌برداری مسیر بیوسنتز آرتمیزینین

نام ژن	نام آغازگر	توالی آغازگر	طول تکثیر
ADS	ADF	5'-GTCGAATGGGCTGTCTCTGC-3'	110 bp
	ADR	5'-TTCTTTCTTGCTCGGCCTTG-3'	
WRKY	WKF	5'- ATATCACATACAAAGGAAACAC-3'	117 bp
	WKR	5'- GGATTCGGTCTTGGTAGTTC-3'	
MYB(putative)	MYF	5'-TATAAGCTATCAACCGATCATCT-3'	114 bp
	MYR	5'-ATTGGGAAGTTTAAAGAAGAAAGT-3'	
MYB(putative)	GLMF	5'-CACCCTACCCTACCACAA-3'	117bp
	GLMR	5'-ATTACCACCAACCCGCTAT-3'	
18S rRNA	18SF	5'-GCAACAAACCCCGACTTCTG-3'	110 bp
	18SR	5'TGCGATCCGTCGAGTTATCA-3'	

(Souza et al., 2009; Wei-Min et al., 2005). به منظور درک و بکارگیری فرایندهای تولید متابولیت‌های ویژه، بایستی ابتدا درک عمیق از سازوکارهای تنظیمی وجود داشته باشد. هر دو ناحیه بالادست 5' و 5'UTR برای فهم سازوکارهای تنظیمی ژن‌های مخصوص بافتی و اندامی مهم هستند. بنابراین، شناسایی عناصر تنظیمی پاسخ‌دهنده در توالی راه‌اندازها برای نیل به این هدف بسیار مهم است. از تجزیه و تحلیل‌های *In Silico* به طور موفقیت‌آمیزی در شناسایی عناصر تنظیمی محتمل در راه‌اندازهای گیاهی استفاده شده است. به عنوان مثال راه‌انداز ژن ADS با استفاده از پایگاه اطلاعاتی PLACE تجزیه و تحلیل (Soon-Hee et al., 2008) و تعدادی عناصر پاسخ‌دهنده (cis-elements) مربوط به تنش‌های خشکی، سرما، دفاع سلولی و عناصر رونویسی عمومی را در این راه‌انداز پیدا کردند.

Lia et al. (2007) راه‌انداز ژن CMO گیاه *Suaeda*

نتایج

تجزیه راه‌انداز (پروموتور)

به دلیل اینکه توالی‌های یک راه‌انداز که به آنها عوامل رونویسی متصل می‌شوند دارای طول کوتاه هستند، ممکن است تعداد بسیار زیادی از آنها در یک توالی وجود داشته باشند. اما بایستی توجه کرد که فقط تعداد کمی از آنها پتانسیل اتصال به عوامل رونویسی را دارند. از جمله دقیق‌ترین روش‌ها برای شناسایی جایگاه‌های اتصال شونده به عوامل رونویسی در یک راه‌انداز شامل انگشت‌نگاری و سنجش‌های که بصورت متحرک روی راه‌انداز صورت می‌گیرد است. البته چون این روش‌ها در شرایط درون شیشه انجام می‌شوند دقت بالایی ندارند و بایستی آنها را در شرایط طبیعی دنبال کرد. با توجه به اینکه انجام این کار بسیار هزینه‌بر و زمان‌بر است امروزه روش‌های *In silico* توجه زیادی را بسوی خود جلب کرده است (Danko et al., 2007;

HMGR و ADS به مقدار زیادی افزایش یافت و میزان تولید آرتمیزینین ۱۲۷ درصد بیشتر از گیاه شاهد بود. در حالی که بیان ژنهای دیگر مانند FDS و CYP افزایش چندانی نداشت. در واقع تحت شرایط تنش، عوامل رونویسی بیان و یا میزان بیانشان افزایش می‌یابد و با افزایش بیان آنها به دلیل اینکه دارای جایگاه‌های روی بالادست ژن‌های دخیل در فرایند بیوسنتز آرتمیزینین هستند، میزان بیان فرآورده نهایی که همان آرتمیزینین است تحت تأثیر قرار می‌گیرد. تجزیه راه‌انداز نشان داد در بالا دست توالی راه‌انداز ژن ADS مربوط به گیاه *A. annua* تعداد زیادی عناصر پاسخ‌دهنده به عوامل غیرزنده شامل انواع مختلف WRKY، DREB و Bzip ... و توالی‌های حفاظت نشده مانند جعبه TATA، CAAT وجود دارد. به طور کلی ژن‌هایی که به وسیله عوامل مختلف محیطی بیان آنها دچار نوسانات زیادی می‌شود دارای راه‌اندازهای پیچیده‌ای هستند. زیرا آنها بایستی با عوامل مختلفی اثر متقابل داشته باشند (Wray et al., 2003).

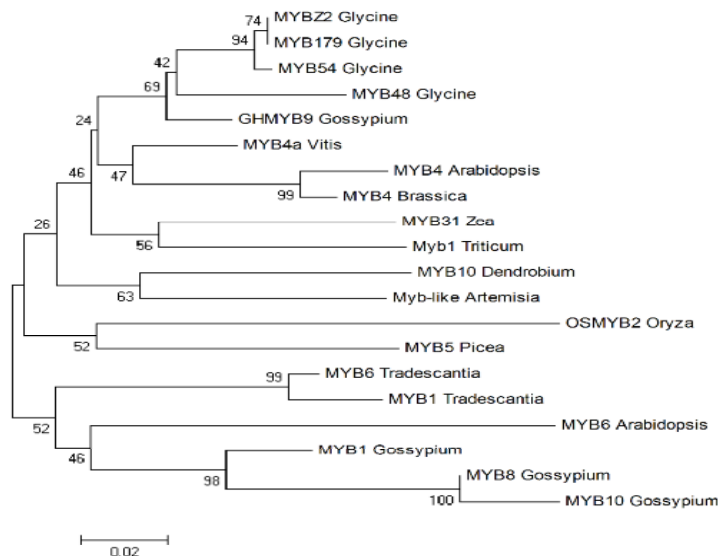
شناسایی عوامل نسخه‌برداری احتمالی R2R3 MYB با استفاده از تجزیه کتابخانه EST گیاه *Artemisia annua*
R2R3 MYB ها یکی از بزرگترین خانواده‌های پروتیین‌های تنظیمی هستند. در ژنوم آرابی‌دوپسیس نزدیک به ۱۲۵ ژن R2R3 MYB گزارش شده است. این خانواده نقش مهمی در فرایندهای نمو و تولیدات متابولیکی گیاهی دارند. MYB‌های زیادی وجود دارند که در مسیرهای متابولیکی دخیل هستند (Yanhui et al., 2006). با توجه مطالعات زیادی که در زمینه تنظیم متابولیت‌های ثانویه با استفاده از عوامل رونویسی R2R3 MYB صورت گرفته است جهت شناسایی توالی‌های ژنی مربوط به خانواده R2R3 MYB بر اساس توالی‌های این خانواده از عوامل رونویسی در گیاه آرابی‌دوپسیس با استفاده از برنامه BLASTN انجام پذیرفت. در نهایت توالی‌های EST که دارای شباهت فراوان ($E > 10^{-3}$) با توالی عوامل رونویسی متعلق به خانواده R2R3 MYB بود یافت شد که شامل EZ206539.1 (با طول ۴۴۱ جفت باز)، EZ404952 (با طول ۶۵۳ جفت باز)، EZ248881.1 (با طول ۳۸۹ جفت باز)، EZ348290.1 (با طول ۳۷۲ جفت باز)، EZ176166.1 (با طول ۱۶۲۱

liaotungensis را با استفاده از روش TAIL PCR جداسازی کردند و سپس با استفاده از پایگاه اطلاعاتی PLANTcare تجزیه و تحلیل نمودند. نتایج حاصله نشان داد که تعداد زیادی عناصر پاسخ‌دهنده که مربوط به تنش‌های خشکی، سرما و دفاعی و عناصر عمومی رونویسی بودند در این راه‌انداز پیدا می‌شود. Tittarelli et al. (2007) راه‌انداز ژن TaPT2 انتقال‌دهنده فسفات گندم را جداسازی و عناصر پاسخ‌دهنده احتمالی آنرا با استفاده از پایگاه اطلاعاتی PLACE مورد تجزیه قرار دادند و عناصر پاسخ‌دهنده مختلفی را در آن شناسایی کردند. همچنین، Souza et al. (2009) راه‌انداز ژن pt214 پروتیین غنی از گلوتامیک اسید را از گیاه کاساوا جداسازی کردند سپس با استفاده از پایگاه‌های اطلاعاتی PLANTcare و PLACE مورد تجزیه و تحلیل قرار دادند و عناصر پاسخ‌دهنده مختلفی را در آن شناسایی کردند. مطالعات صورت گرفته روی آرتمیزینا نشان داد که میزان بیان آرتمیزینین تحت تأثیر تنش‌های غیرزنده افزایش می‌یابد. به عنوان مثال Lulu et al. (2008) بیان سه ژن کلیدی مسیر بیوسنتز آرتمیزینین را تحت شرایط تنش‌های غیرزنده، نور، گرما و سرما در گیاه *A. annua* با استفاده از دو روش PCR زمان واقعی کمی و فلورسانس مورد بررسی قرار دادند و گزارش کردند که بیان آنها تحت این شرایط افزایش پیدا می‌کند. همچنین مطالعات مختلف نشان داد که میزان بیوسنتز آرتمیزینین تحت تأثیر هورمون‌های گیاهی از جمله سیتوکینین‌ها، سالیسیلیک اسید و اسید جیبرلیک قرار می‌گیرد. در واقع تولید متابولیت‌های ثانویه تحت تأثیر میزان ROS است که از محصولات جانبی تنش‌های زنده و غیرزنده در سلول‌ها محسوب می‌شود. Weathers et al. (1997) گزارش کردند که ترکیب BA و کینتین باعث افزایش میزان آرتمیزینین می‌شود. همچنین محققین زیادی تأثیر GA_3 روی افزایش بیوسنتز آرتمیزینین در قسمت‌های هوایی این گیاه گزارش کرده‌اند. در مطالعه ای که اخیراً (Gao-Bin et al., 2009) صورت گرفته است، نشان می‌دهد که سالیسیلیک اسید میزان تولید آرتمیزینین را تحت تأثیر قرار می‌دهد. آنها نشان دادند که با کاربرد خارجی این ماده روی قسمت‌های هوایی گیاه میزان بیان ژن‌های

DNA به اتصال شونده به DNA که در عوامل رونویسی این خانواده وجود دارد، مشاهده شد. در درخت فیلوژنتیکی حاصل از هم‌ردیفی عوامل رونویسی مشابه *Myb-like1_Artemisia* می‌توان مشاهده کرد که بین عامل رونویسی محتمل گیاه *A. annua* و بقیه عوامل رونویسی شباهت بالایی وجود دارد به طوری که بر اساس داده‌های حاصل از ماتریس فاصله بین *MYB4a_Vitis* و *Myb-like1_Artemisia* بیشترین تشابه (۰/۸۸) و بین *Myb-like1_Artemisia* و *Myb1_Triticum* کمترین میزان تشابه (۰/۸) وجود دارد (شکل ۱).

جفت باز) و EZ153079.1 (با طول ۳۶۴ جفت باز) هستند. در بین توالی‌های بالا توالی EST مربوط به شماره دسترسی EZ176166.1 دارای طول مناسبی برای تجزیه‌های بیشتر بود. نتایج نشان داد که توالی‌های EST دیگر هرکدام قسمتی از توالی مرجع EZ176166.1 هستند. در واقع این توالی‌ها کلاستر UniGene توالی مرجع EZ176166.1 را تشکیل می‌دهند.

هم‌ردیفی بین *Myb-like1_Artemisia* و دیگر عوامل رونویسی نشان داد که *Myb-like1_Artemisia* یک عامل رونویسی متعلق به خانواده MYBها است. همچنین دو دمین R2 و R3 و موتیف



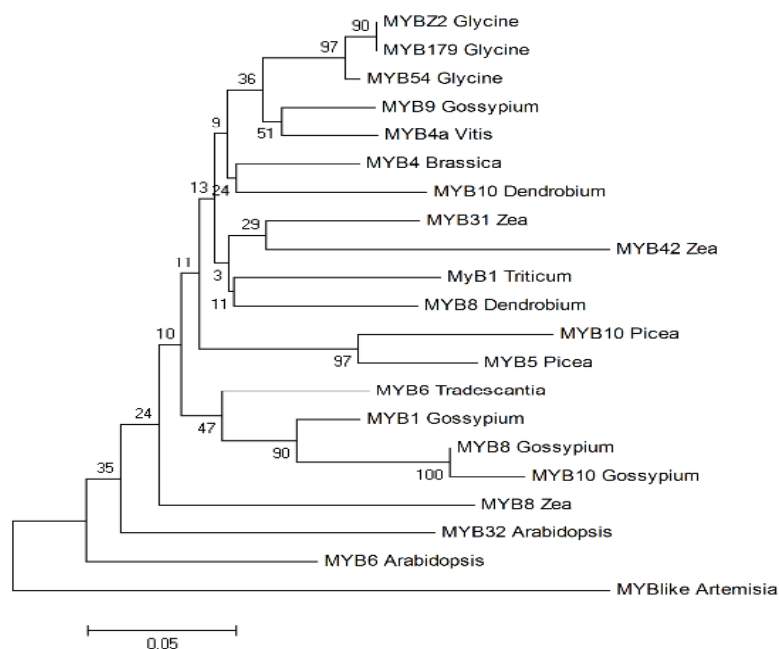
شکل ۱- نمایش درخت فیلوژنتیکی عوامل رونویسی MYB با استفاده از برنامه MEGA4 و الگوریتم NJ. شماره دسترسی هر یک از پروتیین‌های بالا عبارتند از: GHMYB9_Gossypium (AAK19619.1)، MYB4a_Vitis (XP_002278222.1)، MYB4_Arabidopsis (NP_195574.1)، MYB22_Glycine (ABI73970.1)، MYB179_Glycine (ABH02902.1)، MYB4_Brassica (ABQ81931.1)، MYB5_Picea (NP_001105949.1)، MYB31_Zea (AAA33067.1)، MYB1_Gossypium (ABQ51221.1)، MYB6_Tradesantia (AAS19480.1)، MYB10_Dendrobium (ABH02822.1)، MYB1_Tradesantia (AAO49419.1)، MYB6_Tradesantia (AAS19480.1)، MYB10_Dendrobium (ABH02822.1)، MYB8_Gossypium (AAT37167.1)، Myb1_Triticum (ABH02823.1)، MYB48_Glycine (AAS19475.1)، OSMYB2_Oryza (BAA23338.1)، MYB5_Picea (NP_192684.1)، MYB6_Arabidopsis (ABR01222.1)، MYB10_Gossypium (ABR01222.1) و OSMYB2_Oryza (BAA23338.1).

MYBها با شماره دسترسی pfam00249 است. نتایج نشان داد که در توالی تقاضا دو ناحیه حفظ شده یا دو دومین عملکردی وجود دارد. ناحیه اول از نوکلئوتید ۱۴ تا ۶۱ و ناحیه دو از نوکلئوتید ۶۷ تا ۱۱۲ توالی تقاضا را شامل می‌شود. عامل رونویسی دیگری که با استفاده از داده‌های EST گیاه *A. annua* به دست آمده است را نیز می‌توان به عنوان یک عامل رونویسی متعلق به خانواده

برای تجزیه بیشتر و اطمینان بیشتر نسبت به تعلق این عامل رونویسی محتمل به خانواده MYBها دومین‌های عملکردی پروتیین مورد نظر با استفاده از پایگاه اطلاعاتی ثانویه خانواده پروتیین‌ها Conserve CD Domain: (www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/ cdd.shtml) عمل شد. نتایج حاصله نشان داد که توالی مورد نظر با احتمال 2.10e-11 متعلق به خانواده

کامل را یافت ولی با استفاده از اطلاعات بدست آمده می توان توالی کامل را با استفاده روش های آزمایشگاهی بدست آورد. در واقع این توالی ها کلاستر UniGene این دو توالی محسوب می شوند. برای مشخص شدن عملکرد EST های بالا با استفاده از برنامه NCBI BLASTX پروتیین های که دارای شباهت بالایی با EST بالا بودند مشخص شدند. در تمامی موارد چارچوب +۳ EST مربوطه با پروتیین های خانواده MYB دارای شباهت بسیار بالا بود ($E > 10^{-50}$). در درخت فیلوژنتیکی حاصل از همردیفی عوامل رونویسی مشابه *Myb-like2_ Artemisia* می توان مشاهده کرد (شکل ۲) که بین عامل رونویسی محتمل گیاه *A. annua* و بقیه عوامل رونویسی شباهت بالای وجود دارد هرچند که داده های حاصل از ماتریس فاصله بین توالی ها فاصله (۰/۳۳۳) را نشان می دهد. مهمترین دلیلی که می توان برای آن ذکر کرد مربوط است به کوتاه بودن توالی مورد نظر باشد زیرا توالی مربوطه قسمتی از توالی اولیه ژن اصلی است.

MYB در نظر گرفت. در نهایت توالی های EST که دارای شباهت فراوان ($E > 10^{-3}$) با توالی عوامل رونویسی متعلق به خانواده MYB R2R3 بود یافت شدند که شامل EZ163055.1 (با طول ۶۰۴ جفت باز) EZ318439.1 (با طول ۳۳۱ جفت باز)، EZ320214.1 (با طول ۵۵۸ جفت باز)، EZ348290.1 (با طول ۳۸۹ جفت باز)، EZ346890.1 (با طول ۴۴۱ جفت باز)، EZ205438.1 (با طول ۷۰۹ جفت باز) و EZ188122.1 (با طول ۴۳۹ جفت باز) هستند. به دلیل اینکه توالی های EST بالا دارای شباهت زیادی با هم بودند به منظور مجتمع نمودن (assembly) آنها از برنامه CAP3 استفاده شد. با کمک این برنامه ما می توانیم توالی EST مرجع را که دیگر توالی های EST هرکدام ممکن از قسمتی از آن توالی مرجع باشند مشخص می شود. نتایج نشان داد که توالی های EST دیگر هرکدام قسمتی از توالی های مرجع EZ205438.1 و EZ163055.1 هستند. البته چون تعداد توالی های EST شناسایی شده دارای شباهت زیاد، کم بودند نمی توان یک توالی مورد توافق



شکل ۲- نمایش درخت فیلوژنتیکی عوامل رونویسی MYB با استفاده از برنامه MEGA4 و الگوریتم NJ. شماره دسترسی هر یک از پروتیین های بالا عبارتند از: MYBZ2_Glycine (XP_002278222.1)، MYB4a_Vitis (AAK19619.1)، GHMYB9_Gossypium (ABQ51221.1)، MYB5_Picea (ABQ81931.1)، MYB4_Brassica (ABH02902.1)، MYB179_Glycine (ABI73970.1)، MYB54_Glycine (NP_001105949.1)، MYB31_Zea (AAA33067.1)، MYB1_Gossypium (ABH02822.1)، Myb1_Triticum (AAS19480.1)، MYB6_Tradescantia (AAO49419.1)، MYB10_Dendrobium (AAT37167.1)، MYB10_Gossypium (ABR01221.1) و MYB6_Arabidopsis (NP_192684.1).

جدول ۳- نتایج مقایسه بیان (fold change) ژن کلیدی ADS و عوامل رونویسی کننده MYB-Like1، WRKY و MYB-Like2 با استفاده از روش PCR زمان واقعی در ژنوتیپ‌های مختلف *A. annua*

ژن‌ها/ ژنوتیپ‌ها	ADS	MYB-Like1	WRKY	MYB-Like2
	۴			
۶	-۲۸/۸	+۳/۰۵	۱/۵	-۵/۳
	۶			
۵	-۴/۲۶	-۴/۱۴	-۴/۰۶	+۴/۵۲۵
	۴			
	-۱۲۳	۱/۳۵	-۲/۵۹	۱/۷
	۶			
۱	-۴/۳۶	۱/۹۸	+۳/۴	+۶/۷
	۵			
	۱/۴	۲/۱	+۱۴/۰۱	۱/۴۹
	۲			
	-۱۴/۲	-۳/۹	-۴/۰۷	+۹/۹
	۴			
	-۱۲۴/۷	۱/۵	+۵/۳	۱/۲۸
	۶			
۲	+۳/۹	۱/۹۸	۱/۱	۱/۴۷
	۵			
	+۱۴/۱	+۸/۲۸	+۳/۴	-۶/۶
	۴			
	-۸/۷	+۶/۱	۱/۳	-۷/۸
	۶			
۳	-۴/۷	-۹/۱	-۴/۱	۱/۲
	۵			
	۱/۱	-۲/۲	۱/۰۹	-۳/۷
	۱			
	۱/۰۹	-۴/۶۷	-۱۴/۲۸	-۵/۶
	۲			
	-۱۵/۵	-۱۸/۲	-۳/۵	۱/۷
	۴			
	-۱۳۶/۲	-۲/۹	-۲/۶	-۴/۴

+ : افزایش بیان و - : کاهش بیان

تجزیه داده‌های PCR زمان واقعی برای ژن کلیدی

ADS و سه عامل رونویسی در ۶ ژنوتیپ *A. annua*

همانطور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود. در مقایسه ژنوتیپ‌های ۵/۶، ۶/۳ و ۲/۱ اگرچه میزان بیان عامل رونویسی MYB-Like2 افزایش پیدا کرده است اما بیان ژن ADS افزایش پیدا نکرده و یا تغییری در بیان آن ژن مشاهده نمی‌شود و در مقایسه بین ژنوتیپ‌های ۵/۳ و ۱/۳ اگرچه میزان بیان این عامل رونویسی کاهش پیدا کرده است ولی تغییری در بیان ژن ADS مشاهده نمی‌شود. در مقایسه ژنوتیپ‌های ۱/۶، ۱/۵ و ۱/۴ با وجود اینکه میزان بیان عامل رونویسی WRK افزایش پیدا کرده است اما بیان ژن ADS افزایش پیدا نکرده و یا تغییری در بیان آن ژن دیده نمی‌شود. همچنین چنانچه در جدول ۳ نشان داده شده است، اگرچه بیان عامل رونویسی MYB-Like1 در مقایسه ژنوتیپ‌های ۴/۶ و ۴/۲ افزایش نشان داده اما بیان ژن ADS افزایش پیدا نکرده و یا تغییری در بیان آن ژن دیده نمی‌شود و در مقایسه بین ژنوتیپ‌های ۱/۳ اگرچه میزان بیان این عامل رونویسی کاهش پیدا کرده است ولی تغییری در بیان ژن ADS در مقایسه بین دو ژنوتیپ مشاهده نمی‌شود. این نتایج نشان می‌دهد که چنانچه ما بیان عامل رونویسی را که در یک ژنوتیپ افزایش پیدا کرده ولی عملاً روی بیان ژن کلیدی ADS تأثیری نداشته است را با استفاده از روش‌های مرسوم افزایش دهیم ممکن است به نتیجه مطلوب نرسیم و بیان ژن ADS که یکی از ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتز آرتیمیزینین است افزایش پیدا نکند. بایستی توجه کرد که گاهی با افزایش بیان یک عامل رونویسی لزوماً بیان ژن کنترل شونده به وسیله آن عامل رونویسی افزایش پیدا نمی‌کند. مهمترین دلیلی که برای آن می‌شود ذکر کرد، شاید نبود جایگاه‌های لازم برای نشستن آن عامل رونویسی باشد. در واقع ممکن است که جایگاه‌های بالا دست ژن به دلیل وجود جهش‌هایی که در آن قسمت‌ها روی می‌دهد دچار دگرگونی می‌شوند و دیگر قادر نخواهند بود که عامل رونویسی مورد نظر را به سمت خود بکشانند. در واقع جمعیت‌های مختلف دارای مقادیر فراوانی از جهش‌های کوچک در سطح راه‌اندازهای خود

مورد مطالعه) نسبت به بقیه ژنوتیپها است. به طوری که در همه مقایسات انجام شده بیان عوامل رونویسی‌کننده و ژن کلیدی آن کمتر بود. مسیرهای متابولیکی به وسیله ژنهای فراوانی کنترل می‌شوند. بسیاری از ژنهای دخیل در مسیرهای متابولیکی شناسایی شده‌اند. اما اطلاعات کمی در ارتباط با نحوه تنظیم بیان آنها در دسترس است. امروز مشخص شده است که میزان تأثیر در محتوی متابولیکی یک گیاه از طریق عوامل تنظیمی خیلی بیشتر از ژنهای محدودکننده آن مسیر متابولیکی می‌باشد. در واقع این به این معنی است که تنظیم تعاونی گونه مسیرهای متابولیکی تأثیر زیادی روی محتوی متابولیکی گیاهان دارد (Iwase et al., 2009). از عوامل رونویسی خانواده MYB برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه استفاده‌های فراوانی شده است. دو عامل رونویسی شناسایی شده در این تحقیق به دو عامل رونویسی MYB4 و MYB5 شباهت بالای داشتند. مطالعاتی که روی این دو عامل رونویسی صورت گرفته نشان می‌دهد که MYB4 R2R3 در آرآبیدوپسیس در تولید ترکیبات فنولیکی نقش دارند. برخی از عوامل رونویسی روی مسیرهای متفاوت متابولیت‌های ثانویه تأثیر دارند. برای مثال Mahjoub et al. (2009) عامل رونویسی VvMYB5b را در گیاه گوجه‌فرنگی بیان نمودند و مشاهده کردند این عامل رونویسی روی تولید متابولیت‌های ثانویه مسیرهای ترپنوئیدی و فنولیکی اثر داشت. از طرف دیگر عامل رونویسی OS MYB4 در گیاه برنج نقش مهمی در تحمل به سرما دارد. به طوری که Vannini et al. (2006) نشان دادند که این عامل رونویسی قادر است ۲۵۴ ژن یعنی حدود ۲۲ درصد از کل ژنهای دخیل در فرایندهای تنظیمی و انتقال پیام را کنترل نماید. همچنین با افزایش بیان این عامل رونویسی نه تنها ژنهای دخیل در فرایند تحمل و سازش به سرما تنظیم شد بلکه ژنهای دخیل در تحمل به تنش‌های غیرزنده دیگر نیز کنترل شدند. در واقع فعالیت بسیاری از این ژن‌ها باعث تولید متابولیت‌های ثانویه فراوانی می‌شوند که در تحمل به سرما نقش دارند.

هستند که این جهش‌ها می‌تواند روی پروفایل بیان ژن‌ها تأثیر معنی‌داری داشته باشند (Rockman & Wray, 2002; Hershberg & Margalit, 2006; Wray et al., 2003).

همانطور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود، در اکثر مقایسات صورت گرفته هرگاه که بیان عامل رونویسی WRKY افزایش پیدا کرده به طبع آن بیان ژن ADS نیز زیاد شده است که این حالت در دو عامل رونویسی دیگر کمتر دیده می‌شود. در واقع این نتایج نشان می‌دهد که این عامل رونویسی و جایگاه اتصال آن روی راه‌انداز ژن ADS نقش مهمتری نسبت به دو عامل رونویسی دیگر دارد. مطالعات مختلف نشان داده‌اند که برخی از مکان‌های اتصالی روی راه‌اندازها (به طبع آن عوامل رونویسی) اهمیت بیشتری نسبت به مکان‌های دیگر دارند. تجزیه‌های عملکردی نشان می‌دهد که اگر چنانچه میزان بیان عوامل نسخه‌برداری مختلف تأثیر متفاوتی روی بیان ژن‌ها بگذارند نشان‌دهنده اهمیت جایگاه‌های اتصالی خاص بر روی بیان ژن‌ها است که در برخی از راه‌اندازها دچار تغییراتی شده است. به دلیل اینکه حتی یک تغییر کم در توالی راه‌اندازها (جایگاه‌های اتصالی) باعث تغییر بیان ژن‌های پایین دست آنها می‌شود. برای فهم این عملکرد بایستی توجه نمود که تجزیه مقایسه‌ای بیان ژن‌ها ما را به این هدف نزدیک می‌کند (Wray et al., 2003). Dongming et al. (2009) عامل رونویسی AaWRKY1 در گیاه *A. annua* را افزایش بیان دادند و سپس مشاهده کردند که بیان ژن ADS نزدیک به ۷ برابر افزایش پیدا کرد. تغییرات تکاملی صورت گرفته در گیاه به تغییر در شبکه بیان ژن‌ها در سطح نسخه‌برداری منجر می‌شود. چنین تغییراتی برای سازگاری‌های اکولوژیکی موجودات به شرایط رشدی لازم و ضروری هستند. مطالعات فراوانی نشان داده‌اند که تغییرات فراوانی که در سطوح بیان ژن‌ها وجود دارد، ارتباط بسیار فراوانی با صفات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی موجودات دارند. مقایسه ژنوتیپ ۳ با بقیه ژنوتیپ‌ها نشان داد که این ژنوتیپ دارای پتانسیل زنتیکی ضعیف‌تری (از نظر بیان ژن‌های

REFERENCES

1. Bouwmeester, H. J., Wallaart, T. E., Janssen, M. H., van Loo, B., Jansen, B. J., Posthumus, M. A., Schmidt, C. O., De Kraker, J. W., König, W. A. & Franssen, M. C. (1999). Amorpha-4,11-diene synthase catalyses the first probable step in artemisinin biosynthesis. *Phytochemistry*, 52, 843-854.
2. Babu, M. M., Luscombe, N. M., Aravind, L., Gerstein, M. & Sarah, A. (2004). Teichmann Structure and evolution of transcriptional regulatory networks. *Current Opinion in Structural Biology*, 14, 283-291.
3. Danko, C. G., McIlvain, V. A., Qin, M., Knox, B. E. & Pertsov, A. M. (2007). Bioinformatic identification of novel putative photoreceptor. *BMC Bioinformatics*, 8, 1-16.
4. Dongming, Ma., Gaobin, Pu., Caiyan, Lei., Lanqing, Ma., Huahong, W., Yanwu, G., Jianlin, C., Zhigao, D., Hong, W., Guofeng, L., Hechun, Y. & Benye, L. (2009). Isolation and Characterization of AaWRKY1, an *Artemisia annua* Transcription Factor that Regulates the Amorpha-4,11-diene Synthase Gene, a Key Gene of Artemisinin Biosynthesis. *Plant Cell Physiology*, 50, 2146-2161.
5. Edrissian, G. H. H. (2006). Malaria in Iran: Past and Present Situation. *Iranian Journal Parasito*, 1, 1-14.
6. Kuhn, S., Gill, M. J. & Kain, K. C. (2005). Emergence of atovaquone-proguanil resistance during treatment of *Plasmodium falciparum* malaria acquired by a non-immune North American traveller to West Africa. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 72, 407-409.
7. Ferreira, J. F. S., Simon, J. E. & Janick, J. (1997). *Artemisia annua*: botany, horticulture and pharmacology. *Horticulture Review*, 19, 319-371.
8. Gao-Bin, P., Dong-Ming, M., Jian-Lin, C., Lan-Qing, M., Hong, W., Guo-Feng, L., He-Chun, Y. & Ben-Ye, L. (2009). Salicylic acid activates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. *Plant Cell Report*, 28, 1127-1135.
9. Iwase, A., Matsui, K. & Ohme-Takagi, M. (2009). Manipulation of plant metabolic pathways by transcription factors. *Plant Biotechnology*, 26, 29-38.
10. Hershberg, R. & Margalit, H. (2006). Co-evolution of transcription factors and their targets depends on mode of regulation. *Genome Biology*, 7, R62.
11. Higo, K., Ugawa, Y., Iwamoto, M. & Korenaga, T. (1999). Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database. *Nucleic Acids Research*, 27, 297-300.
12. Huang, X. & Madan, A. (1999). CAP3: a DNA sequence assembly program. *Genome Research*, 9, 868-877.
13. Lescot, M., Dehais, P., Thijs, G. & Marchal, K. (2002). PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Research*, 30, 325-327.
14. Lia, Q., Yina, H., Lia, D., Zhub, H., Zhanga, Y. & Zhu, W. (2007). Isolation and Characterization of CMO Gene Promoter from Halophyte *Suaeda liaotungensis* K. *Journal of Genetics and Genomics*, 34, 355-361.
15. Lulu, Y., Chang, Z., Ying, H., Ruiyi, Y. & Qingping, Z. (2008). Abiotic stress-induced expression of Artemisinin biosynthesis genes in *Artemisia annua*. *Chinensis Journal Applied Environmental Biology*, 14, 1-5.
16. Mahjoub, A., Hernould, M., Joube, J., Decendit, A., Mars, M., Barrieu, F., Hamdi, S. & Delrot, S. (2009). Overexpression of a grapevine R2R3-MYB factor in tomato affects vegetative development, flower morphology and flavonoid and terpenoid metabolism. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47, 551-561.
17. Marshall, O. J. (2004). PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. *Bioinformatics*, 20, 2471-2472.
18. Olsson, M. E., Olofsson, L. M., Lindahl, A. L., Lundgren, A., Brodelius, M. & Brodelius, P. E. (2009). Localization of enzymes of artemisinin biosynthesis to the apical cells of glandular secretory trichomes of *Artemisia annua* L. *Phytochemistry*, 70, 1123-1128.
19. Olliaro, P. L. & Taylor, W. R. (2004). Developing artemisinin based drug combination for the treatment of drug resistant *falciparum* malaria: a review. *Journal of Postgraduate Medicine*, 50, 40-44.
20. Pujade-Renaud, V., Sanier, C., Cambillau, L. & Pappusamy, A. (2005). Molecular characterization of new members of the *Hevea brasiliensis* hevein multigene family and analysis of their promoter region in rice. *Biochemistry Biophysics Acta*, 1727, 151-161.
21. 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, 1-10.
22. Ridley, R. G. (2002). Medical Need, scientific opportunity and the drive for antimalarial drugs. *Nature*, 415, 686-693.
23. Rychlik, W. (2007). OLIGO 7 Primer Analysis Software. *Methods in Molecular Biology*, 402, 35-59.

24. Rockman, M. V. & Wray, G. A. (2002). Abundant raw material for cis-regulatory evolution in humans. *Molecular Biology Evolution*, 19, 1981–1990.
25. Podlech, D. (1977). Compositae VI Anthemideae. In: K.H. Rechinger (ed.), Flora Iranica. Graz- Austria.
26. Souza, C. R. D., Aragão, F. J., Moreira, E. C. O., Costa, C. N. M., Nascimento, S. B. & Carvalho, L. J. (2009). Isolation and characterization of the promoter sequence of a cassava gene coding for Pt2L4, a glutamic acid-rich protein differentially expressed in storage roots. *Genetics and Molecular Research*, 8, 334-344.
27. Soon-Hee, K., Yung-Jin, C. & Soo-Un, K. (2008). Tissue Specificity and Developmental Pattern of Amorpha-4,11-diene Synthase (ADS) Proved by ADS Promoter-Driven GUS Expression in the Heterologous Plant, *Arabidopsis thaliana*. *Planta Medicine*, 74, 188–193.
28. Souza, C. R. D., Aragão, F. J., Moreira, E. C. O., Costa, C. N. M., Nascimento, S. B. & Carvalho, L. J. (2009). Isolation and characterization of the promoter sequence of a cassava gene coding for Pt2L4, a glutamic acid-rich protein differentially expressed in storage roots. *Genetics and Molecular Research*, 8, 334-344.
29. Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 1596-1599.
30. Tittarelli, L., Milla, F., Vargas, A., Morales, C., Neupert, L. A., Meisel, H., Salvo-G, E., Penalzoza, G., Munoz., Corcuera L. J. & Silva H. (2007). Isolation and comparative analysis of the wheat TaPT2 promoter: identification in silico of new putative regulatory motifs conserved between monocots and dicots. *Journal of Experimental Botany*, 58, 2573-2582.
31. White, N. J. (2004). Anti malarial drug resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, 113,1084-1092.
32. Wallaart, T. E., Bouwmeester, H. J., Hille, J., Poppinga, L. & Maijers, N.C. (2001). Amorpha-4, 11-diene synthase: cloning and functional expression of a key enzyme in the biosynthetic pathway of the novel antimalarial drug artemisinin. *Planta*, 212, 460–465.
33. Wei-Min, L., Zhi-Xing, W., Xin-Wu, P. & Shi-Rong, J. (2005). Cloning and characterization of the light-inducible Gacab promoter from *Gossypium arboreum*. *Agricultural Biotechnology*, 2, 17-22.
34. Wray, G., Matthew, A., Hahn, W., Abouheif, E., Balhoff, J. P., Pizer M., Rockman, M. V. & Romano, L. A. (2003). The Evolution of Transcriptional Regulation in Eukaryotes. *Molecular Biology Evolution*, 20, 1377–1419.
35. Weathers, P. J., Bunk, G. & McCoy, M. C. (1997). Effects of gibberellic acid on hairy root cultures of *Artemisia annua*: growth and artemisinin production. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant*, 41, 47–53.
36. Wingender, E., Dietze, P., Karas, H. & Knüppel, R. (1996). TRANSFAC: a database on transcription factors and their DNA binding sites. *Nucleic Acids Research*, 24, 238-241.
37. Yanhui, C., Xiaoyuan, Y., Kun, H., Meihua, L., Jigang, L., Zhaofeng, G., Zhiqiang, L., Yunfei, Z., Xiaoxiao, W., Xiaoming, Q., Yunping, S., Li, Z., Xiaohui, D., Jingchu, L., Xing-Wang, Chen, D., Gu Hongya, Z. & Li-Jia, Q. (2006) .The MYB transcription factor superfamily of Arabidopsis: expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family. *Plant Molecular Biology*, 60,107–124.
38. Vannini, C., Iriti, M., Bracale, M., Locatelli, F., Faoro, F., Croce, P., Pirona, R., Di Maro, A., Coraggio, I. & Genga, A. (2006). The ectopic expression of the rice Osmyb4 gene in *Arabidopsis* increases tolerance to abiotic, environmental and biotic stresses. *Physiology and Molecular Plant Patholog*, 69, 26–42.