

اثرات نانومحرک دی اکسید تیتانیوم بر الگوی بیان ژن‌های مسیر بیوسنتز سنگوئینارین در مامیران کبیر (*Chelidonium majus L.*)

The effects of titanium dioxide nano-elicitor on the expression profile of sanguinarin biosynthesis pathway genes in greater celandine (*Chelidonium majus L.*)

صدیقه فاریکی اورنگ^{۱*}، صالحه درگاهی^۱، علیرضا پورابوقداره^۲

۱- استادیار، دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)،

قزوین، ایران

۲- پژوهشگر پسا دکتری، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه تهران، کرج،

ایران

Fabriki-Ourang S^{*1}, Darghazi S¹, Pour-Aboughadareh A²

1- Assistant Professor, MSc Student, Department of Genetics and Plant Breeding,
Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran

2- Post-doc Researcher, Tehran University, Karaj, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: s.ourang910@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۷/۹/۱۳ - تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۲/۱۵)

چکیده

شیره گیاهی و اندام‌های مامیران کبیر (*Chelidonium majus L.*) غنی از آلکالوئیدهای ایزوکوئینولین می‌باشند که سنگوئینارین از گروه بنزوفنانتریدین‌ها از مهم‌ترین متابولیت‌های آن است که تجمع آن عمدتاً در ریشه گزارش شده است. بیوسنتز سنگوئینارین نیازمند هفت مرحله واکنش از پیش ماده اس-رتیکولین می‌باشد که توسط آنزیم‌های بربین بریدج (BBE)، شیلاتیفولین سنتتاز (CFS)، استیلوپین سنتتاز (STS)، تترایدروپروتوبرین متیل ترانسفراز (TNMT)، پروتوپین هیدروکسیلاز (P6H) و دی‌هیدروبنزوفنانتریدین اکسیداز (DBOX) صورت می‌گیرد. مطالعه مسیرهای بیوسنتزی و شناسایی عوامل تأثیرگذار در افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه از گام‌های مهم در مهندسی متابولیت می‌باشد. نانوذرات دسته جدیدی از محرک‌ها هستند که به‌عنوان تحریک کننده تولید متابولیت‌های ثانویه محسوب می‌شوند. بدین منظور اثر نانودی اکسید تیتانیوم در تغییر بیان ژن‌های مسیر بیوسنتزی سنگوئینارین مامیران کبیر در قالب آزمایش فاکتوریل با سه فاکتور غلظت نانو دی‌اکسید تیتانیوم، مرحله محلول‌پاشی و زمان پس از القای محرک مورد بررسی قرار گرفت. تجزیه واریانس بیان ژن‌های *MSH* و *BBE P6H STS* تفاوت معنی‌داری در اثر غلظت‌های نانودی اکسید تیتانیوم، مدت زمان پس از محلول‌پاشی، دوره محلول‌پاشی، اندام‌های مختلف گیاه و اثرات متقابل آن‌ها در سطوح احتمال پنج و یک درصد نشان داد. میزان تجمع رونوشت‌های *STP* و *P6H* در ریشه نسبت به برگ و ساقه دو تا سه برابر و رونوشت ژن‌های *MSH* و *BBE* در ریشه چهار برابر ساقه بود. در مجموع هر سه اندام مورد مطالعه، غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانودی اکسید تیتانیوم به ترتیب افزایش ۶۳، ۶۶، ۵۰۰ و ۹۱ درصدی در بیان ژن‌های *MSH* و *BBE P6H STS* نسبت به تیمار شاهد نشان دادند. زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت نسبت به ۷۲ ساعت پس از محلول‌پاشی باعث حداکثر بیان در هر چهار ژن مورد مطالعه شده و غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانودی اکسید تیتانیوم برای ژن‌های *MSH* و *P6H* و *BBE* و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر برای ژن *MSH* بیش‌ترین افزایش بیان را نشان دادند. نتایج این تحقیق نشان داد که نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم در افزایش تولید سنگوئینارین مامیران کبیر از طریق تنظیم ژن‌های مسیر بیوسنتزی آن مؤثر می‌باشد.

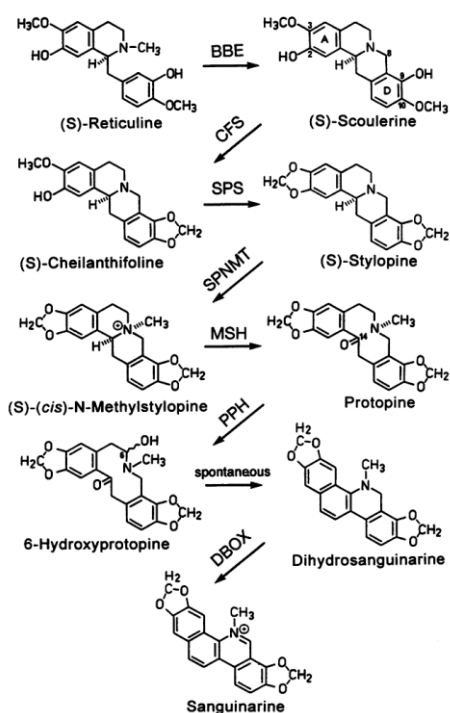
واژه‌های کلیدی

افزایش بیان ژن
سنگوئینارین
محرک
نانوذرات

در حالی که دیگر تحقیقات مهار سنگوئینارین را از بیان این ژن نشان داده‌اند (Kemeny-Bekea et al. 2006). بیوستز متابولیت مهم سنگوئینارین نیازمند هفت مرحله واکنش از اس-رتیکولین (شکل ۱) می‌باشد. اولین مرحله برای بیوستز آلکالوئیدهای بنزوفنانتیریدین و پروتوبربرین شامل تبدیل اس-رتیکولین به اس-اسکولرین می‌باشد که توسط آنزیم بربرین بریدج (Berberine bridge enzyme: BBE) صورت می‌گیرد (Takemura et al. 2016). ژن *BBE* آنزیم کلیدی بربرین بریدج را کد می‌کند. آنزیم *BBE* تبدیل ساختاری گروه N - متیل در S - رتیکولین را به کربن شماره ۸ در S- اسکولرین کاتالیز می‌کند (Frenzel et al. 1988) که این عمل طی یک واکنش بی‌نظیر و خاص در طول مسیر بیوستزی آلکالوئیدهای بنزوفنانتیریدینی انجام می‌شود (Colombo and Bosisio 1996). سپس S- اسکولرین توسط آنزیم شیلانتیفولین سنتتاز (Cheilanthifoline synthase: CFS) به S- شیلانتیفولین تبدیل می‌شود (Hagel and Facchini 2010). آنزیم *CFS* به خانواده *CYP719* تعلق دارد و ژن‌های کدکننده این آنزیم از خشخاش کالیفرنیا جداسازی شده‌است (Ikezawa et al. 2009). آنزیم استیلوپین سنتتاز (*Stylophine synthase: STS*) -*Cheilanthifoline* (S) را به (S)-*Stylophine* تبدیل می‌کند و متعلق به زیرخانواده *CYP719* است. ژن‌های کدکننده این آنزیم از خشخاش خاردار مکزیکی جداسازی و گزارش شده‌اند (Diaz Chavez et al. 2011). با متیلاسیون *Stylophine* - (S) توسط آنزیم *Tetrahydroprotoberberine cis-N-methyltransferase: TNMT* ترکیب *S-cis-N-methylstylophine* تولید می‌شود (Liscombe and Facchini 2007). *S-cis-N-methylstylophine* یک مرحله کلیدی در بیوستز آلکالوئیدهای پروتوپینی و بنزوفنانتیریدینی است. آنزیم *14-S-cis-N-methylstylophine hydroxylase* (MSH) متعلق به زیرخانواده *CYP82N* می‌باشد و سبب تبدیل *S-cis-N-methylstylophine* به پروتوپین می‌شود. آنزیم *6- hydroxylase Protopine (P6H) Protopine* را به *Dihydrosanguinarine* تبدیل می‌کند. این آنزیم متعلق به زیرخانواده *CYP82N3* از خشخاش کالیفرنیا جداسازی شده‌است (Takemura et al. 2010). در انتهای این شاخه، اکسیداسیون دی-

مامیران کبیر با نام علمی *Chelidonium majus L.* از خانواده خشخاش (*Papaveraceae*); گیاه دارویی چندساله با شیرابه زرد-نارنجی در ریشه و اندام‌های هوایی است که به این گیاه خواص ضدالتهابی، ضدعفونی و ضدسرطانی می‌بخشد. نتایج تحقیقات مختلف نشان می‌دهد که خواص دارویی و درمانی شیرابه مامیران کبیر به دلیل آلکالوئیدهای موجود در اندام‌های این گیاه می‌باشد (Ganan et al. 2016). شیره گیاهی و اندام‌های مامیران غنی از آلکالوئیدهای ایزوکوئینولین می‌باشند که به سه گروه عمده بنزوفنانتیریدین (مانند کلیدونین، سنگوئینارین و کلریتیرین)، پروتوپین و مشتقات آن و پروتوبربرین‌ها (مانند بربرین و کوپتیسین) تعلق دارند. کلیدونین، کوپتیسین و بربرین عمده‌ترین آلکالوئیدها در اندام‌های هوایی هستند درحالی‌که کلیریتیرین و سنگوئینارین عمدتاً در ریشه گزارش شده‌است (Tome and Colombo 1995). بنزیل ایزوکوئینولین‌ها (*Benzylisoquinoline alkaloids: BIAs*) گروه بزرگی از ترکیبات متنوع طبیعی محسوب می‌شوند که عمدتاً در خانواده‌های *Papaveraceae*, *Ranunculaceae*, *Berberidaceae* و *Menispermaceae* یافت می‌شوند (Li et al. 2016). بیوستز آلکالوئیدهای بنزیل-ایزوکوئینولین با تبدیل تیروزین به دوپامین و ۴-هیدروکسی فنیل استالدهید آغاز می‌شود. تیروزین دکربوکسیلاز، تیروزین و دهیدروکسی فنیل آلانین را به آمین‌های مشابه خود تبدیل می‌کند. دوپامین و ۴-هیدروکسی فنیل استالدهید توسط نورکوکولارین سنتتاز (NCS) با هم ترکیب شده تا اس-نورکوکولارین (پیش‌ماده مرکزی برای همه بنزیل ایزوکوئینولین آلکالوئیدها در گیاهان) را تولید کند. بیش‌تر تحقیقات بر مسیرهای انشعابی منتهی‌شونده به آلکالوئیدهای بنزوفنانتیریدین (مانند سنگوئینارین)، پروتوبربرین (مانند بربرین) و مورفینان (مانند تبائین، مورفین و کدئین) متمرکز شده‌است. آزمایشات مختلف نشان داده‌اند که سنگوئینارین موجب آپوپتوز در سلول‌های سرطانی انسان می‌شود و مطالعه روی سنگوئینارین به‌عنوان درمان بالقوه سرطان توصیه می‌شود. برخی تحقیقات نشان داده‌اند که اثرات آپوپتوز سنگوئینارین از طریق مهار پروتئین فسفاتاز 2C و فسفوریلاسیون P38 اثر می‌کند

محرک‌های زیستی و غیرزیستی متعددی برای تحریک بیان ژن آنزیم‌های مسیر تولید آلکالوئیدهای بنزوفنانتری‌دین‌ها مانند سنگوئینارین مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج مطالعات مختلف بیانگر این مطلب است که علاوه بر نوع گیاه و بافت هدف، نوع محرک، غلظت آن و مدت زمان تیمار با محرک میزان تولید متابولیت را تحت تاثیر قرار می‌دهد. در این رابطه اثر چندین محرک قارچی به همراه محرک‌های غیرزیستی سالیسیلیک اسید، پراکسید هیدروژن و دی‌اکسید کربن بر بهبود تولید سنگوئینارین در خشخاش بررسی و مشخص شد که تولید سنگوئینارین در کشت‌های سلولی خشخاش در حضور *T. harzanium* افزایش یافته و نیز باعث افزایش بیان هشت الی نه برابری ژن‌های *CFS*، *STS*، *TNMT* و *P6H* شد؛ هم‌چنین در میان محرک‌های غیر زیستی، سالیسیلیک اسید مؤثرتر گزارش شد (Verma et al. 2014).



شکل ۱- مسیر بیوسنتزی تولید سنگوئینارین از اس-رتیکولین (Bleichert et al. 1995). BBE: Berberine bridge enzyme; CFS: (S)-cheilanthifoline synthase; SPS: (S)-stylopine synthase; SPNMT: S-adenosyl-L-methionine: (S)-tetrahydroprotoberberine cis-N-methyltransferase; MSH: (S)-cis-Nmethylstylopine 14-hydroxylase; PPH: protopine 6-hydroxylase; DBOX: (dihydrobenzophenanthridine oxidase).

هیدروسنگوئینارین به سنگوئینارین توسط آنزیم دی-هیدروبنزوفنانتری‌دین اکسیداز (Dihydro Benzophenanthridine Oxidase: DBOX) که یک آنزیم سیتوزولی می‌باشد صورت می‌گیرد (Facchini et al. 1996). ژن *DBOX* مسئول تولید آنزیم دی‌هیدروبنزوفنانتری‌دین اکسیداز، دیگر ژن مؤثر در مسیر بیوسنتزی سنگوئینارین است که مسئول تنظیم آستانه تحمل سلولی به سمیت سنگوئینارین است (Hagel et al. 2012).

محرک می‌تواند یک فاکتور محیطی و یا یک مولکول پیام‌رسان باشد که آبخاری از سیگنال‌های پیام‌رسانی را فعال می‌نماید؛ امری که با بیان ژن‌های بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه مرتبط می‌باشد. محرک‌ها عمدتاً بر اساس منشاء آن‌ها، نام بیولوژیکی و ماهیت فیزیکی-شیمیایی به دسته‌های مختلفی تقسیم می‌شوند. نانوذرات دسته جدیدی از محرک‌ها هستند که با وجود مطالعات کم در این زمینه، تحریک متابولیت‌های ثانویه در پاسخ به تیمار نانوذرات مبین این مسئله است که این ذرات به‌عنوان تحریک کننده تولید متابولیت‌های ثانویه محسوب می‌شوند (Shakya et al. 2017). نانوذرات دی اکسیدتیتانیوم در گیاهان با افزایش فعالیت نیترات رودوکتاز و گلوتامات دهیدروژناز بر متابولیسم نیتروژن تاثیر گذاشته و موجب بالا رفتن میزان فتوسنتز و رشد می‌شود. این نانو ذره به دلیل کوچکی اندازه به سرعت درون سلول‌های گیاهی وارد شده و تحرکات بیانی در ژن‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهد. استفاده از نانوذرات به‌عنوان محرک در سال‌های اخیر مورد توجه زیادی قرار گرفته و گزارش‌های محدودی نیز وجود دارد. در این خصوص (Raei et al. 2013) با استفاده از نانوذرات دی اکسیدتیتانیوم و نقره افزایش میزان آلونین در سوسپانسیون سلولی آلونوره‌ها را گزارش کردند. میزان آرتیمیزین در کشت ریشه موئینه گیاه *Artemisia annua* در پاسخ به تیمار با نانو ذرات نقره افزایش یافته است (Zhang et al. 2013). تاثیر مثبت نانوذرات مس، آهن و سیلیسیم در افزایش متابولیت‌های پاپاورین، کدئین و تبائین در سوسپانسیون سلولی گیاه خشخاش توسط (Bandarian et al. 2013) گزارش شده است. در گیاه *Calendula officinalis* میزان فلاونوئید و آنتوسیانین در پاسخ به نانوذرات نقره کاهش یافته است در حالی که مقدار کارتنوئید و ساپونین افزایش یافته است (Ghanati and Bakhtiarian 2014).

اسپری انجام گرفت، به طوری که محلول پاشی در دو مرحله با فاصله زمانی ۷۲ ساعت انجام شد. لازم به ذکر است که به منظور افزایش میزان نفوذپذیری، به هنگام محلول پاشی از Tween 80 (یک درصد، Scharlu) استفاده شد و گیاهان شاهد (غلظت صفر) با آب دیونیزه حاوی Tween محلول پاشی شدند. نمونه‌های گیاهی برگ از تیمارهای مختلف در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از هر محلول پاشی تهیه و برای بررسی‌های ملکولی مورد استفاده قرار گرفتند. همچنین پس از آخرین نمونه‌گیری برگ در زمان ۷۲ ساعت پس از محلول پاشی دوم، به منظور مقایسه میزان بیان ژن‌ها در اندام‌های مختلف، نمونه‌گیری از سه اندام ریشه، ساقه و برگ انجام شد.

استخراج RNA کل از نمونه‌های جمع‌آوری شده ترکیبات تیماری مختلف و اندام‌های ریشه، ساقه و برگ با محلول RNX-Plus (Sinaclon) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت و در ادامه از الکتروفورز ژل آگارز و اسپکتروفتومتری (Nanodrop, Thermo scientific) برای سنجش کیفیت و کمیت RNA استخراج شده استفاده شد. برای حذف آلودگی احتمالی RNA با DNaseI ژنومی، نمونه‌های RNA با آنزیم DNaseI (Fermentas) تیمار شدند و سپس واکنش سنتز cDNA با استفاده از کیت (-601 Hyper Script شرکت GeneAll مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده صورت گرفت. به منظور بررسی میزان بیان نسبی ژن‌های مورد مطالعه، واکنش Real Time-PCR با استفاده از (Amplicon) Cyber green در چهار تکرار برای هر تیمار در دستگاه BioRad (MiniOpticon, USA) انجام گرفت. آغازگرهای مورد نیاز (جدول ۱) از توالی ژن‌های *stylopine N-methylstylopine hydroxylase* (KY550671)، *synthase* (KY646397)، *protopine 6-hydroxylase* (KY783479) و *Berberin Bridge Enzyme* (KY595435) که در آزمایشگاه ژنتیک و ژنومیکس دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره) جداسازی شده بود؛ با نرم‌افزار Primer 3 (ver. 0.4.0) طراحی و ویژگی‌های جفت آغازگرها از لحاظ تشکیل ساختارهای ثانویه، همودایمر و هتروداایمر و غیره با نرم‌افزار Oligoanalyzer (ver. 3.1) بررسی و تایید شدند. ژن خانه‌دار *Actin* به عنوان ژن مرجع برای نرمال کردن داده‌های بیان ژن‌ها مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۱).

در مطالعه‌ای مشابه، بیان ژن‌های بیوسنتزکننده آلکالوئیدهای گیاه خشخاش مانند بیان ژن‌های *CYP80B1*، *CNMT*، *6OMT*، *TYDC* و *4OMT* با محرک قارچی تحریک شده و به دنبال آن میزان سنگوئینارین افزایش یافت (Facchini and Park 2003).

مطالعه نحوه تنظیم مسیرهای بیوسنتزی و شناسایی عوامل تاثیرگذار در افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه از گام‌های مهم در جهت مهندسی متابولیت می‌باشد که استفاده از محرک‌ها یکی از روش‌های مؤثر است. در این راستا اثر غلظت‌های مختلف نانودی اکسید تیتانیوم به همراه سه عامل تعداد دوره محلول پاشی، مدت زمان پس از محلول پاشی و نیز اندام گیاهی در تغییر الگوی بیان ژن‌های مسیر بیوسنتزی سنگوئینارین گیاه مامیران کبیر مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از نانوذرات دی اکسید تیتانیوم (TiO_2) با میانگین اندازه ذرات ۲۵ نانومتر (Sigma-Aldrich) استفاده شد. سوسپانسیون TiO_2 در غلظت‌های مختلف (۱۰۰۰، ۵۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر) تهیه شد. برای تهیه سوسپانسیون TiO_2 از آب دیونیزه استفاده شد و به منظور پراکنده‌سازی (dispersion) سوسپانسیون، سونیکاسیون (160W, 35KHz) به مدت ۴۵ دقیقه انجام شد. لازم به ذکر است که برای جلوگیری از متراکم شدن مجدد ذرات، سوسپانسیون‌ها تا زمان استفاده روی همزن مغناطیسی قرار داده شدند.

بذور گیاه مامیران کبیر (*Chelidonium majus* L.) از موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور تهیه و در شرایط گلخانه (۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، دمای $25^{\circ}C$ روز و $20^{\circ}C$ شب) با ترکیب خاک با نسبت ۱ خاک: ۱ ماسه: ۱ خاکبرگ + کوکوپیت در قالب آزمایش فاکتوریل $3 \times 2 \times 4$ بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار کشت شد. فاکتورهای مورد بررسی شامل نانودی اکسید تیتانیوم در سه غلظت ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر به همراه تیمار شاهد (غلظت صفر)، فاکتور تعداد محلول پاشی در دو سطح (یک بار محلول پاشی و دو بار محلول پاشی) و فاکتور زمان پس از القای محرک در سه سطح ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بودند. محلول پاشی نانوذرات به گیاهچه‌های ۲۱ روزه به صورت

محلول پاشی و اثرات متقابل محلول پاشی‌ها \times غلظت‌ها، محلول پاشی‌ها \times زمان‌ها، غلظت‌ها \times زمان‌ها \times محلول پاشی‌ها نشان داد. معنی دار بودن اثرات متقابل عوامل مورد مطالعه دلالت بر عدم پاسخ یکسان و بیان متفاوت چهار ژن مسیر بیوستزی سنگوئینارین در غلظت‌های مختلف نانودی اکسید تیتانیوم و مرحله محلول پاشی و گذشت زمان پس از محلول پاشی دارد. هم‌چنین نتایج تجزیه واریانس آزمایش دوم (جدول ۳) حاکی از تاثیر سطوح مختلف غلظت نانودی اکسید تیتانیوم بر میزان بیان نسبی هر چهار ژن *MSH* و *BBE*، *P6H*، *STS* در اندام‌های مختلف گیاه مامیران کبیر بود و هر سه منبع تغییر غلظت نانوذره، اندام گیاهی و اثر متقابل اندام گیاهی در غلظت نانوذره در سطح احتمال یک درصد ($P \leq 0.01$) معنی دار شدند. مقایسه میانگین اندام‌های گیاهی از نظر بیان نسبی هر چهار ژن *BBE*، *P6H*، *STS* و *MSH* نشان داد که میزان بیان این ژن‌ها در سه اندام مختلف (ریشه، ساقه و برگ) گیاه مامیران متفاوت بود. با بررسی منحنی‌های تغییرات بیان ژنی اثر متقابل غلظت نانودی اکسید تیتانیوم و اندام گیاهی (شکل ۲)، در سه غلظت مختلف نانودی اکسید تیتانیوم، بیان ژن‌های *BBE* (شکل ۲-الف) *STS* (شکل ۲-ب)، *P6H* (شکل ۲-ج) و *MSH* (شکل ۲-د) در هر سه اندام مامیران نسبت به شاهد افزایش معنی داری پیدا کرد و بیش‌ترین میزان افزایش بیان در مورد هر چهار ژن مورد مطالعه در اندام ریشه مشاهده شد (شکل ۲).

مخلوط واکنش qRT-PCR شامل $5 \mu\text{l}$ از *2x RealQ Plus 2x* Master Mix Green (Ampliqon)، $1 \mu\text{l}$ نمونه cDNA، $0.5 \mu\text{l}$ از هر یک از آغازگر پیشرو و پسرو و $3 \mu\text{l}$ آب عاری از RNase بود که با آب مقطر استریل در حجم نهایی $10 \mu\text{l}$ میکرولیتر تهیه شدند. برنامه دمائی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به صورت پنج دقیقه در 94°C برای واسرشته‌سازی اولیه، 40 چرخه شامل 20 ثانیه در 94°C (واسرشته‌سازی)، 20 ثانیه در 58°C (اتصال آغازگرها) و 30 ثانیه در 72°C (بسط) و در نهایت افزایش دما برای ترسیم منحنی ذوب از 65 تا 95 درجه سلسیوس انجام گرفت. برای تمام نمونه‌ها هر واکنش RT-PCR، در چهار تکرار (دو تکرار بیولوژیک و دو تکرار تکنیکی) اجرا شد. میزان بیان نسبی ژن‌های مورد بررسی با استفاده از رابطه $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ (Pfaffl) (2001) محاسبه شدند. در نهایت تجزیه‌های آماری شامل تجزیه واریانس یک طرفه و مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن با استفاده از نرم‌افزار MSTAT-C و رسم نمودارها با نرم‌افزار Excel, ver 2010 انجام شد.

نتایج و بحث

تجزیه واریانس داده‌های مربوط به میزان بیان ژن‌های *STS*، *P6H*، *BBE* و *MSH* (جدول ۲) آزمایش اول در اندام برگ اختلاف معنی داری را در سطوح احتمال پنج و یک درصد ($0.05/0.01$) در منابع تغییر غلظت‌های نانودی اکسید تیتانیوم، مدت زمان پس از محلول پاشی، اثر متقابل غلظت‌ها \times زمان‌ها، دوره

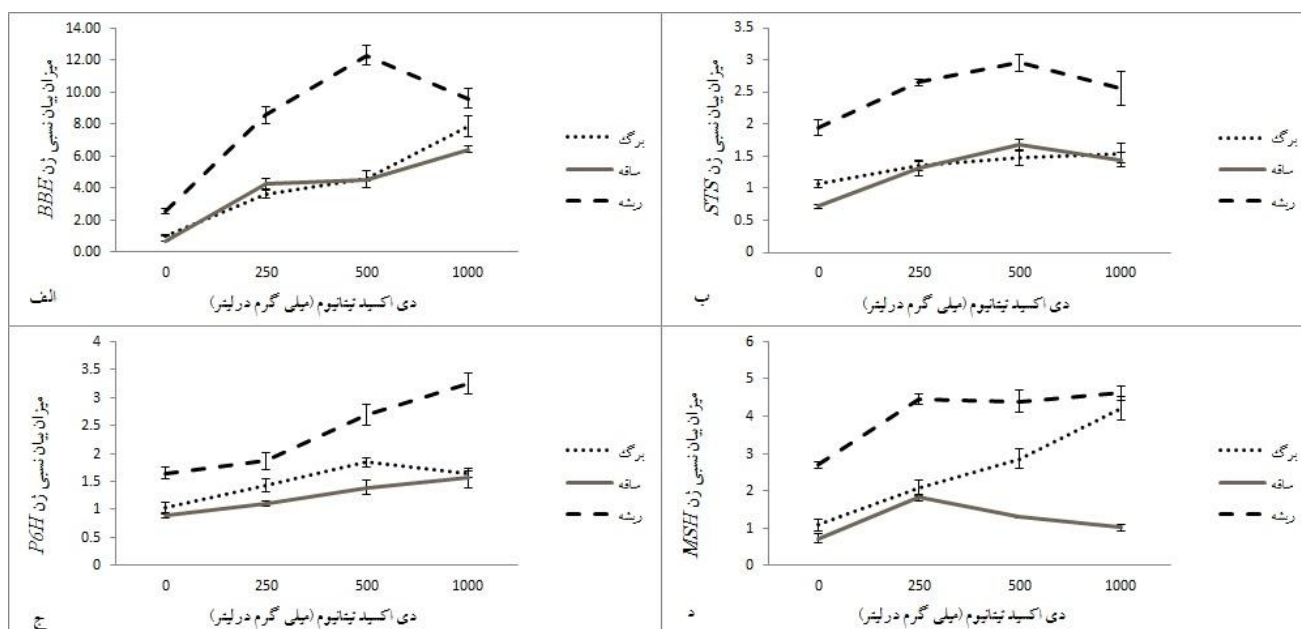
جدول ۱- مشخصات آغازگرها برای بررسی بیان نسبی ژن‌های مسیر بیوستز سنگوئینارین در مامیران کبیر با qRT-PCR

Gene	Accession number	Enzyme	Sequence (5'-3')	Tm (°C)	Amplicon length (bp)
<i>STS</i>	KY550671	Stylopine synthase	F: CTTCTCAACTACGGCATGGG R: TGCTAATGGTGCAATGGGTT	58	197
<i>MSH</i>	KX646397	methylstylopine 14- hydroxylase	F: GTACCCAGCAGGACCATTGA R: GCTCCCATCTCGTTGCATCT	58	121
<i>BBE</i>	KY595435	Berberin Bridge Enzyme	F: TGCCGAGAACCAAGGAAGAG R: CCCAAGCTGTTTCCGAGTCT	58	189
<i>P6H</i>	KY783479	Protopine 6-hydroxylase	F: GCCCTGCCTTACAATGAA R: TCTTTCTAAGCTCGCGCCAA	58	198
<i>Actin</i>	XM_016623745	Actin	F: GCGACGGTGTCTCACATACA R: GCGACAATTTCCCGTTTCAG	58	164

جدول ۲- تجزیه واریانس میزان بیان نسبی ژن‌های مسیر بیوستتزی سنگوئینارین در برگ مامیران کبیر تحت محلول پاشی نانو دی اکسید تیتانیوم در زمان‌های مختلف.

میانگین مربعات (MS)				منابع تغییر (S.O.V)	درجه آزادی (df)
<i>MSH</i>	<i>BBE</i>	<i>P6H</i>	<i>STS</i>		
۷۸۵ ^{oo}	۲۶۶۴ ^{oo}	۱۳۷۶ ^{oo}	۹۰۶ ^{oo}	۳	غلظت نانو ذره
۲۷ ^{oo}	۲۱۷ ^{oo}	۸۶۴ ^{oo}	۳۰۳ ^{oo}	۲	زمان
۱/۹۵ ^{oo}	۱۶/۹۸ ^{oo}	۲/۲۳ ^{oo}	۰/۷۶ ^{oo}	۶	غلظت × زمان
۰/۰۵ ^{ns}	۰/۰۰۰ ^{ns}	۰/۸۷ ^{oo}	۳۷ ^{oo}	۱	محلول پاشی
۰/۲۶ ^o	۲۶/۵۶ ^{oo}	۰/۸۳ ^{oo}	۱/۱ ^{oo}	۳	محلول پاشی × غلظت
۵/۹۵ ^{oo}	۱۹/۴۳ ^{oo}	۲/۰۰۷۸	۱/۳۴ ^{oo}	۲	محلول پاشی × زمان
۲/۹۴ ^{oo}	۹/۸۲ ^{oo}	۱/۲۸ ^{oo}	۰/۹ ^{oo}	۶	غلظت × زمان × محلول پاشی
۰/۰۸۹	۰/۱۵۵	۰/۰۳۴	۰/۰۱۱	۷۲	خطای آزمایش
۹/۱	۶/۵۲	۸/۷۶	۵/۷۸		CV %

ns، * و **: به ترتیب اختلاف غیر معنی دار و اختلاف معنی دار در سطوح احتمال پنج و یک درصد ($P \leq 0/05, 0/01$)



شکل ۲- منحنی تغییرات بیان نسبی ژن‌های الف) *BBE*، ب) *STS*، ج) *P6H* و د) *MSH* در اندام‌های مختلف مامیران کبیر تحت غلظت‌های مختلف نانو دی اکسید تیتانیوم.

گیاهان خانواده خشخاش مانند *P. somniferum* (Facchini and De Luka 1995) و *P. bracteatum* (Rezaei et al. 2016) بیان ژن‌های مسیر بیوستتزی سنگوئینارین در ریشه بیشتر از ساقه و برگ است و این می‌تواند دلیلی بر تجمع بیشتر سنگوئینارین در ریشه گیاه مامیران باشد (Facchini and De Luka 1995). نتایج مطالعات مختلف در خشخاش و شقایق کالیفرنیا نیز نشان می‌دهند که سنگوئینارین در ریشه این گیاهان تجمع می‌یابد که این به دنبال

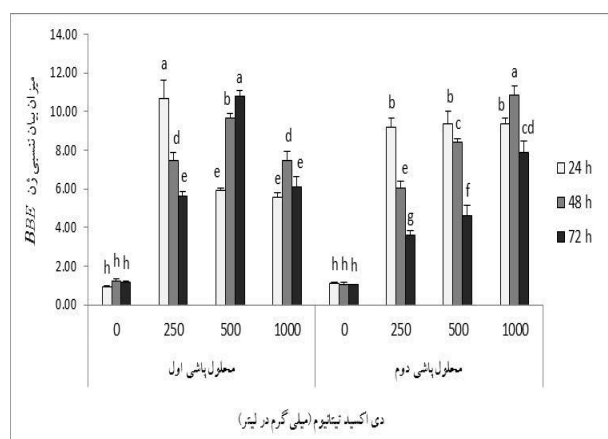
به عبارتی بیان ژن‌های *MSH*، *BBE*، *STS* و *P6H* در ریشه بیشتر از ساقه و برگ بود. میزان تجمع رونوشت‌های *STS* و *P6H* در ریشه نسبت به برگ و ساقه دو الی سه برابر و رونوشت ژن‌های *MSH* و *BBE* در ریشه چهار برابر ساقه بودند. بنابراین از آنجایی که رونوشت این ژن‌ها بیشترین انباشتگی را در ریشه مامیران دارند، تأیید کننده این مطلب است که در مامیران کبیر نیز همانند دیگر گیاهان دارای آلکالوئیدهای بنزوفنانتیریدین و دیگر

تحریک ژنهای *STS*، *BBE*، *P6H* در سوسپانسیون سلولی و گیاهچه *E. californica* و خشخاش در حضور ایستورهای زیستی (*Botrytis Cinerea* و مخمر) و محرکهای غیر زیستی (متیل جاسمونات) مبین تاثیرگذاری elicitation در بیان ژنهای بیوسنکننده آلکالوئیدها می باشد (Alcantara et al. 2005; Dittrich and Kutchan 1991)؛ که در توافق با چنین نتایجی، تاثیر مثبت نانو دی اکسید تیتانیوم بر بیان این ژنها در مامیران نیز مشاهده شد و نیز مشخص می شود که میزان تجمع رونوشت ژنهای مذکور در طی رشد و نمو تغییر می کند. علاوه بر این، افزایش بیان ژنهای مورد بررسی در پاسخ به TiO_2 نشان از تنظیم مشترک این ژنها دارد.

جدول ۳- تجزیه واریانس میزان بیان نسبی ژنهای مسیر بیوسنتزی سنگوئینارین در اندامهای مختلف مامیران کبیر تحت محلول پاشی نانو دی اکسید تیتانیوم.

میانگین مربعات (MS)				درجه آزادی (df)	منابع تغییر (S.O.V)
<i>MSH</i>	<i>BBE</i>	<i>P6H</i>	<i>STS</i>		
۷/۱۵ ^{oo}	۱۰/۱۶ ^{oo}	۲/۳۷ ^{oo}	۱/۳۸ ^{oo}	۳	غلظت نانوذره
۳۲/۱۵ ^{oo}	۹۲/۷ ^{oo}	۵/۶۴ ^{oo}	۷/۷۹ ^{oo}	۲	اندام گیاهی
۲/۰۱ ^{oo}	۱۰/۶ ^{oo}	۰/۳۳ ^{oo}	۰/۰۹۲ ^{oo}	۶	غلظت × اندام
۰/۰۳۴	۰/۱۶	۰/۰۱۶	۰/۰۱۶	۳۶	خطای آزمایش
CV %					
۷/۱۱	۷/۳	۷/۵	۷/۲۶		

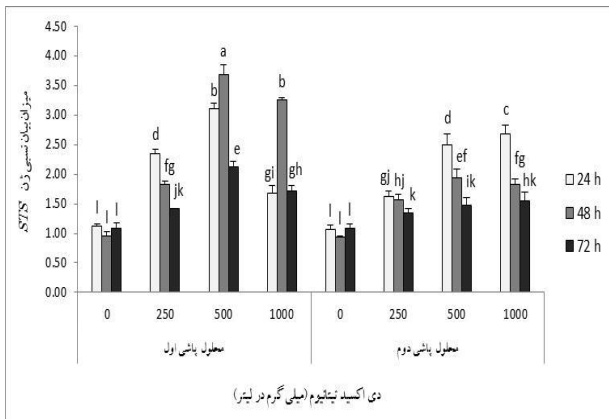
***: اختلاف معنی دار در سطح احتمال یک درصد ($P \leq 0.01$).



شکل ۳- مقایسه میانگین و الگوی تغییرات بیان نسبی ژن *BBE* در برگ مامیران کبیر تحت غلظت‌های مختلف نانو دی اکسید تیتانیوم در زمان‌های مختلف پس از محلول پاشی.

تجمع مقادیر قابل ملاحظه‌ای از رونوشت ژنهای *STS* (Verma et al. 2014)، *BBE* (Hagel et al. 2013)، *MSH* (Beaudoin and Facchini 2013) و *P6H* (Blechert et al. 1995) اتفاق می افتد؛ بنابراین ژنهای مسیر بیوسنتزی سنگوئینارین دارای سیستم بیانی بافت اختصاصی (Tissue-specific) می باشند.

بر اساس مقایسه میانگین اثر متقابل، ریشه در هر سه غلظت مختلف نانودی اکسید تیتانیوم به طوری معنی داری نسبت به سایر میانگین‌ها بیشترین میزان بیان را در هر چهار ژن مورد مطالعه نشان داده و در کلاس گروه بندی a، b و c قرار گرفتند. از سوی دیگر با افزایش غلظت نانودی اکسید تیتانیوم از ۵۰۰ به ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر، میزان افزایش بیان ژنهای مسیر سنگوئینارین بطئی و در مورد برخی ژنها و اندامها کاهش بیان (ژنهای *BBE* (شکل ۲-الف) و *STS* (شکل ۲-ب) در اندام ریشه و ژنهای *STS* (شکل ۲-ب)، و *MSH* (شکل ۲-د) در اندام ساقه) مشاهده شد. از منحنی‌های مشاهده شده (شکل ۲) می توان این گونه استنباط نمود که غلظت‌های پائین و متوسط نانودی اکسید تیتانیوم به عنوان شوک‌های مناسب محرکی می توانند موجب افزایش بیان ژنهای مسیر بیوسنتزی سنگوئینارین و به تبع آن افزایش سنتز سنگوئینارین شود. در مجموع هر سه اندام مورد مطالعه، غلظت ۵۰۰ میلی گرم در لیتر نانودی اکسید تیتانیوم به ترتیب موجب افزایش ۶۳، ۶۶، ۵۰۰ و ۹۱ درصدی در بیان ژنهای *STS*، *P6H*، *BBE* و *MSH* نسبت به تیمار شاهد شد. در تایید نتایج به دست آمده، Facchini and Park (2003) افزایش میزان آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولین در کشت سلولی خشخاش که با محرک قارچی القاء شده بود را در نتیجه فعال شدن تمام ژنهای شناخته شده در بیوسنتز S-reticulin و سنگوئینارین در سطح رونویسی گزارش کرده اند. لازم به ذکر است که نقش مهم S-reticulin به عنوان ترکیب حدواسط در نقطه انشعاب مرکزی در بیوسنتز آلکالوئیدها مبین این است که تنظیم آنزیم‌های نقطه انشعاب مانند *BBE* دارای نقشی کلیدی در کنترل و تجمع سنگوئینارین در گیاهان مربوطه است (Facchini et al. 1996). همانگونه که از شکل ۲ نیز استنباط می شود کلیه ژنهای مورد بررسی در پاسخ به محرک تحریک شدند (هر چند غلظت محرک در این مورد عاملی مهم و تاثیرگذار تلقی می شود). القاء و



شکل ۴- مقایسه میانگین و الگوی تغییرات بیان نسبی ژن *STS* در برگ مامبران کبیر تحت غلظت‌های مختلف نانو دی‌اکسید تیتانیوم در زمان‌های مختلف پس از محلول‌پاشی.

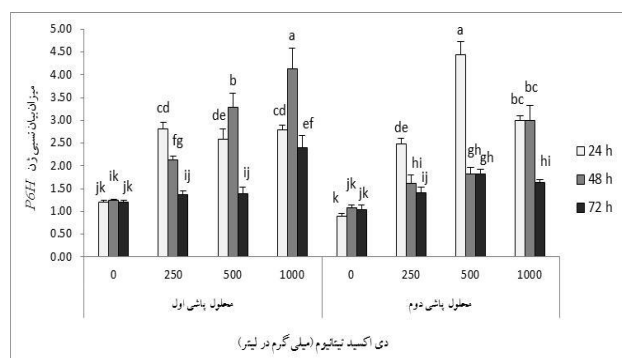
مقایسه میانگین اثر متقابل سه جانبه و روند تغییرات بیان ژن *STS* در برگ در شکل ۴ نشان داده شده است. بیش‌ترین (گروه a و b) میزان بیان ژن *STS* در برگ در ترکیب‌های تیماری ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانودی‌اکسید تیتانیوم در محلول‌پاشی اول در ۴۸ و ۲۴ ساعت پس از محلول‌پاشی و ۱۰۰۰ میلی‌گرم نانودی‌اکسید تیتانیوم در محلول‌پاشی اول و ۴۸ ساعت پس از محلول‌پاشی مشاهده شد. روند تغییرات بیان ژن *STS* در برگ (شکل ۴) نشان داد که در هر سه غلظت نانودی‌اکسید تیتانیوم در هر دو مرحله محلول‌پاشی میزان بیان از ۲۴ ساعت پس از محلول‌پاشی به سمت ۷۲ ساعت پس از محلول‌پاشی روند کاهشی معنی‌داری دارد. نتایج مقایسه میانگین بیان ژن *STS* در اندام برگ نشان داد که محلول‌پاشی اول نسبت به محلول‌پاشی دوم، زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت نسبت به ۷۲ ساعت پس از محلول‌پاشی و غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانودی‌اکسید تیتانیوم نسبت به سایر غلظت‌ها و تیمار شاهد با اختلاف معنی‌داری باعث افزایش بیان ژن *BBE* شدند. این نتایج در توافق با مطالعه (Alcantara et al. 2005) مبنی بر تحریک بیان ژن *BBE* در خشخاش در پاسخ به محرک قارچی *Botrytis cinerea* می‌باشد؛ به طوری که پس از حداکثر شدن میزان بیان ژن *BBE* در کشت سلولی خشخاش نسبت به نمونه‌های شاهد در ۵۰ ساعت پس از القاء، روند نزولی در میزان بیان ژن گزارش شده است. در مطالعه‌ای مشابه در *E. californica* گزارش شده است که میزان بیان *BBE* پس از یک تاخیر، در ۱۶ ساعت پس از القاء با محرک قارچی به افزایش هفت برابری نسبت به شاهد رسید (Dittrich and Kutchan 1991). در آزمایش (2015) Khodayari et al. نیز حداکثر بیان ژن *BBE* در زمان ۴۸ ساعت پس از القای نانودی‌اکسید تیتانیوم مشاهده شد. Liscombe and Facchini (2007) نیز حداکثر بیان ژن *BBE* را ۱۰ ساعت پس از القای محرک گزارش کردند و اعلام نمودند که بیان ژن *BBE* می‌تواند متناسب با نوع و مقدار محرک متغیر باشد.

مقایسه میانگین اثر متقابل سه جانبه و روند تغییرات بیان ژن *P6H* در اندام برگ (شکل ۵) نشان داد که بیش‌ترین بیان ژن در ترکیب‌های تیماری ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانودی‌اکسید تیتانیوم در محلول‌پاشی اول در ۴۸ ساعت پس از محلول‌پاشی و ۲۵۰

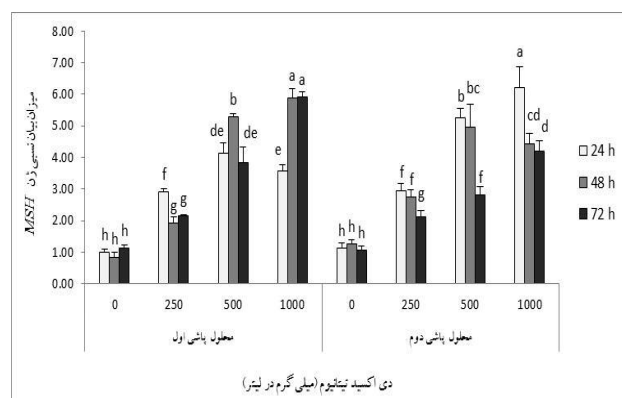
بر اساس مقایسه میانگین اثر متقابل سه جانبه غلظت نانوذره × مرحله محلول‌پاشی × زمان پس از محلول‌پاشی (شکل ۳)، بیش‌ترین (گروه a) میزان بیان ژن *BBE* در اندام برگ در ترکیب‌های تیماری ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر نانودی‌اکسید تیتانیوم در محلول‌پاشی اول و ۲۴ ساعت پس از محلول‌پاشی، غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانودی‌اکسید تیتانیوم در محلول‌پاشی اول و ۷۲ ساعت پس از محلول‌پاشی، و غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانودی‌اکسید تیتانیوم در محلول‌پاشی دوم و ۴۸ ساعت پس از محلول‌پاشی مشاهده شد. روند تغییرات بیان ژن *BBE* در برگ (شکل ۳) نشان داد که در غلظت پائین نانودی‌اکسید تیتانیوم (۲۵۰ mg.L⁻¹) بیش‌ترین بیان در ۲۴ ساعت پس از محلول‌پاشی مشاهده شده و با گذشت زمان به ۴۸ و ۷۲ ساعت میزان بیان به طور معنی‌داری کاهش یافت. اما در غلظت بالای نانودی‌اکسید تیتانیوم (۱۰۰۰ mg.L⁻¹) افزایش بیان تا ۴۸ ساعت پس از محلول‌پاشی‌های اول و دوم مشاهده شده و سپس روند کاهشی در ۷۲ ساعت پس از محلول‌پاشی نشان داد. نتایج مقایسه میانگین بیان ژن *BBE* در اندام برگ نشان داد که زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت نسبت به ۷۲ ساعت پس از محلول‌پاشی و غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانودی‌اکسید تیتانیوم نسبت به سایر غلظت‌ها و تیمار شاهد با اختلاف معنی‌داری باعث افزایش بیان ژن *BBE* شدند. این نتایج در توافق با مطالعه (Alcantara et al. 2005) مبنی بر تحریک بیان ژن *BBE* در خشخاش در پاسخ به محرک قارچی *Botrytis cinerea* می‌باشد؛ به طوری که پس از حداکثر شدن میزان بیان ژن *BBE* در کشت سلولی خشخاش نسبت به نمونه‌های شاهد در ۵۰ ساعت پس از القاء، روند نزولی در میزان بیان ژن گزارش شده است. در مطالعه‌ای مشابه در *E. californica* گزارش شده است که میزان بیان *BBE* پس از یک تاخیر، در ۱۶ ساعت پس از القاء با محرک قارچی به افزایش هفت برابری نسبت به شاهد رسید (Dittrich and Kutchan 1991). در آزمایش (2015) Khodayari et al. نیز حداکثر بیان ژن *BBE* در زمان ۴۸ ساعت پس از القای نانودی‌اکسید تیتانیوم مشاهده شد. Liscombe and Facchini (2007) نیز حداکثر بیان ژن *BBE* را ۱۰ ساعت پس از القای محرک گزارش کردند و اعلام نمودند که بیان ژن *BBE* می‌تواند متناسب با نوع و مقدار محرک متغیر باشد.

ژن *MSH* از ۲۴ ساعت پس از محلول‌پاشی به سمت ۷۲ ساعت پس از محلول‌پاشی شیب کمتری داشته و حتی در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانودی‌اکسید تیتانیوم در محلول‌پاشی اول در ۷۲ ساعت پس از محلول‌پاشی افزایش بیان معنی‌داری هم نشان داد. نتایج مقایسه میانگین بیان ژن *MSH* در اندام برگ نشان داد که محلول‌پاشی اول نسبت به محلول‌پاشی دوم بدون اختلاف معنی‌دار، ولیکن زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت نسبت به ۷۲ ساعت پس از محلول‌پاشی و غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانودی‌اکسید تیتانیوم نسبت به سایر غلظت‌ها و تیمار شاهد با اختلاف معنی‌داری باعث افزایش بیان ژن *MSH* شده‌اند. در توافق با نتایج این تحقیق، در آزمایش (Khodayari et al. (2015 نیز در سوسپانسیون‌های ریشه و مریستم تیمار شده با نانودی‌اکسید تیتانیوم تغییرات بیانی برای سایر ژن‌های (*DIOX2*, *DBOX*) و (*TYDC7*) مسیر سنتزی سنگوئینارین مشاهده شد. به‌طوری که در شش ساعت اول تمام ژن‌ها افزایش بیان نسبت به شاهد را نشان دادند و پس از گذشت ۴۸ ساعت کاهش معنی‌داری در بیان تمام ژن‌ها به‌جز ژن *DBOX* مشاهده شده و در ۱۶۸ ساعت تمام ژن‌ها بیان پایین‌تری در تیمار با نانودی‌اکسید تیتانیوم در مقایسه با تیمار شاهد نشان دادند. همچنین در آزمایش این محققان مشخص شد در بازه زمانی صفر تا ۱۶۸ ساعت، ژن *TYDC7* کم‌ترین تغییر بیان و ژن *BBE* بیش‌ترین تغییرات بیان را نشان دادند، که این نتایج هم‌راستا با نتایج این آزمایش در حداکثر بودن واریانس بیان در ژن *BBE* در اندام ریشه در فاصله زمانی صفر تا ۷۲ ساعت بود. نتایج به‌دست آمده از این تحقیق نشان داد نانو ذراتی مانند دی‌اکسید تیتانیوم می‌تواند بیان ژن آنزیم‌های مسیر بیوسنتزی آلکالوئید سنگوئینارین در مامیران کبیر (*Chelidonium majus* L.) را تحت تاثیر قرار داده و سبب افزایش بیان این ژن‌ها شود بنابراین امید است اطلاعات به‌دست آمده بتواند در زمینه تلاش برای افزایش سنگوئینارین مفید واقع شود. البته با توجه به پیچیده بودن مسیرهای بیوسنتزی آلکالوئیدها، بررسی بیان ژن سایر آنزیم‌ها و نیز اثر متقابل آن‌ها می‌تواند مورد توجه قرار گیرد.

میلی‌گرم در لیتر نانودی‌اکسید تیتانیوم در محلول‌پاشی دوم و ۲۴ ساعت پس از محلول‌پاشی مشاهده شد.



شکل ۵- مقایسه میانگین و الگوی تغییرات بیان نسبی ژن *P6H* در برگ مامیران کبیر تحت غلظت‌های مختلف نانودی‌اکسید تیتانیوم در زمان‌های مختلف پس از محلول‌پاشی.



شکل ۶- مقایسه میانگین و الگوی تغییرات بیان نسبی ژن *MSH* در برگ مامیران کبیر تحت غلظت‌های مختلف نانودی‌اکسید تیتانیوم در زمان‌های مختلف پس از محلول‌پاشی.

همانند ژن *STS*، روند تغییرات بیان ژن *P6H* در برگ (شکل ۵) نشان داد که در هر سه غلظت نانودی‌اکسید تیتانیوم و هر دو مرحله محلول‌پاشی میزان بیان از ۲۴ ساعت پس از محلول‌پاشی به سمت ۷۲ ساعت پس از محلول‌پاشی روند کاهشی معنی‌داری دارد. نتایج مقایسه میانگین برای بیان ژن *P6H* در اندام برگ نشان داد که محلول‌پاشی اول نسبت به محلول‌پاشی دوم، زمان ۲۴ ساعت نسبت به ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از محلول‌پاشی و غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانودی‌اکسید تیتانیوم نسبت به سایر غلظت‌ها و تیمار شاهد با اختلاف معنی‌داری باعث افزایش بیان ژن *P6H* شدند.

روند تغییرات بیان ژن *MSH* در اندام برگ (شکل ۶) تا حدودی با سه ژن دیگر متفاوت بوده و مشاهده شد که میزان کاهش بیان

منابع

- Alcantara J, Bird DA, Franceschi VR, Facchini PJ (2005) Sanguinarine biosynthesis is associated with the endoplasmic reticulum in cultured opium poppy cells after elicitor treatment. *Plant Physiology* 138:173-83.
- Bandarian F, Omodi M, Torabi S (2013) The effect of nano-elicitors on alkaloid production of *Papaver somniferum* in suspension cell culture. M.Sc. thesis. Azad University of Tehran (In Farsi).
- Beaudoin, GAW, and Facchini P J (2013) Isolation and characterization of a cDNA encoding (S)-cis-N-methylstylopine 14-hydroxylase from opium poppy, a key enzyme in sanguinarine biosynthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 431:597-603.
- Blechert S, Brodschelm W, Holder S, Kammerer L, Kutchan TM, Mueller MJ, Xia ZQ, Zenk MH (1995) The octadecanoic pathway: signal molecules for the regulation of secondary pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92:4099-105.
- Chavez ML, Rolf M, Gesell A, Kutchan TM (2011) Characterization of two methylenedioxy bridge-forming cytochrome P450-dependent enzymes of alkaloid formation in the Mexican prickly poppy *Argemone mexicana*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 507:186-93.
- Colombo ML, Bosisio E (1996) Pharmacological activities of *L. (papaveraceae)*. *Pharmacological Research* 33:127-34.
- Dittrich H, Kutchan TM (1991) Molecular cloning, expression, and induction of berberine bridge enzyme, an enzyme essential to the formation of benzophenanthridine alkaloids in the response of plants to pathogenic attack. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88:9969-73.
- Facchini PJ, Penzes C, Johnson AG, Bull D (1996) Molecular characterization of berberine bridge enzyme genes from opium poppy. *Plant Physiology* 112:1669-77.
- Facchini PJ, De Luca V (1995) Phloem-specific expression of tyrosine/dopa decarboxylase genes and the biosynthesis of isoquinoline alkaloids in opium poppy. *The Plant Cell* 7:1811-21.
- Facchini PJ, Park SU (2003) Developmental and inducible accumulation of gene transcripts involved in alkaloid biosynthesis in opium poppy. *Phytochemistry* 64:177-86.
- Facchini PJ, Penzes C, Johnson AG, Bull D (1996) Molecular characterization of berberine bridge enzyme genes from opium poppy. *Plant Physiology* 112:1669-77.
- Ganan NA, Dias AM, Bombaldi F, Zygadlo JA, Brignole EA, De Sousa HC, Braga ME (2016) Alkaloids from *Chelidonium majus* L.: Fractionated supercritical CO₂ extraction with co-solvents. *Separation and Purification Technology* 165:199-207.
- Ghanati F, Bakhtiarian S (2014) Effect of methyl jasmonate and silver nanoparticles on production of secondary metabolites by *Calendula officinalis* L. (Asteraceae). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 13:1783-9.
- Hagel JM, Beaudoin GA, Fossati E, Ekins A, Martin VJ, Facchini PJ (2012) Characterization of a flavoprotein oxidase from opium poppy catalyzing the final steps in sanguinarine and papaverine biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* 287:42972-83.
- Hagel JM, Facchini PJ (2009) Dioxygenases catalyze the O-demethylation steps of morphine biosynthesis in opium poppy. *Nature Chemical Biology* 6:273.
- Ikezawa N, Iwasa K, Sato F (2007) Molecular cloning and characterization of methylenedioxy bridge forming enzymes involved in stylopine biosynthesis in *Eschscholzia californica*. *The FEBS Journal* 274:1019-35.
- Ikezawa N, Iwasa K, Sato F (2009) CYP719A subfamily of cytochrome P450 oxygenases and isoquinoline alkaloid biosynthesis in *Eschscholzia californica*. *Plant Cell Reports* 28:123-33.
- Kemeny-Beke A, Aradi J, Damjanovich J, Beck Z, Facsko A, Berta A, Bodnar A (2006) Apoptotic response of uveal melanoma cells upon treatment with chelidonine, sanguinarine and chelerythrine. *Cancer Letters* 237:67-75.
- Khodayari M, Omid M, Shahnejat-booshehri A, Yazdani D, Naghavi M (2015) Gene expression involved in sanguinarine biosynthesis affected by nano elicitors in *Papaver somniferum*. *Journal of Medicinal Plants* 2: 41-54 (In Farsi).
- Li J, Lee EJ, Chang L, Facchini PJ (2016) Genes encoding norcoclaurine synthase occur as tandem fusions in the Papaveraceae. *Scientific Reports* 6:39256.
- Liscombe DK, Facchini PJ (2007) Molecular cloning and characterization of tetrahydroprotoberberine cis-N-methyltransferase, an enzyme involved in alkaloid biosynthesis in opium poppy. *Journal of Biological Chemistry* 282:14741-51.
- Raei M, Angaji SA, Omid M, Khodayari M (2014) Effect of abiotic elicitors on tissue culture of *Aloe vera*. *International Journal of Biosciences* 5:74-81.
- Rezaei M, Naghavi MR, Hosseinzadeh AH, Abbasi AR (2016a) Study the expression of genes involved in morphinan alkaloids biosynthesis and corresponding metabolites in *Papaver somniferum*. *Modern Genetics Journal* 11: 229-236 (In Farsi).
- Shakya P, Marslin G, Siram K, Beerhues L, Franklin G (2017) Elicitation as a tool to improve the profiles of high value secondary metabolites and pharmacological properties of *Hypericum perforatum*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 1-13.
- Takemura T, Ikezawa N, Iwasa K, Sato F (2013) Molecular cloning and characterization of a cytochrome P450 in sanguinarine biosynthesis from *Eschscholzia californica* cells. *Phytochemistry* 91:100-8.
- Takemura T, Ikezawa N, Iwasa K, Sato F (2010) Metabolic diversification of benzyloquinoline alkaloid biosynthesis through the introduction of a branch pathway in *Eschscholzia californica*. *Plant and Cell Physiology* 51:949-59.
- Verma P, Khan SA, Mathur AK, Ghosh S, Shanker K, Kalra A (2014) Improved sanguinarine production via biotic and abiotic elicitation and precursor feeding in cell suspensions of latex-less variety of *Papaver somniferum*

with their gene expression studies and upscaling in bioreactor. *Protoplasma* 251: 1359-71.
Zhang B, Zheng LP, Yi Li W, Wen Wang J (2013) Stimulation of artemisinin production in *Artemisia annua*

hairy roots by Ag-SiO₂ core-shell nanoparticles. *Current Nanoscience* 9:363-70.