

تأثیر نانوذرات روی و تیتانیوم بر بیان ژن‌های فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) و سینامیل الکل دهیدروژناز (CAD) در کشت سلولی گیاه کتان (*Linum usitatissimum*)

The effects of nano-ZnO and nano-TiO₂ on expression of
Phenylalanine ammonia lyase (PAL) and Cinnamyl alcohol
dehydrogenase (CAD) genes in cell culture of *Linum usitatissimum*
L.

فاطمه کریمزاده^۱، رحیم حداد^{۱*}، قاسمعلی گروسی^۱

۱- به‌ترتیب کارشناسی ارشد، دانشیاران، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)

Karimzadeh F¹, Haddad R^{*1}, Garoosi Gh¹

1- MSc, Associate Professors, Biotechnology Department, Imam Khomeini
International University (IKIU), Qazvin, IR of Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: r.haddad@ENG.ikiu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۷/۰۸/۲۷ - تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۳/۲۶)

چکیده

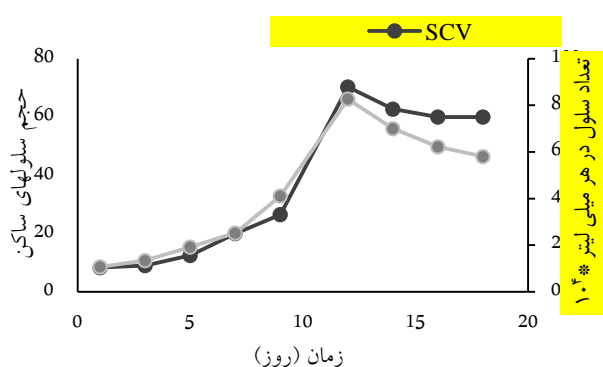
گیاه کتان (*Linum usitatissimum* L) به‌عنوان یک محصول زراعی مهم و منبعی غنی از اسیدهای چرب مفید، پروتئین، فیبر غذایی و لیگنان‌ها شناخته شده‌است. لیگنان‌ها گروه مهمی از متابولیت‌های ثانویه هستند که به‌عنوان ترکیبات آنتی‌اکسیدان، فعالیت‌های بیولوژیکی مهمی مانند اثرات ضد سرطانی در بدن انسان دارند. در این مطالعه بیان ژن‌های فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) و سینامیل الکل دهیدروژناز (CAD) در مسیر بیوسنتز لیگنان‌ها تحت تأثیر نانوذرات روی و تیتانیوم در کشت سلولی کتان مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار جهت بررسی تأثیر نانوذرات روی و تیتانیوم طراحی شد. نانوذرات اکسید روی در غلظت صفر، ۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ میلی‌گرم بر لیتر و اکسید تیتانیوم در غلظت صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر به کشت‌های سلولی اضافه شدند. سپس به‌منظور بررسی بیان ژن‌ها به‌وسیله Real-Time PCR، نمونه‌برداری از کشت‌های سلولی، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد انجام شد. بیش‌ترین میزان بیان ژن PAL در دو غلظت ۳۰ و ۶۰ میلی‌گرم بر لیتر و کم‌ترین آن در غلظت ۱۲۰ mg/L نانوذره روی مشاهده شد. نانو ذره تیتانیوم بر روی بیان ژن PAL تأثیر معنی‌داری نداشت ولی باعث افزایش بیان CAD در غلظت ۱۵۰ mg/L در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ شد. بیان CAD تحت تأثیر نانوذره روی در غلظت ۶۰ mg/L در همه بازه‌های زمانی افزایش یافت و در غلظت ۱۲۰ mg/L نانوذره روی، کاهش میزان بیان این ژن مشاهده شد. به‌طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که نانوذره روی در افزایش بیان هر دو ژن PAL و CAD مؤثر است در صورتی که نانوذره تیتانیوم تنها در تغییر بیان ژن CAD مؤثر بوده و تأثیری در بیان ژن PAL نداشته است.

واژه‌های کلیدی

بیان ژن
سینامیل الکل دهیدروژناز
فنل آلانین آمونیالیاز
کتان
کشت سلولی
نانوذرات

آرتمیزین در گیاه درمنه در اثر استفاده از نانوذره کبالت در محیط کشت سلولی گیاه درمنه افزایش یافت (Ghasemi et al. 2015). با توجه به اهمیت استفاده از محرک‌ها در جهت افزایش متابولیت‌های ثانویه و به علت اهمیت کتان به عنوان یک منبع مهم از لیگنان‌ها و مؤثر بودن ژن‌های *PAL* و *CAD* در مسیر بیوسنتز لیگنان‌ها، لذا در این تحقیق سعی شد تا میزان بیان ژن‌های *PAL* و *CAD* در مسیر بیوسنتز لیگنان‌ها توسط نانوذرات روی و تیتانیوم در کشت سلولی کتان مورد ارزیابی قرار گیرد.

بذور گیاه کتان (وارسته شهدا کرمان) پس از ضدعفونی در محیط جامد MS کشت و در انکوباتور نگهداری شدند. ریزنمونه‌های مختلف جهت کالوس‌زایی در محیط کشت جامد MS حاوی mg/L ۲ بنزیل-آدنین (BAP) و ۱ mg/L نفتالین استیک اسید (NAA) کشت و در تاریکی در دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار داده شدند. به منظور تولید کشت سوسپانسیون سلولی، کالوس‌های ترد و نرم انتخاب شدند سپس در محیط MS مایع با همان ترکیب هورمونی محیط جامد کشت و در انکوباتور شیکردار (با سرعت چرخش ۱۰۰ دور در دقیقه) تحت شرایط دمایی 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. منحنی رشد سلولی با اندازه‌گیری صفاتی مانند تعداد سلول در هر میلی‌لیتر محیط کشت و حجم ایستابی سلول‌ها (SCV) هر دو روز یکبار به دست آمد (شکل ۱).



شکل ۱ - منحنی رشد کشت سلولی کتان *Linum usitatissimum* ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP

به منظور تهیه سوسپانسیون نانوذرات، پودر نانوذرات به شیشه استوک حاوی آب دیونیزه منتقل و با استفاده از دستگاه

کتان (*Linum usitatissimum*) گیاهی یکساله، علفی و متعلق به خانواده لپناسه می‌باشد که به طور عمومی به عنوان دانه روغنی شناخته می‌شود. این گیاه به علت دارا بودن آنتی‌اکسیدان‌های مهمی از قبیل لیگنان‌ها می‌تواند از رشد سلول‌های سرطانی جلوگیری نماید و نقش مهمی در مبارزه با انواع سرطان‌ها به ویژه سرطان‌های سینه، روده بزرگ و پروستات ایفا کند (Rajasha et al. 2006). لیگنان‌ها شاخه مهمی از ترکیبات فنیل پروپانویدی هستند و نقش مهمی در مقاومت گیاه در برابر تنش‌های محیطی و حمله پاتوژن‌ها بازی می‌کنند (Dixon et al. 2002). در مسیر بیوسنتز لیگنان‌ها ژن‌های زیادی وجود دارد. ژن *PAL* (فنیل آلانین آمونیلایز) کدکننده اولین آنزیم در مسیر بیوسنتز فنیل پروپانویدها است که منجر به تبدیل L-فنیل آلانین به ترانس سینامیک اسید می‌شود. سپس ترانس سینامیک اسید در چندین واکنش متوالی با فعالیت آنزیم‌های ۴ - کومارات کوآلیگاز (4CL) و سینامیل کوآ ردوکتاز (CCR) متابولیت‌های دیگری از جمله کانیرآلدئید تولید می‌نماید که این ترکیبات توسط سینامیل الکل دهیدروژناز (*CAD*) به فرم الکی خود تبدیل می‌شوند. جفت شدن واحدهای کانیریل الکل منجر به تولید پینوریزینول شده و به واسطه فعالیت پینولاریسی رزینول ردوکتاز (PLR)، لاریسی زینول و سپس سیسویسولاریسی زینول تولید می‌شود. سیسویسولاریسی زینول در جهت تشکیل سیسویسو لاریسی زینول دی گلیکوزید (SDG)، لیگنان اصلی حاضر در کتان، رسوب می‌کند (Boerjan et al. 2003). کشت‌های سلولی گیاهان دارویی از جمله تکنیک‌های جالبی هستند که برای افزایش تولید متابولیت‌های سودمند مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Murthy et al. 2014). استفاده از ایستورها در این کشت‌ها یک روش مهم جهت بهبود تولید متابولیت‌های ثانویه به شمار می‌رود. افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در اثر استفاده از نانوذرات به عنوان ایستور در چندین مورد گزارش شده است (Baenas et al. 2014). مقدار آلوین در اثر استفاده از نانوذرات دی اکسید تیتانیوم و نقره در کشت سلولی آلوئه ورا افزایش یافت (Raei et al. 2014). بررسی بیان ژن در گیاه آراییدوبسیس نشان داد که اکثر ژن‌های القا شده توسط نانوذرات روی، ژن‌های درگیر در پاسخ به ایستورهای زیستی و غیر زیستی هستند (Landa et al. 2012). میزان تولید

شامل ۷/۵ میکرولیتر مخلوط SYBR Green (Amplicon)، یک میکرولیتر آغازگر (۰/۵ میکرولیتر به ازای هر کدام از آغازگرهای رفت و برگشت)، ۵/۵ میکرولیتر آب دوبار تقطیر و یک میکرولیتر نمونه cDNA بود. برنامه دمایی استاندارد به کار برده شده برای همه واکنش‌ها به این صورت بود که مخلوط واکنش به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد، سپس برای ۳۵ چرخه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد (۵ ثانیه)، دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد (۲۰ ثانیه) و دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد (۳۰ ثانیه) حرارت داده شد. برای تمام نمونه‌ها هر واکنش در دو تکرار بیولوژیک و یا دو تکرار تکنیکی اجرا و از ژن *Actin* به عنوان ژن کنترل داخلی برای نرمال کردن نتایج حاصل از دستگاه استفاده شد (جدول ۱). مقدارهای Ct در همه نمونه‌ها تعیین و با استفاده از روش ارائه شده توسط Pfaffl (۲۰۰۱) تصحیح شدند (Pfaffl 2001). در نهایت داده‌های حاصله با استفاده از نرم افزار آماري SPSS (ver 16.0) مورد تجزیه قرار گرفت. مقایسه میانگین داده‌ها به روش آزمون دانکن ارزیابی و رسم نمودارها با نرم افزار Excel, ver 2013 انجام شد. نتایج تجزیه واریانس داده‌های مربوط به میزان بیان ژن *CAD* تحت تأثیر نانوذره تیتانیوم اختلاف معنی‌داری را در سطح احتمال یک درصد برای غلظت نانوذرات دی اکسید تیتانیوم، مدت زمان پس از اعمال نانوذره و اثر متقابل غلظت × زمان‌ها نشان داد. در حالیکه اثر ساده غلظت نانوذره تیتانیوم و اثر متقابل غلظت × زمان بر روی میزان بیان ژن *PAL* معنی‌دار نبود (جدول ۲).

اولتراسونیک به مدت ۳۰ دقیقه پراکنده و به مدت ۲۰ دقیقه در اتوکلاو استریل شدند. طرح آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا شد. فاکتور اول شامل زمان (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) و فاکتور دوم غلظت‌های مختلف نانوذرات روی (صفر، ۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ میلی‌گرم بر لیتر) و تیتانیوم (صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) بود که یازده روز پس از کشت به سوسپانسیون‌های سلولی اضافه و نمونه‌برداری ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از اعمال تیمار صورت گرفت.

استخراج RNA کل سلول‌های نمونه‌برداری شده از کشت‌های سلولی تیمار شده با غلظت‌های مختلف نانوذرات با استفاده از محلول کیت RNxPlus (شرکت سیناکلون، ایران) انجام گرفت. کمیت و کیفیت نمونه‌های RNA استخراج شده به ترتیب به وسیله دستگاه نانو دراپ (Thermo NanoDrop 1000, USA) و الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد (حجمی /حجمی) مورد بررسی قرار گرفت. از تیمار با آنزیم DNaseI (Fermentas) برای حذف آلودگی‌های احتمالی DNA ژنومی موجود در نمونه‌ها استفاده شد. سنتز cDNA با استفاده از آنزیم ترانس کریپتاز معکوس MMLV (Cat.No.: 28025-021) انجام شد. جهت طراحی آغازگرهای مورد استفاده در بررسی بیان ژن‌ها (جدول ۱) از نرم افزار Oligo5 استفاده شد. مقایسه کمی بیان ژن‌های *PAL* و *CAD* با استفاده از روش Real time PCR و دستگاه BIO-RAD-RT-PCR مدل CFD-3120 ساخت کشور آمریکا صورت گرفت. مخلوط واکنش PCR برای هر نمونه با حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر

جدول ۱- مشخصات آغازگرها در واکنش RT-PCR

ژن	توالی آغازگر 5'→3'	دمای اتصال (°C)	طول قطعه سنتز شده	منبع یا شماره دسترسی به ژن در NCBI
<i>Actine</i>	CCGGTGTATGGTTGGAAT (Forward)	51	153	(Preisner et al. 2014)
	TGTAGAAAGTGTGATGCCAAA (Reverse)	57		
<i>CAD</i>	GAGTTCTGCAAGGATGAAGGGT (Forward)	61	124	DQ487210
	CTGCAACATCAACCACGAACCT (Reverse)	61		
<i>PAL</i>	ATGGAGCATATTCTCGACGG (Forward)	55	121	(Wang et al. 2016)
	CTAGCCATTGAGCGAAGTC (Reverse)	61		

جدول ۲- تجزیه واریانس میزان بیان نسبی ژن‌های *PAL* و *CAD* در کشت سلولی گیاه کتان تحت تأثیر نانو دی اکسید تیتانیوم در زمان‌های مختلف.

میانگین مربعات (MS)		درجه آزادی	منابع تغییرات
<i>CAD</i>	<i>PAL</i>		
۲/۸ ^{**}	۰/۰۸۸ ^{ns}	۳	غلظت
۳/۰۱۹ ^{**}	۱/۲۰۸ [*]	۲	زمان
۱/۳۴ ^{**}	۰/۰۶۹ ^{ns}	۶	غلظت × زمان
۰/۱۵۵	۰/۰۹۸	۲۴	خطای آزمایش
۷/۷۶	۶/۰۵		CV

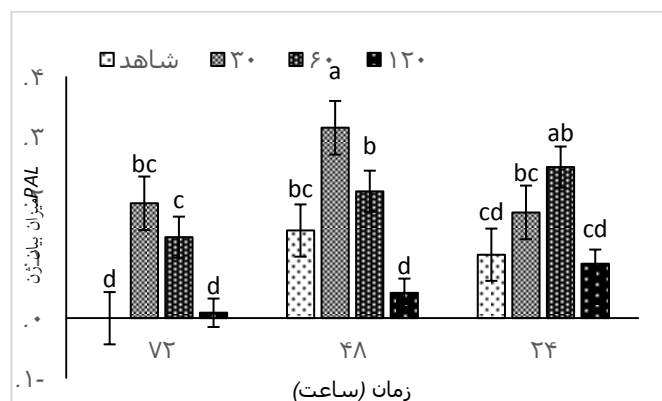
ns، * و **: به ترتیب اختلاف غیرمعنی دار و اختلاف معنی دار در سطوح احتمال پنج و یک درصد

جدول ۳- تجزیه واریانس میزان بیان نسبی ژن‌های *PAL* و *CAD* در کشت سلولی گیاه کتان تحت تأثیر نانو اکسید روی در زمان‌های مختلف.

میانگین مربعات (MS)		درجه آزادی	منبع تغییرات
<i>CAD</i>	<i>PAL</i>		
۲۷/۷۹ ^{**}	۲۳/۱ ^{**}	۳	غلظت
۱۹/۲۵۶ ^{**}	۱۲/۱۹ ^{**}	۲	زمان
۱۰/۷۸ ^{**}	۸/۰۲۳ ^{**}	۶	غلظت × زمان
۰/۰۶۲	۰/۰۲۱	۲۴	خطای آزمایش
۶/۵۲	۸/۶۷		CV

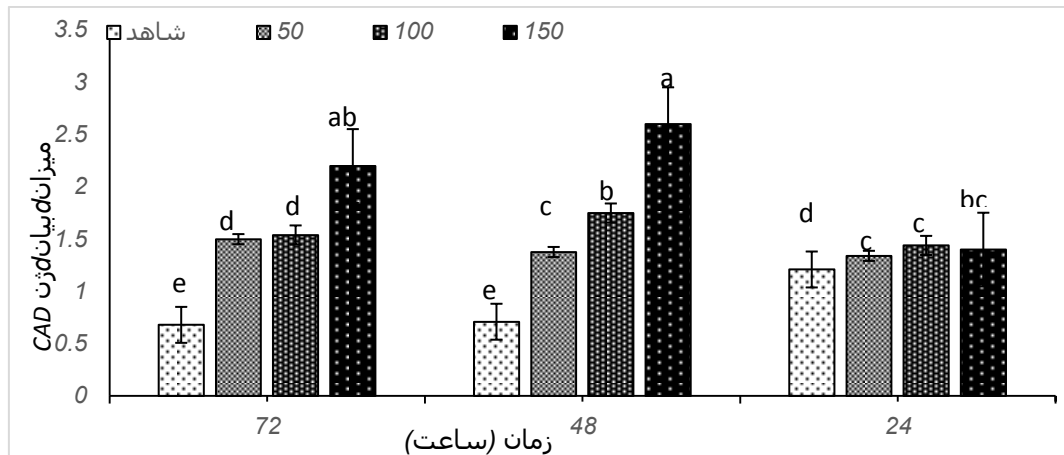
ns، * و **: به ترتیب اختلاف غیرمعنی دار و اختلاف معنی دار در سطوح احتمال پنج و یک درصد

به ترتیب ۵۳ و ۵۸ درصد افزایش را نشان داد. فعالیت *PAL* در غلظت ۱۲۰ mg/L نانوذره روی در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۱۴، ۶۹ و ۱۰۰ درصد کاهش یافت (شکل ۲). مقایسه میانگین میزان بیان ژن *CAD* نشان می‌دهد بیان ژن در غلظت ۱۵۰ mg/L در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ (به ترتیب ۷۲ و ۶۹ درصد افزایش نسبت به نمونه شاهد) دارای بیشترین میزان است (شکل ۳). میزان بیان *CAD* تحت تأثیر نانوذره روی در غلظت ۶۰ mg/L در سه بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۶۶، ۵۵ و ۸۲ درصد افزایش را نشان داده است. بیان *CAD* در غلظت ۱۲۰ mg/L نانوذره روی در بازه زمانی ۲۴ ساعت به میزان ۶۲، ۴۸ ساعت به میزان ۶۸ و ۷۲ ساعت به میزان ۶۷ درصد کاهش یافت (شکل ۴). روش‌های مختلفی برای بهبود تولید متابولیت‌های ثانویه دارویی به‌ویژه تولید کشت سوسپانسیون سلولی گیاهی شناخته شده است (Vasconsuelo and Boland 2007). در مطالعه حاضر، کشت‌های سلولی گیاه کتان واکنش‌های مختلفی به نانوذرات TiO₂ و ZnO نشان دادند. در مطالعه حاضر نانوذره تیتانیوم به رغم افزایش بیان ژن *CAD* در غلظت ۱۵۰ mg/L تأثیر معنی‌داری بر بیان ژن *PAL* نداشت.

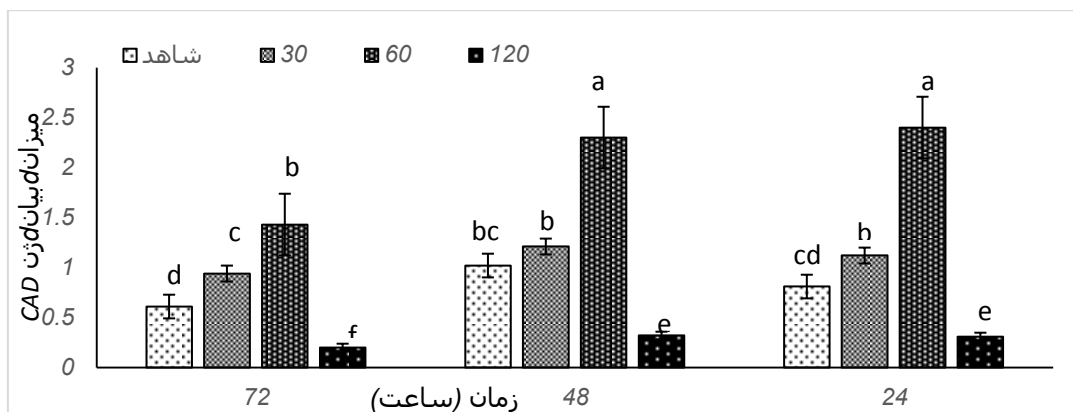


شکل ۲- تغییرات بیان ژن *PAL* در مسیر بیوسنتز لیگنان‌ها تحت تأثیر نانوذرات روی (در غلظت‌های صفر، ۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ میلی‌گرم در لیتر) در بازه‌های زمانی مختلف در کشت سلولی گیاه کتان (معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۱ درصد)

نتایج تجزیه واریانس آزمایش بررسی اثر نانوذره اکسید روی حاکی از تأثیر غلظت‌های مختلف نانو اکسید روی بر میزان بیان نسبی هر دو ژن *PAL* و *CAD* در زمان‌های مختلف بود و هر سه منبع تغییر غلظت نانوذره، زمان و اثر متقابل غلظت‌های نانوذره روی در زمان‌های مختلف در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شدند (جدول ۳). بیشترین تأثیر نانوذره روی بر افزایش بیان ژن *PAL* مربوط به غلظت‌های ۶۰ و ۳۰ mg/L به ترتیب در زمان‌های ۲۴ و ۷۲ ساعت بود که نسبت به تیمار شاهد در همان زمان‌ها



شکل ۳- تغییرات بیان ژن *CAD* در مسیر بیوسنتز لیگنان‌ها تحت تأثیر نانوذرات تیتانیوم (۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر) در بازه‌های زمانی مختلف در کشت سلولی گیاه کتان (معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۱ درصد)



شکل ۴- تغییرات بیان ژن *CAD* در مسیر بیوسنتز لیگنان‌ها تحت تأثیر نانوذرات روی (در غلظت‌های صفر، ۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ میلی‌گرم در لیتر) در بازه‌های زمانی مختلف در کشت سلولی گیاه کتان (معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۱ درصد)

اکسیژن واکنش‌گر، فعال سازی ژن‌های مربوط به دفاع، تغییرات ساختاری دیواره سلولی و سنتز فیتواکسین‌ها اتفاق می‌افتد. کم شدن بیان ژن *PAL* در غلظت ۱۲۰ mg/L ممکن است به علت سمیت نانوذره و تأثیر آن بر روی یکی از واسطه‌های فوق و کم شدن بیان ژن باشد (Siddiqui et al. 2015). آنزیم *PAL* به‌عنوان آنزیم آغازکننده نخستین مرحله در مسیر بیوسنتز فنیل پروپانویدها نقش ضروری در سازو کار دفاعی دارد و احتمالاً در افزایش جریان کربن به داخل این مسیر برای سنتز ترکیبات وابسته به تنش دفاعی فعالیت می‌کند (Ni et al. 1996). افزایش فعالیت *PAL* و دیگر آنزیم‌های مسیر فنیل پروپانوییدی که منجر به افزایش ترکیبات فنلی می‌شود، از نخستین پاسخ‌های دفاعی گیاهان در شرایط تنش می‌باشد (Garcia-Brugger et al. 2006). گزارش شده‌است که فعالیت آنزیم *PAL* تحت تأثیر الیستورهای

همچنین، نشان داد که غلظت‌های بالا از نانوذرات اثرات منفی را بر بیان ژن‌های *PAL* و *CAD* داشته و با افزایش زمان و غلظت روند کاهشی بیشتر شده‌است که با نتایج شرفی و همکاران (Sharafi et al. 2013) بر روی غلظت‌های مختلف نانوذره روی در کشت سلولی گیاه *Hypericum perforatum* مطابقت دارد و غلظت‌های بالاتر نانوذرات روی (150 ppb) اثرات منفی بر تولید هیپتیکین و هیپرفورین می‌گذارد. در پژوهشی دیگر نیز غلظت بالا نانوذرات آلومینیوم و تیتانیوم در گندم باعث کاهش طول ریشه و ساقه شدند و تنها در غلظت‌های پایین (۱۰۰ mg/L) اثرات مثبت نشان دادند (Aliabadi et al. 2016). بنابراین غلظت‌های بالای نانوذرات می‌تواند اثرات سمی بر روی گیاه داشته باشد. به‌دنبال اعمال الیستور پاسخ‌های دفاعی سریع در سلول گیاهی نظیر افزایش جریان‌ات یونی از عرض غشای پلاسمایی، تولید انواع

سنتز شده توسط کتان هستند که کاربردهای دارویی بسیاری دارند (Bozan and Temelli 2008) استفاده از نانوذرات در محیط کشت می‌تواند این متابولیت‌ها و متعاقبا خواص دارویی آن‌ها را تحت تاثیر قرار دهد. نتایج این تحقیق نشان داد که تیمار کشت‌های سلولی با نانوذرات می‌تواند بیان ژن‌ها در مسیر بیوسنتز لیگنان‌ها را افزایش دهد. این افزایش در بیان ژن ممکن است سبب بهبود تولید متابولیت‌های ثانویه شود. بنابراین کاربرد نانوذرات در زمان و غلظت مناسب می‌تواند یک عامل مناسب جهت افزایش بیان ژن در مسیر بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه باشد. در نهایت پیشنهاد می‌شود دیگر نانوذرات به‌عنوان محرک برای مطالعه بیان ژن‌های *PAL* و *CAD* و دیگر ژن‌ها در مسیر بیوسنتز لیگنان‌ها مورد استفاده قرار گیرند.

قارچی نیز افزایش می‌یابد (Hano et al. 2006). مطالعاتی در رابطه با فعال‌سازی ژن‌ها در طول مراحل احتمالی مسیر بیوسنتز فنیل پروپانویید در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی در سیستم‌های گیاهی گزارش شده‌است. در یک مطالعه القای سریع و قوی در رونوشت‌های *PAL* در کشت‌های سلولی *Medicago truncatula* تحریک شده با عصاره مخمر مشاهده شد (Suzuki et al. 2005). در بررسی اثر عصاره‌های قارچی در کشت سلولی گیاه کتان سفید (*Linum album*) نشان داده شد بیان ژن‌های *PAL* و *CAD* بعد از افزودن الیستور قارچی به محیط کشت به‌طور معنی‌دار افزایش یافت (Bahabadi et al. 2012). در کشت سلولی گیاه مریم گلی کاربرد متیل جاسمونات به‌عنوان الیستور بیان ژن *PAL* را نسبت به نمونه‌های شاهد افزایش داده است (Zhao et al. 2005). با توجه به اینکه لیگنان‌ها و فنل، متابولیت‌های ثانویه مهم

منابع

- Aliabadi T, Afshar AS, Nematpour FS (2016) The effects of nano TiO₂ and Nano aluminium on the growth and some physiological parameters of the wheat (*Triticum aestivum*). Iranian Journal of Plant Physiology.
- Baenas N, García-Viguera C, Moreno D (2014) Elicitation: a tool for enriching the bioactive composition of foods. *Molecules* 19: 13541-13563.
- Bahabadi SE, Sharifi M, Behmanesh M, Safaie N, Murata J, Araki R, Yamagaki T, Satake H (2012) Time-course changes in fungal elicitor-induced lignan synthesis and expression of the relevant genes in cell cultures of *Linum album*. *Journal of Plant Physiology* 169:487-491.
- Boerjan W, Ralph J, Baucher M (2003) Lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology* 54: 519-546.
- Bozan B, Temelli F (2008) Chemical composition and oxidative stability of flax, safflower and poppy seed and seed oils. *Bioresource Technology* 99: 6354-6359.
- Dixon RA, Achnine L, Kota P, Liu CJ, Reddy MS, Wang L (2002) The phenylpropanoid pathway and plant defence—a genomics perspective. *Molecular plant pathology* 3: 371-390.
- Garcia-Brugger A, Lamotte O, Vandelle E, Bourque S, Lecourieux D, Poinsot B, Wendehenne D, Pugin A (2006) Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Molecular plant-microbe interactions* 19: 711-724.
- Gatoo MA, Naseem S, Arfat MY, Mahmood Dar A, Qasim Kh, Zubair S (2014) Physicochemical properties of nanomaterials: implication in associated toxic manifestations. *BioMed research international* 2014:8.
- Ghasemi B, Hosseini R, Nayeri FD (2015) Effects of cobalt nanoparticles on artemisinin production and gene expression in *Artemisia annua*. *Turkish Journal of Botany* 39: 769-777.
- Hano C, Addi M, Bensaddek L, Crônier D, Baltora-Rosset S, Doussot J, Maury S, Mesnard F, Chabbert B, Hawkins S, Lainé E, Lamblin F (2006) Differential accumulation of monolignol-derived compounds in elicited flax (*Linum usitatissimum*. L) cell suspension cultures. *Planta* 223: 975-989.
- Landa P, Vankova R, Andrllova J, Hodek J, Marsik P, Storchova H, White JC, Vanek T (2012) Nanoparticle-specific changes in Arabidopsis thaliana gene expression after exposure to ZnO, TiO₂, and fullerene soot. *Journal of Hazardous Materials* 241: 55-62.
- Mandeh M, Omidi M, Rahaie M (2012) In vitro influences of TiO₂ nanoparticles on barley (*Hordeum vulgare* L.) tissue culture. *Biological Trace Element Research* 150:376-380.
- Murthy HN, Lee E-J, Paek K-Y (2014) Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 11:1-18.
- Ni W, Fahrendorf T, Ballance GM, J. Lamb C, A. Dixon R (1996) Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.). XX. Transcriptional activation of phenylpropanoid pathway genes in elicitor-induced cell suspension cultures. *Plant Molecular Biology* 30: 427-438.
- Pais I (1983) The biological importance of titanium. *Journal of Plant Nutrition* 6: 3-131.

- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29: e45-e45.
- Preisner M, Kulma A, Zebrowski J, Dymińska L, Hanuza J, Arendt M, Starzycki M, Szopa J (2014) Manipulating cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) expression in flax affects fibre composition and properties. *BMC Plant Biology* 14: 50.
- Raei M, Angaji SA, Omid M, Khodayari M (2014) Effect of abiotic elicitors on tissue culture of *Aloe vera*. *Int J Biosci. International Journal of Biosciences* 5: 74-81.
- Rajesh J, Murthy KNC, Kumar MK, Madhusudhan B, A. Ravishankar G (2006) Antioxidant potentials of flaxseed by in vivo model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 3794-3799.
- Sharafi E, Khayam Nekoei S, Fotokian MH, Davoodi D, Hadavand Mirzaei H, Hasanloo T (2013) Improvement of hypericin and hyperforin production using zinc and iron nano-oxides as elicitors in cell suspension culture of *St John's wort (Hypericum perforatum L.)*. *Journal of Medicinal Plants and By-Product* 2: 177-184.
- Siddiqui MH, Al-Wahaibi MH, Firoz M, Y. Al-Khaishany M (2015) Role of nanoparticles in plants. In: *Nanotechnology and Plant Sciences*. Springer. pp. 19-35.
- Suzuki H, Reddy MS, Naoumkina M, Aziz N, May GD, Huhman DV, Sumner LW, Blount JW, Mendes P, Dixon RA (2005) Methyl jasmonate and yeast elicitor induce differential transcriptional and metabolic re-programming in cell suspension cultures of the model legume *Medicago truncatula*. *Planta* 220: 696-707.
- Vasconsuelo A, Boland R (2007) Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. *Plant Science* 172: 861-875.
- Wang H, Wang J, Guo X, Brennan CS, Li T, Fu X, Chen G, Liu RH (2016) Effect of germination on lignan biosynthesis, and antioxidant and antiproliferative activities in flaxseed (*Linum usitatissimum L.*). *Food chemistry* 205: 170-177.