ژنتیک نوین
دوره سیزدهم، شماره ٤، زمستان ۱۳۹۷
صفحه ۵۲۳ - ۵۱۳

اثرات نانومحرک دی اکسید تیتانیوم بر الگوی بیان ژن‌های مسیر بیوسنتز سنگوئینارین در ماميران 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 فابریکی اورنگ*[۱]، صالحه درگاهی[۱]، علیرضا پورابوقداره[۲]

۱- به‌ترتیب 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], Darghahi S[1], Pour-Aboughadareh A[2]

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 عمدتا در ریشه گزارش شده‌است. بیوسنتز سنگوئینارین نیازمند هفت مرحله واکنش از پیش ماده اس- رتیکولین می‌باشد که توسط آنزیم‌های بربرین بریدج (BBE)، شیلانتیفولین سنتتاز (CFS)، استیلوپین سنتتاز (STS)، تتراهیدروپروتوبربرین متیل ترانسفراز (TNMT)، پروتوپین هیدروکسیلاز (P6H) و دی‌هیدروبنزوفنانتریدین اکسیداز (DBOX) صورت می‌گیرد. مطالعه مسیرهای بیوسنتزی و شناسایی عوامل تاثیرگذار 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 *STS*، *P6H*، *BBE* و *MSH* تفاوت معنی‌داری در اثر غلظت‌های نانودی‌اکسید 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 *STS* و *P6H* در ریشه نسبت به برگ و ساقه دو تا سه برابر و رونوشت ژن‌های *BBE* و *MSH* در ریشه چهار برابر ساقه بود. در مجموع هر سه اندام مورد مطالعه، غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانودی اکسید تیتانیوم به‌ترتیب افزایش ٦٣، ٦٦، ۵۰۰ و ۹۱ درصدی در بیان ژن‌های *STS*، *P6H*، *BBE* و *MSH* نسبت به تیمار شاهد نشان دادند. زمان‌های ٢٤ و ٤٨ ساعت نسبت به ۷۲ ساعت پس از محلول‌پاشی باعث حداکثر بیان در هر چهار ژن مورد مطالعه شده و غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانودی‌اکسید تیتانیوم برای ژن‌های *STS*، *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

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.4.6.9]

مقدمه

مامیران‌کبیر 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 به‌دلیل 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 بنزوفنانتریدین (مانند کلیدونین، سنگوئینارین و کلریترین)، پروتوپین و مشتقات آن و پروتوبربرین‌ها (مانند بربرین و کوپتیسین) تعلق دارند. کلیدونین، کوپتیسین و بربرین عمده‌ترین آلکالوئیدها در اندام‌های هوایی هستند درحالی‌که کلیریترین و سنگوئینارین عمدتا در ریشه گزارش شده‌است (Tome and Colombo 1995). بنزیل ایزوکوئینولین‌ها (Benzylisoquinoline alkaloids: BIAs) گروه بزرگی از ترکیبات متنوع طبیعی محسوب می‌شوند که عمدتا در خانواده‌های Papaveraceae، Ranunculaceae، Berberidaceae و Menispermaceae یافت می‌شوند (Li et al. 2016). بیوسنتز آلکالوئیدهای بنزیل-ایزوکوئینولین با تبدیل تیروزین به دوپامین و ٤- هیدروکسی فنیل استالدهید آغاز می‌شود. تیروزین دکربوکسیلاز، تیروزین و دهیدروکسی فنیل آلانین را به آمین‌های مشابه خود تبدیل می‌کند. دوپامین و ٤-هیدروکسی فنیل استالدهید توسط نورکوکلارین سینتاز (NCS) با هم ترکیب شده تا اس- نورکوکلارین (پیش‌ماده مرکزی برای همه بنزیل‌ایزوکوئینولین آلکالوئیدها در گیاهان) را تولید کند. بیش‌تر تحقیقات بر مسیرهای انشعابی منتهی‌شونده به آلکالوئیدهای بنزوفنانتریدین (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 داده است که اثرات آپوپتوز سنگوئینارین از طریق مهار پروتئین فسفاتاز 2C و فسفوریلاسیون P38 اثر می‌کند در حالی‌که دیگر تحقیقات مهار سنگوئینارین را از بیان این ژن نشان داده‌اند (Kemeny-Bekea et al. 2006).

بیوسنتز متابولیت مهم سنگوئینارین نیازمند هفت مرحله واکنش از اس- رتیکولین (شکل ۱) می‌باشد. اولین مرحله برای بیوسنتز آلکالوئیدهای بنزوفنانتریدین 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 بیوسنتزی آلکالوئیدهای بنزوفنانتریدینی 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 (Stylopine synthase: STS) (S)-Cheilanthifoline را به (S)-Stylopine 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 (S)- Stylopine توسط آنزیم (Tetrahydroprotoberberine cis- N- methyltransferase: TNMT) ترکیب S-cis- N- methylstylopine تولید می‌شود (Liscombe and Facchini 2007). S-cis- N- methylstylopine یک مرحله کلیدی در بیوسنتز آلکالوئیدهای پروتوپینی و بنزوفنانتریدینی است. آنزیم S-cis- N- methylstylopine 14-hydroxylase (MSH) متعلق به زیرخانواده CYP82N می‌باشد و سبب تبدیل S-cis- N- methylstylopine به پروتوپین می‌شود. آنزیم Protopine 6- hydroxylase (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-

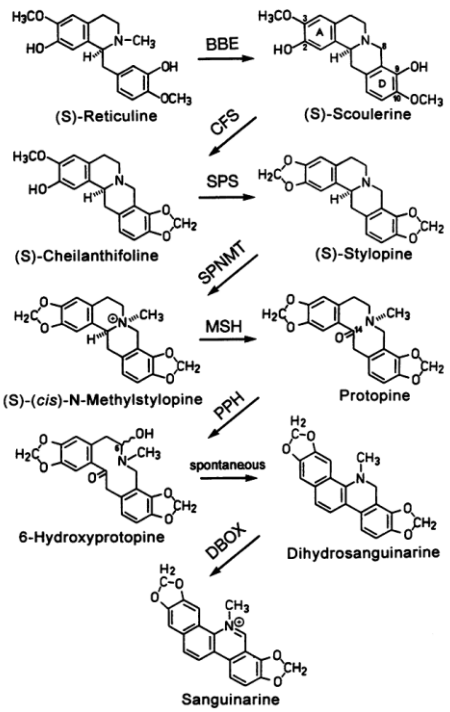
[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.4.6.9]

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 آبشاری از سیگنال‌های پیام‌رسانی را فعال می‌نماید؛ امری که با بیان ژن‌های بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه مرتبط می‌باشد. محرک‌ها عمدتا 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 به‌دلیل 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 آلوئین در سوسپانسیون سلولی آلوئه‌ورا را گزارش کردند. میزان آرتمیزین 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 سیلسیوم در افزایش متابولیت‌های پاپاورین، کدئین و تبائین در سوسپانسیون سلولی گیاه خشخاش توسط Bandarian et al. (2013) گزارش شده‌است. در گیاه *Calendula officinalis* میزان فلاونوئید و آنتوسیانین در پاسخ به نانوذرات نقره کاهش یافته است در حالی‌که مقدار کارتنوئید و ساپونین افزایش یافته است (Ghanati and Bakhtiarian 2014).

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 به‌همراه محرک‌های غیرزیستی سالیسیلیک اسید، پراکسیدهیدروژن و دی‌اکسیدکربن 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 (Blechert 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)

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.4.6.9]

در مطالعه‌ای مشابه، بیان ژن‌های بیوسنتزکننده آلکالوئیدهای گیاه خشخاش مانند بیان ژن‌های *TYDC*، *6OMT*، *CNMT*، *CYP80B1*، *4OMT* و *BBE* 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 متابولیت های 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 محلول‌پاشی 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 اکسیدتیتانیوم (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 به‌منظور پراکنده‌سازی (disperssion) سوسپانسیون، سونیکاسیون (160W, 35KHz) به مدت ٤٥ دقیقه انجام شد. لازم به ذکر است که برای جلوگیری از متراکم شدن مجدد ذرات، سوسپانسون‌ها 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 (١٦ ساعت روشنایی و ٨ ساعت تاریکی، دمای ٢٥°C روز و٢٠°C شب) با ترکیب خاک با نسبت ١ خاک: ١ ماسه: ١ خاکبرگ + کوکوپیت در قالب آزمایش فاکتوریل ٣×٢×٤ بر پایه طرح کاملا تصادفی با سه تکرار کشت شد. فاکتورهای مورد بررسی شامل نانودی‌اکسید تیتانیوم در سه غلظت ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر به همراه تیمار شاهد (غلظت صفر)، فاکتور تعداد محلول‌پاشی در دو سطح (یک بار محلول‌پاشی و دو بار محلول‌پاشی) و فاکتور زمان پس از القای محرک در سه سطح ٢٤، ٤٨ و ٧٢ ساعت بودند. محلول‌پاشی نانوذرات به گیاهچه‌های ٢١ روزه به‌صورت اسپری انجام گرفت، به‌طوری که محلول‌پاشی در دو مرحله با فاصله زمانی ٧٢ ساعت انجام شد. لازم به ذکر است که به‌منظور افزایش میزان نفوذپذیری، به هنگام محلول‌پاشی از Tween 80 (یک درصد، Scharlu) استفاده شد و گیاهان شاهد (غلظت صفر) با آب دیونیزه حاوی Tween محلول‌پاشی شدند. نمونه‌های گیاهی برگی از تیمارهای مختلف در زمان‌های ٢٤، ٤٨ و ٧٢ ساعت پس از هر محلول‌پاشی تهیه و برای بررسی‌های ملکولی مورد استفاده قرار گرفتند. همچنین پس از آخرین نمونه‌گیری برگی در زمان ٧٢ ساعت پس از محلول‌پاشی دوم، به‌منظور 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 باDNA ژنومی، نمونه‌های RNA با آنزیم DNaseI (Fermentas) تیمار شدند و سپس واکنش سنتز cDNA با استفاده از کیت (-601 602) Hyper Script شرکت GeneAll مطابق با دستوالعمل شرکت سازنده صورت گرفت. به‌منظور 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 ١) از توالی ژن‌های *stylopine synthase* (KY550671)، *N-methylstylopine hydroxylase* (KX646397)، *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 هترودایمر و غیره با نرم‌افزار Oligoanalyzer (ver. 3.1) بررسی و تایید شدند. ژن خانه‌دار *Actin* به‌عنوان ژن مرجع برای نرمال کردن داده‌های بیان ژن‌ها مورد استفاده قرار گرفت (جدول ١).

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.4.6.9]

مخلوط واکنش qRT-PCR شامل ۵ µl از 2x RealQ Plus 2x Master Mix Green(Ampliqon)، ۱ µl نمونه cDNA، ۰/۵ µl از هر یک از آغازگر پیشرو و پسرو و ۳ µl آب عاری از RNase بود که با آب‌مقطر استریل در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر تهیه شدند. برنامه دمائی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به‌صورت پنج دقیقه در دمای ۹٤ °C برای واسرشته‌سازی اولیه، ٤۰ چرخه شامل ۲۰ ثانیه در دمای ۹٤°C (واسرشته‌سازی)، ۲۰ ثانیه در دمای ۵۸°C (اتصال آغازگرها) و ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲°C (بسط) و در نهایت افزایش دما برای ترسیم منحنی ذوب از ٦۵ تا ۹۵ 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 $2^{-\Delta\Delta CT}$ (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 معنی‌داری را در سطوح احتمال پنج و یک درصد (۰/۰۵، $P\leq$۰/۰۱) در منابع تغییر غلظت‌های نانودی اکسیدتیتانیوم، مدت زمان پس از محلول‌پاشی، اثر متقابل غلظت‌ها × زمان‌ها، دوره محلول‌پاشی و اثرات متقابل محلول‌پاشی‌ها × غلظت‌ها، محلول‌پاشی‌ها × زمان‌ها، غلظت‌ها × زمان‌ها × محلول‌پاشی‌ها نشان داد. معنی‌دار بودن اثرات متقابل عوامل مورد مطالعه دلالت بر عدم پاسخ یکسان و بیان متفاوت چهار ژن مسیر بیوسنتزی سنگوئینارین در غلظت‌های مختلف نانودی‌اکسید تیتانیوم و مرحله محلول‌پاشی و گذشت زمان پس از محلول‌پاشی دارد. هم‌چنین نتایج تجزیه واریانس آزمایش دوم (جدول ۳) حاکی از تاثیر سطوح مختلف غلظت نانودی اکسید تیتانیوم بر میزان بیان نسبی هر چهار ژن *STS*، *P6H*، *BBE* و *MSH* در اندام‌های مختلف گیاه مامیران کبیر بود و هر سه منبع تغییر غلظت نانوذره، اندام گیاهی و اثر متقابل اندام گیاهی در غلظت نانوذره در سطح احتمال یک درصد ($P\leq$۰/۰۱) معنی‌دار شدند. مقایسه میانگین اندام‌های گیاهی از نظر بیان نسبی هر چهار ژن *STS*، *P6H*، *BBE* 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 معنی‌داری پیدا کرد و بیش‌ترین میزان افزایش بیان در مورد هر چهار ژن مورد مطالعه در اندام ریشه مشاهده شد (شکل ۲).

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

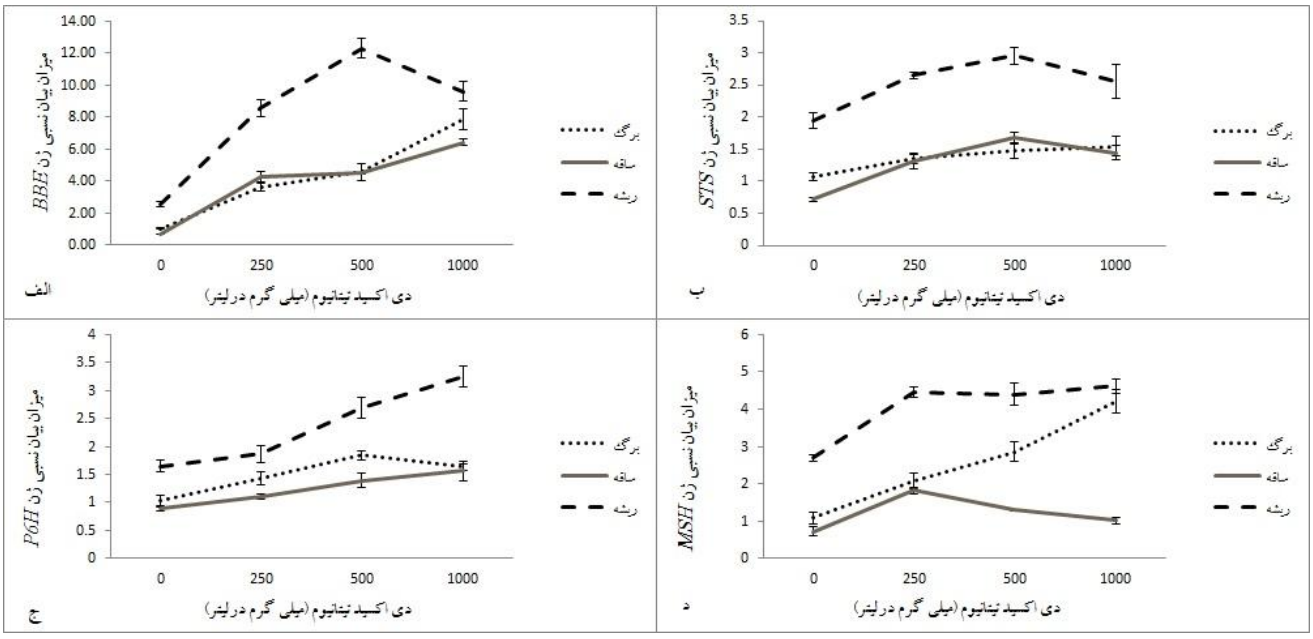
Gene	Accession number	Enzyme	Sequence (5′-3′)	Tm (°C)	Amplicon length (bp)
STS	KY550671	Stylopine synthase	F: CTTCTTCAACTACGGCATGGG R: TGCTAATGGTGCAATGGGTT	۵۸	۱۹۷
MSH	KX646397	methylstylopine 14- hydroxylase	F: GTACCCAGCAGGACCATTGA R: GCTCCCATCTCGTTGCATCT	۵۸	۱۲۱
BBE	KY595435	Berberin Bridge Enzyme	F: TGCCGAGAACCAAGGAAGAG R: CCCAAGCTGTTTCCGAGTCT	۵۸	۱۸۹
P6H	KY783479	Protopine 6-hydroxylase	F: GCCCTGCCTTCACAATGAA R: TCTTTCTAAGCTCGCGCCAA	۵۸	۱۹۸
Actin	XM_016623745	Actin	F: GCGACGGTGTCTCACATACA R: GCGGACAATTTCCCGTTCAG	۵۸	۱٦٤

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.4.6.9]

جدول ۲- تجزیه واریانس میزان بیان نسبی ژن‌های مسیر بیوسنتزی سنگوئینارین در برگ مامیران کبیر تحت محلول‌پاشی نانو دی اکسیدتیتانیوم در زمان‌های مختلف.

درجه آزادی (df)	منابع تغییر (S.O.V)	میانگین مربعات (MS)			
		STS	*P6H*	*BBE*	*MSH*
غلظت نانوذره	۳	۹/۰۶**	۱۳/۷۶**	۲۶۶/٤**	۷۸/۵**
زمان	۲	۳/۰۳**	۸/٦٤**	۲۱/۷**	۲/۷**
غلظت × زمان	٦	۰/۷۲**	۲/۲۳**	۱٦/۹۸**	۱/۹۵**
محلول پاشی	۱	۳/۷**	۰/۸۷**	۰/۰۰۰^{ns}	۰/۰۵^{ns}
محلول پاشی × غلظت	۳	۱/۱**	۰/۷۳**	۲٦/۵٦**	۰/۲٦*
محلول پاشی × زمان	۲	۱/۳٤**	۲/**۷۸	۱۹/٤۳**	۵/۹۵**
غلظت × زمان× محلول پاشی	٦	۰/۹**	۱/۲۸**	۹/۸۲**	۲/۹٤**
خطای آزمایش	۷۲	۰/۰۱۱	۰/۰۳٤	۰/۱۵۵	۰/۰۸۹
CV %		۵/۷۸	۸/۷٦	٦/۵۲	۹/۱

ns، * و **: به‌ترتیب اختلاف غیرمعنی‌دار و اختلاف معنی‌دار در سطوح احتمال پنج و یک درصد (۰/۰۱، $P\leq$۰/۰۵)



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 اکسیدتیتانیوم.

به‌عبارتی بیان ژن‌های *STS*، *BBE*، *P6H* و *MSH* 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 *BBE* و *MSH* در ریشه چهار برابر ساقه بودند. بنابراین از آنجایی‌که رونوشت این ژن‌ها بیشترین انباشتگی را در ریشه مامیران دارند، تائید کننده این مطلب است که در مامیران کبیر نیز همانند دیگر گیاهان دارای آلکالوئیدهای بنزوفنانتریدین و دیگر گیاهان خانواده خشخاش مانند *P. somniferum* (Facchini and De Luka 1995) و *P. bracteatum* (Rezaei et al. 2016) بیان ژن‌های مسیر بیوسنتزی 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 به‌دنبال

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.4.6.9]

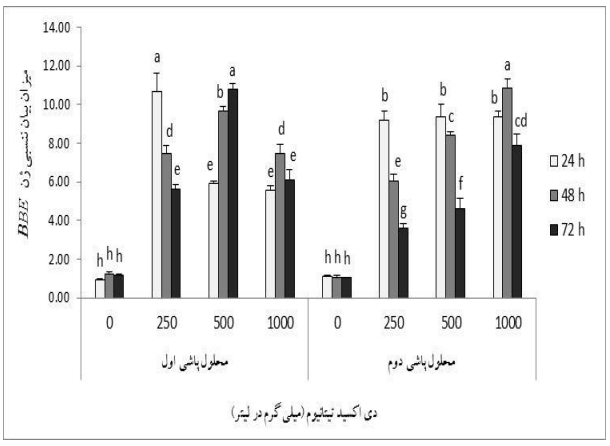
تجمع مقادیر قابل ملاحظه‌ای از رونوشت ژن‌های *STS* (Verma et al. 2014)، *BBE* (Hagel et al. 2013)، *MSH* (Beaudoin and Facchini 2013) و *P6H* (Blechert et al. 1995) اتفاق می‌افتد؛ بنابراین ژن‌های مسیر بیوسنتزی سنگوئینارین دارای سیستم بیانی بافت اختصاصی (Tissue-specific) می‌باشند.

بر اساس مقایسه میانگین اثر متقابل، ریشه در هر سه غلظت مختلف نانودی‌اکسید تیتانیوم به‌طوری معنی‌داری نسبت به سایر میانگین‌ها بیش‌ترین میزان بیان را در هر چهار ژن مورد مطالعه نشان داده و در کلاس گروه‌بندی a، b و c قرار گرفتند. از سوی دیگر با افزایش غلظت نانودی اکسید تیتانیوم از ۵۰۰ به ۱۰۰۰ میلی‌گرم 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) می‌توان این‌گونه استنباط نمود که غلظت‌های پائین و متوسط نانودی‌اکسید تیتانیوم به عنوان شوک‌های مناسب محرکی می‌توانند 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 به‌ترتیب موجب افزایش ۶۳، ٦٦، ۵۰۰ و ۹۱ درصدی در بیان ژن‌های *STS*، *P6H*، *BBE* و *MSH* نسبت به تیمار شاهد شد. در تایید نتایج به‌دست‌آمده، 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 کرده‌اند. لازم به ذکر است که نقش مهم S-reticulin به‌عنوان 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 می‌شود کلیه ژن‌های مورد بررسی در پاسخ به محرک تحریک شدند (هر چند غلظت محرک در این مورد عاملی مهم و تاثیرگذار تلقی می‌شود). القاء و تحریک ژن‌های *BBE*، *STS*، *P6H* در سوسپانسیون سلولی و گیاهچه *E. californica* و خشخاش در حضور الیستورهای زیستی (*Botyris Cinerea* و مخمر) و محرک‌های غیر زیستی (متیل جاسمونات) مبین تاثیرگذاری elicitation در بیان ژن‌های بیوسنزکننده آلکالوئیدها می‌باشد (Alcantara et al. 2005; Dittrich and Kutchan 1991)؛ که در توافق با چنین نتایجی، تاثیرمثبت نانو دی‌اکسید تیتانیوم بر بیان این ژن‌ها در مامیران نیز مشاهده شد و نیز مشخص می‌شود که میزان تجمع رونوشت ژن‌های مذکور در طی رشد و نمو تغییر می‌کنند. 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 محلول‌پاشی نانو دی‌اکسید تیتانیوم.

منابع تغییر (S.O.V)	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات (MS)			
		STS	*P6H*	*BBE*	*MSH*
غلظت نانوذره	۳	۱/۳۸**	۲/۳۷**	۱۰۱/٦**	۷/۱۵**
اندام گیاهی	۲	۷/۷۹**	۵/٦٤**	۹۲/۷**	۳۲/۱۵**
غلظت × اندام	٦	۰/۰۹۲**	۰/۳۳**	۱۰/٦**	۲/۰۱**
خطای آزمایش	۳٦	۰/۰۱٦	۰/۰۱٦	۰/۱٦	۰/۰۳٤
CV %		۷/۲٦	۷/۵	۷/۳	۷/۱۱

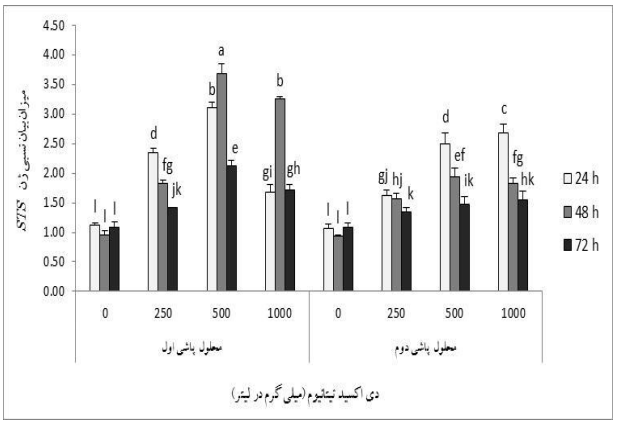
**: اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد ($P\leq$۰/۰۱).



شکل ۳- مقایسه میانگین و الگوی تغییرات بیان نسبی ژن BBE در برگ مامیران کبیر تحت غلظت‌های مختلف نانو دی‌اکسید تیتانیوم در زمان‌های مختلف پس از محلول‌پاشی.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.4.6.9]

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 نانودی اکسید تیتانیوم در محلول‌پاشی اول و ۲٤ ساعت پس از محلول‌پاشی، غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانودی اکسید تیتانیوم در محلول‌پاشی اول و ۷۲ ساعت پس از محلول‌پاشی، و غلظت ۱۰۰۰میلی‌گرم در لیتر نانودی اکسید تیتانیوم در محلول‌پاشی دوم و ٤۸ ساعت پس از محلول‌پاشی مشاهده شد. روند تغییرات بیان ژن *BBE* در برگ (شکل ۳) نشان داد که در غلظت پائین نانودی اکسید تیتانیوم ($250\ mg.L^{-1}$) بیش‌ترین بیان در ۲٤ ساعت پس از محلول پاشی مشاهده شده و با گذشت زمان به ٤۸ و ۷۲ ساعت میزان بیان به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. اما در غلظت بالای نانودی اکسید تیتانیوم ($1000 mg.L^{-1}$) افزایش بیان تا ٤۸ ساعت پس از محلول پاشی‌های اول و دوم مشاهده شده و سپس روند کاهشی در ۷۲ ساعت پس از محلول پاشی نشان داد. نتایج مقایسه میانگین بیان ژن *BBE* در اندام برگ نشان داد که زمان‌های ۲٤ و ٤۸ ساعت نسبت به ۷۲ ساعت پس از محلول‌پاشی و غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانودی اکسید 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؛ به‌طوری‌که 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 شده‌است. در مطالعه‌ای مشابه در *E. californica* گزارش شده‌است که میزان بیان *BBE* پس از یک تاخیر، در ۱٦ ساعت پس از القاء با محرک قارچی به افزایش هفت برابری نسبت به شاهد رسید (Dittrich and Kutchan 1991). در آزمایش Khodayari et al. (2015) نیز حداکثر بیان ژن *BBE* در زمان ٤۸ ساعت پس از القای نانودی اکسید 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.



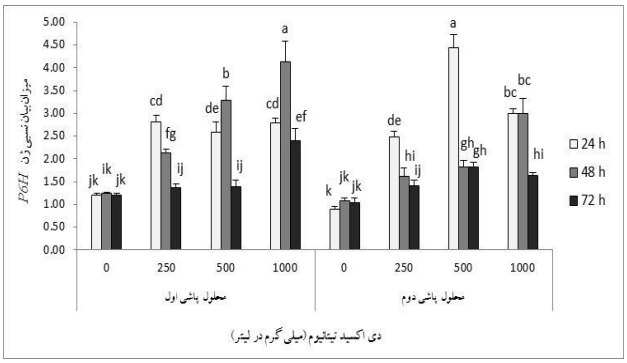
شکل ٤- مقایسه میانگین و الگوی تغییرات بیان نسبی ژن *STS* در برگ مامیران کبیر تحت غلظت‌های مختلف نانو دی‌اکسید تیتانیوم در زمان‌های مختلف پس از محلول‌اشی.

مقایسه میانگین اثر متقابل سه جانبه و روند تغییرات بیان ژن *STS* در برگ در شکل ٤ نشان داده شده‌است. بیش‌ترین (گروه a و b) میزان بیان ژن *STS* در برگ در ترکیب‌های تیماری ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانودی‌اکسید تیتانیوم در محلول‌پاشی اول در ٤۸ و ۲٤ ساعت پس از محلول‌پاشی و ۱۰۰۰میلی گرم نانودی‌اکسید تیتانیوم در محلول پاشی اول و ٤۸ ساعت پس از محلول‌پاشی مشاهده شد. روند تغییرات بیان ژن *STS* در برگ (شکل ٤) نشان داد که در هر سه غلظت نانودی‌اکسید تیتانیوم در هر دو مرحله محلول‌پاشی میزان بیان از ۲٤ ساعت پس از محلول‌پاشی به سمت ۷۲ ساعت پس از محلول پاشی روند کاهشی معنی‌داری دارد. نتایج مقایسه میانگین بیان ژن *STS* در اندام برگ نشان داد که محلول پاشی اول نسبت به محلول پاشی دوم، زمان‌های ۲٤ و ٤۸ 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 *STS* شدند. در توافق با این نتایج، میزان تجمع رونوشت‌های *STS* در القاء *E. californica* با متیل جاسمونات افزایش یافته است (Ikezawa et al. 2007).

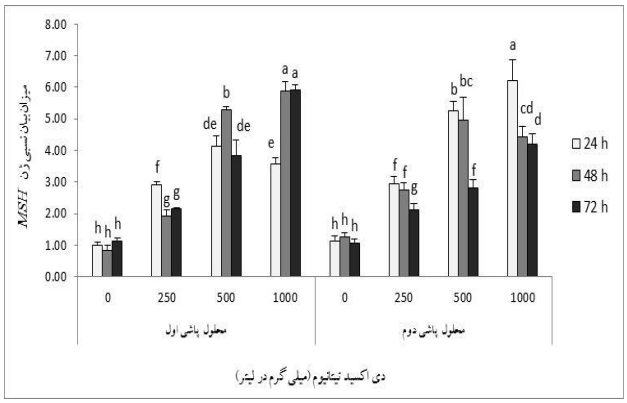
مقایسه میانگین اثر متقابل سه جانبه و روند تغییرات بیان ژن *P6H* در اندام برگ (شکل ۵) نشان داد که بیش‌ترین بیان ژن در ترکیب‌های تیماری ۱۰۰۰میلی‌گرم در لیتر نانودی‌اکسید تیتانیوم در محلول‌پاشی اول در ٤۸ ساعت پس از محلول‌پاشی و۲۵۰

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.4.6.9]

میلی‌گرم در لیتر نانودی‌اکسید تیتانیوم در محلول‌پاشی دوم و ۲٤ ساعت پس از محلول‌پاشی مشاهده شد.



شکل ٥- 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 ٦- 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 ٥) نشان داد که در هر سه غلظت نانودی‌اکسید تیتانیوم و هر دو مرحله محلول‌پاشی میزان بیان از ۲٤ ساعت پس از محلول پاشی به سمت ۷۲ ساعت پس از محلول‌پاشی روند کاهشی معنی‌داری دارد. نتایج مقایسه میانگین برای بیان ژن *P6H* در اندام برگ نشان داد که محلول پاشی اول نسبت به محلول پاشی دوم، زمان ۲٤ ساعت نسبت به ٤٨ و ۷۲ ساعت پس از محلول پاشی و غلظت ٥۰۰ 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 ٦) تا حدودی با سه ژن دیگر متفاوت بوده و مشاهده شد که میزان کاهش بیان ژن *MSH* از ۲٤ ساعت پس از محلول‌پاشی به سمت ۷۲ ساعت پس از محلول‌پاشی شیب کمتری داشته و حتی در غلظت ۱۰۰۰میلی‌گرم 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 ۲٤ و ٤٨ ساعت نسبت به۷۲ 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 (*DBOX*، *DIOX2* و *TYDC7*) مسیر سنتزی سنگوئینارین مشاهد شد. به‌طوری که در شش ساعت اول تمام ژن‌ها افزایش بیان نسبت به شاهد را نشان دادند و پس از گذشت ٤٨ ساعت کاهش معنی‌داری در بیان تمام ژن‌ها به‌جز ژن *DBOX* مشاهده شده و در ۱٦٨ 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 ۱٦٨ 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 آلکالویید 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.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.4.6.9]

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, Omidi 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, Omidi 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 benzylisoquinoline 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 elicitations and precursor feeding in cell suspensions of latex-less variety of *Papaver somniferum*

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.4.6.9]

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.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.4.6.9]