

مقایسه سطح تظاهر ژن‌های مؤثر در زیست‌ساخت آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولین با عامل‌های رونویسی WRKY و bZIP در مراحل مختلف نمو گیاه خشخاش افیونی

مهدی رضایی^۱، محمدرضا نقوی^{۲*}، عبدالهادی حسین‌زاده^۳ و علیرضا عباسی^۳

۱، ۲ و ۳. دانشجوی دکتری، استاد و دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۵/۱۵ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۲/۱۵)

چکیده

در این پژوهش ارتباط میان میزان رونویسی دو عامل رونویسی فرضی (WRKY و bZIP) و ژن‌های *T6ODM*، *COR*، *SAT*، *BBE*، *TYDC* و *Papaver* (*NOS*، *DBOX*، *SODM*، *CODM* در زیست‌ساخت (بیوسنتز) آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولین در گیاه خشخاش افیونی (*Papaver somniferum*) بررسی شد. نمونه‌برداری از گیاهان در پنج مرحله نمو شامل وردمانی (رزت)، ظهور جوانه گل، جوانه پاندولی، گلدهی و تیغ‌زنی بالغ انجام شد. قسمت‌های مورد بررسی شامل ریشه، قسمت پایین ساقه، برگ، بالای ساقه، کپسول و محتویات درون کپسول بودند. نتایج نشان داد، درجه‌های بالایی از هماهنگی میان میزان رونویسی عامل رونویسی WRKY و ژن‌های دخیل در زیست‌ساخت آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولین وجود داشت. بیشترین میزان هماهنگی میان میزان رونویسی عامل رونویسی WRKY و ژن *TYDC* مشاهده شد. با توجه به اینکه ژن *TYDC* از نخستین ژن‌های دخیل در مسیر زیست‌ساختی آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولین است به نظر می‌رسد که این عامل رونویسی از راه تأثیر بر میزان رونویسی این ژن همه مسیر را تحت تأثیر خود قرار دهد. به‌طور شگفت‌انگیزی هماهنگی بالایی نیز میان میزان رونویسی عامل رونویسی bZIP و برخی از ژن‌های مورد بررسی در این پژوهش مشاهده شد. از آنجاکه تنظیم زیست‌ساخت متابولیت‌های ثانویه و دفاع در برابر بیمارگر به ترتیب از نقش‌های یادشده در مورد عامل‌های رونویسی WRKY و bZIP هستند و تولید آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولین با دفاع در برابر بیمارگر و جلوگیری از آسیب‌رسانی اشعه UV مرتبط دانسته شده است می‌توان انتظار داشت که به‌احتمال میان میزان رونویسی این عامل‌های رونویسی و ژن‌های دخیل در زیست‌ساخت آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولین ارتباط نزدیکی وجود داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولین، متابولیت ثانویه، میزان رونویسی.

Comparison of transcription level of some involved genes in benzyloquinoline alkaloid biosynthesis and two hypothetical transcription factors (WRKY and bZIP) in different developmental stages of *Papaver somniferum*

Mahdi Rezaei¹, Mohamad Reza Naghavi^{2*}, Abdol Hadi Hoseinzadeh³ and Ali Reza Abbasi³

1, 2, 3. Ph.D. Candidate, Professor and Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

(Received: Aug. 6, 2015 - Accepted: Mar. 5, 2016)

ABSTRACT

In this study the relationships between transcription rate of two hypothetical transcription factors (WRKY and bZIP) and *TYDC*، *BBE*، *COR*، *T6ODM*، *CODM*، *SODM*، *DBOX* and *NOS* which are involved in benzyloquinoline alkaloids biosynthesis in *Papaver somniferum* were surveyed. Sampling was performed during five developmental stages including rosette, bud initiation, pendulous bud, flowering and lancing. Investigated parts were root, bottom part of stem, leaf, upper part of stem, capsule wall and capsule content. The results showed that there were high degree of consistency among the transcription rate of WRKY and the other genes which are involved in benzyloquinoline alkaloids biosynthesis specially *TYDC*. Since *TYDC* is one of the initial genes in benzyloquinoline alkaloid pathway, it seems that WRKY affect the entire pathway by changing *TYDC* transcription rate. Surprisingly, a coordinate regulation was seen among transcription rate of bZIP and the genes involved in benzyloquiniline biosynthetic pathway. Since the modulation of secondary metabolism and defense against pathogens have been respectively attributed to WRKY and bZIP functions and production of benzyloquiniline alkaloids is related to defense against plant pathogens and avoiding UV injuries, it seems that the transcription rate of these transcription factors and benzyloquiniline biosynthetic genes are closely related.

Keywords: Benzyloquiniline Alkaloid, secondary metabolite, transcription rate.

مقدمه

کنترل رونویسی یک راهبرد اصلی و مهم است که یک یاخته یا یک موجود زنده می‌تواند از راه آن بیان ژن‌های خود را کنترل کند. تنظیم‌کننده‌های رونویسی که به توالی‌های خاصی از DNA متصل می‌شوند، گروهی از عامل‌های رونویسی هستند که نقش مهمی را در تنظیم میزان رونویسی ژن‌های هدف خود ایفا می‌کنند (Martinez, 2002). در این راستا آن‌ها بیان ژن‌هایی را که برای نمو طبیعی و پاسخ مناسب به محرک‌های فیزیولوژیک یا محیطی ضروری هستند را به‌صورت زمانی و مکانی کنترل می‌کنند (Zhang & Wang, 2005).

بررسی مقایسه‌ای ژنگان (ژنوم) نشان داده است، ژن‌های مربوط به تنظیم‌کننده‌های رونویسی در ژنگان‌های گیاهی و جانوری فراوان‌تر هستند و به نظر می‌رسد که تکامل و تنوع یوکاریوت‌ها با گسترش و بسط خانواده‌های ژنی تنظیم‌کننده رونویسی در دودمان‌های خاص مرتبط باشد (Riechmann *et al.*, 2000). همچنین مقایسه‌های ژنگانی در سطح گسترده نشان داده است که خانواده‌های عامل‌های رونویسی موجود در نهانانگان در مقایسه با جانوران و قارچ‌ها دستخوش توسعه و گسترش شدیدتری شده‌اند که این مسئله می‌تواند به‌احتمال نشانگر قابلیت گیاهان گلدار در سازگاری با شرایط محیطی ناپایدار و مختلف باشد (Shiu *et al.*, 2005; Rian *et al.*, 2008).

ژن‌های رمزکننده عامل‌های رونویسی در گیاهان به‌طور عمده در سطح پایین، اغلب در یک نوع یاخته یا بافت خاص و اغلب به‌طور موقت در فرآیند نمو ظاهر می‌یابند (Czechowski *et al.*, 2005). گیاهان خانواده‌های مشخصی از عامل‌های رونویسی مشترک با دیگر موجودها مانند MYB، bZIP و E2F/DP دارند. ولی بعضی از خانواده‌های عامل‌های رونویسی مانند DOF تنها در گیاهان وجود دارند. ژنگان علف تال (آرابیدوپسیس) خانواده‌های مختلفی از عامل‌های رونویسی شامل WRKY، NAC، bZIP، MADS، AP2، bHLH، MYB، C2H2 و ... دارد (Riechmann, 2000).

پروتئین‌های WRKY خانواده بزرگی از عامل‌های

رونویسی هستند که ۷۴ عضو در علف تال و ۱۰۹ عضو در برنج دارند. نخستین cDNA کدکننده پروتئین WRKY به نام SPF1 از سیب‌زمینی شیرین (*Ipomoea batatas*) همسانه سازی شد (Ishiguro & Nakamura, 1994). این پروتئین‌ها یک یا دو دومین WRKY دارند که شامل ناحیه‌ای با ۶۰ اسیدآمین با توالی WRKYGQK در انتهای آمین و درون مایه (motif) شبه انگشت روی C-C-H-C/H (C2H2) یا C2HC در انتهای کربوکسیل هستند. پروتئین‌های WRKY به‌طور اختصاصی به توالی جعبه W (TTGAC(C/T)) متصل می‌شوند. اسیدآمین‌های سیستئین و هیستیدین در دومین WRKY برای اتصال پروتئین‌های این خانواده به جعبه W ضروری هستند. عامل‌های رونویسی WRKY در تنظیم پاسخ گیاه به تنش‌های زنده و غیرزنده از جمله حمله عامل‌های بیماری‌زا، زخم، تنش‌های اکسایشی (اکسیداتیو)، خشکی، سرما، شوری، نمو تریکوم، جنین‌زایی، پیری و سوخت‌وسازی (متابولیسم) ثانویه نقش دارند (Liu *et al.*, 2007). عامل‌های رونویسی WRKY از راه کنترل میزان تولید متابولیت‌های ثانویه می‌توانند به نقش حفاظتی خویش در گیاهان بپردازند. برای مثال عامل رونویسی *AaWRKY1* در گیاه *Artemisia annua* نقش مهمی در کنترل رونویسی ژن‌های دخیل در زیست‌ساخت (بیوسنتز) آرتمیزینین دارد (Ma *et al.*, 2007). افزون بر جعبه W یک بررسی نشان داده است، دومین WRKY همچنین می‌تواند به SURE که یک عامل cis پاسخ‌دهنده به قند است و به‌عنوان یک فعال‌کننده رونویسی عمل می‌کند، متصل شود (Sun *et al.*, 2003).

ویژگی عامل‌های رونویسی bZIP عبارت است از یک دومین حفاظت‌شده ۴۰ تا ۸۰ اسیدآمین‌های که از دو درون مایه تشکیل شده است: یک ناحیه اساسی که مسئول اتصال اختصاصی عامل رونویسی به DNA هدف است و یک زیپ لوسین که برای دایمریزاسیون عامل رونویسی مورد نیاز است (Wingender *et al.*, 2001; Hurst, 1995). بررسی‌های بیوشیمیایی، مولکولی و ژنتیکی نشان داده‌اند که bZIPها تنظیم‌کننده‌های مهمی برای فرایندهای مربوط به

گیاهخواران و تابش UV محافظت می‌کنند. بسیاری از آلکالوئیدهای تولیدشده به‌وسیله گیاه ارزش دارویی بالایی داشته و برای تیمار بیماری‌ها استفاده شده‌اند (Patra et al., 2013).

تنظیم رونویسی زیست‌ساخت آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولین امروزه در خشخاش افیونی (Kawano et al., 2012; Mishra et al., 2013) و به‌صورت بسیار گسترده‌تر در *Coptis japonica* (Kato et al., 2007) بررسی شده است. اهمیت کنترل رونویسی در سوخت‌وساز آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولین به‌طور خاص از (۱) جایگیری رونوشت‌های ژن‌های زیست‌ساختی در نوع خاصی از یاخته (Bird et al., 2003; Samanani et al., 2006) و (۲) القای هماهنگ رونوشت برداری همه ژن‌های زیست‌ساختی بیان‌شده (Zulak et al., 2007) و پروتئین‌های متناظر با آن‌ها (Zulak et al., 2009; Desgagné-Penix et al., 2010) پس از اضافه کردن محرک (السیتور) قارچی به کشت یاخته‌ای خشخاش افیونی، مشهود است.

در این بررسی نوسان‌ها در میزان رونویسی دو عامل رونویسی فرضی *bZIP* و *WRKY* و برخی از ژن‌های دخیل در زیست‌ساخت آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولین شامل *TYDC* (Tyrosine decarboxylase), *BBE* (Berberine Bridge), *SAT* (Salutaridinol 7-O-acetyltransferase), *COR* (Codeinone Reductase), *CODM*, *T6ODM* (Thebaine 6-O-demethylase), *SODM* (Scoulerine O-demethylase), *DBOX* (Codeine O-demethylase), *NOS* (Dihydrobenzophenanthridine Oxidase), *Noscapine Synthase*) در قسمت‌های مختلف گیاه، در پنج مرحلهٔ نمو مقایسه شد تا در صورت مشاهده ارتباط قوی میان میزان رونویسی این عامل‌های رونویسی و ژن‌های مورد بررسی، از آن‌ها برای بررسی‌های بعدی مانند افزایش کارایی مسیر زیست‌ساختی (با استفاده از افزایش بیان و یا کاهش بیان این عامل‌های رونویسی) استفاده شود.

گیاه از جمله تمایز اندام (ارگان) و بافت (Walsh et al., 1998; Chuang et al., 1999; Abe et al., 2005; Shen et al., 2007; Silveira et al., 2007) افزایش طول یاخته (Yin et al., 1997; Fukazawa et al., 2000) کنترل ترازش نیتروژن/کربن (Ciceri et al., 2006) دفاع در برابر بیمارگر (Kaminaka et al., 2006) سوخت‌وساز انرژی (Baena-Gonzalez et al., 2007) پاسخ به پروتئین‌های تا نخورده (Iwata & Koizumi, 2005) پیام‌رسانی مسیر قند و هورمون (Nieva et al., 2005) پاسخ به نور (Ulm et al., 2004) کنترل اسمزی (Sato et al., 2004) و تنظیم ژنی پروتئین ذخیره‌ای بذر (Lara et al., 2003) هستند.

در آغاز ۵۰ پروتئین *bZIP* گیاهی بر پایهٔ همانندی دومین *bZIP* آن‌ها به پنج خانواده تقسیم‌بندی شدند (Vettore et al., 1998). بررسی توالی کامل ژنگان علف تال نشان داد که ۸۱ ژن فرضی *bZIP* در آن حضور دارد (Jakoby et al., 2002). اگرچه بررسی‌های بعدی با جزئیات بیشتر نشان داد که ۷۵ تا ۷۷ پروتئین که با ژنگان علف تال کد می‌شوند شامل ۱۰ گروه همسان (هومولوگ) هستند (Vincentz et al., 2003).

ساخت (سنتز) و تجمع درست متابولیت‌های ثانویه به‌شدت به‌صورت زمانی و مکانی کنترل‌شده و توسط شماری از عامل‌های زنده و غیرزنده تحت تأثیر قرار می‌گیرد. تنظیم زمانی و مکانی رونویسی ژن‌های مسیرهای سوخت‌وسازی توسط شبکهٔ پیچیده‌ای از پروتئین‌های تنظیمی که به‌عنوان عامل‌های رونویسی شناخته می‌شوند کنترل می‌شود. برخی از عامل‌های رونویسی به DNA متصل نمی‌شوند، بلکه با عامل‌های کمکی (کوفاکتورهای) دیگری برهمکنش کرده و مجموعه‌هایی را شکل می‌دهند که بیان ژن هدف را تنظیم می‌کنند (Yang et al., 2012).

آلکالوئیدها شامل ترپنوئید ایندول آلکالوئیدها (مانند وینبلاستین و وینکریستین)، تروپان آلکالوئیدها (مانند کوکائین و اسکوپولامین)، پیورین آلکالوئیدها (مانند کافئین) و بنزیل ایزوکوئینولین آلکالوئیدها (مورفین) بوده و گیاهان را در برابر میکروب‌ها، حملهٔ

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

بذرهای خشخاش افیونی (*P. somniferum*) از یک نمونه یا تیپ شیمیایی (chemotype) محلی در استان فارس تهیه شد. بستر مورد استفاده برای کشت بذرها شامل ۴۰ درصد پرلیت، ۴۰ درصد کوکوپیت و ۲۰ درصد خاک رس بود. بذرها روی بستر اشباع از آب کشت و آبیاری آن‌ها هر هفته یک بار انجام شد.

نمونه برداری

نمونه برداری از گیاهان در پنج مرحلهٔ نمو شامل وردمانی (رزت)، ظهور جوانه گل، جوانه پاندولی، گلدهی و تیغ‌زنی بالغ در سال ۱۳۹۲ انجام شد. نمونه‌های گیاهی بی‌درنگ در نیتروژن مایع منجمد و سپس به فریزر -80°C منتقل شدند.

استخراج RNA و ساخت رشتهٔ اول cDNA

برای استخراج RNA از شیوهٔ ادغام کردن استفاده شد به طوری که میزان تا حدودی یکسان از هر کدام از قسمت‌های مورد بررسی پنج گیاه بالغ توزین و در نیتروژن مایع کوبیده شدند. میزانی از پودر همگن شده برای استخراج RNA استفاده شد. قسمت‌های مورد بررسی شامل ریشه (۳ سانتی‌متر انتهایی)، قسمت

پایین ساقه (۲ سانتی‌متر بالاتر از طوقه)، برگ (دو برگ انتهایی)، بالای ساقه (۲ سانتی‌متر زیر کپسول)، کپسول و محتویات درون کپسول بودند. استخراج با استفاده از محلول استخراج P-BIOZOL و بنابر دستورکار شرکت سازنده (BIO FLUX) انجام شد. آنگاه تیمار با آنزیم DNase بنا بر دستورکار شرکت Fermentas برای حذف آلودگی احتمالی به DNA ژنگانی صورت گرفت. ساخت رشتهٔ اول cDNA با استفاده از آغازگرهای الیگو dT و آنزیم رونوشت بردار معکوس ساخت شرکت Fermentas انجام شد.

طراحی آغازگرها

در آغاز توالی‌های کدکننده ژن‌های یادشده در جدول یک از پایگاه اطلاعاتی NCBI دریافت و طراحی آغازگرها با استفاده از نرم‌افزارهای بر خط Primer Quest و 3 انجام شد. در مورد هر کدام از ژن‌ها، آغازگرهای پیشنهادی با استفاده از نرم‌افزارهای Oligo Analyzer و Oligo Calculator از نظر داشتن ویژگی‌های مهم (Hairpin، Dimer-Self و Hetero-Dimer) آزمون شدند و بهترین جفت آغازگر برای اطمینان از اختصاصی بودن برای ژن مورد نظر در نرم‌افزار بر خط Primer Blast ارزیابی شد. آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۱ آورده شده‌اند.

جدول ۱. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده برای انجام qRT-PCR

Table 1. The characteristics of primer pairs used for qRT-PCR

| Annealing temperature (centigrade) | Primers sequences | Primers name | Gene name |
|------------------------------------|--|--------------------|--|
| 60 | TTGATTGGGAACCTAACGGCAGAAG TGAAAAGGTCCAGTCGGTGATAACA | COR-F COR-R | Codeinone Reductase (<i>COR</i>) |
| 60 | TTGTGCTTAAATTTTCGTGGATGAC TGATTACATCACTTGACCCAAACAG | CODM-F CODM-R | Codeine O-demethylase (<i>CODM</i>) |
| 60 | AAAACCTCCAGTGCCTCTCA ACCCTFAATCTCGGCTGCTT | T6ODM-F T6ODM-R | Thebaine 6-O-demethylase (<i>T6ODM</i>) |
| 60 | TGTGAGAACTGAAGAACACACAAT AAGGACTCAGACCACTGAAAGACG | DIOX2-F DIOX2-R | Scoulerine O-demethylase (<i>SODM</i>) |
| 60 | ATGCGTACGAGGTGGTGATG AACAACGGGTTCTGCATGG | BBE-F BBE-R | Berberine Bridge Enzyme (<i>BBE</i>) |
| 60 | AACCCACTAGACCCTGATGA GACCTGGCTTCTAACTGGATAAC | TYDC-F TYDC-R | Tyrosine/Dopa decarboxylase (<i>TYDC</i>) |
| 60 | TGACAGAAAAGCTTGCCTAAAG TAGATACACTGGGAGGAGGATG | NOS-F NOS-R | Noscapine Synthase (<i>NOS</i>) |
| 60 | CACCCAACTCAACACAAACAC CATGACCACCACTTCGTACTT | DBOX-F DBOX-R | Dihydrobenzophenanthridine Oxidase (<i>DBOX</i>) |
| 60 | GCATTACCCACACCAACCAA ACTTCTCGGATCTTCGCTCC | WRKY-F WRKY-R | <i>WRKY</i> |
| 60 | TACACAGAACGACTCCAAAGAC GTACTCATAGGTTCGAGCATCC | BZIP-F BZIP-R | <i>bZIP</i> |
| 60 | TGGAAGTCCGTGATGAAATCC GCTGGTAAGAACGCCGAAAC | SAT-F SAT-R | Salutaridinol 7-O-acetyltransferase (<i>SAT</i>) |
| 60 | AGATGATTCCAACCAAGCCCA CCTTGATGACACCAACAGCAACT | Elf1a-F Elf1a-R | Elongation Factor 1 alpha (<i>ELF1a</i>) |

بنزیل ایزوکوئینولین هستند به نظر می‌رسد که این عامل رونویسی از راه تأثیر بر میزان رونویسی این ژن‌ها همه مسیر را تحت تأثیر خود قرار دهد. در مورد عامل رونویسی bZIP بیشترین میزان هماهنگی در میزان رونویسی با ژن‌های *SODM*، *DBOX* و *CODM* مشاهده شد (شکل‌های ۲-۵، ۲-۷ و ۲-۸).

از آنجاکه تنظیم زیست‌ساخت متابولیت‌های ثانویه و دفاع در برابر بیمارگر به ترتیب از نقش‌های یادشده در مورد عامل‌های رونویسی WRKY و bZIP هستند و تولید آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولین با دفاع در برابر بیمارگر و جلوگیری از آسیب‌رسانی اشعه UV مرتبط دانسته شده است می‌توان انتظار داشت که به احتمال میان میزان رونویسی این عامل‌های رونویسی و ژن‌های دخیل در زیست‌ساخت آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولین ارتباط نزدیکی وجود داشته باشد.

Mishra *et al.* (2013) موفق به شناسایی یک عامل رونویسی WRKY در خشخاش افیونی شدند که با W-box که یک عامل سیس حفاظت‌شده در راه‌انداز (پروموتور) ژن‌های *TYDC* است برهمکنش کرده و رونویسی آن‌ها را فعال می‌کند.

گروه‌بندی سلسله مراتبی (Hirarchical clustering) داده‌های ریز آرایه به‌دست‌آمده از مقایسه جمعیت رونوشت‌ها در کشت‌های یاخته‌ای تهیه‌شده در زمان‌های مختلف پس از تیمار با محرک با جمعیت کنترل، ۴ شکل مختلف از رخ‌نمای (پروفیل) زمانی رونویسی را در مورد ۱۴۲ عامل رونویسی فرضی در مجموعه EST‌های خشخاش افیونی *Facchini et al.* (2007) آشکار کرد. در این مطالعه الگوی تجمع ۱۷ رونوشت همانند القای ژن‌های زیست‌ساختی آلکالوئیدها در زمان‌های مختلف در کشت یاخته‌ای خشخاش تیمار شده با محرک بود (Facchini & Park, 2003).

چندین نوع مختلف شامل سه عدد WRKY، ۲ عدد Zink finger، یک عدد BZIP و یک دومین AP2 در این گروه قرار دارند و به دلیل نقش اثبات‌شده عناصر مرتبط در تنظیم ژن‌های زیست‌ساختی دخیل در مسیرهای متابولیتی ثانویه دیگر، قابل توجه است (Van der Fits & Memelink, 2004; Vom Endt *et al.*, 2004; Pauw *et al.*, 2002).

برای انجام qRT-PCR از کیت شرکت Solis BioDyne که رنگ فلئورسنت Eva Green دارد استفاده شد. شرایط دمایی و زمانی چرخه‌ها و غلظت واکنشگرها بنا بر دستورکار شرکت سازنده تنظیم شد (جدول‌های ۲ و ۳). از ژن *Elf1a* به‌عنوان ژن خانه‌دار استفاده شد. واکنش‌های Real Time PCR در دستگاه Rotor-Gene 6000 ساخت شرکت Qiagen با سه تکرار تکنیکی و یک تکرار زیستی انجام شد. تجزیه داده‌های به‌دست‌آمده از بیان ژن‌ها با استفاده از نرم‌افزار REST 2009 که از رابطه ۱ (Pfaffl, 2004) برای محاسبه استفاده می‌کند، انجام شد.

$$Ratio = \frac{(E_{target})^{\Delta Cp(\text{mean control} - \text{mean sample})}}{(E_{reference})^{\Delta Cp(\text{mean control} - \text{mean sample})}}$$

جدول ۲. نوع و غلظت نهایی واکنشگرهای مورد استفاده

برای انجام qRT-PCR

Table 2. qRT-PCR components and final concentration of them

| Components | Final concentration |
|--------------------|---------------------|
| Master mix | 1x |
| Forward primer | 0.15 pmol |
| Reverse primer | 0.15 pmol |
| cDNA | 50 ng |
| ddH ₂ O | - |
| Total volume | 20 μl |

جدول ۳. چرخه‌های دمایی مورد استفاده در qRT-PCR

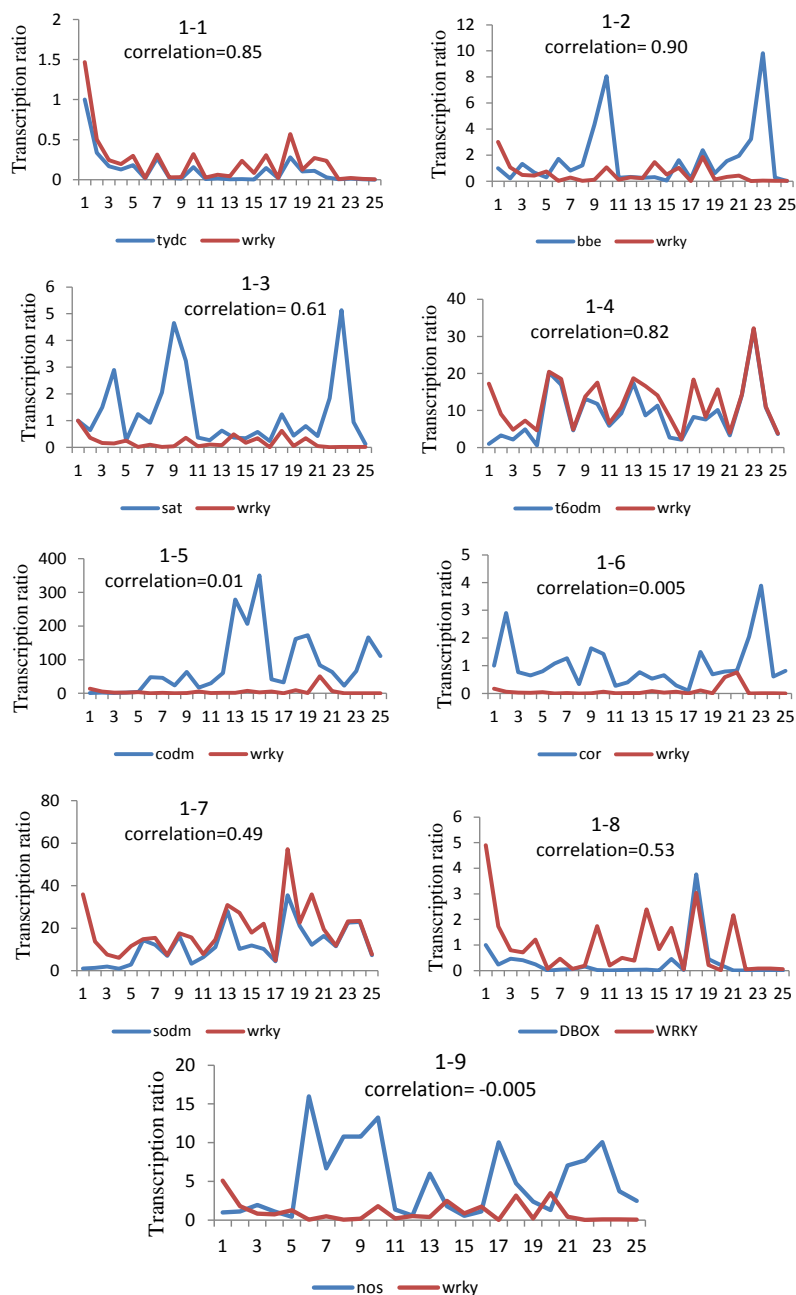
Table 3. The characteristics of cycles in qRT-PCR

| Step | Number of cycle (s) | Temperature (centigrade) | Time (second) |
|-------------------------|---------------------|--------------------------|---------------|
| Polymerase denaturation | 1 | 95 | 900 |
| Annealing | 40 | 95 | 15 |
| Extension | | 60 | 20 |
| | | 72 | 20 |
| Melt Curve | 1 | 65-90 | 600 |

نتایج و بحث

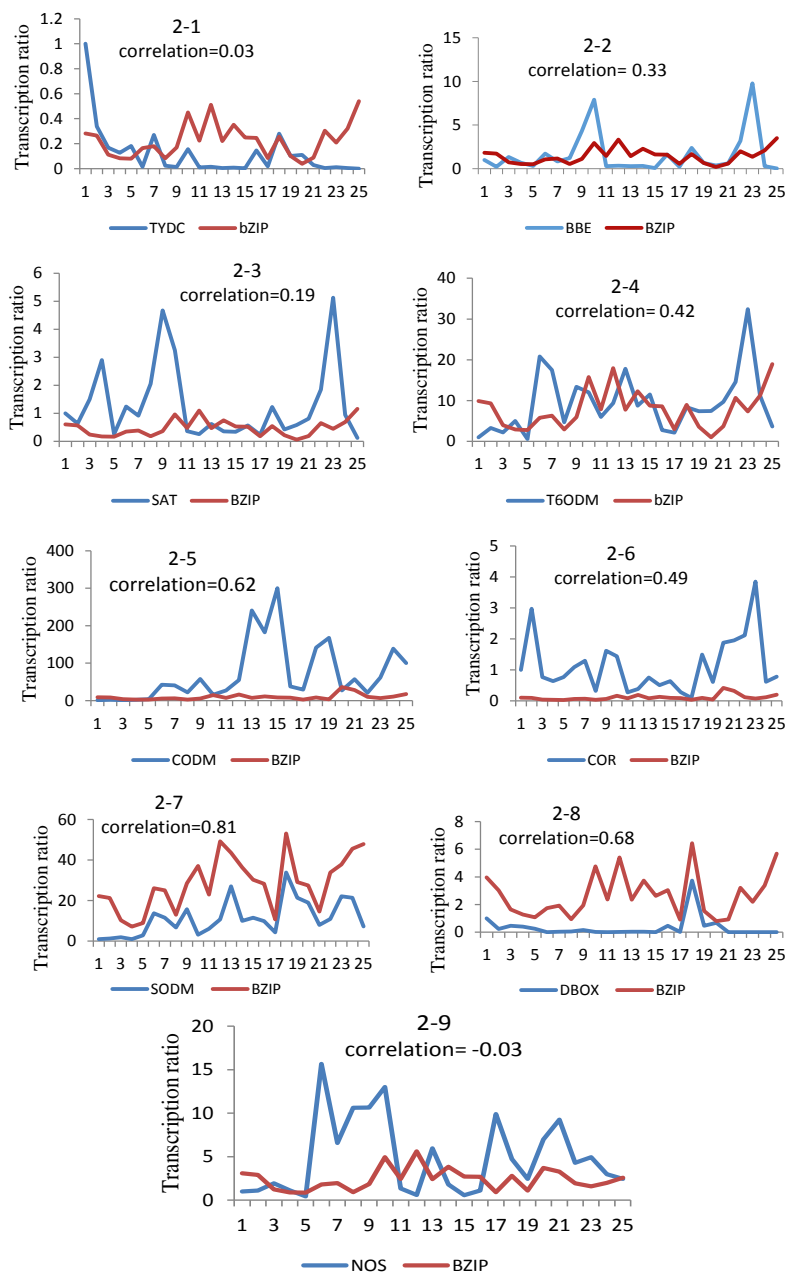
نتایج نشان داد، سطح بالایی از هماهنگی میان میزان رونویسی عامل رونویسی WRKY و ژن‌های دخیل در زیست‌ساخت آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولین وجود داشت (شکل‌های ۱-۱ تا ۱-۹). بیشترین میزان هماهنگی در مورد عامل رونویسی WRKY با میزان رونویسی ژن‌های *TYDC* و *BBE* مشاهده شد (شکل ۱-۱).

با توجه به اینکه ژن‌های *TYDC* و *BBE* از ژن‌های کلیدی دخیل در مسیر زیست‌ساختی آلکالوئیدهای



شکل ۱. مقایسه نوسانات میزان رونویسی ژن‌های ۱-۱- *TYDC*، ۱-۲- *BBE*، ۱-۳- *SAT*، ۱-۴- *T6ODM*، ۱-۵- *CODM*، ۱-۶- *COR*، ۱-۷- *SODM*، ۱-۸- *DBOX* و ۱-۹- *NOS* با عامل رونویسی فرضی *WRKY* در اندام‌های مختلف خشخاش افیونی طی مراحل نموی مختلف. اعداد محور افقی در نمودارها شامل ۱: ریشه/رزت، ۲: ریشه/جوانه، ۳: ریشه/جوانه پاندولی، ۴: ریشه/گلدهی، ۵: ریشه/تیغزنی، ۶: پایین ساقه/رزت، ۷: پایین ساقه/ظهور جوانه، ۸: پایین ساقه/جوانه پاندولی، ۹: پایین ساقه/گلدهی، ۱۰: پایین ساقه/تیغزنی، ۱۱: برگ/رزت، ۱۲: برگ/ظهور جوانه، ۱۳: برگ/جوانه پاندولی، ۱۴: برگ/گلدهی، ۱۵: برگ/تیغزنی، ۱۶: کپسول/ظهور جوانه، ۱۷: کپسول/جوانه پاندولی، ۱۸: کپسول/گلدهی، ۱۹: کپسول/تیغزنی، ۲۰: گلبرگ/جوانه پاندولی، ۲۱: گلبرگ/گلدهی، ۲۲: بالای ساقه/گلدهی، ۲۳: بالای ساقه/تیغزنی، ۲۴: محتوای کپسول/گلدهی، ۲۵: محتوای کپسول/تیغزنی هستند. میزان رونویسی هر ژن در اندام‌های مختلف طی مراحل نموی نسبت به میزان بیان آن در ریشه مرحله رزت سنجیده شده است.

Figure 1. comparison between transcription ratios of 1-1- *TYDC*, 1-2- *BBE*, 1-3- *SAT*, 1-4- *T6ODM*, 1-5- *CODM*, 1-6- *COR*, 1-7- *SODM*, 1-8- *DBOX*, 1-9- *NOS* and a *WRKY* transcription factor in different organs of opium poppy during developmental stages. Numbers on the horizontal axis shows organ/developmental stage 1: root/rosette, 2: root/bud initiation, 3: root/pendulous bud, 4: root/flowering, 5: root/stem/rosette, 6: bottom of stem/bud initiation, 8: bottom of stem/pendulous bud, 9: bottom of stem/flowering 10: bottom of stem/lancing, 11: leaf/rosette, 12: leaf/bud initiation, 13: leaf/pendulous bud, 14: leaf/flowering, 15: leaf/lancing, 16: capsule/bud initiation, 17: capsule/pendulous bud, 18: capsule/flowering, 19: capsule/lancing, 20: petal/pendulous bud, 21: petal/flowering, 22: upper of stem/flowering, 23: upper of stem/lancing, 24: capsule content/flowering, 25: capsule content/lancing. Transcription ratios in different organs during developmental stages were measured related to transcription level in the root at rosette stage.



شکل ۲. مقایسه نوسانات میزان رونویسی ژن‌های ۱-۲-*TYDC*، ۲-۲-*BBE*، ۳-۲-*SAT*، ۴-۲-*T6ODM*، ۵-۲-*CODM*، ۶-۲-*COR*، ۷-۲-*SODM*، ۸-۲-*DBOX* و ۹-۲-*NOS* با عامل رونویسی فرضی *bZIP* در اندام‌های مختلف خشخاش افیونی طی مراحل نمو مختلف. اعداد محور افقی در نمودارها شامل ۱: ریشه/رزت، ۲: ریشه/ظهور جوانه، ۳: ریشه/جوانه پاندولی، ۴: ریشه/گلدهی، ۵: ریشه/تیغ‌زنی، ۶: پایین ساقه/رزت، ۷: پایین ساقه/ظهور جوانه، ۸: پایین ساقه/جوانه پاندولی، ۹: پایین ساقه/گلدهی، ۱۰: پایین ساقه/تیغ‌زنی، ۱۱: برگ/رزت، ۱۲: برگ/ظهور جوانه، ۱۳: برگ/جوانه پاندولی، ۱۴: برگ/گلدهی، ۱۵: برگ/تیغ‌زنی، ۱۶: کپسول/ظهور جوانه، ۱۷: کپسول/جوانه پاندولی، ۱۸: کپسول/گلدهی، ۱۹: کپسول/تیغ‌زنی، ۲۰: گلبرگ/جوانه پاندولی، ۲۱: گلبرگ/گلدهی، ۲۲: بالای ساقه/گلدهی، ۲۳: بالای ساقه/تیغ‌زنی، ۲۴: محتوای کپسول/گلدهی، ۲۵: محتوای کپسول/تیغ‌زنی هستند. میزان رونویسی هر ژن در اندام‌های مختلف طی مراحل نمو نسبت به میزان بیان آن در ریشه مرحله رزت سنجیده شده است.

Figure 2. comparison between transcription ratios of 1-1- *TYDC*, 1-2- *BBE*, 1-3- *SAT*, 1-4- *T6ODM*, 1-5- *CODM*, 1-6- *COR*, 1-7- *SODM*, 1-8- *DBOX*, 1-9- *NOS* and a *bZIP* transcription factor in different organs of opium poppy during developmental stages. Numbers on the horizontal axis shows organ/developmental stage 1: root/rosette, 2: root/ bud initiation, 3: root/pendulous bud, 4: root/flowering, 5: root/lancing, 6: bottom of stem/rosette, 7: bottom of stem/bud initiation, 8: bottom of stem/pendulous bud, 9: bottom of stem/flowering 10: bottom of stem/lancing, 11: leaf/rosette, 12: leaf/bud initiation, 13: leaf/ pendulous bud, 14: leaf/flowering, 15: leaf/lancing, 16: capsule/bud initiation, 17: capsule/pendulous bud, 18: capsule/ flowering, 19: capsule/lancing, 20: petal/pendulous bud, 21: petal/flowering, 22: upper of stem/flowering, 23: upper of stem/lancing, 24: capsule content/flowering, 25: capsule content/lancing. Transcription ratios in different organs during developmental stages were measured related to transcription level in the root at rosette stage.

درون یا نزدیکی نواحی پیشبر ژن‌های زیست‌ساختی در خوشه ژن‌های زیست‌ساختی گزارش شده در مورد نوسکاپین وجود دارد (Winzer *et al.*, 2012) که پیشنهاد می‌دهد به احتمال زیست‌ساخت نوسکاپین نیز توسط عامل‌های رونویسی *WRKY* صورت می‌گیرد.

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به رابطه مشاهده شده میان میزان رونویسی عامل‌های رونویسی فرضی مورد بررسی در این تحقیق و ژن‌های دخیل در زیست‌ساخت آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولین می‌توان پیشنهاد کرد که اثر افزایش بیان و خاموشی آن‌ها در گیاه بر میزان تولید آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولین بررسی شود. همچنین جداسازی شمار اندکی از cDNAهای کدکننده عامل‌های رونویسی با الگوی زمانی و تجمع مکانی مناسب، یک چهارچوب کاری عالی را برای بررسی خاموشی ژن با استفاده از VIGS یا RNAi برای دستیابی به نقش تنظیمی آن‌ها در محیط *In Vivo* در سوخت‌وساز آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولین فراهم می‌آورد.

در گیاه خشخاش افیونی از زخم و دیگر محرک‌های پاسخ دفاعی برای شناسایی EST‌های متناظر با رونوشت‌های ژنی القاشده استفاده شد (Mishra *et al.*, 2013). یک عامل رونویسی بالقوه از نوع *WRKY* جداسازی و نشان داده شد که به عامل‌های حفاظت‌شده متصل‌شونده به *WRKY* در راه اندازه‌های ژن‌های زیست‌ساختی مشخص در محیط درون شیشه متصل شد. آن‌ها از روش تک دورگی (هیبریدی) مخمر برای بررسی این اتصال استفاده کردند. عامل رونویسی *WRKY* دیگری در رگه (لاین)‌های تراریخته با T-DNA در خشخاش افیونی شناسایی و نشان داده شد که تجمع آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولین در رگه تراریخته تغییر یافته بود (Kawano *et al.*, 2012). افزون بر این، بیان اکتوپیک یک عامل رونویسی *WRKY* از *Arabidopsis thaliana* در خشخاش کالیفرنایی (*Eschscholzia californica*) باعث القای رونوشت‌های *BBE* و *NMCH* و افزایش چشمگیری در تجمع آلکالوئیدهای بنزوفنانتریدین از جمله سنگوئینارین شد (Apuya *et al.*, 2008). به‌طور جالبی چندین عامل *WRKY* بالقوه

REFERENCES

1. Abe, M., Kobayashi, Y., Yamamoto, S., Daimon, Y. & Yamaguchi, A. (2005). FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. *Science*, 309, 1052-1056.
2. Apuya, N. R., Park, J. H., Zhang, L., Ahyow, M., Davidow, P., Van Fleet, J., Rarang, J. C., Hippley, M., Johnson, T. W., Yoo, H. D., Trieu, A., Krueger, S., Wu, C., Lu, Y., Flavell, R. B. & Bobzin, S. C. (2008). Enhancement of alkaloid production in opium and California poppy by transactivation using heterologous regulatory factors. *Plant Biotechnology Journal*, 6, 160-175.
3. Baena-Gonzalez, E., Rolland, F., Thevelein, J. M. & Sheen, J. (2007). A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature*, 448, 938-943.
4. Bird, D. A., Franceschi, V. R. & Facchini, P. J. (2003). A tale of three cell types: alkaloid biosynthesis is localized to sieve elements in opium poppy. *Plant Cell*, 15, 2626-2635.
5. Chuang, C. F., Running, M. P., Williams, R. W. & Meyerowitz, E. M. (1999). The PERIANTHIA gene encodes a bZIP protein involved in the determination of floral organ number in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Development*, 13, 334-344.
6. Ciceri, P., Locatelli, F., Genga, A., Viotti, A. & Schmidt, R. J. (1999). The activity of the maize Opaque2 transcriptional activator is regulated diurnally. *Plant Physiology*, 121, 1321-1328.
7. Czechowski, T., Stitt, M., Altmann, T., Udvardi, M. K. & Scheible, W. R. (2005). Genome wide identification and testing of superior reference genes for transcription normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 139, 5-17.
8. Desgagné-Penix, I., Khan, M., Schriemer, D. C., Cram, D., Nowak, J. & Facchini, P. J. (2010). Integration of deep transcriptome and proteome analyses reveals the components of alkaloid metabolism in deep poppy cell cultures. *BMC Plant Biology*, 10, 252-261.
9. Facchini, P. J., Hagel, J. M., Liscombe, D. K., Loukanina, N., MacLeod, B. P., Samanani, N. & Zulak, K. G. (2007). Opium poppy: blueprint for an alkaloid factory. *Photochemistry Review*, 6, 97-124.
10. Facchini, P. J. & Park, S. U. (2003). Developmental and inducible accumulation of gene transcripts involved in alkaloid biosynthesis in opium poppy. *Phytochemistry*, 64, 177-186.

11. Fukazawa, J., Sakai, T., Ishida, S., Yamaguchi, I. & Kamiya, Y. (2000). Repression of shoot growth, a bZIP transcriptional activator, regulates cell elongation by controlling the level of gibberellins. *Plant Cell*, 12, 901-915.
12. Hurst, H. C. (1995). Transcription factors 1: bZIP proteins. *Protein Profile*, 2, 101-168.
13. Ishiguro, S. & Nakamura, K. (1994). Characterization of a cDNA encoding a novel DNA-binding protein, SPF1, that recognizes SP8 sequences in the 5' upstream regions of genes coding for sporamin and beta-amylase from sweet potato. *Molecular Genes and Genetics*, 244, 563-571.
14. Iwata, Y. & Koizumi, N. (2005). An Arabidopsis transcription factor, AtbZIP60, regulates the endoplasmic reticulum stress response in a manner unique to plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America Journal*, 102, 5280-5285.
15. Jakoby, M., Weisshaar, B., Droge-Laser, W., Vicente-Carbajosa, J. & Tiedemann, J. (2002). bZIP transcription factors in Arabidopsis. *Trends in Plant Science*, 7, 106-111.
16. Kaminaka, H., Nake, C., Epple, P., Dittgen, J. & Schutze, K. (2006). bZIP10-LSD1 antagonism modulates basal defense and cell death in Arabidopsis following infection. *EMBO Journal*, 25, 4400-4411.
17. Kato, N., Dubouzet, E., Kokabu, Y., Yoshida, S., Taniguchi, Y., Dubouzet, J. G., Yazaki, K. & Sato, F. (2007). Identification of a WRKY protein as a transcriptional regulator of benzyloisoquinoline alkaloid biosynthesis in *C. japonica*. *Plant Cell Physiology*, 48, 8-18.
18. Kawano, N., Kiuchi, F., Kawahara, N. & Yoshimatsu, K. (2012). Genetic and phenotypic analyses of a *P. somniferum* T-DNA insertional mutant with altered alkaloid composition. *Pharmaceuticals*, 5, 133-154.
19. Lara, P., Onate-Sanchez, L., Abraham, Z., Ferrandiz, C. & Diaz, I. (2003). Synergistic activation of seed storage protein gene expression in Arabidopsis by ABI3 and two bZIPs related to OPAQUE2. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 21003-21011.
20. Lee, E. J. & Facchini, P. J. (2010). Norcoclaurine synthase is a member of the pathogenesis-related 10/Bet v1 protein family. *Plant Cell*, 22, 3489-3503.
21. Liu, J. X., Srivastava, R., Che, P. & Howell, S. H. (2007). Salt stress responses in *Arabidopsis* utilize a signal transduction pathway related to endoplasmic reticulum stress signaling. *Plant Journal*, 51, 897-909.
22. Liua, X., Baia, X., Wanga, X. & Chu, C. (2007). OsWRKY71, a rice transcription factor, is involved in rice defence response. *Journal of Plant Physiology*. 164, 969-979.
23. Ma, C., Wang, H., Lu, X., Li, H., Liu, B. & Xua, G. (2007). Analysis of *Artemisia annua* L. volatile oil by comprehensive two-dimensional gas chromatography time of flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, 1150, 50-53.
24. Martinez, E. (2002). Multi-protein complexes in eukaryotic gene transcription. *Plant Molecular Biology*, 50, 925-947.
25. Mishra, S., Triptahi, V. & Singh, S. (2013). Wound induced transcriptional regulation of benzyloisoquinoline pathway and characterization of wound inducible *PsWRKY* transcription factor from *P. somniferum*. *PLoS One*, 8, 52784-52792.
26. Nieva, C., Busk, P. K., Dominguez-Puigjaner, E., Lumberras, V. & Testillano, P. S. (2005). Isolation and functional characterisation of two new bZIP maize regulators of the ABA responsive gene rab28. *Plant Molecular Biology*, 58, 899-914.
27. Onoyovwe, A., Hagel, J. M., Chen, X., Khan, M. F., Schriemer, D. & Facchini, P. J. (2013) Morphine biosynthesis in opium poppy involves two cell types: sieve elements and laticifers. *Plant Cell*, 25, 4110-4122.
28. Patra, B., Schluttenhofer, C., Wu, Y., Pattanaik, S. & Yuan, L. (2013) Transcriptional regulation of secondary metabolite biosynthesis in plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1829, 1236-1247.
29. Pauw, B., Hilliou, F. A., Martin, V. S., Chatel, G., de Wolf, C. J., Champion, A., Pre, M., van Duijn, B., Kijne, J. W., van der Fits, L. & Memelink, J. (2004.) Zinc finger proteins act as transcriptional repressors of alkaloid biosynthesis genes in *Catharanthus roseus*. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 52940-52948.
30. Pfaffl, M. W. (2004). Quantification strategies in real-time PCR. In: Bustin SA (ed), *A-Z of Quantitative PCR*, La Jolla, CA: IUL (pp. 87-120) Biotechnology Series, International University Line.
31. Rian˜o-Pachon, D. M., Corre˜a, L. G. G., Trejos-Espinosa, R. & Mueller-Roeber, B. (2008). Green transcription factors: a chlamydomonas overview. *Genetics*, 179, 31-39.
32. Riechmann, J. L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C. Z., Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O. J., Samaha, R. R., Creelman, R., Pilgrim, M., Broun, P., Zhang, J. Z., Ghandehari, D., Sherman, B. K. & Yu, G. L. (2000). *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among Eukaryotes. *Science*, 290, 2105-2110.
33. Samanani, N., Alcantara, J., Bourgault, R., Zulak, K. G. & Facchini, P. J. (2006). The role of phloem sieve elements and laticifers in the biosynthesis and accumulation of alkaloids in opium poppy. *Plant Journal*, 47, 547-563.

34. Satoh, R., Fujita, Y., Nakashima, K., Shinozaki, K. & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2004). A novel subgroup of bZIP proteins functions as transcriptional activators in hypoosmolarity-responsive expression of the ProDH gene in Arabidopsis. *Plant Cell Physiology*, 45, 309-317.
35. Shen, H., Cao, K. & Wang, X. (2007). A conserved proline residue in the leucine zipper region of AtbZIP34 and AtbZIP61 in *Arabidopsis thaliana* interferes with the formation of homodimer. *Biochemistry and Biophysics Research Communication*, 362, 425-430.
36. Shiu, S. H., Shih, M. C., Li, W. H. (2005). Transcription factor families have much higher expansion rates in plants than in animals. *Plant Physiology*, 139, 18-26.
37. Silveira, A. B., Gauer, L., Tomaz, J. P., Cardoso, P. R. & Carmello-Guerreiro, S. (2007). The Arabidopsis AtbZIP9 protein fused to the VP16 transcriptional activation domain alters leaf and vascular development. *Plant Science*, 172, 1148-1156.
38. Sun, C., Palmqvist, S., Olsson, H., Boren, M., Ahlandsberg, S. & Jansson, C. (2003). A novel WRKY transcription factor, SUSIBA2, participates in sugar signaling in barley by binding to the sugar-responsive elements of the iso1 promoter. *Plant Cell*, 15, 2076-2092.
39. Ulm, R., Baumann, A., Oravec, A., Mate, Z. & Adam, E. (2004). Genome-wide analysis of gene expression reveals function of the bZIP transcription factor HY5 in the UV-B response of Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America Journal*, 101, 1397-1402.
40. Van der Fits, L. & Memelink, J. (2000). ORCA3, a jasmonate-responsive transcriptional regulator of plant primary and secondary metabolism. *Science*, 289, 295-297.
41. Vettore, A. L., Yunes, J. A., Cord, N. G., da Silva, M. J. & Arruda, P. (1998). The molecular and functional characterization of an Opaque2 homologue gene from Coix and a new classification of plant bZIP proteins. *Plant Molecular Biology*, 36, 249-263.
42. Vincentz, M., Bandeira-Kobarg, C., Gauer, L., Schlogl, P. & Leite, A. (2003). Evolutionary pattern of angiosperm bZIP factors homologous to the maize Opaque2 regulatory protein. *Journal of Molecular Evolution*, 56, 105-116.
43. Vom Endt, D., Kijne, J. W. & Memelink, J. (2002). Transcription factors controlling plant secondary metabolism: what regulates the regulators? *Phytochemistry*, 61, 107-114.
44. Walsh, J., Waters, C. A. & Freeling, M. (1998). The maize gene *liguleless2* encodes a basic leucine zipper protein involved in the establishment of the leaf blade sheath boundary. *Genes Development*, 12, 208-218.
45. Weltmeier, F., Ehlert, A., Mayer, C. S., Dietrich, K. & Wang, X. (2006). Combinatorial control of Arabidopsis proline dehydrogenase transcription by specific heterodimerisation of bZIP transcription factors. *EMBO Journal*, 25, 3133-3143.
46. Wingender, E., Chen, X., Fricke, E., Geffers, R. & Hehl, R. (2001). The TRANSFAC system on gene expression regulation. *Nucleic Acids Research*, 29, 281-283.
47. Winzer, T., Gazda, V., He, Z., Kaminski, F., Kern, M. & Larson, T.R. (2012). A Papaver somniferum 10-gene cluster for synthesis of the anticancer alkaloid noscapine. *Science*, 336, 1704-1708.
48. Yamada, Y., Kokabu, Y., Chaki, K., Yoshimoto, T., Ohgaki, M., Yoshida, S., Kato, N., Koyama, T. & Sato, F. (2011). Isoquinoline alkaloid biosynthesis is regulated by a unique bHLH-type transcription factor in *C. japonica*. *Plant Cell Physiology*, 52, 1131-1141.
49. Yang, C. Q., Fang, X., Wu, X. M. Y., Mao, B., Wang, L. J. & Chen, X. Y. (2012). Transcriptional regulation of plant secondary metabolism. *Journal of Integrated Plant Biology*, 54, 703-712.
50. Yin, Y., Zhu, Q., Dai, S., Lamb, C. & Beachy, R. N. (1997). RF2a, a bZIP transcriptional activator of the phloem-specific rice tungro bacilliform virus promoter, functions in vascular development. *EMBO Journal*, 16, 5247-5259.
51. Zhang, Y. & Wang, L. (2005). The WRKY transcription factor superfamily: its origin in eukaryotes and expansion in plants. *BMC Evolutionary Biology*, 5(1), 1-12.
52. Zulak, K.G., Cornish, A., Daskalchuk, T. E., Deyholos, M. K., Goodenowe, D. B., Gordon, P. M. K., Klassen, D., Pelcher, L. E., Sensen, C. W. & Facchini, P. J. (2007). Gene transcript and metabolite profiling of elicitor-induced opium poppy cell cultures reveals the coordinate regulation of primary and secondary metabolism. *Planta*, 225, 1085-1106.
53. Zulak, K. G., Khan, M. F., Alcantara, J., Schriemer, D. C. & Facchini, P. J. (2009). Plant defense responses in opium poppy cell cultures revealed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry proteomics. *Molecular Cell Proteomics*, 8, 86-98.