

تأثیر نانو محرک‌ها بر تولید و بیان ژن‌های دخیل در زیست‌ساخت آلکالوئیدها در دروایه شقایق *Papaver orientale* L. شرقی

صفورا شیروانی^۱ و محمدرضا نقوی^{۲*}

۱ و ۲. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران، کرج

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۳/۹ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۱/۱۳)

چکیده

کشت بافت منبع بالقوه‌ای در جهت تولید متابولیت‌های ثانویه است. محرک (الیستور)ها نقش مهمی در القای سامانه دفاعی گیاهان و تولید متابولیت‌های ثانویه ایفا می‌کنند. الکلونیدها گروهی از متابولیت‌های ثانویه و با ارزش اقتصادی هستند که استفاده از آنها توسط انسان به عصر باستان باز می‌گردد. بسیاری از گونه‌های *Papaver* توانایی تولید آلکالوئیدهایی مانند پاپاورین، نوسکاپین، مورفین و کدئین را دارند. در این پژوهش تغییرپذیری بیان ژن‌های دخیل در زیست‌ساخت (بیوستز) این آلکالوئیدها در کشت دروایه (سوسپانسیون) یاخته‌ای *Papaver orientale* در فاصله‌های زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اعمال محرک‌های نانو نقره و نانو دی‌اکسید تیتانیوم با qRT-PCR بررسی شد. نتایج بیانگر افزایش بیان *DBOX*، *SDR*، *COR* و *CODM* و ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تیمار با نانو نقره بود درحالی‌که کاهش بیان *SaLAT* و *T₆ODM* در ۲۴ ساعت آغازین مشاهده شد. نانو دی‌اکسید تیتانیوم پس از ۴۸ ساعت منجر به افزایش بیان *DBOX*، *COR* و *CODM* شد. ولی افزایش بیان *SDR*، *SaLAT* و *T₆ODM* تنها پس از ۲۴ ساعت مشاهده شد. بنا بر نتایج به‌دست آمده از HPLC نانو نقره به‌صورت بسیار مؤثرتر از نانو دی‌اکسید تیتانیوم پاپاورین، نوسکاپین و مورفین را به ترتیب ۱۹، ۱/۸۸ و ۳/۱۲ برابر پس از ۴۸ ساعت در مقایسه با شاهد افزایش داد. بنابراین می‌توان از کشت دروایه یاخته‌ای شقایق شرقی به‌عنوان منبعی برای تولید آلکالوئیدهای مهمی مانند مورفین و نوسکاپین استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: آلکالوئیدها، کشت دروایه یاخته‌ای، نانو محرک‌ها، *Papaver orientale*، qRT-PCR.

Effect of nano elicitors on alkaloids production and genes expression in *Papaver orientale* suspension culture

Safoora Shirvani¹ and Mohammad Reza Naghavi^{2*}

1, 2. Former M. Sc. Student and Professor, University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
(Received: May 29, 2016 - Accepted: Feb. 1, 2017)

ABSTRACT

Plant cell cultures have emerged as potential sources of secondary metabolites. Elicitors play an important role in challenging the plant defense system and altering the secondary metabolite production. Alkaloids are secondary metabolites that have been used as medicine since ancient times. Many *Papaver* species contain alkaloids such as papaverine, noscapine, morphine and codeine. In this study, we investigated the expression level of genes involved in the biosynthesis of alkaloids in suspension culture of *Papaver orientale* L. 24 and 48 hours after treatment by nano-Ag and nano-TiO₂ with qRT-PCR. qRT-PCR analysis showed that *DBOX*، *SDR*، *COR* and *CODM* expression were significantly up-regulated at 24 h and 48 h in silver nanoparticles treatment while *SaLAT* and *T₆ODM* down-regulated. Nano-TiO₂ caused up-regulation of *DBOX*، *COR* and *CODM* after 48 h but *SDR*، *SaLAT* and *T₆ODM* expression considerably up-regulated at 24 h. The high-performance liquid chromatography analysis indicated the nano-Ag is more effective than nano-TiO₂ that increased papaverine, noscapine and morphine respectively 19-fold, 1.88-fold and 3.12-fold in comparison with control 48 h after treatment. This finding indicates that we can use the cell suspension culture of *Papaver orientale* L. as source of important alkaloids particular morphin and noscapine.

Keywords: Alkaloids, Nano elicitors, *Papaver orientale*, qRT-PCR, Suspension culture.

* Corresponding author E-mail: mnaghavi@ut.ac.ir

مقدمه

استفاده از گیاهان به قدمت بشر روی کره زمین باز می‌گردد. شمار محدودی از جنس‌ها و گونه‌های گیاهی قادر به تولید گروهی از ترکیب‌ها با وزن مولکولی کم هستند. طی یک طبقه‌بندی این ترکیب‌ها با عنوان متابولیت‌های ثانویه شناخته می‌شوند (Croteau *et al.*, 2000; Makkar *et al.*, 2007;) (Schillmiller *et al.*, 2008; De Luca *et al.*, 2012). متابولیت‌های ثانویه در پاسخ به محرک (الیسیتور)ها پس از مجموع واکنش‌های فسفرازیبی (فسفریلاسیون) و فسفرزداپی (دفسفریلاسیون) پروتئین‌های غشای یاخته، ایجاد جریان‌های کلسیمی، فعال شدن پروتئین‌کینازها و NADPH اکسیدازها، تولید ROSها و در نهایت بیان ژن‌های دفاعی در یاخته‌های گیاهی تولید می‌شوند (Zhao *et al.*, 2005).

شقایق شرقی (*Papaver orientale* L.) از خانواده Papaveraceae، گیاهی تتراپلوئید ($2n = 4x = 28$) است (Nyman & Bruhn, 1979). گیاهان خانواده خشخاش قادر به تولید گروهی از متابولیت‌های ثانویه (آلکالوئیدها) اهمیت تجاری خاص دارند (Vincenzo *et al.*, 2012). ناحیه‌های پراکنش شقایق شرقی شمال غربی ایران و شمال شرق ترکیه است (Nyman & Bruhn, 1979). این گیاه قابلیت تولید آلکالوئیدهای مهمی چون اریپاوین^۱ (۲۰ درصد) و تبائین^۲ (۹ درصد) (Shafiee *et al.*, 1975) و افزون بر این آلکالوئیدهای دیگری مانند سالوتاریدیدن^۳، مکامبریدین^۴ و ارینتالیدین^۵ را دارد (Sariyar, 2002). کشت بافت و یاخته‌های گیاهی به‌عنوان منبعی برای تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی، به‌صورت گسترده‌ای در شرایط *in vitro* برای کاربردهای دارویی و داروسازی، افزودنی‌های غذایی، چاشنی‌ها و دیگر کاربردهای صنعتی استفاده می‌شود (Hamill & Rhodes, 1993; Rao & Ravishankar, 2002; Daud & Keng, 2006; Murthy *et al.*, 2014).

کشت بافت و یاخته‌های گیاهی از محرک‌ها به‌صورت گسترده‌ای در جهت افزایش متابولیت‌های ثانویه استفاده می‌شوند. محرک‌ها به‌صورت کلی به دو دسته زیستی و غیر زیستی طبقه‌بندی می‌شوند (Namdo, 2007). نانوذرات (NPs) خواص منحصر به فردی دارند که توجهات جهانی را به خود معطوف کرده است. در طبقه‌بندی محرک‌ها نانوذرات به‌عنوان محرک‌های غیر زیستی شناخته می‌شوند. نانو دی‌اکسید تیتانیوم در شرایط نوری منجر به افزایش فعالیت نورساختی (فتوسنتزی) گیاه می‌شود (Castiglione *et al.*, 2009). Raei *et al.* (2014)، در نتایج بررسی‌های خود نشان دادند، استفاده از این نانوذره در کشت دروایه (سوسپانسیون) یاخته‌ای صبرزد (*Aloe vera*) منجر به افزایش میزان آلونین می‌شود. نانو نقره خواص ضد میکروبی و ضد قارچی دارد (Servin *et al.*, 2015). استفاده از نانو نقره و نانو دی‌اکسید تیتانیوم در کشت دروایه یاخته‌ای خشخاش افیونی موجب افزایش تجمع تبائین و سنگوئینارین و همچنین افزایش بیان ژن‌های دخیل در زیست‌ساخت (بیوسنتز) آلکالوئیدها شدند (Khodayari, 2014). ریشه‌های موئن شقایق شرقی به‌صورت شگرفی قابلیت تولید مورفین و کدئین را دارند. تیمار این ریشه‌های موئن با متیل جاسمونات (MJ) و سالیسیلیک اسید (SA) موجب افزایش تجمع آلکالوئیدها شد به‌گونه‌ای که بیشترین میزان تجمع آلکالوئیدها در پاسخ به محرک MJ و ۴۸ ساعت پس از اعمال محرک مشاهده شد (Hashemi & Naghavi, 2015).

این پژوهش با توجه به اهمیت اقتصادی آلکالوئیدهای شقایق شرقی در صنایع داروسازی، به‌منظور بررسی تأثیر نانو نقره و نانو دی‌اکسید تیتانیوم در کشت دروایه یاخته‌ای این گیاه، بر تغییر زیست‌ساخت آلکالوئیدها و ژن‌های دخیل در زیست‌ساخت این ترکیب‌ها در دو بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت انجام شده است.

مواد و روش‌ها

کشت بافت

بذرهای گیاه شقایق شرقی *Papaver orientale* L. از شرکت Botanic samen واقع در شهر زوریخ سوئیس

1. Oripavine
2. Thebaine
3. Salutaridine
4. Mecambridine
5. Orientalidine

ویال‌های شیشه‌ای مخصوص منتقل و در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند. برای اندازه‌گیری آلکالوئیدها از دستگاه HPLC مدل (Platin Blue, Germany)، واقع در آزمایشگاه مرکزی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران استفاده شد. از ستون C18 به منظور جداسازی آلکالوئیدها در این دستگاه و برای شست‌وشوی ستون از ترکیب بافر استات و استونیتریل (۶۵:۳۵) به‌عنوان حالت متحرک استفاده شد. دستگاه به‌صورت خودکار ۱۵ میکرولیتر از عصاره متانولی را برداشته و عصاره یاخته‌ای با سرعت 1 ml min^{-1} در ستون دستگاه جریان پیدا کرده است. از شناساگر UV با طول‌موج ۲۵۴ نانومتر برای مشاهده پیک‌های آلکالوئیدها استفاده شد. دمای ستون نیز 25°C تنظیم شد. تأثیر دو محرک نانوقره و نانو اکسید تیتانیوم با قطر ۲۰ نانومتر در غلظت ۲۰ میلی‌گرم در لیتر و با دو تکرار بر تولید و تجمع متابولیت‌ها در پینه‌های خشخاش شرقی به‌صورت طرح کامل تصادفی در دو بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت بررسی شد.

استخراج RNA

استخراج RNA از پینه‌های تیمار شده با نانو ذرات با استفاده از کیت P-بایزول (BIOFLUX) صورت گرفت. از ۰/۱۵ گرم از پینه‌های ساییده شده با نیتروژن مایع به‌منظور استخراج RNA استفاده شد. به‌منظور اطمینان از کیفیت RNA استخراج شده و تعیین غلظت آن از دستگاه نانودراپ استفاده شد. افزون بر این پس از اطمینان از کنترل کیفی و کمی RNA کل استخراج شده با روش الکتروفورز روی ژل آگارز، به‌منظور حذف DNA ژنگانی (ژنومی) در نمونه‌های RNA استخراج شده و جلوگیری از ایجاد اختلال در انجام واکنش Real-time PCR، از تیمار DNAaseI بر پایه روش پیشنهادی شرکت فرمنتاز استفاده شد. نمونه‌ها برای نگهداری درازمدت به دمای -80°C درجه سلسیوس منتقل شدند. برای ساخت cDNA با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از نانودراپ، از هر نمونه RNA به میزان ۱ میکروگرم برداشته و با استفاده از کیت فرمنتاز بنابر دستورکار شرکت سازنده برای همه نمونه‌ها cDNA ساخته شد، سپس با استفاده از

تهیه شد. به‌منظور تهیه گیاهچه‌های سترون در آغاز بذرها با الکل ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه و پس از آن با هیپوکلریت ۲/۵ درصد به مدت ۶-۷ دقیقه ضدعفونی شدند. بذرها سه بار با آب مقطر دو بار سترون شست‌وشو داده شدند، سپس بذرها ضدعفونی شده به محیط کشت $1/2 \text{ MS}$ بدون هورمون حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، ۱ گرم زغال فعال و ۷ گرم در لیتر آگار در ظرف‌های سترون کشت شدند. بذرها کشت داده شده به اتاق کشت با دمای $23 \pm 2^\circ \text{C}$ و تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند. جوانه‌زنی بذرها پس از ده روز آغاز شد. پس از دستیابی به گیاهچه‌هایی به ارتفاع ۱۰-۸ سانتی‌متر پس از ۷۵ روز، ریز نمونه‌های مناسب از برگ‌های حقیقی، ریشه و طوقه برای پینه (کالوس)‌زایی انتخاب و به محیط پینه‌زایی، محیط MS حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکاروز و ۷ گرم در لیتر آگار به همراه تیمار هورمونی ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و با pH ۵/۸ پیش از اضافه کردن آگار منتقل شدند (Zakaria *et al.*, 2013). پس از دو بار واکشت پینه‌ها به فاصله یک ماه، پینه به‌دست‌آمده از ریز نمونه ریشه بر پایه سرعت رشد برای تهیه دروایه یاخته‌ای انتخاب شد. به‌منظور تهیه دروایه یاخته‌ای ۰/۵ گرم پینه به‌دست‌آمده از ریشه در ۲۵ ml محیط هورمون‌دار مورد استفاده برای پینه‌زایی ولی بدون آگار، در ارلن ۱۰۰ ml منتقل شد. ارلن‌ها به اتاقک رشد لرزان (شیکر انکوباتور) با دمای $25 \pm 2^\circ \text{C}$ و 120 rpm در شرایط به‌کلی تاریک منتقل شدند. اعمال محرک در روز ۱۶ در شرایط به‌کلی استریل صورت گرفت.

عصاره‌گیری و تجزیه HPLC

۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اعمال محرک‌ها به کشت دروایه یاخته‌ای، از نمونه‌های تیمار شده عصاره‌گیری صورت گرفت. پینه‌ها توسط کاغذ صافی سترون از دروایه جدا شده و با دستگاه فریز دارای خشک شدند. استخراج آلکالوئید به روش Cho *et al.* (2008)، انجام شد. پس از تهیه عصاره نمونه‌ها پالایش شدند (μm ۰/۲۲) و تا هنگام تزریق به دستگاه HPLC در

(پاپاورین، تبائین، مورفین، کدئین و سنگوئینارین) از راه تزریق استانداردها در سه غلظت متفاوت با استفاده از سطح منحنی جذب آنها در ۲۵۴ نانومتر رسم شد. فام‌نگار (کروماتوگرام) آلکالوئیدها با تزریق ۱۵ میکرو لیتر از هر یک از نمونه‌های عصاره‌گیری شده رسم شد.

نتایج

به‌منظور بررسی تغییر میزان آلکالوئیدها پس از تیمار با نانو محرک‌ها توسط HPLC، در آغاز نمودار استاندارد یا واسنجی دستگاه از راه تزریق استانداردها در سه غلظت متفاوت به دستگاه و محاسبه سطح منحنی جذب در ۲۵۴ نانومتر، منحنی واسنجی آن‌ها رسم شد (شکل ۱). در نهایت غلظت متابولیت‌های مدنظر با استفاده از رابطه به‌دست‌آمده اندازه گرفته شدند (شکل ۲).

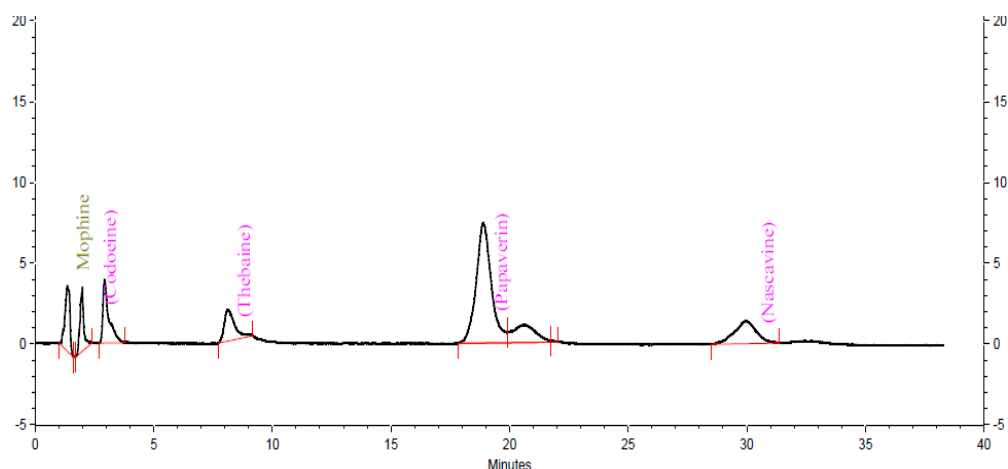
آغازگر ژن مرجع *Efl-alpha* روی همهٔ cDNAهای ساخته شده واکنش PCR انجام شد. پس از اطمینان از cDNA ساخته شده، واکنش Real-time PCR با استفاده از کیت 5x HOT FIREPol EvaGreen® (ROX) qPCR Mix Plus و با ۲ تکرار بیولوژیک و سه تکرار تکنیکی انجام شد. به این منظور cDNAهای استفاده‌شده هم غلظت شدند و برای همهٔ آغازگرها (جدول ۱) میزان ۱ میکروگرم در میکرولیتر استفاده شد. در نهایت تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از روش مقایسه‌ای $2^{-\Delta\Delta CT}$ انجام شد.

تهیهٔ منحنی واسنجی و اندازه‌گیری کمی آلکالوئیدها به‌منظور بررسی تغییر میزان آلکالوئیدها پس از تیمار سوسپانسیون سلولی با نانو الیسیتورها توسط HPLC، در آغاز نمودار کالیبراسیون هر یک از آلکالوئیدها

جدول ۱. نام و توالی آغازگرهای مورد استفاده برای qRT-PCR در *P. orientale*

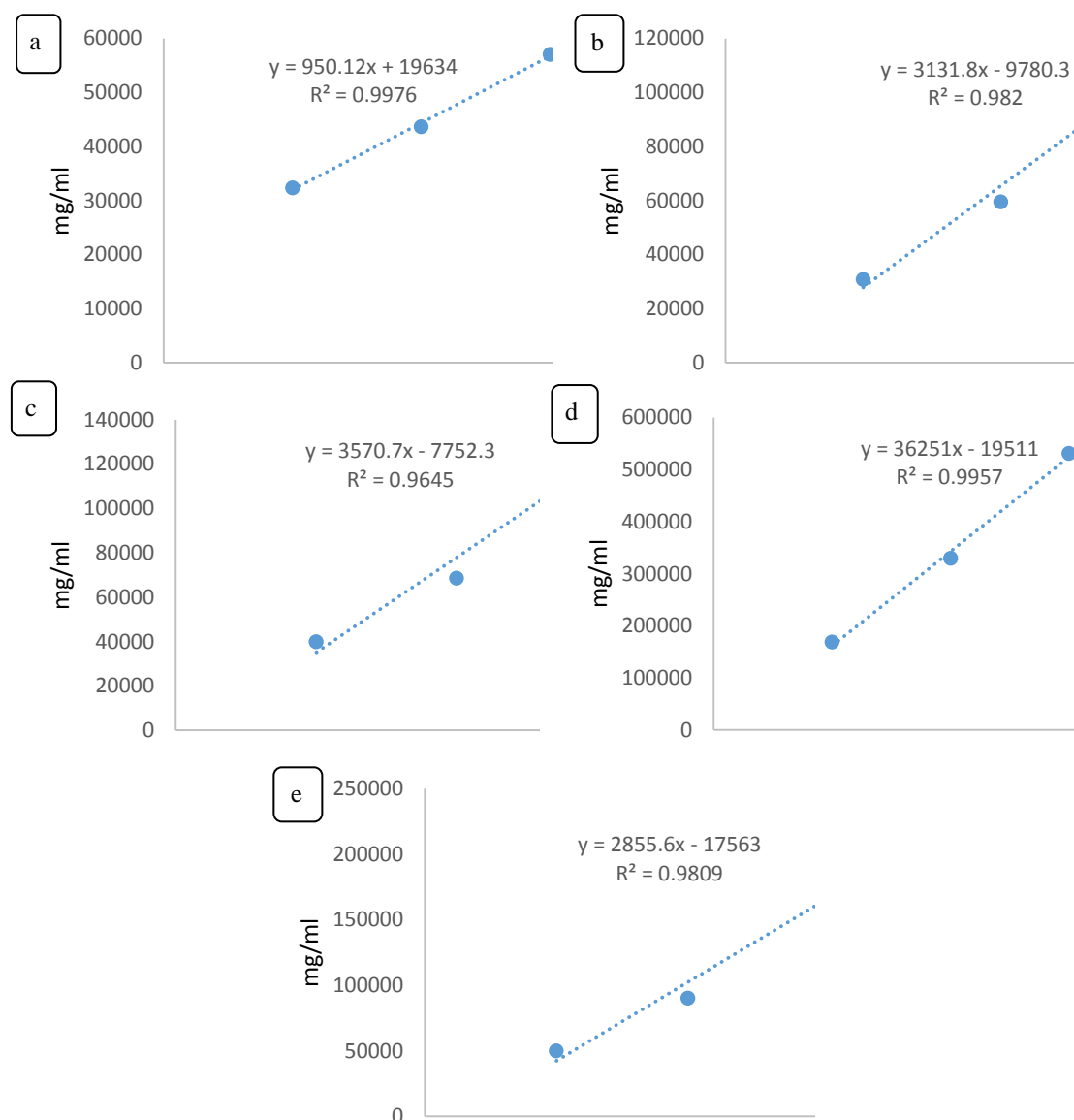
Table 1. Primer list that used in qRT-PCR for *P. orientale*

Primer	Accession no.	Sequence
<i>S-COR-F</i>		TTGATTGGGAACTAACGGCAGAAG
<i>S-COR-R</i>	FJ624147	TGAAAGGTCCAGTCGGTGATAACA
<i>S-CODM-F</i>		TTGTGCTTAAATTTCGTGGATGAC
<i>S-CODM-R</i>	GQ500141	TGATTACATCACTTGACCCAAACAG
<i>S-T₆ODM-F</i>		AAAACCTCCAGTGCCTCTCA
<i>S-T₆ODM-R</i>	GQ500139	ACCCTTAATCTCGGCTGCTT
<i>S-DBOX-F</i>		TGTGAGAAACTGAAGAACACACAAT
<i>S-DBOX-R</i>	GQ500140	AAGGACTCAGACCACTGAAAGACG
<i>SDR-F</i>		TGACAGAAAGAGCTTGCCATAAAG
<i>SDR-R</i>	JQ659007	TAGATACACTGGGAGGAGGATG
<i>S-SAT-F</i>		TGGAAGTCCGTGATGAAATCC
<i>S-SAT-R</i>	KR260912	GCTGGTAAGAACGCCGAAAC
<i>Efl-alpha-F</i>		AGATGATTCCAACCAAGCCCA
<i>Efl-alpha-R</i>	KF033667.1	CCTTGATGACACCAACAGCAACT



شکل ۱. منحنی‌های HPLC برای استانداردهای مورفین، کدئین، تبائین، پاپاورین و نوسکاپین

Figure 1. The HPLC curves for external standard of morphine, codeine, thebaine, papaverine and noscapine



شکل ۲. نمودار استاندارد های (a) مورفین، (b) تبائین، (c) پاپاورین، (d) کدئین و (e) نوسکاپین
 Figure 2. The standard curves of a) morphine b) thebaine c) papaverine d) codeine and e) noscapine

محرك تفاوت معناداری در تولید و تجمع نوسکاپین با شاهد مشاهده نشد. نتایج نشان دهنده آن بود، میزان تبائین تجمع یافته در یاخته پس از ۲۴ ساعت تفاوت معناداری را با شاهد نداشت اما پس از ۴۸ ساعت کاهش میزان تبائین در مقایسه با شاهد مشاهده شد. افزایش تولید و تجمع مورفین در مقایسه با شاهد ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اعمال محرك مشاهده شد به صورتی که بیشترین میزان تولید مورفین به میزان ۳/۱۲ برابر در مقایسه با شاهد ۴۸ ساعت پس از اعمال نانو نقره مشاهده شد. ۲۴ ساعت اعمال این محرك در دروایه یاخته‌ای ریشه منجر به افزایش ۱/۳۴ برابری

تأثیر محركها بر تولید آلکالوئیدها در دروایه یاخته‌ای ریشه *P. orientale L.* نانو نقره (NPAg)

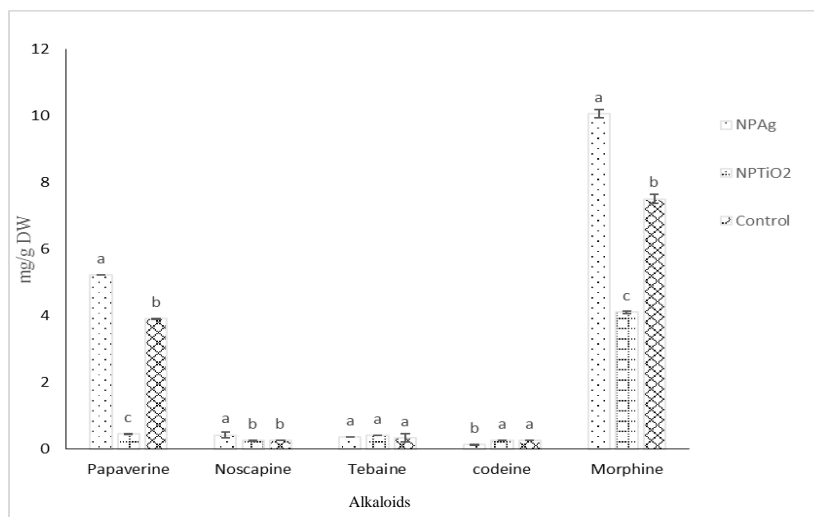
تجزیه آماری نتایج به دست آمده از HPLC در دروایه‌های تیمار شده با محرك نانو نقره نشان داد که تولید آلکالوئیدها به شدت تحت تأثیر این محرك قرار گرفته است. محرك نانو نقره منجر به افزایش تولید پاپاورین ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اعمال محرك به ترتیب ۱/۳۳ و ۱۹/۹۳ برابر شد. ۴۸ ساعت پس از اعمال محرك نانو نقره تجمع ۱/۸۸ برابری نوسکاپین مشاهده شد در صورتی که ۲۴ ساعت پس از اعمال این

نداد اما پس از ۴۸ ساعت افزایش ۱/۵۱ برابری نوسکاپین مشاهده شد. محرک نانو دی‌اکسید تیتانیوم موجب افزایش تجمع تبائین پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب ۱/۲ و ۱/۰۷ برابر در مقایسه با شاهد شد. ۴۸ ساعت پس از اعمال این محرک افزایش ۱/۳۱ برابری مورفین در مقایسه با شاهد مشاهده شد درحالی‌که در ۲۴ ساعت آغازین تجمع مورفین به شدت کاهش یافته بود. نتایج نشان داد، تولید و تجمع کدئین پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت تحت تأثیر این محرک قرار نگرفت و تفاوت معناداری با شاهد نشان نداد (شکل ۳ و ۴).

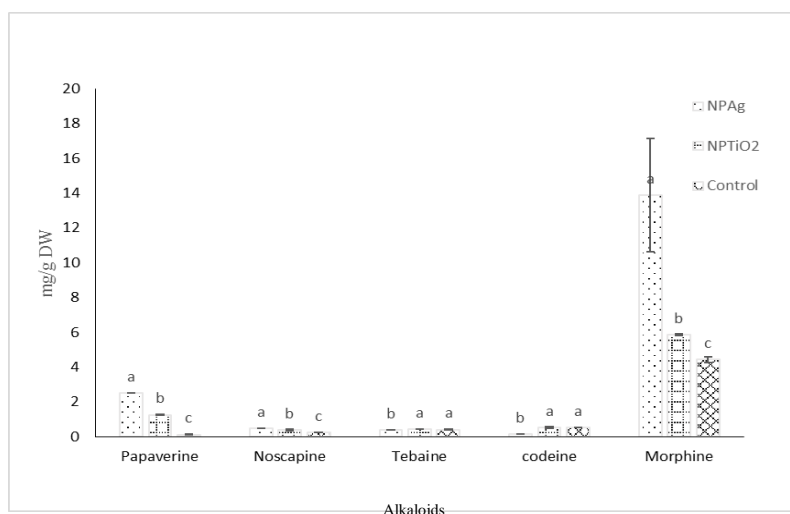
مورفین شد. کاهش میزان کدئین در دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اعمال محرک نانو نقره در مقایسه با شاهد مشاهده شد (شکل ۳ و ۴).

نانو دی‌اکسید تیتانیوم (TiO₂)

نانو دی‌اکسید تیتانیوم منجر به افزایش ۹/۹۵ برابر تجمع پاپورین پس از ۴۸ ساعت در مقایسه با شاهد شد، در صورتی‌که در ۲۴ ساعت آغازین پس از تیمار کاهش تجمع پاپورین مشاهده شد. این نانو محرک در ۲۴ ساعت آغازین تأثیری بر تولید نوسکاپین نداشت و تفاوت معناداری را با شاهد نشان



شکل ۳. تأثیر نانو محرک بر تولید آلکالوئیدها ۲۴ ساعت پس از اعمال در دروایهٔ یاخته‌ای ریشه *P. orientale* L.
Figure 3. The effect of nano elicitors after 24 H on alkaloids production in root suspension culture of *P. orientale* L.



شکل ۴. تأثیر نانو محرک بر تولید آلکالوئیدها ۴۸ ساعت پس از اعمال در دروایهٔ یاخته‌ای ریشه *P. orientale* L.
Figure 4. The effect of nano elicitors after on alkaloids production 48 h in root suspension culture of *P. orientale* L.

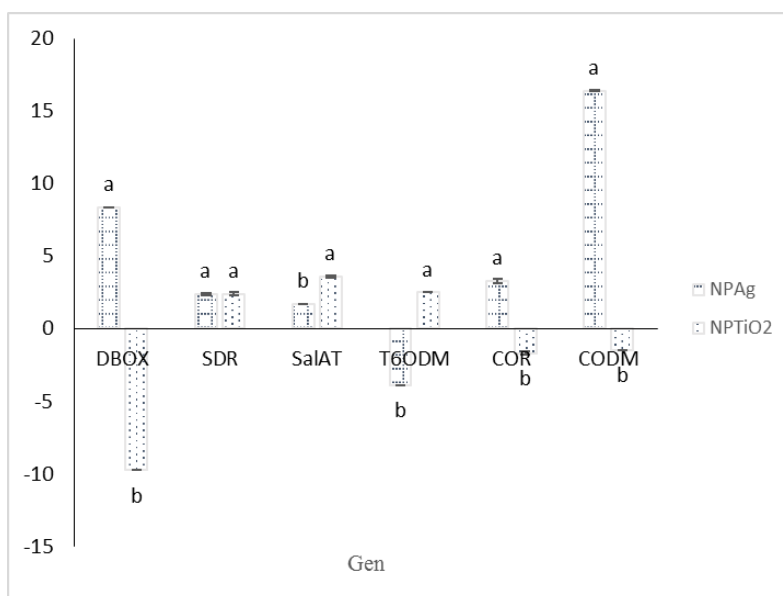
نانو دی‌اکسید تیتانیوم (TiO_2)

تجزیه آماری نشان داد، در درواپه‌های تیمار شده با نانو دی‌اکسید تیتانیوم بیان ژن‌های *SalAT*، *SDR*، *T₆ODM* در هر دو بازه نمونه‌برداری (۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اعمال محرک) افزایش یافت. بیان ژن‌های *COR*، *DBOX* در ۲۴ ساعت آغازین پس از اعمال محرک کاهش یافت اما پس از ۴۸ ساعت افزایش بیان این ژن‌ها مشاهده شد. این نانو ذره منجر به کاهش ۹/۷۷ برابری بیان ژن *DBOX*، پس از ۲۴ ساعت شد. اما پس از ۴۸ ساعت میزان بیان ژن *DBOX* را ۱/۲ برابر افزایش داد. بیان ژن *SDR* در ۲۴ و ۴۸ ساعت به میزان ۲/۴ و ۲/۵۴ برابر افزایش نشان داد. ژن *SalAT* نیز ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اعمال محرک نانو دی‌اکسید تیتانیوم ۳/۵۹ و ۱/۱۶ برابر افزایش یافت. پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت بیان ژن *T₆ODM* به ترتیب به میزان ۲/۵ و ۱/۶۸ برابر افزایش یافت. بیان ژن *COR* پس از ۲۴ ساعت ۱/۶۸ برابر کاهش یافت اما پس از ۴۸ ساعت بیان این ژن ۵/۹۵ برابر افزایش یافت. بیان نسبی ژن *CODM* پس از ۲۴ ساعت کاهش ۱/۴۸ برابری و پس از ۴۸ ساعت افزایش ۱/۰۶ برابری را نشان داد (شکل‌های ۵ و ۶).

بررسی بیان نسبی ژن‌های دخیل در زیست‌ساخت آلکالوئیدها

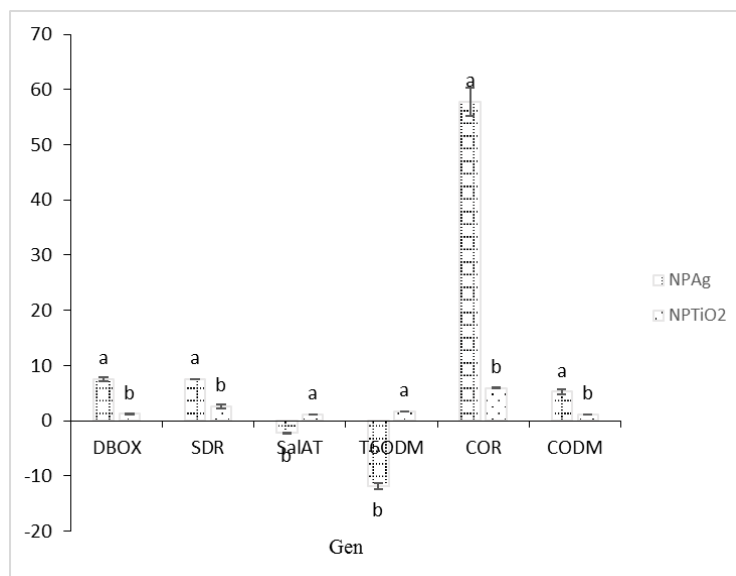
نانو نقره (NPAg)

نتایج به‌دست‌آمده از بررسی بیان ژن‌ها در درواپه‌های ریشه تیمار شده با محرک نانو نقره نشان داد، این محرک به‌صورت بسیار معناداری بر بیان ژن‌های *SDR*، *DBOX*، *SalAT*، *T₆ODM*، *COR* و *CODM* مؤثر بوده است. در این درواپه‌ها ۲۴ ساعت پس از تیمار، افزایش ۸/۳۳ برابری بیان ژن *SDR*، *DBOX* به میزان ۲/۳۶ برابر در مقایسه با شاهد مشاهده شد. ۴۸ ساعت پس از اعمال این نانو محرک نیز افزایش بیان هر دو ژن *DBOX* و *SDR* به ترتیب ۷/۵۲ و ۷/۴۸ برابر مشاهده شد. بیان ژن *SalAT* پس از ۲۴ ساعت به میزان ۱/۷ برابر افزایش یافت در صورتی که پس از ۴۸ ساعت بیان این ژن به میزان ۲/۱۸ برابر کاهش یافت. بیان ژن *T₆ODM* پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت ۳/۹ برابر و ۱۱/۹ برابر کاهش یافت. نتایج نشان داد، بیان ژن *COR* در هر دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اعمال محرک به میزان ۳/۳ و ۵۷/۷۵ برابر افزایش یافت. بیان ژن *CODM* تحت تیمار نانو نقره پس از ۲۴ ساعت به میزان ۱۶/۳۹ برابر افزایش نشان داد. پس از ۴۸ ساعت نیز بیان این ژن ۵/۲۵ برابر افزایش یافت (شکل‌های ۵ و ۶).



شکل ۵. تأثیر نانو محرک بر الگوی بیان نسبی ژن‌های دخیل در زیست‌ساخت آلکالوئیدها ۲۴ ساعت پس از اعمال در درواپه *P. orientale* L. یاخته‌ای ریشه

Figure 5. The effect of nano elicitors after 24 h on genes expression in root suspension culture of *P. orientale* L.



شکل ۶. تأثیر نانو محرک بر الگوی بیان نسبی ژن‌های دخیل در زیست‌ساخت آلکالوئیدها ۴۸ ساعت پس از اعمال در دروایهٔ یاخته‌ای ریشه *P. orientale* L.

Figure 6. The effect of nano elicitors after 48 h on genes expression in root suspension culture of *P. orientale* L.

منجر به تولید متابولیت‌های ثانویه می‌شوند (Zhao *et al.*, 2005; Hegal & Facchini, 2010). در نتایج بررسی‌های خود گزارش دادند که با تجمع تبائین و اریپاوین میزان مورفین و کدئین در کموتایپ‌های مختلف خشخاش افیونی کاهش می‌یابد. مشاهده‌ها در این پژوهش نیز بیانگر تجمع کم تبائین در حضور بالای مورفین بود در صورتی که پژوهش‌های مختلف تجمع مورفین و کدئین در کشت یاخته‌ای خشخاش افیونی را غیرممکن دانسته و تجمع این ترکیب‌ها را وابسته به سامانهٔ شیرابه‌ای در این گیاه دانسته‌اند (Facchini *et al.*, 1996; Kutchan & Huang, 2000; Beaudoin & Facchini, 2014). از میان مورفینان تنها تجمع تبائین در کشت دروایهٔ یاخته‌ای خشخاش افیونی گزارش شده است. در این پژوهش تجمع بالای مورفین در برابر تجمع پایین محصولات حد واسط همچون تبائین مشاهده شد. بر پایهٔ این نتایج می‌توان پینه‌های این گیاه را به‌عنوان منبع جدیدی برای تولید مورفینان‌ها گزارش کرد. نانو دی‌اکسید تیتانیوم به‌عنوان دیگر نانوذرهٔ استفاده‌شده منجر به افزایش پاپاورین، نوسکاپین و مورفین پس از ۴۸ ساعت در کشت دروایهٔ یاخته‌ای ریشهٔ شقایق شرقی شد. Khodayari (2014)، با استفاده از نانو دی‌اکسید

بحث

نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش نشان‌دهندهٔ افزایش پاپاورین، مورفین و نوسکاپین به‌ویژه ۴۸ ساعت پس از اعمال محرک نانو نقره در کشت دروایهٔ یاخته‌ای شقایق شرقی است. Raei *et al.* (2014)، با استفاده از نانو نقره به‌عنوان الیسیور در کشت دروایهٔ یاخته‌ای صبرزد، تولید آلونین را ۴۸ ساعت پس از اعمال محرک افزایش دادند. نانو نقره فعالیت ضد میکروبی دارد گرچه سازوکار سمیت این نانوذره به‌خوبی شناسایی نشده است. اما به نظر می‌رسد این نانوذره با تولید یون نقره و یا به‌صورت نانوذره بر یاخته تأثیر می‌گذارد. یون نقره با اتصال به پروتئین‌های سیستمین‌دار در غشاء پلاسمایی منجر به آسیب‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی غشا و دیوارهٔ یاخته‌ای می‌شود (Levine *et al.*, 1994; Gajjar *et al.*, 2009; Ocsoy *et al.*, 2013). همچنین نانو نقره پس از نفوذ به درون یاخته منجر به تنش‌های اکسایشی (اکسیداتیو) از راه تولید ROSها و مهار آنزیم‌های تنفسی و آنزیم‌های مهم یاخته‌ای می‌شود (Ocsoy *et al.*, 2011; Yin *et al.*, 2013). ROSها به‌صورت مستقیم و یا با فعال کردن مسیر جاسمونیک اسید که پایین‌دست این مسیر سیگنالی در درون یاخته است،

نخستین اعمال این محرک افزایش یافت در صورتی که با میزان افزایش پاپاورین تولیدشده در یاخته‌ها هیچ همخوانی نداشت. احتمال می‌رود نانوقره پس از ورود به یاخته شبکه گسترده‌ای از واکنش‌های اکسایشی و آسیب‌های یاخته‌ای را آغاز می‌کند. یاخته نیز در جهت از بین بردن اثر سمی این نانوذره بیان ژن‌های دفاعی خود و به‌ویژه ژن‌های محصولات احیاکننده را به‌شدت افزایش می‌دهد (Sytra *et al.*, 2013). در این تیمار نیز به نظر می‌رسد که یاخته بیان ژن *DBOX* را به‌شدت افزایش داده باشد اما تحت تأثیر تغییر پس از ترجمه با میزان افزایش متابولیت هیچ همخوانی نداشته باشد. مسیر زیست‌ساخت نوسکاپین، نارکوتین همی‌استال، برای نخستین بار در دو گونه *P. fugax* و *P. pseudo-orientale* شناسایی شد (Sariyar & Shamma, 1986). Chen & Facchini (2013)، ژن *NOS (SDRI)* که مرحله پایانی در ساخت (سنتز) نوسکاپین است را شناسایی کردند. خاموشی این ژن با متد *VIGS* منجر به کاهش معناداری در میزان نوسکاپین و افزایش آلکالوئیدهای نارکوتین همی‌استال‌ها شد. درحالی‌که، خاموشی ژن *NOS* هیچ تأثیر معناداری در تجمع آلکالوئیدهای بالادستش نداشت (Chen & Facchini, 2013). بیشترین میزان بیان ژن *NOS* (۷/۴۸ برابر) پس از ۴۸ ساعت توسط نانو نقره مشاهده شد. میزان نوسکاپین تجمع یافته نیز ۱/۸۸ برابر افزایش یافت. نتایج نشان‌دهنده افزایش بیان نسبی ژن *SalAT* در تیمار نانو دی‌اکسید تیتانیوم پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت بود. بیشترین میزان بیان این ژن ۲۴ ساعت پس از اعمال نانو دی‌اکسید تیتانیوم به‌عنوان تیمار در دروايه یاخته‌ای (۳/۵۹ برابر) مشاهده شد. همچنین میزان افزایش تجمع تبائین نیز مشاهده شد. بررسی الگوی بیان این ژن توسط Zeigler *et al.* (2005)، نشان‌دهنده حضور این ژن در *P. somniferum*، *P. orientale* و *P. bracteatum* بود. این ژن به‌عنوان یکی از ژن‌های کلیدی در مسیر زیست‌ساخت مورفینان شناسایی شده است (Facchini *et al.*, 2008). افزایش بیان ژن *SalAT* افزایش تجمع مورفین را در پی داشت گرچه خاموشی این ژن منجر به تجمع سالوتاریدین مشاهده نشد (Allen *et al.*,

تیتانیوم تولید سنگوئینارین و تبائین را در کشت دروايه خشخاش افیونی افزایش دادند. نانو دی‌اکسید تیتانیوم تأثیر مثبتی در کنترل بیماری‌های گیاهی و فعالیت‌های ضد میکروبی دارد (Cui *et al.*, 2009; Ram Prasad & Prasad, 2014). این نانوذره با جذب نور قادر به تولید رادیکال‌های اکسیژن است و به‌این ترتیب موجب تحریک شبکه دفاعی گیاه می‌شود (Woods *et al.*, 2005; Lie *et al.*, 2008). افزون بر این نانو دی‌اکسید تیتانیوم خواص نوری دارد که منجر به فعالیت کلروپلاست می‌شود (Monica & Cremonini, 2009). در این پژوهش بیان نسبی ژن‌های *DBOX*، *SDR*، *SalAT*، *T₆ODM*، *COR* و *CODM* در دو بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت بررسی شد. این ژن‌ها به‌عنوان ژن‌های کلیدی در مسیر زیست‌ساخت *Bias* شناخته می‌شوند. خاموشی این ژن‌ها منجر به تولید نشدن آلکالوئیدهای خشخاش همچون مورفین، کدئین، پاپاورین و نوسکاپین می‌شود. الگوی بیان ژن *DBOX* با میزان پاپاورین تجمع یافته درون‌یاخته به‌کلی همخوانی داشت. این ژن به‌عنوان ژن کلیدی در مسیر زیست‌ساخت پاپاورین و سنگوئینارین شناخته شده است. سنگوئینارین ترکیب ضد باکتریایی است. تجمع سنگوئینارین برخلاف مورفین و کدئین که در شیرایه گیاه مشاهده می‌شود، در ریشه گیاه است. Hegel *et al.* (2012)، در نتایج بررسی‌های خود نشان دادند، میزان تجمع رونوشت‌های *DBOX* در ریشه گیاه خشخاش بالاست. زیست‌ساخت سنگوئینارین در شبکه آندوپلاسمی زبر (ER) صورت می‌گیرد و پس از آن با ریزکیسه (ویزیکول)‌هایی به واکوئل‌های موجود در ریشه گیاه منتقل می‌شوند. به نظر می‌رسد که پاپاورین نیز در ریشه گیاه تولید می‌شود و آنگاه انتقال آن به اندام‌های هوایی گیاه صورت می‌گیرد (Beaudoin & Facchini, 2014). بیشترین میزان بیان این ژن توسط نانوقره پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب ۸/۳۳ و ۷/۵۲ برابر مشاهده شد. میزان پاپاورین نیز در این دو تیمار ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب ۱/۳۳ و ۱۹/۹۳ برابر افزایش یافت. نتایج نشان‌دهنده آن است که بیان این ژن در تیمار نانوقره در ساعت‌های

زیست‌ساخت مورفین به میزان بیشتری در مقایسه با مسیر اول در تولید مورفین نقش ایفا کرده باشد.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش مؤید آن است که محرک‌های مختلف تأثیر متفاوتی در تولید و تجمع آلکالوئیدها در کشت دروایه یاخته‌ای دارند. افزون بر این به نظر می‌رسد که پینه‌های گیاه شقایق شرقی بر خلاف پینه‌های خشخاش افیونی قابلیت تولید مورفین را دارد. بیشترین میزان تجمع آلکالوئیدها ۴۸ ساعت پس از اعمال محرک‌ها در دروایه یاخته‌ای ریشه مشاهده شد. بررسی الگوی بیان ژنی نیز نشان‌دهنده آن بود که تنها بیان یک ژن بر تولید و تجمع آلکالوئیدها در کشت دروایه یاخته‌ای مؤثر نیست بلکه در تنظیم کل مسیر زیست‌ساخت آلکالوئیدها توسط شبکه گسترده‌ای از عامل‌های مولکولی، بیوشیمیایی و یاخته‌ای تأثیرگذار هستند. در این بررسی تغییر بسیار متنوعی از الگوی بیان ژنی و میزان تجمع متابولیت‌ها مشاهده شد. در برخی موارد الگوی بیان ژنی با میزان تولید متابولیت همخوانی داشت در صورتی که در مواردی نیز بدون همخوانی مشاهده شد. احتمال می‌رود که سطوح دیگری از کنترل به غیر از رونویسی در تنظیم ژن‌های دخیل در زیست‌ساخت آلکالوئیدها دخیل هستند. که نیازمند بررسی‌های بیشتر در حوزه پروتئومیکس و تأثیر عامل‌های رونویسی بر بیان ژن‌های دخیل در زیست‌ساخت آلکالوئیدها است.

سپاسگزاری

از دفتر سیاستگذاری و برنامه‌ریزی امور پژوهشی وزارت علوم تحقیقات و فناوری برای حمایت مالی از تحقیق حاضر در قالب طرح کاربردی به شماره شناسه ۲۰۰، تشکر و قدردانی می‌گردد.

(2008). بررسی‌ها روی *SalAT* نشان‌دهنده بیان این ژن در همه اندام‌های گیاه بالغ خشخاش افیونی است. همچنین بیان این ژن در بافت‌های نامتمایز نیز گزارش شده است (Khodayari, 2014). مورفینان در آوند آبکش و لاتیسيفرا تولید و در لاتیسيفرا تجمع می‌یابند. یاخته‌های همراه آوند آبکش مسئول تولید آنزیم‌های مورد نیاز برای زیست‌ساخت این گروه از آلکالوئیدها بوده (Beaudoin & Facchini, 2014). کاهش بیان نسبی ژن *T6ODM* در تیمارهای نانو نقره و همچنین افزایش بیان نسبی این ژن در تیمار نانو دی‌اکسید تیتانیوم در هر دو بازه زمانی مشاهده شد. بیشترین میزان بیان این ژن ۲۴ ساعت پس از اعمال نانو دی‌اکسید تیتانیوم بود. افزایش بیان نسبی ژن‌های *COR* و *CODM* نیز مشاهده شد. همچنین نتایج نشان‌دهنده افزایش تجمع مورفین و کاهش تجمع کدئین بود. آنزیم *T6ODM* تبائین تولیدشده را در فرآیند یک واکنش بسیار سریع به کدئین تبدیل می‌کند. آنگاه کدئینون توسط *COR* به کدئین تبدیل می‌شود. این دو آنزیم در مسیر دیگری که از تبائین انشعاب گرفته و اریپاوین را به مورفین تبدیل می‌کند ایفای نقش نیز می‌کنند. کدئین توسط *CODM* به مورفین تبدیل می‌شود. این آنزیم نخستین مرحله در مسیر دیگر که حجم کمی را به خود اختصاص می‌دهد در فرآیند ۳-O-دمتیلایشن تبائین به اریپاوین شرکت می‌کند (Beaudoin & Facchini, 2014). Hegal & Facchini (2010)، با خاموش‌سازی دو ژن *T6ODM* و *CODM* مشاهده کردند که خاموش‌سازی ژن *T6ODM* منجر به کاهش میزان مورفین و کدئین شد. همچنین خاموش‌سازی *CODM* نیز کاهش میزان مورفین را در پی داشت. با توجه به مسیر زیست‌ساخت مورفینان، کاهش بیان نسبی پایین ژن *T6ODM* و افزایش بیان نسبی دو ژن *COR* و *CODM* همچنین میزان زیاد مورفین احتمال می‌رود مسیر دوم

REFERENCES

- Allen, R. S., Miller, J. A., Chitty, J. A., Fist, A. J., Gerlach, W. L. & Larkin, P. J. (2008). Metabolic engineering of morphinan alkaloids by over-expression and RNAi suppression of salutaridinol 7-O-acetyltransferase in opium poppy. *Plant Biotechnology Journal*, 6(1), 22-30.
- Beaudoin, G. A. & Facchini, P. J. (2014). Benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis in opium poppy. *Planta*, 240(1), 19-32.

3. Castiglione, M. R., Frediani, M., Ravalli, C., Venora, G. & Cremonini, R. (2009). Cytological characterization of *Vicia oroboides* Wulfen in Jacq. *Protoplasma*, 236(1-4), 21-27.
4. Chen, X. & Facchini, P. J. (2014). Short-chain dehydrogenase/reductase catalyzing the final step of noscapine biosynthesis is localized to laticifers in opium poppy. *The Plant Journal*, 77(2), 173-84.
5. Cho, H. Y., Son, S. Y., Rhee, H. S., Yoon, S. Y. H., Lee-Parsons, C. W. & Park, J. M. (2008). Synergistic effects of sequential treatment with methyl jasmonate, salicylic acid and yeast extract on benzophenanthridine alkaloid accumulation and protein expression in *Eschscholtzia californica* suspension cultures. *Journal of biotechnology*, 135(1), 117-122.
6. Croteau, R., Kutchan, T. M. & Lewis, N. G. (2000). Natural products (secondary metabolites). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, 24, 1250-319.
7. Cui, H., Zhang, P. & Gu, W. (2009). Application of anatase TiO₂ sol derived from peroxotitanic acid in crop plant diseases control and growth regulation. *NSTI-Nanotech*, 2, 286-289.
8. Daud, Z. & Keng, C. L. (2006). Effects of plant growth regulators on the biomass of embryogenic cells of *Cyperus aromaticus* (Ridly) Mattf and Kukenth. *Biotechnol*, 5, 75-78.
9. De Luca, V., Salim, V., Atsumi, S. M. & Yu, F. (2012). Mining the biodiversity of plants: a revolution in the making. *Science*, 336(6089), 1658-61.
10. Facchini, P. J. & De Luca, V. (2008). Opium poppy and Madagascar periwinkle: model non-model systems to investigate alkaloid biosynthesis in plants. *The Plant Journal*, 54(4), 763-84.
11. Gajjar, P., Pettee, B., Britt, D. W., Huang, W., Johnson, W. P. & Anderson, A. J. (2009). Antimicrobial activities of commercial nanoparticles against an environmental soil microbe *Pseudomonas putida* KT2440. *Journal of Biological Engineering*, 3(9), 1-3.
12. Hagel, J. M., Beaudoin, G. A., Fossati, E., Ekins, A., Martin, V. J. & Facchini, P. J. (2012). Characterization of a flavoprotein oxidase from opium poppy catalyzing the final steps in sanguinarine and papaverine biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 287(51), 42972-83.
13. Hagel, J. M. & Facchini, P. J. (2010). Dioxygenases catalyze the O-demethylation steps of morphine biosynthesis in opium poppy. *Nature Chemical Biology*, 6(4), 273-5.
14. Hamill, J. D. & Rhodes, M. J. C. (1993). Manipulating secondary metabolism in culture. In *Biosynthesis and Manipulation of Plant Products* (pp. 178-209). Springer Netherlands.
15. Hashemi, S. M. & Naghavi, M. R. (2016). Production and gene expression of morphinan alkaloids in hairy root culture of *Papaver orientale* L. using abiotic elicitors. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 125(1), 31-41.
16. Huang, F. C. & Kutchan, T. M. (2000). Distribution of morphinan and benzophenanthridine alkaloid gene transcript accumulation in the opium poppy *Papaver somniferum*. *Phytochemistry*, 53, 555-564.
17. Khodayari, M. (2014). *The effect of elicitors on genes expression in some alkaloids production of P. somniferum* L.. Ph.D. Thesis. Faculty of Agronomy & Plant Breeding Tehran University, Iran.
18. Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R. & Lamb, C. (1994). H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*, 79(4), 583-593.
19. Makkar, H. P., Siddhuraju, P., Becker, K., Makkar, H. P., Siddhuraju, P. & Becker, K. (2007). *Trypsin Inhibitor* (pp. 1-6). Humana Press.
20. Monica, R. C. & Cremonini, R. (2009). Nanoparticles and higher plants. *Caryologia*, 62(2), 161-5.
21. Murthy, H. N., 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)*, 118(1), 1-6.
22. Namdeo, A. G. (2007). Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. *Pharmacognosy reviews*, 1(1), 69-79.
23. Nyman, U. & Bruhn, J. G. (1979). *Papaver bracteatum*-A summary of current knowledge. *Planta medica*, 35, 98-117.
24. Ochoy, I., Paret, M. L., Ochoy, M. A., Kunwar, S., Chen, T., You, M. & Tan, W. (2013). Nanotechnology in plant disease management: DNA-directed silver nanoparticles on graphene oxide as an antibacterial against *Xanthomonas perforans*. *Acs Nano*, 7(10), 8972-80.
25. Prasad, R., Kumar, V. & Prasad, K. S. (2014). Nanotechnology in sustainable agriculture: present concerns and future aspects. *African Journal of Biotechnology*, 13(6), 705-13.
26. Raei, M., Angaji, S. A., Omid, M. & Khodayari, M. (2014). Effect of abiotic elicitors on tissue culture of *Aloe vera*. *Journal of Biosciences (IJB)*, 5(1), 74-81.
27. Rao, S. R. & Ravishankar, G. A. (2002). Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology advances*, 20(2), 101-153.
28. Sariyar, G. & Shamma, M. (1986). Six alkaloids from *Papaver* species. *Phytochemistry*, 25(10), 2403-2406.
29. Sariyar, G. (2002). Biodiversity in the alkaloids of Turkish *Papaver* species. *Pure and applied chemistry*, 74(4), 557-74.

30. Schillmiller, A. L., Last, R. L. & Pichersky, E. (2008). Harnessing plant trichome biochemistry for the production of useful compounds. *The Plant Journal*, 54(4), 702-11.
31. Servin, A., Elmer, W., Mukherjee, A., De la Torre-Roche, R., Hamdi, H., White, J. C., Bindraban, P. & Dimkpa, C. (2015). A review of the use of engineered nanomaterials to suppress plant disease and enhance crop yield. *Journal of Nanoparticle Research*, 17(2), 1-21.
32. Shafiee, A., Lalezari, I., Nasseri-Nouri, P. & Asgharian, R. (1975). Alkaloids of *Papaver orientale* and *Papaver pseudo-orientale*. *Journal of pharmaceutical sciences*, 64(9), 1570-2.
33. Sytar, O., Kumar, A., Latowski, D., Kuczynska, P., Strzałka, K. & Prasad, M. N. V. (2013). Heavy metal-induced oxidative damage, defense reactions, and detoxification mechanisms in plants. *Acta physiologiae plantarum*, 35(4), 985-999.
34. Woods, A., Dickerson, K., Heath, R., Hong, S. P., Momcilovic, M., Johnstone, S. R. & Carling, D. (2005). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase-β acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell metabolism*, 2(1), 21-33.
35. Yin, L., Cheng, Y., Espinasse, B., Colman, B. P., Auffan, M., Wiesner, M., Rose, J., Liu, J. & Bernhardt, E. S. (2011). More than the ions: the effects of silver nanoparticles on *Lolium multiflorum*. *Environmental Science & Technology*, 45(6), 2360-7.
36. Zakaria, R. A., Hour, M. H. & Zare, Z. (2013). Callus production and regeneration of the medicinal plant *Papaver orientale*. *African Journal of Biotechnology*, 31(54), 11152-6.
37. Zhao, J., Davis, L. C. & Verpoorte, R. (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 23(4), 283-333.
38. Ziegler, J., Facchini, P. J., Geißler, R., Schmidt, J., Ammer, C., Kramell, R., Voigtländer, S., Gesell, A., Pienkny, S. & Brandt, W. (2009). Evolution of morphine biosynthesis in opium poppy. *Phytochemistry*, 70(15), 1696-707.