

بررسی اثر محرک زیستی و غیر زیستی بر بیان ژن *Hyp-1* در گل راعی

Investigating The Effect of Biological and non-Biological Elicitor on Expression of *Hyp-1* Gene in *Hypericum perforatum*

زهرا بابائی^{۱*}، محمود سلوکی^۲، بهمن فاضلی‌نسب^۳

- ۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه گیاهان دارویی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل
۲- دانشیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل
۳- مربی، گروه پژوهشی زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه زابل

Babaei Z^{1*}, Solouki M², Fazeli-Nasab B³

- 1- MSc Student, Department of medicinal Plants, Faculty of Agriculture, University of Zabol
2- Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, university of Zabol
3- Instructor, Research Department of Agronomy and Plant Breeding, University of Zabol

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: z.babaei1992@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۶/۸/۲۰ - تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۲/۱۵)

چکیده

گل راعی از خانواده هیپریکاسه، دارای خواص متعدد دارویی نظیر ضدافسردگی، ضد باکتریایی، ضد ویروسی و ضد توموری است؛ اما بیشترین تأثیر آن در درمان افسردگی گزارش شده که این فعالیت عمدتاً به ترکیبات فنلی هایپرفورین و هایپرسین نسبت داده شده است. هدف از تحقیق حاضر ارزیابی اثر کیتوزان (صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ ppm) و نانو ذرات نقره (صفر، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ ppm) بر بیان هایپرسین (ژن *Hyp-1*) بود که بدین منظور آزمایشی بر اساس روش Real Time PCR به صورت فاکتوریل در قالب کاملاً تصادفی با سه تکرار در دو بازه زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعته انجام شد. نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که اثر متقابل نانو ذرات نقره و کیتوزان در بازه زمانی مختلف بر بیان ژن هایپرسین معنی دار بوده ($P < 0.01$) به طوری که بیشترین میزان بیان ژن *Hyp-1* حاصل از سطح ۵۰ ppm کیتوزان و صفر ppm نانو ذرات نقره در بازه زمانی ۴۸ ساعت بود. در کل نتایج این تحقیق نشان داد که نانو ذرات نقره اثر منفی بر بیان ژن *Hyp-1* داشته و با افزایش غلظت نانو ذرات نقره بیان ژن *Hyp-1* کم شده اما کیتوزان اثر مثبتی بر بیان ژن *Hyp-1* داشته ولی با افزایش غلظت تا سطح ۲۰۰ ppm نیز از میزان بیان ژن کاسته شد.

واژه‌های کلیدی

افسردگی
کیتوزان
نانو ذرات نقره
هایپرسین

باعث بیوستتز و انباشت متابولیت‌های ثانویه می‌شود (Zhao et al. 2005).

کیتوزان (پلی ساکارید پلی کاتیونی)، به‌عنوان یکی از محرک‌های زیستی کارآمد، جهت بهبود بخشیدن تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی اثبات شده‌است (Cheng et al. 2006). از موارد دیگری که به‌تازگی به‌عنوان محرک استفاده می‌شود، نانو ذرات هستند و از آنجاکه نانو ذرات قادر به تحریک مکانیسم دفاعی در سلول و تولید متابولیت‌های ثانویه هستند نتایج قابل‌توجهی را می‌توان انتظار داشت (Bondarian et al. 2013).

در تحقیقی بیان ژن‌های *CAD*، *PAL*، *CCR* و *PLR* تحت تاثیر کیتوزان بررسی و مشخص شده بود که تا ۷۲ ساعت بعد از اعمال تیمار افزایش اما در ۱۲۰ ساعت بعد از اعمال تیمار کاهش یافته‌اند (Esmailzadeh Bahabadi and Sharifi 2013)؛ هم‌چنین کاهش بیان ژن‌های *DBR* و *SQS* در ۴۸ ساعت بعد از اعمال تیمار و افزایش بیان ژن *SQS* در ۸ ساعت بعد از اعمال تیمار گزارش شده‌است (Ghassemi et al. 2015). افزایش ۴ برابری بیان ژن *DBOX* در ۴۸ ساعت پس از اعمال محرک نانو ذرات نقره، کاهش بیان در ۷۲ ساعت پس از اعمال تیمار و نهایت عدم تاثیر معنی‌دار بر بیان در ۱۶۸ ساعت بعد از اعمال تیمار نیز گزارش شده‌است (Khodayari et al. 2015a).

با توجه به اینکه تاکنون گزارشی مبنی بر تاثیر نانوذرات نقره و کیتوزان بر بیان ژن *Hyp-1* در گل راعی ذکر نشده و از طرفی نیز به‌علت اهمیت گل راعی به عنوان یک گیاه دارویی در درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله افسردگی (بر اثر وجود هایپرسیسین) و نهایت مؤثر بودن ژن *Hyp-1* در مسیر بیوستتزی هایپرسیسین لذا در این تحقیق سعی شد تا میزان بیان ژن *Hyp-1* توسط کیتوزان و نانوذرات نقره مورد ارزیابی قرار گیرد.

بذرهای گل راعی (*Hypericum perforatum L.*) از بانک ژن تهیه و سپس در آزمایشگاه گیاه‌شناسی دانشگاه زابل تعیین گونه شد. بذور به مدت یک ماه (جهت شکستن خواب بذر) در فریز ۲۰- نگه‌داری شد، پس از شست و شوی سطحی بذرها با هیپوکلراید سدیم ۱ درصد با آب مقطر آبکشی و در بستر کشت (شامل: پرلیت، کوکو پیت، پیت ماس:۱:۱:۱) اتوکلاو شده در لیوان‌های پلاستیکی و در شرایط گلخانه‌ای کشت شدند.

گل راعی (*Hypericum perforatum L.*) متعلق به تیره کلایزاسه (Hazler Pilepic et al. 2008)، بومی اروپا، آسیا و شمال آفریقا است که در ایران در نواحی شمال، شمال شرق، شمال غرب و غرب و هم‌چنین در استان‌های فارس، کهگیلویه و دامنه کوه‌های البرز می‌روید (Barnes et al. 2018). این گیاه حاوی دامنه‌ی وسیعی از متابولیت‌های ثانویه همچون فلاونوئیدها، پروانتوسیانیدین‌ها، نفتودیانترون‌ها (هایپرسیسین و سودوهایپرسیسین)، آسپیل فلوروگلوکوسینول‌ها (هایپرفورین و ادهایپرفورین) است (Glisic et al. 2006) که خواص درمانی زیادی چون کم‌کاری تیروئید، ضدالتهابی، ضدویروسی، آنتی‌اکسیدان، ضد تومور و ضد باکتری را دارد (Caraci et al. 2011) اما بیش‌ترین تاثیر و کاربرد آن تاکنون در درمان افسردگی گزارش شده‌است (Glisic et al. 2006).

هرچند درک ضعیفی از مسیرهایی ساخت هایپرفورین و هایپرسیسین وجود دارد اما هر دو گروه این ترکیب از طریق مسیر پلی کیتید سنتتاز (PKSS) ساخته می‌شوند که نقش آنزیم نیز دارد. به‌احتمال زیاد شروع ساخت هایپرفورین و هایپرسیسین با جمع شدن یک مولکول از استیل کو آنزیم آ (CoA) با ۷ مولکول مالونیل-کوآ (malonyl-CoA) و به شکل خطی اکتا کیتید زنجیره‌ای است که تحت cyclization خاص به شکل آمودین آنترون می‌شود (Michalska et al. 2010). این واکنش توسط PKS III با فعالیت اکتاکتید (OKS) انجام شده و آمودین آنترون نیز به آمودین اکسید شده که احتمالاً توسط فعالیت آمودین آنترون اکسیژناز صورت می‌گیرد (Karioti and Bilia 2010). تراکم آمودین آنترون و به دنبال آن کاهش آب که پس از آن اکسیداسیون فنلی است منجر به شکل‌گیری پروتوهایپرسیسین می‌شود (Zobayed et al. 2006). همه این واکنش‌ها توسط یک جفت پروتئین فنلی به نام *Hyp-1* کاتالیز می‌شود (Michalska et al. 2010).

در میان روش‌های زیادی که به‌منظور افزایش تولید مواد مؤثره گیاهان استفاده می‌شود، موادی از جمله کیتوزان، جاسمونیک اسید، نانو ذرات نقره، تیتانیوم و غیره به شکل محرک که ترکیباتی با منشأ زیستی یا غیر زیستی هستند که با القای سامانه‌ی دفاعی

مخلوط واکنش PCR برای هر نمونه با حجم نهایی ۲۰ میکرو لیتر شامل ۴ میکرو لیتر مخلوط EvaGreen، ۲ میکرو لیتر آغازگر (یک میکرو لیتر به ازای هر کدام از آغازگرهای رفت و برگشت)، ۱۴ میکرو لیتر آغازگر دوبار تقطیر و ۱ میکرو لیتر نمونه cDNA بود. واکنش RT-PCR با چرخه دمایی شامل یک چرخه مرحله واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۵°C به مدت ۱۵ دقیقه و ۴۰ چرخه (مرحله ی واسرشته سازی، در دمای ۹۵°C به مدت ۲۰ ثانیه، مرحله ی اتصال در دمای ۶۱°C به مدت ۲۰ ثانیه و مرحله ی طولی شدن در دمای ۷۲°C به مدت ۲۰ ثانیه) انجام شد. منحنی ذوب نیز با افزایش دما از ۵۵°C تا ۹۹°C، هر پنج ثانیه یک درجه بود. تمامی واکنش های PCR در سه تکرار انجام شد. میزان بیان ژن مورد مطالعه با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen 2001) محاسبه شد. در نهایت داده های حاصله با استفاده از نرم افزار آماری SAS 9.1 مورد تجزیه قرار گرفت و مقایسه میانگین داده ها نیز در سطح احتمال پنج درصد با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن ارزیابی شد.

$$\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct \text{ نمونه کنترل} - \Delta Ct \text{ نمونه آزمایشی})$$

$$\Delta Ct = (\Delta Ct \text{ ژن خانه دار} - \Delta Ct \text{ ژن هدف})$$

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده ها نشان داد که اثرات اصلی کیتوزان، نانو ذرات نقره، زمان، اثرات متقابل دوگانه و سه گانه بر بیان ژن *Hyp-1* در سطح احتمال یک درصد معنی دار شدند ($P < 0.05$). بیشترین میزان بیان ژن در غلظت ۵۰ ppm از کیتوزان مشاهده شد. تأثیر محلول کیتوزان بر بیان ژن مذکور تا غلظت ۲۰۰ ppm نسبت به شاهد سیر صعودی داشت، اما با افزایش غلظت کیتوزان بیان ژن *Hyp-1* سیر نزولی داشته است (شکل ۲A).

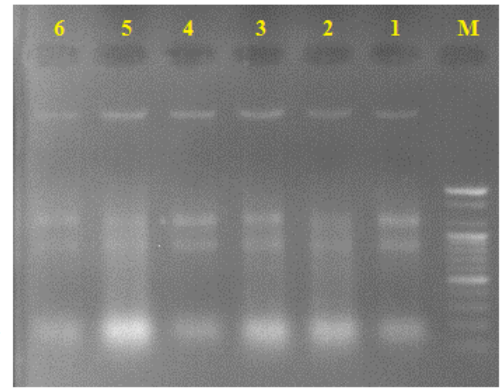
این آزمایش به صورت فاکتوریل ۳ عاملی در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا شد. فاکتور اول شامل: کیتوزان (صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ ppm)، فاکتور دوم نانو ذرات نقره (صفر، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ ppm) و فاکتور سوم زمان (۴۸ و ۷۲ ساعته) بود که در مرحله ی ۴ برگگی گیاهچه ها (پس از اسپری کردن برگ ها با آب مقطر به منظور زدودن گرد و غبار) اعمال تیمار شدند.

در این پژوهش از آغازگرهای اختصاصی ژن *HypPR10.1* به همراه ژن خانه دار ۱۸s استفاده شد. طراحی این آغازگر (جدول ۱) بر اساس انتهای ۳' به کمک داده های موجود در سایت NCBI (National Center for Biotechnology Information) و همچنین نرم افزار Primer Premier 5 انجام شد استخراج RNA کل با استفاده از کیت کیاژن (شرکت Qiagen، آلمان) انجام و برای حذف DNA ژنومی نیز از کیت DNase (شرکت Extragene، تایوان) استفاده شد. کمیت RNA استخراج شده در دستگاه نانودراپ (مدل VDC۲۴، شرکت Analytik jena AG، انگلستان) و کیفیت آن با استفاده از ژل آگاروز یک درصد تعیین شد. مشاهده ی باندهای RNA ریبوزومی 18s و 28s به طور مشخص RNA (Wieczorek et al. 2012) نشان دهنده ی کیفیت مناسب RNA استخراج شده در تحقیق حاضر بود (شکل ۱). سپس از RNA تیمار شده با Dnase برای ساخت cDNA استفاده شد. ضمناً در واکنش PCR بجای استفاده از cDNA از RNA به عنوان الگو (جهت انجام آزمایش کنترل منفی) استفاده شد.

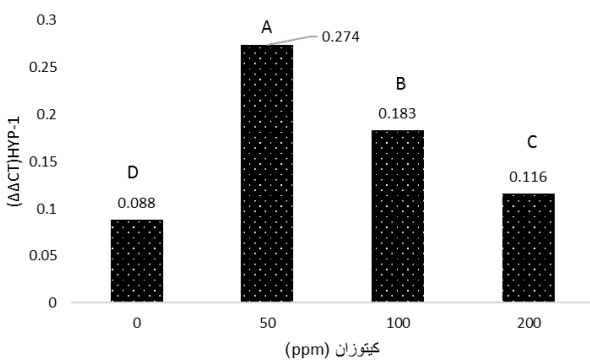
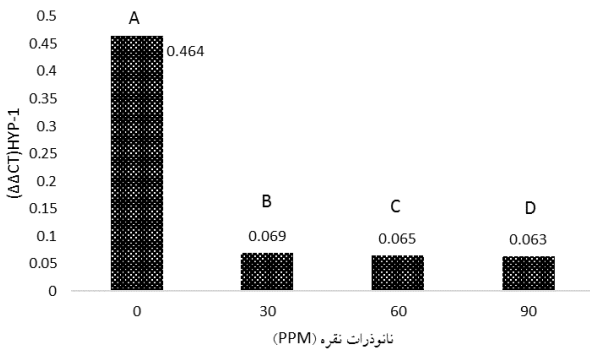
بیان ژن با روش Real Time PCR و با استفاده از کیت EvaGreen (شرکت Solis BioDyne) و آغازگرهای مربوطه در دستگاه Real Time PCR (مدل Rotor-Gene 3000، شرکت Corbett Research، استرالیا) انجام شد.

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق

ژن	پرایمر (3'→5')	طول قطعه تکثیری	دمای اتصال	رفرنس و یا کد دسترسی به ژن در NCBI
<i>Hyp-1</i>	CAGGCTGTTTAAGGCATTGGTC(Forward)	142	61	KU565780
	GGGATGTCCATCAACGAAAGTG(Reverse)			
18s rRNA	AAACGGCTACCACATCCAAG(forward)	247	59	(Karppinen & Hohtola 2008)
	CAACCCAAAGTCCAACACTACG(reverse)			



شکل ۱- کمیت و کیفیت RNA استخراج شده از گل راعی



شکل ۲- اثر غلظت‌های مختلف کیتوزان و نانو ذرات نقره بر میزان بیان ژن *Hyp-1* در گل راعی. حروف مشترک نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار است.

تاکنون پژوهش‌های زیادی در رابطه با تأثیر محرک‌ها بر بیان ژن‌های مختلف صورت گرفته است، در این پژوهش نمونه‌های تیمار شده با کیتوزان، بیش‌ترین میزان بیان ژن را نشان دادند که این امر برگرفته از تأثیر مثبت کیتوزان در جهت افزایش تولید متابولیت‌های ثانوی است (Tahsili et al. 2016).

(Esmailzadeh Bahabadi and Sharifi (2013) با بررسی بیان ژن *PLR*، *CCR*، *CAD* و *PAL* اظهار داشتند که بیان این ژن‌ها تحت تأثیر کیتوزان، افزایش یافته است.

اثر اصلی نانو ذرات نقره نیز بر بیان ژن *Hyp-1* موثر و با افزایش غلظت نانو ذرات نقره بیان ژن نسبت به شاهد کاهش پیدا کرده و سیر نزولی داشته است (شکل ۲B). اثر زمان بر بیان ژن معنی‌دار و مشخص شد که هر چه مدت زمان تماس تیمارها (کیتوزان و نانو ذرات نقره) با نمونه‌ها افزایش یافته از میزان بیان ژن کاسته شده است به‌گونه‌ای که در بازه‌ی زمانی ۴۸ ساعت بیان ژن بیش‌تری نسبت به بازه‌ی زمانی ۷۲ ساعت مشاهده شد.

اثرات متقابل کیتوزان و نانو ذرات نقره و همچنین زمان اعمال تیمار بر بیان ژن *Hyp-1* موثر و مشخص شد که بیش‌ترین میزان بیان در تیمار کیتوزان (۵۰ ppm)، نانو ذرات نقره (صفر ppm) و زمان (۴۸ ساعته) به‌دست آمد (جدول ۲). در کل مشخص شد که نانو ذرات نقره چه در قالب اثر ساده و چه در حالت اثر متقابل تأثیر مثبتی بر بیان ژن *Hyp-1* نداشته هر چند اثر ساده آن نیز منفی بوده است که به‌نظر می‌رسد سمیت نانو ذرات عامل منفی شدن اثر آن در بیان ژن *Hyp-1* است. اثر اصلی نانو ذرات نقره نیز بر بیان ژن *Hyp-1* موثر و با افزایش غلظت نانو ذرات نقره بیان ژن نسبت به شاهد کاهش پیدا کرده و سیر نزولی داشته است (شکل ۲B). اثر زمان بر بیان ژن معنی‌دار و مشخص شد که هر چه مدت زمان تماس تیمارها (کیتوزان و نانو ذرات نقره) با نمونه‌ها افزایش یافته از میزان بیان ژن کاسته شده است به‌گونه‌ای که در بازه‌ی زمانی ۴۸ ساعت بیان ژن بیش‌تری نسبت به بازه‌ی زمانی ۷۲ ساعت مشاهده شد.

اثرات متقابل کیتوزان و نانو ذرات نقره و همچنین زمان اعمال تیمار بر بیان ژن *Hyp-1* مؤثر و مشخص شد که بیش‌ترین میزان

جدول ۲- مقایسه میانگین کیتوزان و نانوذرات نقره بر بیان ژن *Hyp-1* گل راعی در دو بازه زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعته

بازه زمانی		منابع تغییر	
۷۲ ساعته	۴۸ ساعته	نانو ذرات نقره	کیتوزان
0.64k	0.63k	0	0
0.007qrs	0.199i	30	
0.006qrs	0.162j	60	
0.003s	0.202i	90	50
0.628d	0.751a	0	
0.036l	0.243h	30	
0.012pqrs	0.27g	60	100
0.016opq	0.24h	90	
0.654c	0.714b	0	
0.012pqrs	0.025mno	30	200
0.015opqr	0.02nop	60	
0.004rs	0.19nop	90	
0.529e	0.31f	0	200
0.004rs	0.029lmn	30	
0.004s	0.034lm	60	
0.005rs	0.015opqr	90	

حروف مشترک نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار است.

داشته‌اند که تمام ژن‌های مورد مطالعه بیش‌ترین تغییرات بیانی را در ساعت‌های اولیه پس از تیمار با نانو محرک‌ها نشان داده و پس از گذشت زمان، بیان آن‌ها به‌طور معنی‌داری کاهش یافته است. به‌نظر می‌رسد می‌توان از نانو محرک‌ها برای افزایش بیان ژن‌های مؤثر در مسیر بیوسنتزی استفاده کرد اما باید به این نکته توجه داشت که از مدت‌زمان بهینه محرک استفاده کرد، زیرا وجود مستمر محرک خود باعث کاهش ژن‌های مطلوب مورد نظر شده (Khoshnodi et al. 2013; Khodayari et al. 2015b)؛ و از آنجایی‌که متابولیت‌های تولیدشده عمدتاً در واکنش‌های دفاعی سلول تولید می‌شوند، افزایش آن‌ها منجر به یک سری تغییرات سلولی، واکنش‌های فوق حساسیت و در نهایت مرگ سلولی می‌شود (Khodayari et al. 2015b).

Nair et al. (2010) معتقدند که در مطالعات بیان ژن، خصوصیات نانو ذرات، غلظت آن و بافت مورد استفاده بسیار حائز اهمیت‌اند، به‌دلیل اینکه اطلاعات زیادی از موارد استفاده‌ی نانو ذرات و اثرات آن‌ها بر گیاهان در دسترس نیست لذا تصمیم‌گیری در مورد عملکرد آن‌ها در سلول‌های گیاهی نیازمند مطالعات بیشتری در این زمینه است.

(Xool-Tamayo et al. 2017) با استفاده از کیتوزان میزان سنگوئینارین را در خشخاش به دو برابر افزایش دادند. بررسی‌ها نشان داده‌است که غلظت محرک نیز نقش مهمی در فرآیند تحریک داشته و بر شدت پاسخ مؤثر است (Trontin et al. 2016) به طوری‌که در تحقیق حاضر نیز بیشترین میزان بیان ژن *Hyp-1* در غلظت ۵۰ppm از کیتوزان دیده شد و با افزایش غلظت نیز بیان کاهش پیدا کرده و از طرفی نیز تاثیر نانوذرات نقره بر بیان ژن *Hyp-1* سیری نزولی داشته است.

به‌نظر می‌رسد علاوه بر غلظت محرک، مدت‌زمان قرارگیری در معرض محرک نیز بر بیان ژن مؤثر است (Trontin et al. 2016)، به طوری‌که در تحقیق حاضر نیز میزان بیان ژن *Hyp-1* در بازه‌ی ۴۸ ساعت بیش از بازه‌ی زمانی ۷۲ ساعت بود که این کاهش روند بیان ژن توسط (Esmailzadeh Bahabadi and Sharifi 2013) نیز تایید شده‌است.

در تحقیق حاضر نانوذرات نقره تاثیر کاهشی بر بیان ژن *Hyp-1* داشته و با افزایش زمان و غلظت نانو ذرات نقره، روند کاهشی بیان ژن به شکل شدیدتری آشکار شده‌است. در تحقیقی (Khodayari et al. 2015b) تأثیر بازه‌ی زمانی و اعمال نانو ذرات نقره در بیان تعدادی از ژن‌های گیاه پاپاور بررسی و اظهار

(Khodayari et al. 2015b). به این دلیل که با کاهش اندازه‌ی ذرات نانو اثر بخشی آن‌ها افزایش یافته و بر سمیت نانو ذرات نقره افزوده می‌شود (Khoshnodi et al. 2013). از آنجایی که تمامی نمونه‌های تحت تیمار نانو ذره نقره، بیان ژن منفی را نشان دادند، به نظر می‌رسد که این موضوع را می‌توان با اثر سمیت نانو ذرات بر شاخص میتوزی و ژنومی مرتبط دانست (Castiglione et al. 2011).

در کل نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از نانو محرک نقره منجر به کاهش بیان ژن *Hyp-1* شده است اما استفاده از محرک زیستی کیتوزان بر بیان ژن *Hyp-1* مؤثر بوده و سبب افزایش بیان این ژن شده است اما بیشترین میزان بیان ژن در غلظت 50 ppm از کیتوزان و صفر ppm از نانو ذرات نقره و در بازه‌ی 48 زمانی ساعت بوده است که نشان‌دهنده‌ی تأثیر معنی‌دار غلظت محرک و مدت‌زمان تماس آن با بافت گیاهی است.

به نظر می‌رسد نانو ذرات نقره بسته به نوع اندازه می‌توانند به دیواره سلولی، حتی غشای پلاسمایی نفوذ کنند (Manios et al. 2003) البته مکانیسم عمل ذرات نانو نقره در میکروارگانیسم‌ها هنوز به روشنی مشخص نشده ولی پیشنهاد شده است که ذرات نانو نقره می‌تواند به آهستگی یون‌های نقره (Ag^+) را رها کنند و Ag^+ می‌تواند ساختار سلولی میکروارگانیسم‌ها را از بین ببرد (Lubick 2008). محققان نشان دادند که Ag^+ از طریق تولید گونه‌های فعال اکسیژن بر فسفولیپیدها اثر گذاشته و باعث پر اکسیداسیون آن‌ها شده و غشا سلولی میکروارگانیسم‌ها را تخریب می‌کند. ازین گذشته Ag^+ ممکن است با سولفورو در گروه‌های -SH غشا سلولی میکروارگانیسم‌ها جانشین شود و آن‌ها را تخریب کند (Dibrov et al. 2002).

استفاده از راهکار افزایش بیان توسط نانو الیستورها باید با احتیاط بیشتری صورت گیرد زیرا پس از گذشت زمان و حضور مداوم الیستور خود موجب کاهش بیان ژن‌های مطلوب ما خواهد شد

منابع

Barnes J, Barber N, Wheatley D, Sharpe D, Williamson E (2018) A prospective, open, uncontrolled study of a standardised extract of St John's wort (*Hypericum perforatum*) as an aid in smoking cessation. *Stroke* 13: 57-68.

Bondarian F, Torabi S, Omidi M, Bahreini M (2013) Study of callus induction and regeneration of *Papaver somniferum* L. *Current Opinion in Biotechnology* 24: S28-S41.

Caraci F, Crupi R, Drago F, Spina E (2011) Metabolic drug interactions between antidepressants and anticancer drugs: focus on selective serotonin reuptake inhibitors and hypericum extract. *Current Drug Metabolism* 12: 570-577.

Castiglione MR, Giorgetti L, Geri C, Cremonini R (2011) The effects of nano-TiO₂ on seed germination, development and mitosis of root tip cells of *Vicia narbonensis* L. and *Zea mays* L. *Journal of Nanoparticle Research* 13: 2443-2449.

Cheng X-Y, Zhou H-Y, Cui X, Ni W, Liu C-Z (2006) Improvement of phenylethanoid glycosides biosynthesis in *Cistanche deserticola* cell suspension cultures by chitosan elicitor. *Journal of Biotechnology* 121: 253-260.

Dibrov P, Dzioba J, Gosink KK, Häse CC (2002) Chemiosmotic mechanism of antimicrobial activity of Ag^+ in *Vibrio cholerae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46: 2668-2670.

Esmailzadeh Bahabadi S, Sharifi M (2013) Increasing the Production of Plant Secondary Metabolites Using Biotic Elicitors. *Journal of Cell & Tissue* 4: 119-128.

Ghassemi B, Hosseini R, Dehghan nayeri F (2015) The Effect of Nano Cobalt and Nano Chitosan on Artemisinin production and expression of SQS and DBR2 genes in *Artemisia annua*. *Genetic Engineering and Biosafety Journal* 4: 25-39.

Glisic SB, Popadic SV, Skala DU (2006) St. John's Wort *Hypericum perforatum* L.: Supercritical extraction, antimicrobial and antidepressant activity of extract and some component. *Hemijaska Industrija* 60: 61-71.

Hazler Pilepic K, Males Z, Plazibat M (2008) Genetic structure in *Hypericum perforatum* L. population. *Periodicum Biologorum* 110: 367-371.

Karioti A, Bilia AR (2010) Hypericins as potential leads for new therapeutics. *International Journal of Molecular Sciences* 11: 562-594.

Karppinen K, Hohtola A (2008) Molecular cloning and tissue-specific expression of two cDNAs encoding polyketide synthases from *Hypericum perforatum*. *Journal of Plant Physiology* 165: 1079-1086.

Khodayari M, Omidi M, Shah-Najat-Bushehri A, Shit M (2015a) Biological Elistor and Nano-Elistor Effect on Gene Expression of Some Populonic Alkaloids. *Iranian Horticultural Science* 45: 287-295.

Khodayari M, Omidi M, Shah Nejat Bushehri A, Yazdani D, Naqvi MR, Kadkhoda Z (2015b) Effect biological

- elicitor and nano elicitor on increasing the production of alkaloids in opium poppy (*Papaver somniferum*). Iranian Horticultural Science 45: 287-295.
- Khoshnodi S, Ghesemi hagh Z, Ghanbarpor P (2013) Investigating the stress of silver in two nano sizes on germination and growth of cauliflower seeds. In: Proceedings of the 2nd National Conference on Sustainable Agriculture and Environment. Conference Location. pp:8.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Methods 25: 402-408.
- Lubick N (2008) Nanosilver toxicity: ions, nanoparticles or both? Environ Science Technology 42: 8617-8617.
- Manios T, Stentiford EI, Millner PA (2003) The effect of heavy metals accumulation on the chlorophyll concentration of *Typha latifolia* plants, growing in a substrate containing sewage sludge compost and watered with metaliferus water. Ecological Engineering 20: 65-74.
- Michalska K, Fernandes H, Sikorski M, Jaskolski M (2010) Crystal structure of Hyp-1, a St. John's wort protein implicated in the biosynthesis of hypericin. Journal of Structural Biology 169: 161-171.
- Nair R, Varghese SH, Nair BG, Maekawa T, Yoshida Y, Kumar DS (2010) Nanoparticulate material delivery to plants. Plant Science 179: 154-163.
- Tahsili J, Sharifi M, Safaei N, Behmanesh M (2016) Effect of *Fusarium graminearum* cell wall on lignans and phenolic compounds in cell culture of *Linum album*. Applied Biology 29: 79-102.
- Trontin J-F, Klimaszewska K, Morel A, Hargreaves C, Lelu-Walter M-A (2016) Molecular aspects of conifer zygotic and somatic embryo development: a review of genome-wide approaches and recent insights. In Vitro Embryogenesis in Higher Plants: 167-207.
- Wieczorek D, Delauriere L, Schagat T (2012) Methods of RNA Quality Assessment. Promega Corporation Web site: 1-14.
- Xool-Tamayo J, Serrano-Gamboa G, Monforte-González M, Mirón-López G, Vázquez-Flota F (2017) Development of newly sanguinarine biosynthetic capacity in in vitro rootless shoots of *Argemone mexicana* L. Mexican prickly poppy. Biotechnology Letters 39: 323-330.
- Zhao J, Davis LC, Verpoorte R (2005) Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnology Advances 23: 283-333.
- Zobayed S, Afreen F, Goto E, Kozai T (2006) Plant-environment interactions: accumulation of hypericin in dark glands of *Hypericum perforatum*. Annals of Botany 98: 793-804.