تنش‌های محیطی در علوم زراعی
Environmental Stresses in Crop Sciences
جلد یازدهم، شماره سوم، پائیز ۱۳۹۷
۶۲۷-۶۴۳
http://dx.doi.org/10.22077/escs.2017.701.1135

اثر نانو ذرات نقره بر صفات فیزیولوژیک برخی اکوتیپ‌های زعفران (*Crocus sativus* L.) خراسان جنوبی تحت تنش کم‌آبی ملایم

بتول صابر تنها[1*]، براتعلی فاخری[2]، نفیسه مهدی‌نژاد[3]، زهره علیزاده[4]

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل
۲. دانشیار اصلاح نباتات، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل
۳. استادیار اصلاح نباتات، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل
۴. استادیار اصلاح نباتات، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند

تاریخ دریافت: ۹۶/۰۲/۰۷؛ تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۴/۲۶

چکیده

این پژوهش به‌منظور بررسی تأثیر تنش کم‌آبی و نانو ذرات نقره بر صفات فیزیولوژی در گیاه زعفران انجام شد. آزمایش در دو سطح کم‌آبی و نرمال بر روی ۱۰ اکوتیپ زعفران در سه سطح شاهد (آب مقطر)، ۵۵ و ۱۱۰ پی‌پی‌ام نانو ذرات نقره پیاده شد. این بررسی به‌صورت اسپلیت پلات فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه بیرجند و پژوهشکده زیست‌فناوری دانشگاه زابل انجام شد. بعد از تهیه نمونه‌های برگی از تمامی تیمارها، عصاره‌ی آنزیمی برای اندازه‌گیری میزان آنزیم‌ها، کلروفیل a و b، کارتنوئید و پروتئین تهیه شد. داده‌ها با نسخه ۹/۲ نرم‌افزارSAS مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفتند. اثرات اصلی تیمارهای اکوتیپ، نانوذره نقره، تنش خشکی و اثرات متقابل آن‌ها برای آنزیم‌های کاتالاز، پلی فنل اکسیداز، فنیل آلانین آمونیالیاز، کلروفیل b وکارتنوئید در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شدند. بیشترین مقدار کلروفیل b، کارتنوئید و فنیل آلانین آمونیالیاز تحت تنش خشکی در غلظت ۵۵ پی‌پی‌ام نانوذره نقره نسبت به شاهد و سطح ۱۱۰ پی‌پی‌ام مشاهده شد که می‌توان استدلال کرد نانو ذرات به دلیل خاصیت آب‌دوستی و آنتی باکتریال توانسته عملکرد بالایی داشته باشد. بیشترین مقدار کلروفیل a، کاتالاز، پلی فنل اکسیداز و گایاکول پراکسیداز تحت تنش خشکی در تیمار آب مقطر (شاهد) مشاهده شد که می‌توان استدلال کرد نانو نقره در این صفات سمیت ایجاد کرده و باعث کاهش عملکرد در سطوح نانو نقره نسبت به شاهد شده است. درنتیجه اکوتیپ‌های قاین و آرین شهر در شرایط تنش خشکی تحت نانو ذرات نقره با غلظت ۵۵ پی‌پی‌ام بیشترین عملکرد داشتند.

***واژه‌های کلیدی*: الیسیتور، کاتالاز، کارتنوئید، کلروفیل،**

مقدمه

زعفران با نام علمی (*Crocus sativus* L.) دارای ۸۵ گونه بوده که از جنس زعفران، خانواده زنبق و راسته مارچوبه‌ای‌ها است (Rostami et al., 2013). زعفران یک گیاه ژئوفیت است که گلدهی آن در فصل پاییز صورت می‌گیرد (Molina et al., 2005). به دلیل اینکه بنه‌ها تنها راه تکثیر این گیاه می‌باشند و از خصوصیات گیاه محافظت می‌کنند، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند (Keyhani and keyhani, 2004).

الیسیتورها از طریق القای پاسخ‌های دفاعی باعث بیوسنتز و انباشت متابولیت‌های ثانوی می‌شوند (Zhao et al., 2005). یکی از انواع این الیسیتورها که به‌تازگی مورداستفاده قرارگرفته است، نانو ذرات است (Vanaja and Annadurai, 2013). ذرات نانو نقره ذراتی آب‌دوست با خواص ویژه و کاربرد فراوان در تکنولوژی می‌باشند. به نظر می‌رسد این ذرات با از بین بردن کامل قارچ‌ها و باکتری‌ها برخلاف سایر آنتی‌بیوتیک‌ها هیچ‌گونه مقاومتی را در

* نگارنده پاسخگو: بتول صابرتنها. پست الکترونیک: Sabertanha67@gmail.com

میکروب‌ها ایجاد نمی‌کنند. ذرات نانو نقره دارای قطری در حدود یک تا ۱۰۰ نانومتر می‌باشند (Park et al., 2006). تنش آبی در گیاه یا کمبود آب که به آن تنش خشکی هم اطلاق می‌شود، زمانی رخ می‌دهد که سرعت تعرق بیش از سرعت جذب آب باشد. تنش خشکی زیاد باعث کاهش فتوسنتز، اختلال در فرایندهای فیزیولوژیکی و سرانجام خشک شدن و مرگ گیاه می‌شود (Amiri Oghan et al., 2002; Shao et al., 2005). طیف وسیعی از اختلالات مولکولی که منجر به ایجاد آسیب‌های فیزیولوژیکی در گیاهان تحت تنش خشکی می‌شوند را می‌توان ناشی از تولید رادیکال‌های فعال و مخرب اکسیژن دانست. این رادیکال‌ها واکنش‌هایی را هدایت می‌کنند که سبب نابودی DNA، پراکسیداسیون چربی‌ها، تخریب پروتئین‌های غشایی و ماکرو پروتئین‌ها در سلول ازجمله رنگیزه‌های کلروفیل و آنزیم‌ها می‌شوند (Hamrahi et al., 2008). پراکسیدازها متعلق به خانواده بزرگ آنزیم‌ها می‌باشند که به میزان زیاد در گیاهان وجود دارند و در جاروب کردن پراکسید هیدروژن نقش دارند. آنزیم گایاکول پراکسیداز یکی از مهم‌ترین پراکسیدازها هست (Asada, 1992). آنزیم پلی فنول اکسیداز تبدیل منوفنول‌ها را به دی فنول‌ها و همچنین اکسیداسیون دی فنول‌ها را به کوئینون‌ها که در پلی مریزاسیون رنگ‌دانه نقش دارند، کاتالیز می‌کند (Breusegem et al., 2001). کاتالاز آنتی‌اکسیدان مهم دیگری است که پراکسید هیدروژن را به آب و اکسیژن تبدیل می‌کند (Mittier, 2002). آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز یکی از آنزیم‌های مهم در مسیر فنیل پروپانوئید و سنتز ترکیبات فنلی است که در پاسخ به برخی تنش‌های زیستی و غیر زیستی القاشده است (Tian and Li, 2006). کاروتنوئیدها عامل ایجاد رنگ‌های زرد، نارنجی و قرمز و در برخی موارد قهوه‌ای و ارغوانی در گیاهان، میکروارگانیسم‌ها و گلسنگ‌ها هستند (Cheng, 2006). در پژوهشی اثر سطوح تیمارهای شوری تحت تأثیر تیمارهای نانو ذرات نقره نسبت به تیمار شاهد باعث افزایش درصد جوانه‌زنی زیره (*Cuminum cyminum* L.) شده است و تیمار نانو ذرات نقره با غلظت ۲۰ میلی‌گرم در لیتر نسبت به سایر تیمارها از عملکرد مناسب‌تر برخوردار بود (Ekhtiyari and Moraghebi, 2012).

با توجه به اهمیت زعفران، در این پژوهش اثر نانو ذرات نقره بر صفات فیزیولوژیک برخی اکوتیپ‌های زعفران (*Crocus sativus* L.) خراسان جنوبی تحت تنش کم‌آبی ملایم بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در سال زراعی ۱۳۹۳ در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه بیرجند و آزمایش‌های در پژوهشکده زیست‌فناوری زابل انجام شد. آزمایش در شرایط کم‌آبی تحت اثرات نانو ذرات نقره در سه سطح آب مقطر (شاهد بدون نانوذره)، ۵۵ و ۱۱۰ پی‌پی‌ام و تنش در دو سطح کم‌آبی و نرمال به‌صورت طرح اسپلیت پلات فاکتوریل در قالب بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار انجام شد. اکوتیپ‌های زعفران از ۱۰ منطقه خراسان جنوبی شامل بیرجند، نصرآباد، گازار، آرین شهر، قاین، هاشمیه، سرایان، آیسک، سرند، باغستان جمع‌آوری و موردبررسی قرار گرفت.

کشت و تیمار با نانو ذرات نقره

نانو ذرات نقره محصول شرکت آمریکایی US Research Nanomaterials بود که از شرکت پیشگامان نانو مواد ایرانیان تهیه شد. اندازه ذرات نانو نقره ۲۰ نانومتر، لیکوئیدی، کروی و ازلحاظ ساختاری 99.99 درصد خالص است. قبل از کشت، زمین آماده شد. اندازه کرت‌ها ۱×۱ متر و فاصله بین کرت‌ها ۵۰ سانتی‌متر و فاصله بین هر بلوک یک متر در نظر گرفته شد. فاصله دو سطح تنش کم‌آبی و نرمال دو متر فاصله گذاشته شد. بنه‌ها در عمق ۱۵ سانتی-متری و در فاصله ۲۰ سانتی‌متری از یکدیگر کشت شدند. درون هر چاله یک بنه با وزن متوسط ۸ گرم قرار داده شد در هر کرت ۲۵ بنه کشت شد و تا بهمن‌ماه، زمانی که‌برگ‌ها به‌اندازه کافی رشد کرده نگه‌داشته شد تا صفات با دقت بیشتری برای بررسی تأثیر نانوذره نقره اندازه‌گیری شوند. قبل از کشت، بنه‌ها به مدت ۹۰ دقیقه در آب مقطر (شاهد)، آب مقطر حاوی نانو ذرات نقره با غلظت‌های ۵۵ و ۱۱۰ پی‌پی‌ام خیساند شد و کشت شدند. برای جوانه‌زنی بنه‌ها، آبیاری به‌صورت کرتی و سنگین (غرقاب) انجام شد. هنگامی‌که زمین گاو رو شد. برای خروج بهتر جوانه‌ها سله شکنی انجام شد. بعد از خروج گل‌ها آبیاری دوم فقط برای شرایط نرمال هر سه هفته یک‌بار انجام شد.

اندازه‌گیری فاکتورهای بیوشیمیایی

استخراج آنزیم‌ها و پروتئین‌های محلول به شرح زیر انجام شد. مقدار ۰/۱ گرم برگ تازه که سه ماه پس از اعمال تیمار برداشت شد، در هاون چینی سرد با دو میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی مولار (اسیدیته ۶/۸) هموژن شد. سپس به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ (Centrifuge eppendorf 5810R ساخت کشور آلمان) گردید. فاز بالایی عصاره به‌دست‌آمده برای اندازه‌گیری پروتئین‌های محلول بر اساس روش برادفورد (Bradford, 1976) انجام شد. برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز تغییرات جذب محلول واکنش نسبت به شاهد به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر (Spectrophotometer UV-2100 ساخت کشور آمریکا) در طول‌موج ۲۴۰ نانومتر به مدت دو دقیقه در فواصل زمانی ۱۰ ثانیه ثبت گردید. درنهایت فعالیت آنزیم کاتالاز بر اساس میکرو مول پراکسید هیدروژن تجزیه‌شده (ضریب خاموشی ۴۰ میلی‌مولار بر سانتی‌متر در دقیقه به ازای یک میلی‌گرم پروتئین) بیان گردید (Chance and Maehly, 1955). فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز بر اساس میزان اکسید شدن گایاکول در طول‌موج ۴۷۰ نانومتر و با استفاده از ضریب خاموشی mM $^{-1}$ cm $^{-1}$ ۲۶/۶ محاسبه گردید (Zhang et al., 2005). فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در طول‌موج ۴۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. ضریب خاموشی برای پورپوروگالین ۲/۴۷ بر میلی‌مولار بر سانتی‌متر در دقیقه به ازای یک میلی‌گرم پروتئین است (Resende et al., 2002). فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز به مدت یک دقیقه در طول‌موج ۲۹۰ نانومتر و با استفاده از ضریب خاموشی $mM^{-1}\ cm^{-1}$ ۲/۸ تعیین گردید (Nakano and Asada, 1981). جهت سنجش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز جذب نمونه در طول‌موج ۲۶۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید. یک واحد آنزیمی به‌عنوان یک میکرو مول سینامیک اسید تولیدشده در مدت یک دقیقه به ازای هر میلی‌گرم پروتئین تعریف شد (Wang et al., 2006). اندازه‌گیری کلروفیل (Arnon, 1967) و کارتنوئید (Lichtenthale, 1987) انجام گرفت. اندازه‌گیری با استفاده از روش اسپکتروفتومتری (Spectrophotometer UV-2100 ساخت کشور آمریکا) و در طول‌موج‌های ۶۶۳ نانومتر برای کلروفیل a و ۶۴۵ نانومتر برای کلروفیل b برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن‌تر معادله (۱ و ۲) و طول‌موج ۴۸۰ نانومتر برای اندازه‌گیری کارتنوئید برحسب $\mu g\ g^{-1}$ FW معادله (۳) انجام گرفت.

$$Chlorophyl\,la = (19.3 \times A663 - 0.86 \times A645)V / 100W \quad (1)$$

$$Chlorophyl\,lb = (19.3 \times A645 - 3.6 \times A663)V / 100W \quad (2)$$

V = حجم محلول صاف‌شده (محلول فوقانی حاصل از سانتریفیوژ)، A= جذب نور در طول‌موج‌های ۶۶۳، ۶۴۵ و ۴۸۰ نانومتر، W= وزن‌تر نمونه برحسب گرم

$$Carotenied = \frac{[1000 \times A_{480} - 1.8chla - 85.02chlb]}{198} \quad (3)$$

A بیانگر جذب نوری، Chla نشان‌دهنده کلروفیل a و Chlb نشان‌دهنده کلروفیل b است.

داده‌های به‌دست‌آمده از آزمایش‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه 9.2 و Excel 2007 بررسی و تجزیه‌وتحلیل شدند.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که اثرات اصلی اکوتیپ، تنش خشکی، نانوذره نقره، اثرات متقابل دوگانه اکوتیپ×تنش خشکی، اکوتیپ×نانوذره نقره، تنش خشکی×نانوذره نقره و اثرمتقابل سه‌گانه اکوتیپ×تنش خشکی×نانوذره نقره در همه صفات فیزیولوژی بررسی‌شده در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار است.

مقایسه میانگین اثرات متقابل اکوتیپ×تنش خشکی (جدول ۲) نشان داد شاخص‌های کلروفیل a در اکوتیپ‌های قاین با میانگین ۲۹/۶۸ و آرین با میانگین ۲۸/۳۱ میکروگرم برگرم وزن‌تر، کلروفیل b در اکوتیپ‌های قاین ۱۲/۳۰ و آیسک با میانگین ۹/۵۲ میکروگرم برگرم وزن‌تر، کارتنوئید در اکوتیپ‌های قاین با میانگین ۱۴/۴۵ و آرین با میانگین ۱۴/۱۲ میکروگرم برگرم وزن‌تر، فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز در اکوتیپ آرین با میانگین ۱/۱۷۵ Mc/min/mg pro، آنزیم کاتالاز در اکوتیپ آرین با میانگین ۰/۰۰۱۱ Mc/min/mg pro، گایاکول پراکسیداز در اکوتیپ باغستان با میانگین ۰/۰۰۰۲ $mM^{-1}\ cm^{-1}$ و آنزیم پلی فنل اکسیداز در اکوتیپ بیرجند ۰/۰۲۷ Mc/min/mg pro تحت تنش خشکی بالاترین میزان را داشتند. درحالی‌که در آبیاری کامل شاخص پروتئین تام در اکوتیپ‌های قاین با میانگین ۱/۱۶ و باغستان با میانگین ۱/۱۵ میلی‌گرم بر گرم، آنزیم آسکوربات در اکوتیپ قاین با ۰/۰۳۶ و سرند ۰/۰۳۲ mM^{-1}

جدول ۱. تجزیه واریانس صفات فیزیولوژیکی

Table 1. Analysis of variance of physiological traits

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	کلروفیل A Chlorophyll A ug/g f.w	کلروفیل B Chlorophyll B ug/g f.w	کارتنوئید Carotenoid ug/g f.w	پروتئین Protein mg/g	پلی فنل پراکسیداز Polyphenol oxidase Mc/min/mg pro	فنیل الانین امونیالیاز PAL Mc/min/mg pro	کاتالاز Catalase Mc/min/mg pro	گایاکول پراکسیداز Guaiacol peroxidase mM $^{-1}$ cm $^{-1}$	آسکوربات Ascorbate mM $^{-1}$ cm $^{-1}$
تکرار Repeat	2	10.18 ^{ns}	0.31 ^{ns}	4.48 *	0.0004 ^{ns}	0.00003*	0.0006 ^{ns}	4.22E-9^{ns}	1.05E-9 ^{ns}	0.00000005^{ns}
اکوتیپ Ecotype	9	229.68**	46.98**	45.58**	0.0058**	0.00019**	0.473**	2.05E- 7**	9.62 E-9**	0.0003**
تکرار×اکوتیپ Repeat×ecotype	18	3.65	0.24	1.26	0.0006	0.000003	0.0005	3.17E-9	1.42E-9	0.000001
تنش خشکی Drought stress	1	6.43 ^{ns}	2.97**	9.09**	0.0068**	0.00003*	0.354**	5E-10 ^{ns}	8.88E-10 ^{ns}	0.0006**
نانوذره نقره Silver nanoparticles	2	53.45**	21.85**	25.92**	0.0013^{ns}	0.00010**	0.463**	2.75E-8**	4.22E-9 **	0.0001**
اکوتیپ×تنش خشکی Ecotype×Drought stress	9	437.84**	89.61**	104.85**	0.0019*	0.00044**	0.522**	3.93E-7 **	1.42E-8**	0.0005**
اکوتیپ×نانوذره نقره Ecotype×silver nanoparticles	18	95.27**	25.50**	57.98**	0.0023**	0.00031**	0.412**	2.50E-7**	2.21E-8**	0.0002**
تنش خشکی×نانوذره نقره Drought stress×silver nanoparticles	2	136.43**	30.37**	90.11**	0.0037**	0.00015**	0.358**	8.86E-8 **	4.22E9**	0.0002**
اکوتیپ×تنش خشکی×نانوذره نقره Ecotype×Drought stress×silver nanoparticles	18	61.65**	19.12**	31.97**	0.0026**	0.00057**	0.357**	3.12E-7**	1.88E-8**	0.0004**
خطا Error	100	5.80	0.30	1.45	0.0008	0.000008	0.00054	0.000000001	7.22E-10	0.000002
ضریب تغییرات (٪) Coefficient of variation (%)		11.91	9.18	12.55	2.64	16.30	12.27	11.12	15.11	7.52

^{ns}، * و ** به ترتیب نشانه عدم معنی‌داری و معنی‌داری در سطح ۵ درصد و ۱ درصد

Ns, * and** represent nonsignificant and significant at 5 and 1% level, respectively

cm^{-1} بالاترین میانگین را نشان می‌دادند. یکی از دلایلی که تنش‌های محیطی مثل خشکی، رشد و توانایی فتوسنتزی گیاه را کاهش می‌دهند، اختلال در تعادل تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و مکانیسم‌های دفاعی برطرف‌کننده این رادیکال‌ها است که به تجمع گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، القای تنش اکسیداتیو، خسارت به پروتئین‌ها، لیپیدهای غشاء و سایر اجزای سلولی منجر می‌گردد (Mittier, 2002). افزایش فعالیت آنزیم‌ها در شرایط تنش براثر افزایش گونه‌های فعال اکسیژن است که با فعال کردن مسیرهای ترارسانی پیام باعث افزایش بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی و افزایش فعالیت این آنزیم‌ها می‌شود (Mittier, 2002).

جدول ۲. مقایسه میانگین اثرات متقابل اکوتیپ×تنش خشکی صفات فیزیولوژی

Table 2. Means comparison for the interaction effects of ecotypes × Drought stress on physiological traits

Traits /unit صفات/ واحد	Stress level سطح تنش	Gazar گازار	Birjand بیرجند	Hashemie هاشمیه	Qaen قاین	Ayask آیسک
کلروفیلa ChlorophyllA ug/g f.w	آبیاری کامل Full Watering	21.735^{de}	13.903 ^{gh}	24.256^{bcd}	26.50 ^{ab}	18.649 ^{ef}
	تنش خشکی Drought stress	22.036 ^{cde}	26.529 ^{ab}	10.703 ^{h}	29.683 ^{a}	26.080 ^{ab}
کلروفیلb B Chlorophyll ug/g f.w	آبیاری کامل Full Watering	5.362 ^{f}	3.100 ^{ijk}	9.738 ^{b}	6.354 ^{e}	4.701 ^{gf}
	تنش خشکی Drought stress	5.388 ^{f}	7.557 ^{d}	2.968 ^{jk}	12.303 ^{a}	9.522 ^{b}
کارتنوئید Carotenoid ug/g f.w	آبیاری کامل Full Watering	9.892 ^{def}	6.078 ^{jk}	12.627 ^{abc}	10.852 ^{cde}	8.725 ^{fgh}
	تنش خشکی Drought stress	9.555^{def}	12.020 ^{c}	4.635 ^{k}	14.458 ^{a}	12.375 ^{bc}
پروتئین Protein Mg/g	آبیاری کامل Full Watering	1.127^{abcd}	1.117 ^{bcd}	1.107 ^{bcd}	1.168 ^{a}	1.123 ^{abcd}
	تنش خشکی Drought stress	1.115 ^{bcd}	1.086 ^{d}	1.119 ^{bcd}	1.117 ^{bcd}	1.131 ^{abcd}
پلی فنل پراکسیداز Polyphenol peroxidase Mc/min/mg pro	آبیاری کامل Full Watering	0.009 ^{hi}	0.023 ^{abc}	0.026 ^{ab}	0.013 ^{fghi}	0.011^{ghi}
	تنش خشکی Drought stress	0.020 ^{cd}	0.027 ^{a}	0.008 ^{i}	0.014 ^{fgh}	0.020 ^{cde}
فنیل الانین امونیالیاز PAL Mc/min/mg pro	آبیاری کامل Full Watering	0.082 ^{h}	0.186 ^{b}	0.131^{def}	0.162 ^{bcd}	0.157 ^{bcde}
	تنش خشکی Drought stress	0.171 ^{bc}	0.118 ^{efgh}	0.151 ^{bcde}	0.138 ^{cdef}	0.118 ^{efgh}
Catalaseکاتالاز Mc/min/mg pro	آبیاری کامل Full Watering	0.00032 ^{i}	0.00084 ^{b}	0.00054 ^{gh}	0.00070 ^{cd}	0.00066 $^{c-f}$
	تنش خشکی Drought stress	0.00073 ^{bc}	0.00064 $^{c-g}$	0.00068 ^{cde}	0.00058 $^{d-h}$	0.00053 ^{gh}
گایاکول پراکسیداز Guaiacol peroxidase mM $^{-1}$ cm $^{-1}$	آبیاری کامل Full Watering	0.00018^{b-e}	0.00018 $^{b-e}$	0.00013^{fg}	0.00021^{abc}	0.00014 ^{efg}
	تنش خشکی Drought stress	0.00016 $^{c-g}$	0.00018 $^{b-e}$	0.00022 ^{ab}	0.00020 $^{a-d}$	0.00013^{fg}
آسکوربات Ascorbate mM $^{-1}$ cm $^{-1}$	آبیاری کامل Full Watering	0.0151 ^{hi}	0.0176 ^{gh}	0.0281 ^{cd}	0.0367 ^{a}	0.0262 ^{de}
	تنش خشکی Drought stress	0.0257^{de}	0.0224 ^{f}	0.0187 ^{g}	0.0153 ^{hi}	0.0183 ^{g}

جدول ۲. ادامه **Table 2. Continued**

Traits /unit صفات/ واحد	Stress level سطح تنش	Sarand سرند	Ariyan shahr آرین شهر	Baghestan باغستان	Nasrabad نصرآباد	Sarayan سرایان
کلروفیلa ChlorophyllA ug/g f.w	آبیاری کامل Full Watering	23.471 bcd	13.692 gh	18.972 ef	13.286 gh	25.929 abc
	تنش خشکی Drought stress	13.748 gh	28.313 a	17.099 gf	16.225 gf	13.760 gh
کلروفیلb B Chlorophyll ug/g f.w	آبیاری کامل Full Watering	7.821 d	5.203 f	4.201 gh	3.874 ghij	8.140 cd
	تنش خشکی Drought stress	2.928 k	8.893 bc	3.961 ghi	3.636 hijk	3.910 ghi
کارتنوئید Carotenoid ug/g f.w	آبیاری کامل Full Watering	11.547 cd	6.897 hij	8.262 fghi	6.623 ijk	12.404 abc
	تنش خشکی Drought stress	9.154efg	14.124 ab	7.835 fghij	7.109 ghij	7.138 ghij
پروتئین Protein Mg/g	آبیاری کامل Full Watering	1.137abc	1.092 cd	1.150 ab	1.110 bcd	1.106 bcd
	تنش خشکی Drought stress	1.145ab	1.087 cd	1.116 bcd	1.094 cd	1.104 bcd
پلی فنل پراکسیداز Polyphenol peroxidase Mc/min/mg pro	آبیاری کامل Full Watering	0.026 ab	0.013fghi	0.017 def	0.021 bcd	0.015 fg
	تنش خشکی Drought stress	0.015 efg	0.023abc	0.017 def	0.012 ghi	0.025abc
فنیل الانین امونیالیاز PAL Mc/min/mg pro	آبیاری کامل Full Watering	0.163bcd	0.125defg	0.141 cdef	0.152 bcde	0.155 bcde
	تنش خشکی Drought stress	0.146 cde	1.175 a	0.128 defg	0.104 fgh	0.091 gh
کاتالاز Catalase Mc/min/mg pro	آبیاری کامل Full Watering	0.00073 bc	0.00056 fgh	0.00060 d-h	0.00070 cd	0.00066 c-f
	تنش خشکی Drought stress	0.00057 e-h	0.00118 a	0.00051 h	0.00052 h	0.00038 i
گایاکول پراکسیداز Guaiacol peroxidase mM $^{-1}$ cm $^{-1}$	آبیاری کامل Full Watering	0.00013 fg	0.00014efg	0.00017 b-f	0.00022 ab	0.00021 abc
	تنش خشکی Drought stress	0.00020 a-d	0.00015d-g	0.00024 a	0.00016 c-g	0.0001 2g
آسکوربات Ascorbate mM $^{-1}$ cm $^{-1}$	آبیاری کامل Full Watering	0.0325 b	0.0198 g	0.0239 ef	0.0145 i	0.0128 i
	تنش خشکی Drought stress	0.0140 i	0.0128 i	0.0296 c	0.0128 i	0.0194 g

مقایسه میانگین اثرات اکوتیپ×نانوذره نقره (جدول ۳) نشان داد که بیشترین میزان کلروفیل a در اکوتیپ قاین با میانگین ۲۹/۶۰ میکروگرم برگرم وزن‌تر و آنزیم گایاکول پراکسیداز در اکوتیپ‌های باغستان و قاین با میانگین به ترتیب ۰/۰۰۰۳ و ۰/۰۰۰۲ mM^{-1} cm^{-1} در شاهد مشاهده شد. بیشترین مقدار کلروفیل b در اکوتیپ‌های قاین و آرین به ترتیب با میانگین‌های ۱۲/۱۷ و ۱۰/۴۳ میکروگرم برگرم وزن‌تر، کارتنوئید در اکوتیپ‌های قاین و آرین به ترتیب با میانگین‌های ۱۵/۸۷ و ۱۵/۶۹ میکروگرم برگرم وزن‌تر، پروتئین تام در اکوتیپ سرند با میانگین ۱/۱۶۹ میلی‌گرم بر گرم، آنزیم پلی فنل اکسیداز در اکوتیپ سرند با میانگین ۰/۰۳۳ Mc/min/mg pro، آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز و کاتالاز در اکوتیپ آرین با میانگین به ترتیب ۱/۶۰۳ و ۰/۰۰۱۲ Mc/min/mg pro، آسکوربات پراکسیداز در اکوتیپ سرند با میانگین ۰/۰۳۲ mM^{-1} cm^{-1} در تیمار نانوذره نقره ۵۵ پی‌پی‌ام مشاهده شد. نانو ذرات، همانند سایر تنش‌های غیر زیستی، تولید و تجمع گونه‌های فعال اکسیژن را القا می‌کنند که در غلظت‌های بالا برای سلول

زیان‌آور هستند (Hong et al., 2005). افزایش در سطوح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان القاشده توسط نانو ذرات، نشان‌دهنده مکانیسم دفاعی ثانویه علیه تنش اکسیداتیو است (Dixit et al., 2001). در مطالعه‌ای اثر نانو و میدان مغناطیسی به‌صورت جداگانه و باهم بر ویژگی‌های رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه گیاه *Phausalus vulgaries* بررسی و مشخص شد که در غلظت‌های پایین نانو ذرات نقره سبب افزایش رشد گیاه و افزایش برخی متابولیت‌های ثانویه مثل فلاونوئیدها و افزایش خاصیت آنتی‌اکسیدانی در گیاه می‌شوند و این شاید به خاطر تأثیر نانو ذرات نقره بر آنزیم‌های تولیدکننده این ترکیبات است. نانو ذرات نقره توانایی تغییر در رشد گیاه و تغییر تولید متابولیت‌های ثانویه رادارند (Najafi et al., 2013). در مطالعاتی که روی زعفران صورت گرفته مشاهده شد که با اسپری کردن نانو ذرات نقره وزن ریشه و بنه زعفران افزایش‌یافته است (Rezvani et al., 2012).

جدول ۳. مقایسه میانگین اثرات متقابل اکوتیپ×نانوذره نقره صفات فیزیولوژی

Table 3. Means comparison for the interaction effects of silver nanoparticles × ecotypes on physiological traits

صفات/واحد Traits/ unit	سطوح نانو nano-evel	Gazar گازار	Birjand بیرجند	Hashemihe هاشمیه	Qaen قاین	Ayask آیسک
کلروفیل a	صفر (0)	22.37 b-i	23.33 b-g	21.24 e-k	29.60 a	18.09 h-l
ChlorophyllA	55 ppm	21.28 d-k	17.32 i-m	16.21 k-m	27.18 abc	22.61 b-h
ug/g f.w	110 ppm	22 c-j	19.99 f-l	14.98 l-n	27.49 ab	26.38 a-e
کلروفیل B b	صفر (0)	5.65 h-j	6.62 e-h	6 g-j	7.77 c-e	5.92 g-j
Chlorophyll	55 ppm	5.15 j-l	4.39 k-m	7.29 c-f	12.17 a	10.05 b
ug/g f.w	110 ppm	5.32 i-k	4.97 j-m	5.75 g-j	8.03 cd	5.35 i-k
کارتنوئید	صفر (0)	10.67 d-f	10.08 e-h	9.44 e-i	9.10 e-i	8.21 f-j
Carotenoid	55 ppm	9.05 e-i	7.83 h-k	8.46 f-j	15.87 a	14 a-c
ug/g f.w	110 ppm	9.44 e-i	9.23 e-i	7.98 f-j	13.87 a-c	8.54 f-I
پروتئین	صفر (0)	1.106 a-e	1.102 b-e	1.104 b-e	1.121 a-e	1.140 a-d
Protein	55 ppm	1.119 a-e	1.112 a-e	1.122 a-d	1.143 a-d	1.135 a-d
mg/g	110 ppm	1.139 a-d	1.090 de	1.113 a-e	1.163 ab	1.105 a-e
پلی فنل اکسیداز	صفر (0)	0.008 k	0.031 a	0.019 c-g	0.018 c-h	0.027 ab
Polyphenol	55 ppm	0.017 e-h	0.020 c-e	0.020 c-f	0.0128 h-k	0.009 jk
oxidase mc/min/mg pro	110 ppm	0.019 c-g	0.024 bc	0.0128 h-k	0.010 i-k	0.010 i-k
فنیل الانین	صفر (0)	0.083 k	0.135 e-j	0.183 c-e	0.210 bc	0.115 i-k
امونیالیاز PAL	55 ppm	0.176 c-f	0.190 b-d	0.090 jk	0.116 i-k	0.126 f-k
Mc/min/mg pro	110 ppm	0.119 i-k	0.133 e-k	0.150 d-i	0.125 g-k	0.173 c-g
کاتالاز	صفر (0)	0.0003 m	0.0006 f-j	0.0008 b-d	0.0009 bc	0.0004 i-m
Catalase	55 ppm	0.0007 c-e	0.0008 b-d	0.0003 lm	0.0004 j-m	0.0005 g-l
mc/min/mg pro	110 ppm	0.0004 i-m	0.0007 b-e	0.0006 e-i	0.0005 f-k	0.0007 b-e
گایاکول پراکسیداز	صفر (0)	0.00013 gh	0.0001 d-g	0.0001 d-g	0.0002 b	0.0001 f-h
Guaiacol	55 ppm	0.00015 f-h	0.00015 f-h	0.0002 c-f	0.0002 c-f	0.00010 h
peroxidase mM $^{-1}$ cm $^{-1}$	110 ppm	0.0002 bc	0.00015 f-h	0.0001 f-h	0.00015 f-h	0.00016 e-g
آسکوربات	صفر (0)	0.0160 l-n	0.028 bc	0.025 c-e	0.023 d-g	0.21 g-j
Ascorbate	55 ppm	0.028 bc	0.015 m-o	0.018 j-l	0.025 c-f	0.022 e-h
mM $^{-1}$ cm $^{-1}$	110 ppm	0.016 k-m	0.016 k-m	0.026 cd	0.029 ab	0.022 e-h

Table 3. Continued **جدول ۳. ادامه**

Traits/ صفات/واحد unit	سطوح نانو nano-level	Sarand سرند	Ariyan shahr آرین‌شهر	Baghestan باغستان	Nasrabad نصرآباد	Sarayan سرایان
کلروفیل a	صفر (0)	22.45 b-i	20.06 f-l	16.93 j-m	16.86 j-m	21.76 d-j
ChlorophyllA	55 ppm	21.22 e-k	26.48 a-d	18.88 g-l	10.29 n	12.85 mn
ug/g f.w	110 ppm	12.14 mn	16.46 k-m	18.27 g-l	17.11 j-m	24.91 a-f
کلروفیل B b	صفر (0)	7.41 c-f	6.46 f-I	3.77 m-n	5.19 j-l	6.86 d-g
Chlorophyll	55 ppm	6.02 g-j	10.43 b	4.35 k-m	1.91 o	2.68 no
ug/g f.w	110 ppm	2.68 no	4.24 k-m	4.12 l-m	4.15 k-m	8.41 c
کارتنوئید	صفر (0)	11.32 c-e	9 e-i	7.72 h-k	8.90 e-i	10.58 d-g
Carotenoid	55 ppm	14.49 ab	15.69 a	8.17 f-j	3.78 l	5.82 j-l
ug/g f.w	110 ppm	5.23kl	6.83 i-k	8.24 f-j	7.91 g-k	12.90 b-d
پروتئین	صفر (0)	1.115 a-e	1.116 a-e	1.132 a-d	1.098 c-e	1.101 b-e
Protein	55 ppm	1.169 a	1.060 e	1.158 abc	1.115 a-e	1.095 c-e
mg/g	110 ppm	1.139 a-d	1.094 de	1.110 a-e	1.094 c-e	1.119 a-e
پلی فنل اکسیداز	صفر (0)	0.013 g-k	0.015 e-j	0.014 e-k	0.015 e-j	0.031 a
Polyphenol	55 ppm	0.033 a	0.016 e-i	0.014 e-k	0.020 c-e	0.0128 h-k
oxidase mc/min/mg pro	110 ppm	0.014 e-k	0.023 cd	0.024 bc	0.014 f-j	0.016 e-i
فنیل الانین امونیالیاز	صفر (0)	0.156 d-i	0.233 b	0.121 h-k	0.113 i-k	0.120 i-k
PAL	55 ppm	0.171 c-h	1.603 a	0.150 d-i	0.178 c-e	0.110 i-k
mc/min/mg pro	110 ppm	0.136 e-j	0.115 i-k	0.133 e-k	0.093 jk	0.140 d-j
کاتالاز	صفر (0)	0.0006 e-g	0.0009 b	0.0005 h-l	0.0007 d-f	0.0004 i-m
Catalase	55 ppm	0.0007 b-e	0.0012 a	0.0006 e-h	0.0004 k-m	0.0004 j-m
mc/min/mg pro	110 ppm	0.0005 g-l	0.0005 h-l	0.0005 g-l	0.0007 d-f	0.0006 e-i
گایاکول پراکسیداز	صفر (0)	0.0002 c-f	0.0001 h	0.0003a	0.00015 f-h	0.00016 e-g
Guaiacol	55 ppm	0.00015 f-h	0.0002 b-e	0.00016 e-g	0.0002 bcd	0.0001 h
peroxidase mM $^{-1}$ cm $^{-1}$	110 ppm	0.00015 f-h	0.00013 gh	0.0001gh	0.0001 d-g	0.0002 b-d
آسکوربات	صفر (0)	0.025 c-f	0.022 f-i	0.020 g-j	0.013 n-p	0.014 m-p
Ascorbate	55 ppm	0.032 a	0.012 o-p	0.020 ab	0.019 i-l	0.019 g-i
mM $^{-1}$ cm $^{-1}$	110 ppm	0.011 pq	0.014 m-p	0.029 ab	0.008 q	0.014 m-p

مقایسه میانگین اثرات متقابل دوگانه تنش خشکی×نانو ذرات نقره (جدول ۴) نشان داد بیشترین مقدار کلروفیل b با میانگین ۷/۰۷ میکروگرم برگرم وزن‌تر، کارتنوئید با میانگین ۱۱/۶۹ میکروگرم برگرم وزن‌تر، فنیل آلانین آمونیالیاز با میانگین ۰/۴۲ Mc/min/mg pro و کاتالاز با میانگین ۰/۰۰۰۶۸ Mc/min/mg pro در تنش خشکی تحت تیمار ۵۵ پی‌پی‌ام نانوذره نقره مشاهده شد. کلروفیل a با میانگین ۲۲/۷۳ میکروگرم برگرم وزن‌تر و پلی فنل اکسیداز با میانگین ۰/۰۲ Mc/min/mg pro تحت تنش خشکی در شاهد بالاترین میزان تولید را داشتند. بیشترین مقدار گایاکول پراکسیداز با میانگین ۰/۰۰۰۱۹ mM^{-1} cm^{-1} و آسکوربات پراکسیداز با میانگین ۰/۰۲۳ mM^{-1} cm^{-1} تحت عدم خشکی در شاهد مشاهده شد. بیشترین مقدار پروتئین تام با میانگین ۱/۱۳ میلی‌گرم بر گرم در غلظت ۵۵ پی‌پی‌ام نانو ذرات نقره تحت عدم تنش خشکی مشاهده شد. نانو نقره می‌تواند به دیواره سلولی نفوذ کرده و تغییر در نفوذپذیری دیواره ایجاد کند و با تغییر در جذب و دفع مواد توسط دیواره روی بسیاری از فرآیندهای داخل سلول تأثیرگذار باشد. (Alirezaee et al., 2014). یکی از خصوصیات منحصربه‌فرد نانو ذرات قدرت نفوذپذیری بالا است که به سبب ابعاد در محدوده نانو صورت می‌گیرد. لذا نانو ذرات به‌راحتی می‌توانند از دهانه روزنه با محدوده میکرون به‌راحتی عبور کنند. از سوی دیگر، اگرچه دیواره سلول گیاهی به‌مثابه یک سد از ورود عوامل خارجی جلوگیری می‌کند، نانو ذرات با قطر کمتر از ۲۰ نانومتر می‌توانند به‌راحتی از حفرات دیواره سلولی عبور کنند و وارد فضای داخلی سلول و غشای پلاسمایی شوند (Moore, 2006).

جدول ۴. مقایسه میانگین اثرات متقابل تنش خشکی × نانو ذرات نقره بر صفات فیزیولوژی

Table 4. Means comparison of interaction effects of drought stress × silver nanoparticles on physiological traits

صفات/ واحد Traits /unit	سطح تنش Stress level	صفر (0)	55 ppm	110 ppm
کلروفیل a ChlorophyllA ug/g f.w	آبیاری کامل Full Watering	19.810 bc	18.855 c	21.453 ab
	تنش خشکی Drought stress	22.735 a	20.016 bc	18.501 c
کلروفیل b Chlorophyll B ug/g f.w	آبیاری کامل Full Watering	5.714 c	5.841 c	5.993 c
	تنش خشکی Drought stress	6.626 b	7.076 a	4.618 d
کارتنوئید Carotenoid ug/g f.w	آبیاری کامل Full Watering	9.147 cd	8.943 d	10.083 b
	تنش خشکی Drought stress	9.863 bc	11.699 a	7.959 e
پروتئین Protein Mg/g	آبیاری کامل Full Watering	1.111 bc	1.133 a	1.128 ab
	تنش خشکی Drought stress	1.117 abc	1.112 abc	1.106 c
پلی فنل پراکسیداز Polyphenol peroxidase Mc/min/mg pro	آبیاری کامل Full Watering	0.017 bc	0.019 b	0.016 c
	تنش خشکی Drought stress	0.021 a	0.016 bc	0.017 bc
فنیل الانین امونیالیاز PAL Mc/min/mg pro	آبیاری کامل Full Watering	0.146 bcd	0.157 b	0.133 cd
	تنش خشکی Drought stress	0.148 bc	0.425 a	0.130 d
کاتالاز Catalase Mc/min/mg pro	آبیاری کامل Full Watering	0.00063 b	0.00066 ab	0.00065 ab
	تنش خشکی Drought stress	0.00062 bc	0.00068 a	0.00057 c
گایاکول پراکسیداز Guaiacol peroxidase $mM^{-1} cm^{-1}$	آبیاری کامل Full Watering	0.00019 a	0.00016 b	0.00016 b
	تنش خشکی Drought stress	0.00018 ab	0.00018 ab	0.00017 ab
آسکوربات Ascorbate $mM^{-1} cm^{-1}$	آبیاری کامل Full Watering	0.023 a	0.022 b	0.023 ab
	تنش خشکی Drought stress	0.019 c	0.022 ab	0.014 d

مقایسه میانگین اثرات متقابل سه‌گانه اکوتیپ×تنش خشکی×نانو ذرات نقره (جدول ۵) نشان داد بیشترین مقدار کلروفیل a با میانگین ۳۳/۶۵ میکروگرم برگرم وزن‌تر در اکوتیپ قاین، کاتالاز با میانگین ۰/۰۰۱۶ Mc/min/mg pro در اکوتیپ آرین، پلی فنل اکسیداز با میانگین ۰/۰۵ Mc/min/mg pro در اکوتیپ بیرجند، گایاکول پراکسیداز با میانگین ۰/۰۰۴ $mM^{-1} cm^{-1}$ در اکوتیپ نصرآباد تحت تنش خشکی در شاهد مشاهده شد. بیشترین مقدار کلروفیل b با میانگین ۱۸/۹۰ میکروگرم برگرم وزن‌تر و کارتنوئید با میانگین ۲۱/۳۷ میکروگرم برگرم وزن‌تر در اکوتیپ قاین و فنیل آلانین آمونیالیاز با میانگین ۳/۰۰ Mc/min/mg pro در اکوتیپ آرین تحت تنش خشکی در غلظت ۵۵ پی‌پی‌ام نانوذره نقره مشاهده شد. بیشترین مقدار پروتئین تام با میانگین ۱/۲۱ میلی‌گرم بر گرم در آبیاری کامل در غلظت ۱۱۰ پی‌پی‌ام نانوذره نقره در اکوتیپ قاین مشاهده شد. بیشترین مقدار آسکوربات پراکسیداز با

میانگین ۰/۰۴۵ $mM^{-1}\ cm^{-1}$ تحت تنش خشکی در غلظت ۵۵ پی‌پی‌ام در اکوتیپ گازار و در شاهد اکوتیپ سرند در شاهد با میانگین ۰/۰۴۵ $mM^{-1}\ cm^{-1}$ مشاهده شد.

نانو ذرات باعث بسیاری از تغییرات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی در گیاهان می‌شوند که البته اثر آن‌ها به ترکیب شیمیایی، اندازه، سطح پوشش، واکنش‌پذیری و از همه مهم‌تر دوز آن‌ها وابسته است. (Khodakovskaya et al., 2012). محققان پیشنهاد کرده‌اند هر دو اثر مثبت و منفی بر روی رشد و توسعه گیاه و تأثیر نانو ذرات مهندسی‌شده بر روی گیاهان به ترکیب، غلظت، اندازه و خواص فیزیکی و شیمیایی نانو ذرات و همچنین گونه گیاهی بستگی دارد (Ma et al., 2010). میزان کلروفیل a تحت تنش خشکی در شاهد نسبت به سطوح نانوذره تحت تنش و سطوح نانوذره تحت آبیاری افزایش داشته است، کلروفیل نقشی یگانه و اثرگذار در زندگی گیاهان آلی دارد (Eckharti et al., 2004). ازآنجاکه محتویات کلروفیلی گیاه یکی از پارامترهای شاخص عملکرد هورمون اتیلن است (Jone et al., 1997). برخی پژوهش‌ها نشان می‌دهد که فلزات سنگین می‌توانند در غلظت‌های پایین سبب افزایش میزان کلروفیل a وb (John et al., 2008; Ghorbanli and Kiapour, 2012) و در غلظت‌های بالا موجب کاهش این رنگ‌دانه‌ها شوند (John et al., 2009). حضور فلزات سنگین مثل نقره در منطقه ریزوسفر و ورود آن به گیاه باعث کاهش رشد شده و متابولیسم سلولی را بر هم می‌زند؛ بنابراین فرآیندهای مهمی مانند انتقال آب، فسفریلاسیون اکسیداتیو میتوکندری، فتوسنتز و مقدار کلروفیل اثر منفی می‌گذارد (Vitoria et al., 2006). اثرات مستقیم فلزات سنگین بر واکنش‌های نوری فتوسنتز شامل تأثیر بر احیا NADP و فسفریلاسیون نوری و اثرات غیرمستقیم آن بر فرآیند سنتز و تجزیه کلروفیل، تغییر در نسبت کلروفیل a به b و رقابت با سایر عوامل ضروری است (Aggarwal et al., 2011). درصورتی‌که میزان کلروفیل b در سطح ۵۵ پی‌پی‌ام نانوذره نقره تحت تنش خشکی نسبت به شاهد آبیاری و خشکی افزایش نشان داد. در گزارشی بیان شد که اتیلن باعث افزایش فعالیت آنزیم کلروفیلاز و تخریب غشای داخلی کلروپلاست می‌شود، درحالی‌که نیترات نقره ppm ۱۰۰ باعث کاهش تولید اتیلن و کاهش تخریب کلروفیل در میوه calamondin می‌شود. نانو نقره با تأثیری که بر روی رسپتور اتیلن می‌گذارد می‌تواند از تخریب کلروفیل جلوگیری کند درنتیجه میزان آن افزایش می‌یابد (Purvis,1980). در آزمایش حاضر این افزایش در کلروفیل b دیده می‌شود. افزایش میزان کلروفیل در اثر تیمار نانو نقره می‌تواند به دلیل اثر بازدارندگی آن بر روی اتیلن باشد (Reid et al., 1989). اتیلن باعث انتقال اکسین و کاهش میزان کلروفیل و مرگ‌ومیر بافت‌ها می‌شود (Lentini et al., 1988). همچنین گزارش‌شده است که Ag^{+} بااتصال به گیرنده‌های اتیلن و با کاهش تولید اتیلن و تحریک بیوسنتز پلی‌آمین‌ها اثر خود را اعمال می‌نماید (Roustan et al., 1990). در تحقیقی که روی شمعدانی واریته Foxy انجام گرفت، کلروفیل‌های a و b و کل در تیمار ۶۰ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات نقره بیشترین میزان را نشان دادند (Hatami and Ghorbanpour, 2014). تیمار ۱۵ پی‌پی‌ام نانو ذرات نقره منجر به بیشترین افزایش میزان کلروفیل در گیاه گل مریم شد (Asgari et al., 2013). نانو ذرات نقره با غلظت ۵۰ پی‌پی‌ام میزان کلروفیل a و b را در برگ‌های ماش سبز (Vigna radiate) به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش می‌دهد (Najafi and Jamei, 2014). میزان کارتنوئید در سطح ۵۵ پی‌پی‌ام نانوذره نقره تحت تنش خشکی نسبت به شاهد آبیاری و خشکی افزایش داشت. کاروتنوئیدها ازجمله مهم‌ترین و باارزش‌ترین متابولیت‌های ثانویه در موجودات زنده هستند که دارای یک محدوده بزرگ از وظایف ساختاری، اعمال فیزیولوژیک و همچنین بیولوژیک می‌باشند (Hariri et al., 2009). کارتنوئیدها ترکیبات تتراترپنی می‌باشند که وظیفه حفظ کلروفیل از اکسیداسیون نوری، جذب نور و انتقال انرژی به کلروفیل a را بر عهده‌دارند (Devlin and Withman, 2002). همچنین به‌عنوان حامی رنگیزه‌های غیر فتوسنتزی شناخته‌شده‌اند که می‌توانند انرژی اضافی طول‌موج‌های کوتاه را بگیرند و اکسیژن یک تایی را به اکسیژن سه‌تایی تبدیل کرده و با گرفتن رادیکال‌های اکسیژن تولیدشده، نقش آنتی‌اکسیدانی از خود بروز دهند (Inze and Montagu, 2000). میزان کارتنوئید در گیاهان مختلف با بالا رفتن غلظت فلز می‌تواند افزایش یا کاهش نشان دهد. در گیاه خرفه (Portulaca oleracea L.) با افزایش غلظت سولفات مس (تا ۱۵۰۰ میکرو مول) میزان کارتنوئیدها روند افزایشی نشان داد (Ghorbanli and Kiapour, 2012). در پژوهشی اختلاف معنی‌داری بین شاهد و سایر سطوح نانو ذرات نقره در هر دو رقم آنتونی و بلوواندر در محتوای کلروفیل a و کارتنوئید وجود

دارد. ولی با افزایش غلظت نانو ذرات در سطح ۸۰ میلی‌گرم در لیتر، محتوای کلروفیل b در رقم آنتونی و بلووندر به‌طور معنی‌داری کاهش‌یافته و از میزان کلروفیل a و کارتنوئید کاسته شد (Hatami et al., 2014). با افزایش نانو ذرات نقره میزان پروتئین در سطح ۱۱۰ پی‌پی‌ام آبیاری نسبت به شاهد و سطوح دیگر نانوذره در آبیاری کامل و خشکی افزایش‌یافته است. پروتئین‌ها ازجمله مهم‌ترین مولکول‌های درگیر در پاسخ به عناصر فلزی سنگین می‌باشند. واکنش عمومی محیط فیزیولوژیک در مقابل ورود مواد خارجی به داخل سلول، می‌توان به متصل شدن مولکول‌های زیستی ازجمله پروتئین‌ها به این اشاره کرد که کروناها (Corona) را به وجود می‌آورند (Cedervall et al., 2007). غلظت پروتئین و تمایل آن برای اتصال به ذرات، مدت‌زمان تثبیت پروتئین‌ها بر روی ذرات را کنترل می‌کند (Lynch et al., 2006). گیرنده‌های اتیلن به نام ETR1 یک پروتئین دیمر در جایگاه اتصال خود دارای یون مس هستند که برای اتصال به اتیلن ضروری است. یون‌های مس در جایگاه گیرنده‌های اتیلن با دو باقیمانده آمینواسیدی Cys65 و His69 به‌صورت کئوردینانسی متصل می‌شوند (Rodrigvez et al., 1999). گیرنده‌های اتیلنی به‌صورت همو یا هترودایمرهایی که به‌وسیله باندهای دی سولفیدی به هم متصل‌اند عمل می‌کنند. CTR1 یک پروتئین است که به خانواده RAF از پروتئین کیناز Ser/Thr تعلق دارد و تنظیم‌کننده پاسخ اتیلنی است، CTR1 در حضور اتیلن غیرفعال است و غیرفعال بودن آن منجر به فعالیت EIN2 که یک تنظیم‌کننده مثبت پاسخ اتیلنی است می‌شود و درنتیجه، ارسال سیگنال درک اتیلن به هسته انجام و یا با روشن شدن ژن‌های دخیل در پاسخ اتیلن، این پاسخ‌ها آغاز می‌شوند. یون‌های نقره از مهارکننده‌های اتیلن هستند (Beyer., 1976). میزان آنزیم گایاکول پراکسیداز شاهد تحت خشکی نسبت به شاهد آبیاری و سطوح نانو ذرات نقره افزایش‌یافته است. گایاکول پراکسیداز در تمام موجودات یافت می‌شود، این پروتئین‌ها دارای گروه پروستتیک فری پروتوپورفیرین IX می‌باشند. این آنزیم‌ها از چندین سوبسترا برای اکسیداسیون پراکسید هیدروژن استفاده می‌کنند (Asada, 1992). آنزیم آسکوربات پراکسیداز در شاهد آبیاری و سطح ۵۵ پی‌پی‌ام نانوذره نقره تحت تنش خشکی نسبت به شاهد خشکی و دیگر سطوح نانوذره به یک‌میزان افزایش داشته است. پژوهشگران در آزمایش بر روی دو رقم آنتونی و بلووندر تفاوت معنی‌داری در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز مشاهده کردند. همچنین افزایش معنی‌داری در فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز بین دو رقم در غلظت‌های ۴۰ و ۶۰ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات نقره مشاهده کردند (Hatami et al., 2014). میزان پلی فنل اکسیداز شاهد تحت تنش خشکی نسبت به شاهد آبیاری و سطوح نانو ذرات افزایش یافت. پلی‌فنل اکسیدازها با استفاده از مولکول اکسیژن به‌عنوان دهنده‌ی الکترون تبدیلo - دی فنل‌ها به o – دی کوئینون‌ها را کاتالیز می‌کنند (Somner et al., 1994). در پژوهشی افزایش میزان نانو نقره از ۲۰ به ۶۰ ppm باعث افزایش محصول سیب‌زمینی و کاهش پلی فنل شد (Safavi, 2012). در پژوهشی دیگر بر روی گیاه الوورا، تأثیر نانو ذرات نقره بر تولید مهم‌ترین متابولیت ثانویه این گیاه Aloin نشان داد که با افزایش غلظت نانو نقره بیومس افزایش و تولید متابولیت ثانویه کاهش یافت. شاید این اتفاق به‌این‌علت باشد که نانو ذرات نقره می‌تواند بر فعالیت آنزیم-های دخیل در رشد سلول اثر بگذارد (Raei et al., 2014). میزان آنزیم کاتالاز شاهد خشکی نسبت به شاهد آبیاری و سطوح نانو ذرات افزایش یافت. کاتالازها به‌طور عمده در سیتوزول، میتوکندری و پراکسی زوم‌ها یافت می‌شوند.

کاتالازها در سه کلاس طبقه‌بندی می‌شوند. کلاس I: که به مقدار زیادی در برگ‌ها بیان می‌شوند و وابسته به نور می‌باشند و پراکسید هیدروژن را در طول تنفس نوری حذف می‌کنند. کلاس II: که به‌طور عمده در بافت‌های آوندی یافت می‌شوند. کلاس III: به‌طور غالب در گلی اکسی زوم‌های دانه‌ها و دانه رست‌های جوان یافت می‌شوند (Dat et al., 2000). آنزیم کاتالاز نیز یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های سیستم آنتی‌اکسیدانی است که با افزایش تنش خشکی افزایش می‌یابد (Moosavi et al., 2009). میزان فنیل آلانین آمونیاز در سطح ۵۵ پی‌پی‌ام نانوذره نقره تحت تنش خشکی نسبت به شاهد آبیاری و خشکی و سطح ۱۱۰ پی-پی‌ام نانو ذرات افزایش داشت. آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز می‌تواند به‌عنوان آنزیم آنتی‌اکسیدان در نظر گرفته شود، زیرا دارای خاصیت به دام اندازی رادیکال‌های اکسیژن از طریق ترکیبات فنلی تولیدشده، است (Tian and Li, 2006).

جدول ۵. مقایسه میانگین اثرات متقابل سه‌گانه اکوتیپ×تنش خشکی × نانو ذرات نقره صفات فیزیولوژی

جدول ۵. ادامه

Table 5. Continued

سطح تنش Stress level	سطوح نانو nano-level	Ecotype	اکوتیپ	کلروفیل A Chlorophyll A ug/g f.w	کلروفیل B Chlorophyll B ug/g f.w	کارتنوئید Carotenoid ug/g f.w	پروتئین Protein mg/g	پلی فنل پراکسیداز Polyphenol oxidase Mc/min/mg pro	فنیل الانین امونیالیاز PAL Mc/min/mg pro	کاتالاز Catalase Mc/min/mg pro	گایاکول پراکسیداز Guaiacol peroxidase $mM^{-1} cm^{-1}$	آسکوربات Ascorbate $mM^{-1} cm^{-1}$
	55 ppm	Gazar	گازار	21.54 $^{h-p}$	5.15 $^{m-u}$	8.24 $^{l-t}$	1.10 $^{b-f}$	0.02 $^{e-i}$	0.27 ^{cd}	0.012 ^{bc}	0.0002 ^{def}	0.045 ^{a}
		Birjand	بیرجند	27.16 $^{a-h}$	7.23 $^{i-l}$	13.12 $^{e-j}$	1.08 $^{c-f}$	0.01 $^{j-q}$	0.10 $^{j-r}$	0.0005 $^{i-o}$	0.0001 ^{g}	0.010 $^{u-y}$
		Hashemieh	هاشمیه	7.80 ^{tuv}	3.45 $^{s-a}$	3.32 $^{v-z}$	1.12 $^{a-f}$	0.01 $^{m-q}$	0.06 ^{pqr}	0.0002 ^{po}	0.0002 ^{def}	0.021 $^{i-m}$
		Qaen	قاین	31.42 $^{a-d}$	18.90 ^{a}	21.37 ^{a}	1.13 $^{a-f}$	0.01 $^{h-o}$	0.14 $^{g-o}$	0.0005 $^{h-n}$	0.0003 ^{bc}	0.018 $^{k-r}$
		Ayask	آیسک	22.67 $^{g-p}$	13.95 ^{b}	17.40 ^{ab}	1.11 $^{b-f}$	0.009 $^{n-q}$	0.09 $^{k-r}$	0.0004 $^{k-p}$	0.0001 ^{g}	0.015 $^{o-u}$
		Sarand	سرند	16.32 $^{n-s}$	3.81 $^{r-z}$	17.49 ^{ab}	1.17 ^{abc}	0.01 $^{h-n}$	0.17 $^{e-j}$	0.0007 $^{f-i}$	0.0002 ^{def}	0.023 ^{hij}
		Ariyan shahr	آربن شهر	30.16 $^{a-g}$	9.18 $^{e-h}$	17.48 ^{ab}	1.07 ^{ef}	0.02 $^{f-k}$	3.00 ^{a}	0.0014 ^{ab}	0.0002 ^{def}	0.011 $^{t-y}$
		Nasrabad	نصرآباد	17.39 $^{k-s}$	4.14 $^{r-x}$	7.70 $^{m-u}$	1.11 $^{a-f}$	0.01 $^{k-q}$	0.16 $^{f-m}$	0.0007 $^{f-i}$	0.0001 ^{efg}	0.044 ^{a}
		Baghestan	باغستان	15.18 $^{o-t}$	2.64 $^{w-e}$	5.71 $^{r-y}$	1.10 $^{b-f}$	0.02 $^{g-m}$	0.11 $^{i-r}$	0.0005 $^{h-n}$	0.0002 ^{def}	0.013 $^{q-x}$
		Sarayan	سرایان	10.48 $^{s-v}$	2.27 $^{y-e}$	5.12 $^{t-y}$	1.09 $^{b-f}$	0.01 $^{j-q}$	0.12 $^{i-r}$	0.0005 $^{h-n}$	0.0001 ^{g}	0.024 ^{hi}
	110 ppm	Gazar	گازار	20.49 $^{h-r}$	4.61 $^{n-v}$	8.67 $^{k-t}$	1.11 $^{a-f}$	0.02 $^{e-j}$	0.14 $^{g-o}$	0.0006 $^{f-k}$	0.0002 ^{def}	0.018 $^{k-q}$
		Birjand	بیرجند	25.25 $^{b-k}$	6.55 $^{j-m}$	11.84 $^{e-m}$	1.08 $^{c-f}$	0.01 $^{j-q}$	0.16 $^{f-l}$	0.0010 ^{cde}	0.0002 ^{def}	0.015 $^{o-v}$
		Hashemieh	هاشمیه	5.01 ^{uv}	0.89 ^{cd}	1.82 ^{Yz}	1.10 $^{b-f}$	0.01 $^{m-q}$	0.14 $^{g-o}$	0.0006 $^{f-k}$	0.0002 ^{def}	0.015 $^{p-w}$
		Qaen	قاین	23.96 $^{c-n}$	7.65 $^{g-k}$	12.34 $^{e-l}$	1.11 $^{a-f}$	0.008 ^{opq}	0.15 $^{g-o}$	0.0006 $^{f-k}$	0.0001 ^{g}	0.018 $^{k-r}$
		Ayask	آیسک	31.89 ^{abc}	5.24 $^{m-s}$	7.11 $^{p-w}$	1.10 $^{b-f}$	0.008 ^{opq}	0.16 $^{f-k}$	0.0008 ^{efg}	0.0002 ^{def}	0.009 $^{x-z}$
		Sarand	سرند	3.44 ^{v}	0.18 ^{d}	0.84 ^{z}	1.12 $^{a-f}$	0.01 $^{k-q}$	0.10 $^{i-r}$	0.0003 $^{m-p}$	0.0002 ^{def}	0.013 $^{r-x}$
		Ariyan shahr	آربن شهر	22.46 $^{g-p}$	6.44 $^{j-n}$	9.84 $^{h-r}$	1.09 $^{c-f}$	0.04 ^{bcd}	0.11 $^{i-r}$	0.0005 $^{i-o}$	0.0001 ^{efg}	0.011 $^{t-y}$
		Nasrabad	نصرآباد	17.69 $^{j-s}$	3.98 $^{r-x}$	7.80 $^{m-u}$	1.07 ^{ef}	0.03 ^{def}	0.10 $^{i-r}$	0.0003 $^{m-p}$	0.0001 ^{g}	0.023 ^{ijk}
		Baghestan	باغستان	16.73 $^{m-s}$	4.35 $^{p-w}$	8.18 $^{l-t}$	1.08 $^{c-f}$	0.01 $^{l-q}$	0.13 $^{h-p}$	0.0006 $^{f-k}$	0.0002 ^{def}	0.010 $^{v-z}$
		Sarayan	سرایان	18.04 $^{j-s}$	6.24 $^{k-o}$	11.09 $^{e-p}$	1.14 $^{a-f}$	0.01 $^{m-q}$	0.06 ^{pqr}	0.0002 ^{po}	0.0001 ^{efg}	0.017 $^{l-s}$

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک، ازنظر آماری با یکدیگر تفاوت معنی‌داری ندارند.

Means in each column followed by the same letter are not significantly different based on protected LSD.

جدول ۵. ادامه

Table 5. Continued

سطح تنش Stress level	سطوح نانو nano-level	Ecotype	اکوتیپ	کلروفیل A Chlorophyll A ug/g f.w	کلروفیل B Chlorophyll B ug/g f.w	کارتنوئید Carotenoid ug/g f.w	پروتئین Protein mg/g	پلی فنل پراکسیداز Polyphenol oxidase Mc/min/mg pro	فنیل الانین امونیالیاز PAL Mc/min/mg pro	کاتالاز Catalase Mc/min/mg pro	گایاکول پراکسیداز Guaiacol peroxidase $mM^{-1} cm^{-1}$	آسکوربات Ascorbate $mM^{-1} cm^{-1}$
	110 ppm	Gazar	گازار	23.50 d-n	6.03 k-q	10.21 g-q	1.16 a-e	0.01 j-q	0.09 k-r	0.0003 l-p	0.0003 bc	0.015 o-u
		Birjand	بیرجند	14.72 p-t	3.38 t-b	6.61 q-x	1.09 c-f	0.03 cde	0.10 j-r	0.0005 g-m	0.0001 g	0.018 k-q
		Hashemieh	هاشمیه	24.95 b-l	10/61 cde	14.14 b-g	1.12 a-f	0.01 j-q	0.15 g-n	0.0006 f-k	0.0001 g	0.037 bcd
		Qaen	قاین	31.02 a-e	8.42 f-i	15.39 bcd	1.21 a	0.01 k-q	0.10 j-r	0.0005 i-o	0.0002 def	0.041 a-d
		Ayask	آیسک	20.87 h-p	5.45 m-r	9.98 g-q	1.10 b-f	0.01 l-q	0.18 e-i	0.0007 e-h	0.0001 fg	0.036 def
		Sarand	سرند	20.85 h-p	5.18 m-t	9.62 k-s	1.15 a-e	0.01 i-p	0.16 f-l	0.0007 f-i	0.0001 g	0.009 x-z
		Ariyan shahr	آرین شهر	10.46 s-v	2.03 z-d	3.82 u-z	1.09 c-f	0.006 pq	0.11 i-r	0.0005 i-o	0.0001 g	0.017 l-r
		Nasrabad	نصرآباد	18.86 i-r	4.25 q-x	8.68 k-t	1.14 a-f	0.01 h-o	0.16 g-m	0.0007 f-i	0.0001 efg	0.036 de
		Baghestan	باغستان	17.49 j-s	3.94 r-x	7.64 n-u	1.10 b-f	0.01 i-p	0.06 r	0.0008 efg	0.0001 efg	0.007 yz
		Sarayan	سرایان	31.77 abc	10.59 cde	14.71 b-f	1.09 c-f	0.02f-l	0.22 c-g	0.0010 cde	0.0003 bc	0.010 t-y
خشکی کامل Drought stress	شاهد Control	Gazar	گازار	24.06 c-n	6.39 j-o	11.74 d-n	1.12 a-f	0.01 l-q	0.09 k-r	0.0003 l-p	0.0001 g	0.013 r-x
		Birjand	بیرجند	27.16 a-h	8.87 e-i	11.09 e-p	1.09 c-f	0.05 a	0.09 l-r	0.0004 j-p	0.0001 efg	0.041 abc
		Hashemieh	هاشمیه	19.29 h-r	4.55 o-v	8.75 k-t	1.13 a-f	0.005 q	0.24 cde	0.0011 cd	0.0002 bcd	0.021 i-n
		Qaen	قاین	33.65 a	10.35 cde	9.65 i-s	1.10 b-f	0.01 h-n	0.12 i-r	0.0006 f-k	0.0002 def	0.009 x-z
		Ayask	آیسک	23.67 d-n	9.37 d-g	12.60 c-k	1.17 a-d	0.04 abc	0.09 j-r	0.0004 k-p	0.0001 g	0.030 g
		Sarand	سرند	21.47 h-p	4.78 m-v	9.11 j-t	1.13 a-f	0.01 k-q	0.16 g-m	0.0007 f-i	0.0002 def	0.006 z
		Ariyan shahr	آرین شهر	31.32 ab	11.04 cd	15.03 bce	1.09 c-f	0.006 pq	0.41 b	0.0016 a	0.0001 g	0.016 n-t
		Nasrabad	نصرآباد	16.20 n-s	3.75 r-z	7.99 m-t	1.15 a-e	0.009 n-q	0.11 i-r	0.0005 i-o	0.0004 a	0.021 i-l
		Baghestan	باغستان	16.75 m-s	3.90 r-x	7.43 o-v	1.08 c-f	0.005 q	0.06 pqr	0.0004 j-p	0.0001 g	0.015 o-v
		Sarayan	سرایان	12.75 q-u	3.21 v-b	5.19 t-y	1.07 ef	0.04 ab	0.08 m-r	0.0003 l-p	0.0001 g	0.016 m-s

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک، ازنظر آماری با یکدیگر تفاوت معنی‌داری ندارند.

Means in each column followed by the same letter are not significantly different based on protected LSD.

نتیجه‌گیری کلی

بر اساس نتایج به‌دست‌آمده می‌توان نتیجه گرفت که نانو نقره در گیاهان همانند تنش خشکی باعث ایجاد تنش می‌شود، درنتیجه گیاه برای مقابله با این تنش و حفظ بقای خود تغییراتی را در مکانیسم‌های حیاتی خود ایجاد می‌کند. صفات کلروفیل b، کارتنوئید و فنیل آلانین آمونیالیاز در شرایط تنش خشکی تحت نانو ذرات نقره با غلظت ۵۵ پی-پی‌ام بیشترین تولید را در اکوتیپ قاین و آرین‌شهر نشان دادند که بیانگر عملکرد بالای صفات در این شرایط نسبت به شاهد است. صفات کلروفیل a، کاتالاز، پلی فنل اکسیداز و گایاکول پراکسیداز تحت تنش خشکی در شاهد بیشترین میزان عملکرد داشتند. ممکن است غلظت بالای نانو نقره اثرات سمی برای این صفات داشته باشد. نانو ذرات نقره در سطح ۵۵ پی‌پی‌ام نسبت به سطح شاهد و ۱۱۰ پی‌پی‌ام اثر بهتری داشته است. نانو ذرات به‌واسطه خاصیت آب‌دوستی با آزاد کردن کم‌کم ذرات آب به بنه کمک می‌نمایند که در سطح تنش خشکی به‌خوبی عمل نمایند. همچنین خاک-های مرطوب و باتلاقی مناسب رشد زعفران نیست زیرا در چنین خاک‌هایی بنه زعفران سریعاً پوسیده می‌شود؛ بنابراین آبیاری زیاد منجر به پوسیدگی بنه می‌شود که نانو ذرات با خاصیت ضد میکروبی و قارچی و آب‌دوستی که دارند از پوسیدگی جلوگیری می‌کنند.

منابع

Aggarwal, A., Sharma, I., Tripathi, B.N., Munjal, A.K., Baunthiyal, M., Sharma, V., 2011. Photosynthesis: Overviews on Recent Progress & Future Perspective. Edition: First, Chapter: Metal toxicity and Photosynthesis: IK International Publishing House. New Delhi, pp.16, 229-236.

Amiri Oughan, H., Ahmadi, M.R., Moghadam, M., Valizadeh, M., Shakiba, M.R., 2002. Heritability of seed yield and yield components in rapeseed (*Brassica napus*) under drought stress and normal conditions. Journal of Seed and Plant. 18(2), 179-199.

Alirezaee, F. Kiarostami, KH., Hossein Zadeh Namin, M., 2014. The effect of nano silver on compounds phenoli and rosmarinic acid in callus tissue culture of lavender. First National Congress of Biology and Natural Sciences Iran. Tehran. [In Persian].

Asada, K., 1992. Ascorbate Peroxidase –A Hydrogen Peroxide Scavenging Enzyme in Plants. Physiologia Plantarum. 85(2), 235-241.

Asgari, M., Azimi, M.H., Hamzehi, Z., Mortazavi, S.N., Khodabandelu, F., 2013. Effect of nano- silver and sucrose on vase life of Tuberose (*Polianthes tuberosa* cv. peril) cut flowers. International Journal of Agronomy and Plant Production. 4(4), 680-687.

Arnon, A.N., 1967. Method of extraction of chlorophyll in the plants. Agronomy Journal. 23, 112-121.

Elmo, M., Beyer, Jr., 1976. Effect of silver ion, carbon dioxide, and oxygen on ethylene action and metabolism. Plant Physiology. 63(1), 169-173.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 72, 248-254.

Breusegem, F.V., Vranova, E., Dat, J.F., Inze, D., 2001. The role of active oxygen species in plant signal transduction. Plant Science. 161, 405-414.

Cedervall, T., Lynch, I., Lindman, S., Berggard, T., Thulin, E., Nilsson, H., Dawson, K.A., Linse, S., 2007. Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 104(7), 2050-2055.

Chance, B., Maehly, A.C., 1955. Assay of catalases and peroxidases. Methods in Enzymology. 2, 764-755.

Cheng, Q., 2006. Structural diversity and functional novelty of new carotenoid biosynthesis genes. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 33(7), 552–559.

Dat, J., Vandenabeele, S., Vranova, E., Van, M.M., Inzé, D., Van Breusegem, F., 2000. Dual action of the active oxygen species

during plant stress responses. Cellular and Molecular Life Sciences. 57(5), 779-795.

Devlin, M.R., Withman, F.H., 2002. Plant Physiology. CBs publishers and distributers, Chapter 12.

Dixit, V., Pandey, V., Shyam, R., 2001. Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L.). Journal of Experimental Botany. 52(358), 1101-1109.

Eckharti, U., Grimm, B., Hortensteiner, S., 2004. Recent advances in chlorophyll biosynthesis and breakdown in higher plants. Plant Molecular Biology. 56, 1-14.

Ekhtiyari, R., Moraghebi, F., 2012. The study of the effects of nano silver technology on salinity tolerance of cumin seed (*Cuminum cyminum* L.). Plant and Ecosystem. 7(25), 99-107.

Ghorbanli, M., Kiapour, A., 2012. Copper-induced changes on pigments and activity of non-enzimatic and enzymatic systems in *Portulaca oleracea* L. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants. 28(2), 235-247. [In Persian with English Summary].

Hariri, F.,Omidi, M., Shafi'i, M., Parvanhe, S., 2009. Production and exacerbation of the genes expression of the carotenoid biosynthesis pathway by genetic engineering. Regional Conference of Food and Biotechnology, Kermanshah, Islamic Azad University, Kermanshah Branch. [In Persian with English Summary].

Hatami, M., Ghorbanpour, M., 2014. Defense enzyme activities and biochemical variations of Pelargonium zonale in response to nanosilver application and dark storage. Turkish Journal of Biology. 38(1), 130-139.

Hatami, M., Hatamzadeh, A., Ghasemnezhad, M., Hasan sajedi, R., Ghorbanpour, M., 2014. Changes in antioxidant enzymes activity in two *Pelargonium zonale* cultivars by nanosilver oarticles during dark storage. Journal of Plant Production Technology. 13(2), 99-108. [In Persian with English Summary].

Hamrahi, S., Habibi, D., Madani, H., Mashhadi Akbar Boojar, M., 2008. Effect of cycocel and micronutrients on antioxidants rates as indices of drought resistance of rapeseed. New Finding in Agriculture. 2(3), 316-329. [In Persian with English Summary]

Hong, F., Zhou, J., Liu, C., Yang, F., Wu, C., Zheng, L., Yang, P., 2005. Effect of nano-TiO2 on photochemical reaction of chloroplasts of spinach. Biological trace element research. 105(1-3), 269-279.

Inze, D., Montagu, M. V., 2000. Oxidative stress in plants. Cornawall Great Britain. 336p.

Jone, R., Cattro, A., Travaglio, D., 1997. Chlorophyll content as index of ethylene inside culture vessels. Acta Horticulturae. 447, 229-230.

John, R., Ahmad, P., Gadgil, K., Sharma, S., 2008. Effect of cadmium and lead on growth, biochemical parameters and uptake in Lemna polyrrhiza L. Plant Soil and Environment. 54(6), 262–270.

John, R., Ahmad, P., Gadgil, K., Sharma, S., 2009. Heavy metal toxicity: effect on plant growth, biochemical parameters metal accumulation by *Brassica juncea* L. International Journal of Plant Production. 3(3), 65-76.

Keyhani, E., Keyhani, J., 2004. Hypoxia/anoxia as signaling for increased alcohol dehydrogenase activity in saffron (*Crocus sativus* L.) corm. Annals of the New York Academy of Sciences. 1030, 449-457.

Khodakovskaya, M.V., Kim, B.S, Kim, J.N., Alimohammadi, M., Dervishi, E., Mustafa, T., Cernqla, C.E., 2012. Carbon nanotubes as plant growth regulators: effects on tomato growth, reproductive system, and soil microbial community. Small. 9(1), 115–123.

Lentini, Z., Mussell, H., Mutschler, M.A., Earle, E. D., 1988. Ethylene generation and reversal of ethylene effects during development in vitro rapid-cycling *Brassica camp*ertis L. Plant Science. 54, 75-81.

Lichtenthaler, H.K., 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. Methods in Enzymology. 148, 350-382.

Lynch, I., Dawson, K.A., Linse, S., 2006. Detecting cryptic epitopes created by nanoparticles. Science's STKE. (327), pp17.

Ma, X., Geiser-Lee, J., Deng, Y., Kolmakov, A., 2010. Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: phytotoxicity, uptake and accumulation. Science of the Total Environment. 408(16), 3053–3061.

Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in Plant Science 7(9), 405-410.

Molina, R.V., Valero, M., Navarro, Y., Guardiola, J.L., García-Lui. A., 2005. Temperature effects on flower formation in saffron (*Crocus sativus* L.). Scientia Horticulturae. 103(3), 361–379.

Moore, M.N., 2006. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? Environ International Corporation. 32(8), 967–976.

Moosavi, A., Tavakkol-Afshari, R., Sharif-Zadeh, F., Aynehband, A., 2009. Effect of seed priming on germination characteristics, polyphenol oxidase, and peroxidase activities of four amaranth cultivars. Journal of Food, Agriculture and Environment (JFAE). 7(3), 353- 358.

Nakano, Y., Asada, K., 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant and Cell Physiology. 22(5), 867-880.

Najafi, S., Jamei, R., 2014. Effect of silver nanoparticles and $Pb(NO_3)_2$ on the yield and chemical composition of mung bean (*Vigna radiata*). Journal of Stress Physiology and Biochemistry. 10(1), 316-325.

Najafi, S., Heidari, R., Jamei, R., 2013. Influence of silver nanoparticles and magnetic field on phytochemical, antioxidant activity compounds and physiological factors of *Phaseolus vulgaris*. Technical Journal of Engineering and Applied Sciences. 3(21), 812-2816.

Park, H.J., Kim, S.H., Kim, H.J., Choi, S. H., 2006. A new composition of nanosized silica–silver for control of various plant diseases. Journal of Plant Pathology. 22(3), 295–302.

Purvis, A.C., 1980. Sequence of chloroplast degreening in calamondin fruit as influenced by ethylene and $AgNO_3$. Journal Plant Pathology. 66(4), 624-627.

Raei, M., Angaji, A., Omidi, M., Khodayari, D., 2014. Effect of abiotic elicitors on tissue culture of *Aloe vera*. International Journal of Biosciences (IJB). 5(1), 74-81.

Reid, MS., Evanse, RY., Dodge, L.L., 1989. Ethylene and silver thiosulfate influence opening of cut rose flowers. Horticultural Sciences. 114(3), 436-44.

Resende, M.L.V., Nojosa, G.B.A., Cavalcanti, L.S., Aguilar, M.A.G., Silva, L.H.C.P., Perez, J.O., Andrade, G.C.G., Carvalho, G.A., Castro, R.M., 2002. Induction of resistance in cocoa against *Crinipellis perniciosa* and *Verticillium dahliae* by acibenzolar-S-methyl (ASM). Plant Pathology. 51, 621-628.

Rezvani, N., Sorooshzadeh, A., Farhadi, N., 2012. Effect of nano-silver on growth of saffron in flooding stress. World Academy of Science. Engineering & Technology. 6(1), 517–522.

Rodriguez, F.I., Esch, J.J., Hall, A.E., Binder, B.M., Schaller, G.E., Bleecker, A.B., 1999. A copper cofactor for the ethylene receptor ETR1 from Arabidopsis. Science. 12, 996-998.

Rostami, M., Mohammadparast, B., Golfam, R., 2013. Effect of Different Levels of Salt Stress on the Concentration of Saffron Leaf Elements (*Crocus Sativus* L.), National Conference on Agricultural Science and Technology, Malayer, Malayer University. [In Persian].

Roustan, J.P., Latche, A., Fallot, J., 1990. Inhibition ethylene production and stimulation of carrot somatic embryogenesis by salicylic acid. Biologia Plantarum. 32, 273-276.

Safavi, K., 2012. Evaluation of Using Nanomaterial in Tissue Culture Media and Biological activity. Second International Conference on Ecological, Environmental and Biological Sciences. 13-14 October 2012, Bali, Indonesia.

Shao, H.B., Liang, M.A., Shao, M.A., Wang, B.C., 2005. Changes of anti-oxidative enzymes and membrane peroxidation for soil water deficits among 10 wheat genotypes at seedling. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 42(2), 107-113.

Somner, A., Neiman, E., Steffens, J.C., Mayer, A.M., Harel, E., 1994. Import, Targeting and Processing of a Plant Polyphenol Oxidase. Journal Plant Physiology. 105(4), 1301-1311.

Tian, X., Li, Y., 2006. Nitric oxide treatment alleviates drought stress in wheat seedlings. Biologia Plantarum. 50(4), 775-778.

Vanaja, V., Annadurai, G., 2013. Coleus aromaticus leaf extract mediated synthesis of silver nanoparticles and its bactericidal activity. Applied Nanoscience. 3(3), 217-223.

Vitoria, A.P., Cunha, M., Da., Azevedo, R.A., 2006. Ultra structural changes of Radish leaf

exposed to cadmium. Environmental and Experimental Botany. 58(1-3), 47-52.

Wang, J. W., Zheng, L. P., Wu, J. Y., Tan, R.Y., 2006. Involvement of nitric oxide in oxidative burst, phenylalanine ammonia-lyase activation and taxol production induced by low-energy ultrasound in *Taxus yunnanensis* cell suspension cultures. Nitric Oxide. 15(4), 351-358.

Zhao, J., Davis, L.C., Verpoorte, R., 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnology Advances. 23(4), 283-333.

Zhang, Z., Pang, X., Duan, X., Ji, Z.L., Jiang, Y., 2005. Role of peroxidase in anthocyanin degradation in litchi fruit pericarp. Food Chemistry 90 (1), 47-52.