Crop Biotech.
Spring (2017) 17: 1-13.

مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال هفتم، شماره هفدهم، بهار ۱۳۹۶ (۱۳-۱)

اثرات الیسیتور نانوذرات نقره و تنش خشکی بر بیان ژن بتاکاروتن‌هیدروکسیلاز (*bch*) بر عملکرد کارتنوئید زعفران (*Crocus sativus* L.)

بتول صابر تنها[1*]، براتعلی فاخری[2]، نفیسه مهدی‌نژاد[3]، زهره علیزاده[4]
۱. کارشناسی‌ارشد، گروه اصلاح‌نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل
۲. دانشیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل
۳. استادیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل
٤. استادیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۱۷- تاریخ تصویب: ۱۳۹۶/۳/۲۳)

Effects of silver nanoparticles elicitor and drought stress on the expression of beta-carotene hydroxylase (*bch*) gene on the yield of saffron carotenoid (*Crocus sativus* L.)

Batol Sabertanha[1*], Baratali Fakheri[2], Nafiseh Mahdinezhad[3], Zohreh Alizade[4]
1. M.Sc., Department of Plant Breeding and Biotechnology, College of Agriculture, University of Zabol, Iran.
2. Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, College of Agriculture, University of Zabol, Iran.
3. Assistant Professors, Department of Plant Breeding and Biotechnology, College of Agriculture, University of Zabol, Iran.
4. Assistant Professors, Department of Plant Breeding and Biotechnology, College of Agriculture, University of Birjand, Iran.
(Received: Jan. 6, 2017 - Accepted: Jun. 13, 2017)

Abstract

This study aimed to investigate the effect of drought stress and silver nanoparticles on beta-carotene hydroxylase (*bch*) gene expression and carotenoid production in saffron. The experiment was implemented in two levels including normal irrigation and full drought stress on nine ecotypes of saffron in three levels: control (distilled water), 55 and 110 ppm of silver nanoparticles levels. This study was conducted in split plot factorial experiment based on randomized complete block design with two replications at research field of Birjand University and biotechnology institute of Zabol University.In order to examine gene expression pattern, after taking leaf samples from all treatments, RNA extraction, cDNA synthesis and determination of temperature gradient, Real time polymerase chain reaction (Real-Time PCR) was used. Then, Data were analyzed using EX and SAS 9.2 software. The main effects of treatments with nine ecotypes of saffron, silver nanoparticle and drought stress and their interaction effects for *bch* gene expression and amount of carotenoid were significant at 1% probability level. The maximum *bch* gene expression and the amount of carotenoid was observed in 55 ppm of silver nanoparticles under drought stress in Ghaen ecotype (1478.62 & 21.37 $\mu g.g^{-1}$, respectively). Therefore, drought stress and silver Nanoparticles up to 55ppm increased bch gene expression and carotenoid production.

Keywords: Saffron, Beta-carotene hydroxylase, Nanoparticles, Real Time PCR

چکیده

این پژوهش به‌منظور بررسی تأثیر تنش خشکی و نانو ذرات نقره بر بیان ژن بتاکاروتن‌هیدروکسیلاز (*bch*) و تولید کارتنوئید در گیاه زعفران انجام شد. آزمایش در دو سطح آبیاری نرمال و تنش خشکی کامل بر روی نه اکوتیپ زعفران در سه سطح، شاهد (آب مقطر)، ۵۵ و ۱۱۰ پی‌پی‌ام نانو ذرات نقره پیاده شد. این بررسی به‌صورت اسپیلت پلات فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در دو تکرار در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه بیرجند و پژوهشکده زیست‌فناوری دانشگاه زابل انجام شد. بعد از تهیه نمونه‌های برگی از تمامی تیمارها، استخراج RNA، ساخت cDNAو تعیین شیب دمایی، جهت بررسی الگوی بیان ژن از واکنش Real Time PCR استفاده شد. سپس داده‌ها با نرم‌افزارهای GenEX و SAS 9.2 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. اثرات اصلی تیمارهای اکوتیپ، نانوذره نقره و تنش خشکی و اثرات متقابل آن‌ها برای بیان ژن *bch* و میزان کارتنوئید در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد. حداکثر بیان ژن *bch* و مقدار کارتنوئید در سطح ۵۵ پی‌پی‌ام نانوذره نقره تحت تنش خشکی در اکوتیپ قاین (به ترتیب ۱٤۷۸/٦۲ و ۲۱/۳۷ میکروگرم بر گرم وزن‌تر) مشاهده شد. در نتیجه، تنش خشکی و نانوذره نقره تا سطح ۵۵ پی‌پی‌ام موجب افزایش بیان ژن *bch* و میزان تولید کارتنوئید شده است.

واژه‌های کلیدی: زعفران، بتاکاروتن هیدروکسیلاز، نانو ذرات، Real Time PCR.

* نویسنده مسئول: بتول صابر تنها
E-mail: Sabertanha67@gmail.com

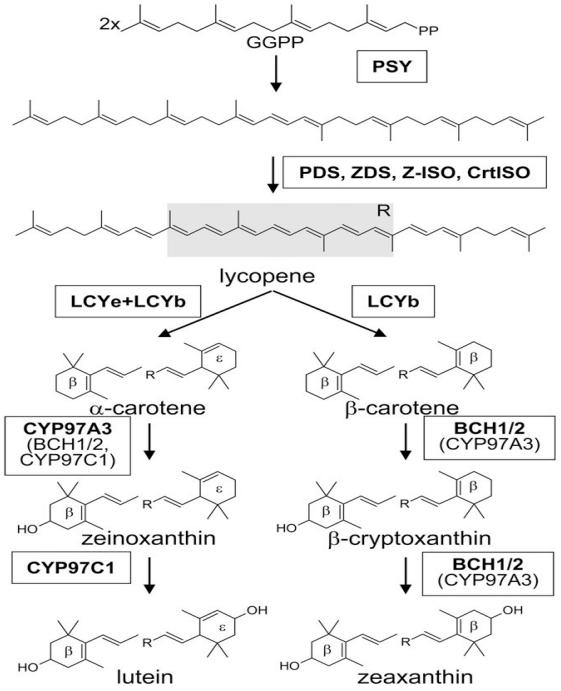
مقدمه

زعفران (*Crocus sativus* L.) از خانواده زنبق و راسته مارچوبه‌ای‌ها بوده و دارای ۸۵ گونه است (Rostami *et al*., 2013). در بین ۸۵ گونه شناخته‌شده از جنس *Crocus*، زعفران زراعی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. محصول زعفران گران‌بهاترین ادویه و از نظر دارویی نیز بسیار با ارزش است (Grilli-Caiola, 2004). زعفران یک گیاه زمین‌گرا (ژئوفیت) است که گلدهی آن در فصل پاییز صورت می‌گیرد (Molina *et al*., 2005). کاروتنوئیدها ازجمله مهم‌ترین و با ارزش‌ترین 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 ایزوپرنید ۴۰ کربنه هستند که از بلوک‌های ساختمانی ۵ کربنه ایزوپنتنیل ساخته می‌شوند که در گیاهان سنتز آن از طریق دو مسیر جداگانه صورت می‌گیرد: مسیر موالونات سیتوپلاسمی و مسیر لوکاتید-پلاستید (MEP). مسیر MEP بخش بزرگی از جریان کربن را که وارد کارتنوئید می‌شود را فراهم می‌کند (Rodriguez-concepcion, 2010). کارتنوئیدها در گیاهان عالی (شکل ۱) با تبدیل ژرانیل‌ژرانیل پیرو فسفات (GGPP) به فیتوئن توسط فیتوئن‌سنتاز (*PSY*)، سنتز می‌شوند. به دنبال آن توسط فیتوئن دساچراز (*PDS*)، ۱۵-سیس-ζ-کاروتن ایزومراز (15-cis-ζ-carotene isomerase) (*ISO-Z*)، ζ- کاروتن دساچراز (ζ-carotene desaturase) (*ZDS*) و کارتنوئید ایزومراز (*CRTISO*) اشباع صورت می‌گیرد تا ترانس-لیکوپن تمام خطی تولید شود. چرخه لیکوپن کاروتنوئیدی خطی که توسط لیکوپن β-سیکلاز (*β-LCY*) و/یا لیکوپن □- سیکلاز (*□-LCY*) کاتالیز می‌شود، یک نقطه چند شاخه در مسیر است که منجر به کاروتنوئیدها با یک -□ و یک حلقه- β (α-کاروتن و مشتقات آن: □، β-کاروتنوئیدها) یا دو حلقه- β (β-کاروتن و مشتقات آن: β، β-کاروتنوئیدها) می‌شود (Cunningham & Gantt, 1998; Chen *et al.,* 2010). پس‌ازآن، α-کاروتن و β-کاروتن با هیدروکسیلی شدن، اپوکسیداسیون یا ایزومریزاسیون تغییریافته تا ویژگی‌های ساختاری مختلفی را بیان نمایند (Tian *et al*., 2003; Kim & DellaPenn, 2006). بتاکاروتن هیدروکسیلاز (*CHY-β*) یک non-heme di-iron hydroxylase است که در تبدیل β-کاروتن (β-carotene) و β-کریپتوگزانتین (β-cryptoxanthin) به زیگزانتین (zeaxanthin) نقش دارد (Tian et al., 2003; Kim & DellaPenna 2006). در *Arabidopsis*، چهار آنزیم هیدروکسیلاز کاروتنوئید گزارش‌شده است: یک جفت از non-heme di-iron hydroxyllases (*BCH1* و *BCH2*) و دو آهن حاوی سیتوکروم P450 منواکسیژناز (*CYP97A* و *CYP97C*) (Tian *et al.,* 2003; Kim & DellaPenna, 2006).

تنش نتیجه روند غیرعادی فرآیندهای فیزیولوژیک است که از تأثیر یک یا ترکیبی از عوامل زیستی و محیطی حاصل می‌شود. تنش خشکی هنگامی در گیاه حادث می‌شود که آب موجود در خاک کاهش یافته و شرایط جوی به دفع آب از طریق تبخیر و تعرق کمک کند. یک راه‌حل اساسی برای برطرف کردن یا کاهش دادن اثرات تنش‌های محیطی یافتن ژنوتیپ‌های ویژه‌ای است که دارای مجموعه‌ای از صفات مطلوب و باقابلیت توارث بالا باشند (Vincour & Altman, 2005). بدین منظور ضروری می‌نماید تا مکانیسم‌های مولکولی که در مقاومت به خشکی در گیاهان مؤثر می‌باشند، مورد بررسی قرار گیرد (Umezawa *et al.,* 2006).

الیسیتورها از طریق القای پاسخ‌های دفاعی باعث

بیوسنتز و انباشت متابولیت‌های ثانوی می‌شوند (Zhao *et al.,* 2005). الیسیتورهای غیرزیستی، منشأ بیولوژیکی ندارند و در گروه فاکتورهای فیزیکی و ترکیبات شیمیایی قرار می‌گیرند (Patel & Krishnamurthy, 2013). الیسیتورهای غیرزیستی شامل نور، اشعه فرابنفش، بسیاری از فلزات سنگین، مواد شیمیایی، ترکیبات غیرضروری محیط کشت و بسیاری از موارد دیگر می‌شوند. این تحریک‌کننده‌ها، تولیدکننده فیتوالکسین می‌باشند. نانو ذرات یکی از انواع این الیسیتورها است که به‌تازگی مورداستفاده قرار گرفته است. نانو ذرات عناصر اساسی و پایه‌ای در چارچوب نانو فناوری هستند (Vanaja & Annadurai, 2012). که قطر حداقل یکی از ابعاد آن‌ها کمتر از ۱۰۰ نانومتر است (Dubey *et al.,* 2010). پژوهشگران توانستند با استفاده از نانو ذرات نقره و دی‌اکسید تیتانیوم موجب افزایش میزان آلوئین در کشت سوسپانسیون سلولی آلوئه‌ورا (Aloe vera) شوند (Raee *et al.,* 2012). در این پژوهش به بررسی اثرات الیسیتور نانو ذرات نقره و تنش خشکی بر بیان ژن بتاکاروتن هیدروکسیلاز (*bch*) بر عملکرد کارتنوئید زعفران (*Crocus sativus* L.) در اکوتیپ‌های متفاوت پرداخته‌شده است.



شکل ۱. مسیر بیوسنتز کارتنوئید در گیاهان (Kim *et al.,* 2009)

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه و طرح آزمایش

این پژوهش در سال زراعی ۱۳۹۳ در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه بیرجند و پژوهشکده زیست‌فناوری دانشگاه زابل انجام شد. آزمایش تحت اثرات نانوذرات نقره در سه سطح عدم استفاده از نانو (شاهد)، ۵۵ و ۱۱۰ پی‌پی‌ام و تنش خشکی در دو سطح آبیاری و عدم آبیاری کامل به‌صورت طرح اسپلیت پلات فاکتوریل در قالب بلوک‌های کامل تصادفی با دو تکرار انجام شد. اکوتیپ‌های زعفران از نه منطقه خراسان جنوبی شامل بیرجند، نصرآباد، گازار، آرین شهر، قاین، هاشمیه، سرایان، آیسک و سرند جمع‌آوری و مورد بررسی قرار گرفت.

کشت و تیمار با نانو ذرات نقره

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 و غیر تنش خشکی دو متر بود. بنه‌ها در عمق ۱۵ سانتی‌متری و در فاصله ۲۰ سانتی‌متری از یکدیگر کشت شدند. درون هر چاله یک بنه قرار داده شد تا صفات با دقت بیشتری برای بررسی تأثیر نانوذرات نقره اندازه‌گیری شوند. قبل از کشت، بنه‌ها به مدت ۹۰ دقیقه در آب مقطر فاقد نانو ذرات نقره (شاهد)، آب مقطر حاوی نانوذرات نقره با غلظت‌های ۵۵ و ۱۱۰ پی پی‌ام خیسانده شد و کشت شدند. برای جوانه‌زنی بنه‌ها آبیاری به‌صورت کرتی و سنگین (غرقاب و روی بنه‌ها به‌اندازه ۱۵ سانتی‌متر آب باشد) انجام شد. هنگامی‌که زمین گاو رو شد، برای خروج بهتر جوانه‌ها سله‌شکنی انجام شد. بعد از خروج گل‌ها آبیاری دوم فقط برای شرایط نرمال هر سه هفته یک‌بار انجام شد.

اندازه‌گیری کارتنوئید

اندازه‌گیری کارتنوئید با استفاده از روش Lichtenthaler (1987) انجام گرفت. اندازه‌گیری با استفاده از روش اسپکتوفتومتری (Spectrophotometer UV-2100, USA) در طول‌موج ۴۸۰ نانومتر برای کارتنوئید برحسب میکروگرم بر گرم وزن‌تر ($\mu g.g^{-1}$ FW) طبق رابطه (۱) انجام گرفت (Lichtenthaler, 1987) که در این معادله A بیانگر جذب نوری، Chla نشان‌دهنده کلروفیل a و Chlb نشان‌دهنده کلروفیل b می‌باشد.

$$\text{Cartenoied} = \frac{[۱۰۰۰ \times A(۱/۸ \times \text{Chla} - ۸۵/۰۲ \times \text{Chlb})]}{۱۹۸} \quad (۱)$$

استخراج ریبونوکلئیک‌اسید (RNA)

استخراج ریبونوکلئیک‌اسید کل با استفاده از کیت دنا زیست آسیا شامل سه محلول بافر DRI، DRII و DRIII به همراه اتانول ۹۶ درصد و کلروفوم، طبق پروتکل پیشنهادی شرکت دنازیست آسیا انجام شد. RNA استخراج‌شده جهت نگهداری به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شد. به‌منظور اطمینان از کیفیت RNA استخراج‌شده، کیفیت آن توسط الکتروفورز ژل آگاروز یک درصد بررسی شد. RNAها با غلظت‌های مورد استفاده در RT-PCR گرادیان و Real time PCR به‌عنوان الگو در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز قرار گرفتند و هیچ تکثیری که نشان‌دهنده آلوده بودن نمونه‌ها به DNA ژنومی باشد را نشان ندادند.

سنتز cDNA

مرحله بعد از استخراج RNA، سنتز cDNA (DNA معکوس) است که از روی آن مراحل بعدی آزمایش انجام گردید. سنتز cDNA با استفاده از کیت HyperScript^{TM} RT master mix ساخت شرکت GeneAll و مطابق پروتکل پیشنهادی شرکت انجام شد. کیت شامل سه محلول Oligo dT، Water DEDC و Master Mix بود. cDNAهای حاصل در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. cDNA آماده‌شده را به نسبت ۱۰ به ۱ رقیق نموده و برای آزمون پرایمرها و Real time PCR استفاده گردید.

طراحی آغازگرها

آغازگرها مورداستفاده ابتدا با نرم‌افزار پرایمر3، طراحی سپس با آغازگرهای برگرفته از Moshtagh *et al.* (2010) مقایسه شد. جفت آغازگرهای ژن *bch* (GenBank accession no. AJ416711.2) و همچنین ژن *18SrRNA* (As housekeeping gene AJ489273.1) به‌عنوان ژن رفرنس در جدول ۱ آورده شده است. آغازگرهای *bch* باندهایی با طول قطعه ۱۰۸bp و *18srRNA* باندهایی با طول

قطعه bp ۱۳۳ را تکثیر می‌کنند (Moshtaghi *et al.*, 2010). به‌منظور به‌دست آوردن دمای مطلوب اتصال آغازگرها به توالی موردنظر، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با شیب دمایی، با دستگاه ترموسایکلر اپندرف ساخت کشور آلمان انجام گرفت. دما از ۵۳ تا ۶۲ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد.

جدول ۱. آغازگرهای استفاده‌شده در واکنش RT-PCR

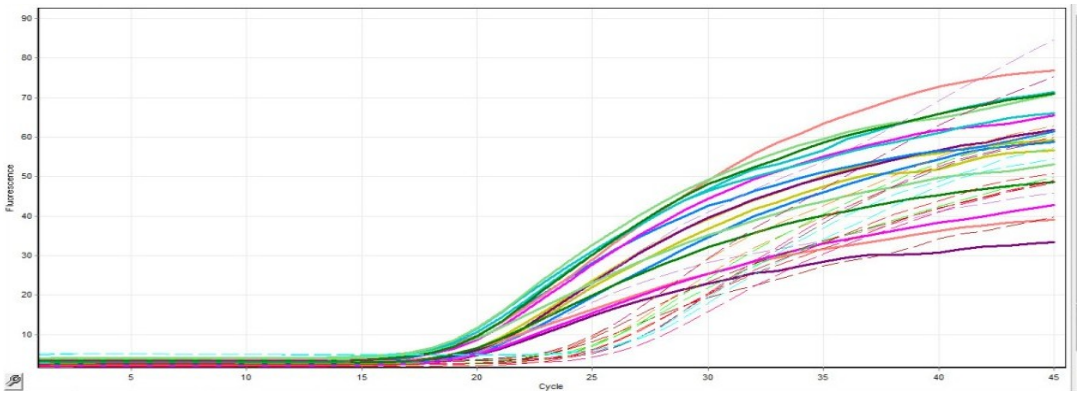
Primer	Primer sequnce	Tm(c)	GC(%)
Forward BCH	5-GCATCATCCTCCTCTCTTCG-3	60.5	55
Reverse BCH	5-CGAGAACGAAAAACACTGTCG-3	59.4	47.62
Forward 18SrRNA	5-TGTTATTGCCTCAGCCTTCC-3	58.4	50
Reverse 18SrRNA	5-GCGGTTTCTCTGGTTAATTCC-3	59.4	47.62

مطالعه الگوی بیان ژن

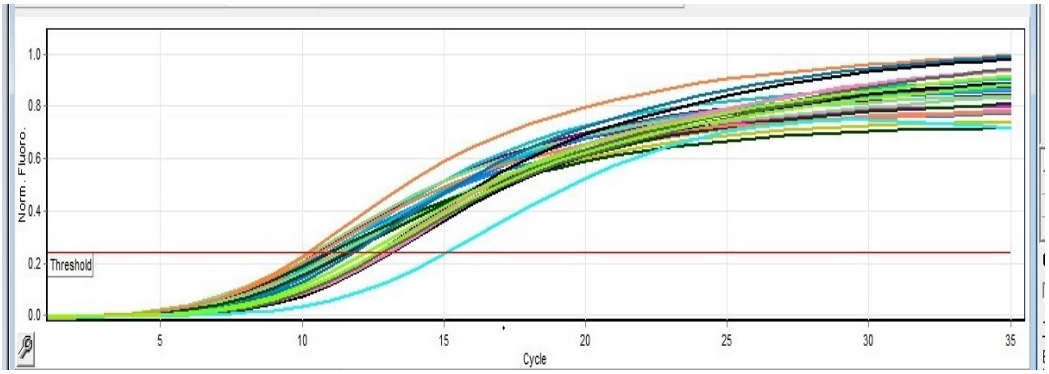
پس از اطمینان از کارکرد صحیح آغازگرها و الگوی بیان ژن موردنظر، واکنش Real time PCR در دو تکرار با استفاده از کیت 5x Hot Firepol EvaGreen qPCR Mix Plus (no ROX) ساخت شرکت دنازیست (Solis BioDyne) و با استفاده از دستگاه Real time PCR مدل RG-3000 Corbett Research ساخت کشور آلمان انجام شد. اندازه‌گیری بیان ژن توسط واکنش Real time PCR بر اساس روش استاندارد به‌صورت نسبی صورت گرفت. کمیت نسبی به‌وسیله اندازه‌گیری افزایش تشعشع فلورسنس درنتیجه اتصال رنگ (Eva Green) با استفاده از دستگاه RG-3000 Corbett Research انجام گرفت. اجزای واکنش Real time PCR با حجم نهایی۲۰ میکرولیتر شامل ۴ میکرولیتر 5x Hot Firepol EvaGreen qPCR Mix Plus (no ROX)، ۰/۵ میکرولیتر از هر دو پرایمر Forward و Reverse، ۱ میکرولیتر cDNA و ۱۴ میکرولیتر Nuclease Free Water بود. برنامه حرارتی تکثیر ژن با استفاده از روش Real time PCR شامل ۲۰ ثانیه در دمای۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۴۰ تکرار با سیکل‌های ۲۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۴۰ تکرار با سیکل‌های ۳۰ ثانیه در دمای ۵۲ درجه سانتی‌گراد (دمای اتصال)، ۴۰ تکرار با سیکل‌های ۳۰ ثانیه در دمای۷۲ درجه سانتی‌گراد و ۲۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. پس از انجام واکنش تکثیر به روشQ Real time PCR داده‌های خام به‌صورت Ct (Threshold cycle) از دستگاه استخراج شد. برای هر نمونه دو تکرار در نظر گرفته شد و برای محاسبه ΔΔCt از نرم‌افزار Gen EX استفاده شد. پس از به دست آوردن Ct برای تمام نمونه‌ها و محاسبه ΔΔCt برای هریک از آن‌ها، تجزیه‌وتحلیل داده‌ها با استفاده از نسخه ۹/۲ نرم‌افزار SAS (SAS Institute, 2014) و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای توکی (Haghgoo *et al.*, 2013) در سطح احتمال یک درصد انجام گرفت.

نتایج و بحث

پس از انجام واکنش Real Time PCR نمودارهای تکثیر (به‌ترتیب ۱ و ۲) برای ژن بتاکاروتن هیدروکسیلاز *bch* و ژن رفرنس *18srRNA* مشاهده شد. بر اساس Ctهای به‌دست‌آمده از منحنی تکثیر ژن *bch* و منحنی تکثیر *18srRNA*، ΔΔCt محاسبه شد و آنالیز آماری انجام شد. نتایج تجزیه واریانس (جدول۲) نشان داد که اثرات اصلی اکوتیپ، تنش خشکی، نانوذره نقره و اثرات متقابل دوگانه و سه‌گانه آن‌ها برای ژن بتاکاروتن هیدروکسیلاز (*bch*) و کارتنوئید در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شدند.



نمودار ۱. منحنی تکثیر ژن بتاکاروتن هیدروکسیلاز (*bch*)



نمودار۲. منحنی تکثیر ژن *18srRNA*

جدول ۲. تجزیه واریانس ژن بتاکاروتن هیدروکسیلاز (*bch*) و کارتنوئید

منابع تغییرات	درجات آزادی	میانگین مربعات	
		بیان ژن *bch*	کارتنوئید
تکرار	1	8.197^{ns}	4.48*
اکوتیپ	8	89094.26**	45.58**
تکرار ×اکوتیپ	8	24.82^{ns}	1.26 ^{ns}
تنش خشکی	8	85770.16**	9.09**
نانوذره نقره	2	78914.07**	25.92**
اکوتیپ× تنش خشکی	8	72580.08**	104.85**
اکوتیپ × نانوذره نقره	16	75306.93**	57.98**
تنش خشکی× نانوذره نقره	2	90549.09**	90.11**
اکوتیپ× تنش خشکی× نانوذره نقره	16	86932.73**	31.97**
خطا	45	5.56	1.45
ضریب تغییرات (٪)		5.53	12.55

* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد و ns غیر معنی‌دار.

مقایسه میانگین اثرات متقابل اکوتیپ× تنش خشکی (جدول ۳) نشان داد که ژن *bch* در اکوتیپ قاین تحت تنش خشکی با میانگین ۵۰۳/۴ بالاترین میزان و سرایان با میانگین ۱/۰۱ تحت آبیاری کامل کمترین میزان بیان را داشت. بیشترین میزان کارتنوئید با میانگین ۱۴/۴۵ در اکوتیپ قاین در سطح تنش خشکی مشاهده شد.

مقایسه میانگین اثر متقابل اکوتیپ× نانوذره نقره (جدول ۴) نشان داد که بیشترین میزان بیان ژن *bch* در اکوتیپ قاین و سطح ۵۵ پی‌پی‌ام نانوذره نقره با میانگین ۷۳۹/۷۲ و بیشترین میزان تولید کارتنوئید در اکوتیپ قاین و غلظت ۵۵ پی‌پی‌ام نانوذره نقره با میانگین ۱۵/۸۷ مشاهده‌شده است.

مقایسه میانگین اثر متقابل دوگانه نانوذره نقره× تنش خشکی (جدول ۵) نشان داد که بیشترین میزان بیان ژن *bch* مربوط به تنش خشکی و سطح ۵۵ پی‌پی‌ام نانو ذرات نقره با میانگین ۱۸۱/۰۴ بود. همچنین تولید کارتنوئید در تنش خشکی و سطح ۵۵ پی‌پی‌ام نانوذره نقره با میانگین ۱۱/۶۹ بیشترین میزان را نشان داد.

نتایج اثرات متقابل سه‌گانه اکوتیپ× تنش خشکی× نانوذره نقره (جدول ۶) نشان داد که ژن *bch* در اکوتیپ قاین، تحت تنش خشکی و در سطح ۵۵ پی‌پی‌ام نانوذره نقره با میانگین ۱۴۷۸/۶۲ بالاترین میزان بیان را داشت. در مرحله بعد اکوتیپ سرایان، تحت تنش خشکی و ۱۱۰ پی‌پی‌ام نانوذره نقره با میانگین ۱۵۱/۷۰ نسبت به شاهد بیان بالاتر و معنی‌دار نشان داد. اکوتیپ قاین تحت تنش خشکی در سطح ۵۵ پی‌پی‌ام نانوذره نقره با میانگین ۲۱/۳۷ بالاترین میزان کارتنوئید را تولید نمود.

جدول ۳. اثر متقابل دوگانه اکوتیپ × تنش خشکی در بیان ژن *bch* و تولید کارتنوئید

		گازار	بیرجند	هاشمیه	قاین	آیسک	سرند	آرین‌شهر	نصرآباد	سرایان
ژن *bch*	آبیاری کامل	7.80f	3.62fg	3.64fg	37.37c	54.04b	1.40g	20.13d	1.19g	1.01g
	تنش خشکی	21.21d	4.65fg	15.10e	503.4a	13.84e	2.04g	18.35de	3.59fg	55.19b
کارتنوئید	آبیاری کامل	9.89def	6.07jk	12.62abc	10.85cde	8.72fgh	11.54cd	6.89hij	6.62ijk	12.40abc
	تنش خشکی	9.55def	12.02c	4.63k	14.45a	12.37bc	9.15efg	14.12ab	7.10ghij	7.13ghij

جدول ۴. اثر متقابل دوگانه اکوتیپ × نانوذره نقره در بیان ژن *bch* و تولید کارتنوئید

		گازار	بیرجند	هاشمیه	قاین	آیسک	سرند	آرین‌شهر	نصرآباد	سرایان
ژن *bch*	شاهد	0.92 l	1.52kl	16.35g	13.15gh	1.44kl	1.250 w	2.41j-l	4.69i-l	7.42h-k
	۵۵ پی‌پی‌ام	33.26f	7.12h-l	8.37hig	739.72a	15.73g	1.84kl	49.22e	1.23kl	0.88l
	۱۱۰ پی‌پی‌ام	9.33hi	3.76i-l	3.38i-l	58.40d	83.76b	1.89kl	6.09i-l	1.26kl	76.00c
کارتنوئید	شاهد	10.67d-f	10.08e-h	9.44e-i	9.10e-i	8.21f-j	11.32c-e	9.00e-i	8.90e-i	10.58d-g
	۵۵ پی‌پی‌ام	9.05e-i	7.83h-k	8.46f-j	15.87a	14.00a-c	14.49ab	15.69a	3.78l	5.82j-l
	۱۱۰ پی‌پی‌ام	9.44e-i	9.23e-i	7.98f-j	13.87a-c	8.54f-I	5.23kl	6.83i-k	7.91g-k	12.90b-d

جدول ۵. اثر متقابل دوگانه تنش خشکی × نانوذره نقره در بیان ژن *bch* و تولید کارتنوئید

		صفر	۵۵ پی‌پی‌ام	۱۱۰ پی‌پی‌ام
ژن *bch*	آبیاری کامل	1.00e	10.17d	32.92b
	تنش خشکی	9.48d	181.04a	21.28c
کارتنوئید	آبیاری کامل	9.14cd	8.94d	10.08b
	تنش خشکی	9.86bc	11.69a	7.95e

جدول ۶. اثر متقابل سه‌گانه تنش اکوتیپ × تنش خشکی × نانوذره نقره در بیان ژن *bch* و تولید کارتنوئید

			ژن *bch*	کارتنوئید
		گازار	1.00 n	ijklmnopqrs 9.60
		بیرجند	1.00 n	jklmnopqrst 9.07
		هاشمیه	1.00 n	10.12ghijklmnopq
		قاین	1.00 n	6.78pqrstuvw
	شاهد	آیسک	1.00 n	5.60 stuvwxy
		سرند	1.00 n	13.52 bcdefghi
		آرین	1.00 n	2.96 wxyz
		نصرآباد	1.00 n	7.44 opqrstuv
		سرایان	1.00 n	15.97 bc
		گازار	5.12 klmn	9.98 ghijklmnopqr
		بیرجند	6.18 jklmn	2.55 xzy
		هاشمیه	۵/۱۵klmn	13.61 bcdefghi
		قاین	0.83n	10.37 ghijklmnopq
آبیاری کامل	۵۵ پی‌پی‌ام	آیسک	15.11hij	10.59fghijklmnopq
		سرند	2.93 lmn	11.49defghijklmno
		آرین	13.71 e	13.90 bcdefgh
		نصرآباد	0.26 n	8.65 klmnopqrst
		سرایان	1.73 mn	6.51 qrstuvwx
		گازار	17.27 ghi	10.21 ghijklmnopq
		بیرجند	3.69 lmn	6.61 qrstuvwx
		هاشمیه	4.76 klmn	14.14 bcdefg
		قاین	110.28 c	15.39 bcd
	۱۱۰ پی‌پی‌ام	آیسک	146.01 b	9.98ghijklmnopq
		سرند	0.27 n	9.62 klmnopqrs
		آرین	11.36ijklm	3.82uvwxyz
		نصرآباد	2.32 lmn	8.68 klmnopqrst
		سرایان	0.31n	14.71bcdef
		گازار	0.84 n	11.74 defghijklmn
		بیرجند	2.04 lmn	11.09 efghijklmnop
		هاشمیه	31.71 f	8.75 klmnopqrst
		قاین	25.31 f	9.65ijklmnopqrs
	شاهد	آیسک	3.67 lmn	12.60 cdefghijk
		سرند	1.88lmn	9.11 jklmnopqrst
		آرین	3.82lmn	15.03bce
		نصرآباد	8.38 ijklmn	7.99 mnopqrst
		سرایان	13.85hijk	5.19tuvwxy
		گازار	61.39 d	8.24lmnopqrst
		بیرجند	8.06ijklmn	13.12cdefghij
		هاشمیه	11.59ijkl	3.32vwxyz
		قاین	1478.62a	21.37a
	۵۵ پی‌پی‌ام	آیسک	16.35ghi	17.40ab
		سرند	1.75n	17.49ab
		آرین	50.40e	17.48ab
		نصرآباد	2.20lmn	7.70mnopqrstu
		سرایان	0.03n	5.12tuvwxy
		گازار	1.39n	8.67klmnopqrst
		بیرجند	3.84lmn	11.84cdefghijklm
		هاشمیه	2.00lmn	1.82yz
		قاین	6.53jklmn	12.34cdefghijkl
	۱۱۰ پی‌پی‌ام	آیسک	21.50gh	7.11pqrstuvw
		سرند	3.50lmn	0.84z
		آرین	0.83n	9.84hijklmnopqr
		نصرآباد	0.19n	7.80mnopqrstu
		سرایان	151.70b	11.09efghijklmnop

رشد و پراکنش گیاهان به‌طور مداوم تحت اثر عوامل تنش‌زای محیطی است (Browse & Xin, 2001). به‌منظور سازگاری و پاسخ‌دهی سریع، گیاهان نمی‌توانند موقعیت مکانی خود را مانند دیگر موجودات زنده تغییر دهند اما در فرآیند تکامل آن‌ها مکانیسم‌هایی وجود دارد که به حفظ و پایداری عملکرد کمک می‌کند (Heidarvand & Maal Amiri, 2010). از این جمله می‌توان به مکانیسم‌های مقاومت، تحمل و اجتناب اشاره کرد که سبب تغییرات مورفولوژیک، فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و تغییر در وضعیت تظاهر ژن شده که به‌طور بالقوه می‌توانند قابل توارث نیز باشند، یعنی محیط به‌طور دائم در حال تغییر بوده و گیاهان نیز خود را با این تغییرات تنظیم می‌کنند؛ بنابراین امروزه تمرکز تحقیقات بیولوژیکی مهم روی سازگاری گیاهان به عوامل محیطی مثل دما، شوری، خشکی، فلزات سنگین و غیره می‌باشد (Kazemi shahandashti *et al.,* 2013; Nazari *et al.,* 2012). در این بررسی‌های نتایج اثرات متقابل اکوتیپ× تنش خشکی بیانگر افزایش میزان بیان ژن *bch* و کارتنوئید تحت تنش خشکی نسبت به سطح آبیاری است. همچنین در این شرایط اکوتیپ قاین نسبت به سایر اکوتیپ‌ها عملکرد خوبی داشته است. رطوبت بیش‌ازحد منجر به کمبود اکسیژن و تجمع اتیلن در گیاهان می‌شود. ریشه و بنه‌ها حساس‌ترین اندام زعفران به رطوبت بیش‌ازحد می‌باشند. رطوبت بیش‌ازحد می‌تواند از رشد و نفوذپذیری ریشه در اکثر گیاهان به‌جز گیاهان آب‌دوست مانند برنج جلوگیری کند (Visser & Pierik, 2007; Rezvani & Sorooshzadeh, 2014). اثر محلول‌پاشی نانوذره نقره بر کاهش تنش غرقابی در زعفران موردبررسی قرار گرفت، نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از نانوذره نقره ۵۰ و ۱۰۰ پی‌پی‌ام، اثرات منفی تنش غرقابی را بر ارتفاع گیاه و تعداد بنه جبران کرد (Seif Sahandi *et al.,* 2011)؛ بنابراین چنین استدلال می‌شود رطوبت بیش از حد بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیک، مورفولوژیک و بیوشیمیایی گیاه ازجمله ظرفیت فتوسنتزی، مقدار ریشه و ساقه، میزان تولید توده زنده گیاه، روابط آبی، متابولیسم کربوهیدرات‌ها، ساختار سلول، تغذیه، تعادل بین هورمون‌ها و بیان ژن‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Perata & Alpi, 1993; Crawford & Andle, 1996; Biemelt *et al.,* 1999). اثر متقابل اکوتیپ×نانوذره نقره در سطح ۵۵ پی‌پی‌ام نانوذره نقره نسبت به سطح ۱۱۰ پی‌پی‌ام و شاهد افزایش‌یافته است. اکوتیپ‌های قاین و آیسک نسبت به سایر اکوتیپ‌ها بیان ژن و تولید کارتنوئید بالایی داشتند. نانو ذرات نقره با مسدود کردن سیگنال دهی اتیلن باعث بالا رفتن سرعت رشد زعفران می‌شود (Rezvani *et al.,* 2012). نانو ذرات در گیاهان از طریق افزایش فعالیت نیترات ردوکتاز و گلوتامات دهیدروژناز بر متابولیسم نیتروژن اثر گذاشته و باعث افزایش رشد و میزان فتوسنتز می‌شود. این ذره نانویی به خاطر اندازه کوچک آن، به‌سرعت به درون سلول نفوذ کرده و منجر به افزایش میزان پروتئین و تحریک بیان ژن در سلول‌های گیاهی می‌شود (Yang *et al.,* 2008). اثر متقابل نانوذره نقره× تنش خشکی باعث شد میزان بیان ژن بتاکاروتن هیدروکسیلاز و تولید کارتنوئید در سطح ۵۵ پی‌پی‌ام نانو ذرات نقره و تحت تنش خشکی نسبت به سطح شاهد و ۱۱۰ پی‌پی‌ام نانو ذرات نقره افزایش داشته باشد. ازجمله فرآیندهایی که تحت تأثیر تنش ناشی از فلزات سنگین قرار می‌گیرد. فتوسنتز و رنگیزه‌های فتوسنتزی است (Zengin & Munzuroglu, 2005). عوامل مختلفی مانند غلظت الیسیتور، سن محیط کشت، زمان افزودن الیسیتور به محیط کشت و مدت زمانی که نمونه در معرض الیسیتور قرار می‌گیرد، بر افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه تأثیر می‌گذارد (Vasconsuelo & Boland, 2007). غلظت الیسیتور نقش مهمی در فرآیند تحریک دارد و عامل مؤثری برشدت پاسخ است. غلظت مؤثر

الیسیتور برحسب گونه گیاهی فرق می‌کند، به‌طوری‌که غلظتی از الیسیتور که در یک گیاه اثر تحریکی دارد، ممکن است در گیاه دیگر اثر نداشته باشد (Khosroushahi *et al.,* 2005). آنالیز بیان ژن‌های مسیر بیوسنتز کارتنوئیدها در همه بافت‌های سبز گیاه انجام شده است، ولی مشخص‌شده است که در بافت‌هایی که میزان تجمع کارتنوئید مثل گل‌ها و میوه‌ها بالاست، میزان بیان ژن‌های این گروه نیز بالاست (Cunningham & Gantt, 1998). نانو ذرات 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 میکروب‌ها ایجاد نمی‌کنند. به‌طورکلی، یون نقره میتواند جایگزین یون‌های مس از پروتئین‌های پذیرنده شده و جذب اتیلن را مسدود کند، زیرا یون‌های مس نقش حیاتی در اتصالات اتیلن بر روی پذیرنده‌ها دارند و به‌این‌ترتیب باعث حفظ کلروفیل و کارتنوئید می‌شوند. این اثر ضد اتیلنی یون نقره توسط محققان زیادی گزارش‌شده است (Strader *et al.,* 2009; Chang & Chen, 2001). Moshtaghi *et al.* (2010) در بررسی بیان ژن‌های *bch* و *pds* تحت تأثیر تیمار آبیاری و تنش گزارش نمودند که بیان ژن‌های گیاهان آبی در مقایسه با گیاهانی که تحت تنش بودند کاهش‌یافته است. با کاهش آبیاری، سطح بیان این دو ژن افزایش نشان داد. این محققین بیان نمودند که تنش غیرزنده و خشک‌سالی بر بیان ژن مربوط به کلاله زعفران تأثیر می‌گذارد و ژن *bch* و بیان آن به‌طور مستقیم بر تولید کارتنوئید تأثیر می‌گذارد. عدم آبیاری و یک نوبت آبیاری به‌عنوان تنش غیرزنده در فصل رشد زعفران می‌تواند بیان بسیاری از ژن‌ها را در فرآیند گلدهی افزایش دهد (Moshtaghi *et al.,* 2010). در مطالعه‌ای ترکیبی از ذرات نانو SiO_2 و TiO_2 فعالیت نیترات ردوکتاز را در سویا افزایش داد و توانایی جذب و استفاده از آب را تشدید نمود (Lin & Xing, 2007). تنش کم‌آبی ملایم و محلول‌پاشی با نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم با غلظت ۳۰ پی‌پی‌ام دارای روند تقریباً مشابه در افزایش تولید رزمارینیک اسید و نیز افزایش بیان ژن *RAS* بودند (Kamalizadeh *et al.,* 2014). در پژوهشی سطح بیان برخی از ژن‌ها مثل *bchII* در Arabidopsis تحت تنش نور بالا افزایش یافته است (Rossel *et al.,* 2002). میزان بیان ژن *FNS I* در غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میکرومولار الیسیتور نقره به‌طور معنی‌دار نسبت به گیاه شاهد افزایش‌یافته است (Yousefi *et al.,* 2015). بیان ژن‌ها در سوسپانسیون‌های ریشه تیمار شده گیاه *Papaver somniferum* L. با نانو الیسیتور نقره، نشان داد که این الیسیتور به‌طور معنی‌دار بر تغییر بیان ژن‌های *tydc7*، *DBOX*، *DIOX2* و *bbe1* مؤثر بوده است (Khodayari *et al.,* 2015). در پژوهشی محققان مشاهده کردند که نانوذره نقره در تیمار ۱۰ پی‌پی‌ام باعث افزایش میزان کارتنوئید در گیاه کلزا در شرایط کشت درون شیشه شد (Tabatabai pazhoh *et al.,* 2013). نتایج اثرات متقابل سه‌گانه اکوتیپ× تنش خشکی× نانوذره نقره بیانگر افزایش میزان بیان ژن *bch* و تولید کارتنوئید در اکوتیپ قاین تحت تنش خشکی و در سطح ۵۵ پی‌پی‌ام نانوذره نقره نسبت به شاهد و سطح ۱۱۰ پی‌پی‌ام نانوذره نقره می‌باشد. درنتیجه چنین استدلال شد که اکوتیپ قاین ممکن است نسبت به بقیه اکوتیپ‌ها جوان‌تر باشد و بهتر از بقیه عمل کرده است. همچنین نانو ذرات نقره در غلظت‌های بالا باعث سمیت در گیاه می‌شود که سطح ۵۵ پی‌پی‌ام نسبت به سطح شاهد و ۱۱۰ پی‌پی‌ام اثر بهتری داشته است. Kazemi *et al.* (2012) بیان داشتند که رطوبت زیاد باعث خرابی پیازها می‌شود. Kafi (2002) بیان داشت که خاک‌های مرطوب و باتلاقی مناسب رشد زعفران نمی‌باشند 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. نانوذرات به‌واسطه خاصیت آب‌دوستی با آزاد کردن کم‌کم ذرات آب به بنه کمک می‌نمایند که در سطح تنش خشکی به‌خوبی عمل نمایند و باعث افزایش بیان ژن *bch* و تولید کارتنوئید شوند.

نتایج بیان ژن *bch* و تولید کارتنوئید نشان داد که میزان بیان ژن *bch* و تولید کارتنوئید در اکوتیپ قاین در سطح ۵۵ پی‌پی‌ام نانوذره نقره تحت تنش خشکی افزایش‌یافته است. درنتیجه می‌توان نتیجه گرفت که با افزایش میزان بیان ژن *bch* تحت تنش خشکی و نانوذره نقره، میزان تولید کارتنوئید در مسیر بیوسنتزی نیز افزایش‌یافته است.

سپاسگزاری

از پژوهشکده زیست‌فناوری دانشگاه زابل و مزرعه تحقیقاتی دانشگاه بیرجند به دلیل فراهم آوردن امکانات مالی و اجرایی، تشکر و قدردانی می‌شود.

REFERENCES

Biemelt S, Hajirezai MR, Melzer M (1999) Sucrose synthase activity does not restrict glycolysis in roots of transgenic potato plants under hypoxic conditions. Planta 210: 41-49.

Browse J, Xin Z (2001) Temperature sensing and cold acclimation. Curr. Opin. Plant Biol. 4(3): 241-246.

Chang YS, Chen HC (2001) Variability between silver thiosulfate and 1-naphthaleneacetic acid applications in prolonging bract longevity of potted bougainvillea. Sci. Hort. 87: 217-224.

Chen Y, Li F, Wurtzel ET (2010) Isolation and characterization of the Z-ISO gene encoding a missing component of carotenoid biosynthesis in plants. Plant Physiol. 153(1): 66-79.

Crawford RMM, Andle RB (1996) Oxygen deprivation stress in a changing environment. J. Exp. Bot. 47: 145-159.

Cunningham FX, Gantt E (1998) Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 49, 557-583.

Dubey S, Lahtinen M, Sillanpaa M (2010) Green synthesis and characterizations of silver and gold nanoparticles using leaf extract of Rosa rugosa. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 364: 34-41.

Grilli-Caiola M (2004) Saffron reproduction biology. Acta Hortic. 650: 25-39.

Hariri F, Omidi M, Shafiei M, Parvane S (2009) Production and Intensification of carotenoid biosynthesis genes by genetic engineering, food and biotechnology Regional Conference.

Haghgoo R, Rezvani M B, Kameli S (2013) Effect of various amounts of nanosilver incorporation on the mechanical properties of resin modified glass-ionomer cement. Journal of Dental Medicine-Tehran University of Medical Sciences 26(3): 211-7.

Heidarvand L, Maal Amiri R (2010) What happen in plant molecular response to cold stress. Acta physiol. Plant. 32: 419-431.

Kamalizadeh M, Bihamta M R, Peyghambari SA, Hadian J (2014) Expression of Genes Involved in Rosmarinic Acid Biosynthesis Pathway in Dragonhead Affected by Nanoparticles. J. G3M. 12(1).

Kafi M (2002) Saffron production and processing technology. Institute Press Ferdowsi University of Mashhad. 276PP.

Kazemi shahandashti S S, Maal Amiri R, Zeinali H, Ramezanpoor S S (2013) Change in membrane fatty acid compositions and cold-induced responses in chickpea. Mol. Biol. Rep.

40: 893-903.

Kazemi M, Talebifar M, Abedin A, Safariyan A (2012) Saffron (acquaintances, crop management and production, chemical composition and cost) 1st Ed. Ayyz Press. 75 P.

Khodayari M, Omidi M, Shah nejat boshehri AA, Yazdani D, Naghavi MR (2015) Variation in the expression of genes involved in the biosynthesis of the plant Papaver somniferum L. Sngvyynaryn affected by Nano elicitors. J. Medicinal Plants (14) 2.

Khosroushahi A, Valizadeh M, Ghasempour M. Naghdibadi H (2005) Improved Taxol production by combination of inducing factors in suspension cell culture of Taxus baccata. Cell Biol. Int. 30: 262-269.

Kim J, DellaPenna D (2006) Defining the primary route for lutein synthesis in plants: the role of Arabidopsis carotenoid b-ring hydroxylase CYP97A3. Proc. Nati.Acad. Sci.U.S.A. 103, 3474-3479.

Kim J, Smith JJ, Tian L, Dellapenna D (2009) The evolution and function of carotenoid hydroxylases in Arabidopsis. Plant Cell Physiol. 50: 463-479.

Lichtenthaler HK (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. J. Met. Enzymol. 148: 350-382.

Lin D, Xing B (2007) Phytotoxicity of nanoparticles: inhibition of seed germination and root growth. Environ. Pollut. 150: 243-50.

Moshtaghi N, Ghahremanzadeh R, Marashi h (2010) Irrigation effects on pds and bch genes expression of the Iranian Saffron. J. Cell Mol. Res. 2(2): 61-66.

Molina RV, Valero M, Navarro Y (2005) Temperature effects on flower formation in saffron (*Crocus sativus* L.). Sci. Hort. 103:361–379.

Nazari M R, Habibpour Mehraban F, Maal Amiri R, Zeinali Khaneghah H (2012) Change in Antioxidant Responses against Oxidative Damage in Black Chickpea Following Cold Acclimation. Russ. J. Plant Physiol. 59: 183-189.

Patel H, Krishnamurthy R (2013) Elicitors in Plant Tissue Culture. J. Pharm. Phytochem. 2: 60-65.

Perata P, Alpi A (1993) Plant responses to anaerobiosis. Plant Sci. 93:1–17.

Raee M, Omidi M, Turabi S (2012) Effect of abiotic stimuli on tissue culture of Aloe Vera, Biotechnology Master's Thesis, Islamic Azad University, Sci. Res.

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

Rezvani N, Sorooshzadeh A (2014) Effect of nano-silver on root and bud growth of saffron in flooding stress condition. J. Agricul. Technol. Saffron. 2(1): 91-104.

Rodriguez-Concepcion M (2010) Supply of precursors for carotenoid biosynthesis in plants. Arch. Biochem. Biophys. 504: 118-122.

Rossel JB, Wilson IW, Pogson B.J (2002) Global Changes in Gene Expression in Response to High Light in Arabidopsis. Plant Physiol. 130: 1109-1120.

Rostami M, Mohammad parast M, Mohammad parast B, Golfam R (2013) The effect of different levels of salinity on leaf concentrations of saffron (*Crocus sativus* L.). National Conference on Agricultural Science and Technology.

SAS Institute (2014) SAS/Stat User's Guide, Version 9.2. SAS Institute, Cary, NC.

Seif Sahandi M, Sorooshzadeh A, Rezazadeh H, Naghdiabadi HA (2011) Effect of nano silver and silver nitrate on seed yield of borage. J. Med. Plants Res. 5(2):171-175.

Strader LC, Beisner ER, Bartel B (2009) Silver ions increase auxin efflux independently of effects on ethylene

response. Plant Cell. 21: 3585-3590.

Tabatabai pazhoh Z, Razavizadeh R, Rostami F (2013) The effect of nano silver pigments chlorophyll and carotenoids and flavonoids found in canola (*Brassica napus*) *in vitro*. Second National Conference Nanvaz technology theory and application.

Tian L, Magallanes-Lundback M, Musetti V, DellaPenna D (2003) Functional analysis of beta- and epsilon-ring carotenoid hydroxylases in Arabidopsis. Plant Cell Physiol. 15: 1320-1332.

Umezawa T, Fujita M, Fujita Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2006) Engineering Drought Tolerance in Plants: Discovering and Tailoring Genes to Unlock the Future. Curr. Opin. Biotechnol. 17:113-122.

Vanaja V, Annadurai G (2012) Coleus aromaticus leaf extract mediated synthesis of silver nanoparticles and its bactericidal activity. App. Nano sci. 3: 217-223.

Vasconsuelo A, Boland R (2007) Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. Plant Sci. 172: 861-875.

Vincour B, Altman A (2005) Recent Advances in Engineering Plant Tolerance to Abiotic Stress: Achivements and Limitations. Curr. Opin. Biotechnol. 16:123-132.

Visser E J W, Pierik R (2007) Inhibition of root elongation by ethylene in wetland and non-wetland plant species and the impact of longitudinal ventilation, Plant Cell Environ. 30 (1): 31-38 pp.

Yang HG, Sun CH, Qiao ShZ, Zou J, Liu G, Smith SC, Cheng, Lu GQ (2008) Anatase TiO2 single crystals with a large percentage of reactive facets. Nature 453: 638-641.

Yousefi K, Riahi-Madvar A, Baghizadeh A (2015) Investigation of the effects of Ag and Cu elicitors on flavones synthase 1 gene expression and some biochemical parameters on *Cuminum cyminum* L. endemic to Iran. J. Plant Res. (Ira. J. Biol.). 28(1).

Zengin F K, Munzuroglu O (2005) Effects of some heavy metaleson chlorophyll, proline and som antioxidant and chemicals in Bean (*Phaseolus vulgaris* L) seedlings. Acta Biol. Cracov. Ser. Bot.47(2):157–164.

Zhao J, Davis LC, Verpoorte R (2005) Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnol. Adv. 23: 283-333.