



Evaluation of photosynthetic pigments, fluorescence indexes, gas exchange, and some active flavonoid substances in *Viola tricolor* L. under the effect of bio-silver nanoparticles

Arefeh hassanvand¹, Sara Saadatmand^{2*}, Hossein Lari Yazdi³,
Alireza Iranbakhsh⁴

¹ Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran. Email: a.hassanvand@pnu.ac.ir

² Department of Biology, Science and Research branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran, Email: s_saadatmand@srbiau.ac.ir

³ Department of Biology, Science and Research branch, Islamic Azad University, borujerd, Iran, Email: lariyazdi_hossein@yahoo.com

⁴ Department of Biology, Science and Research branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran iranbakhshar@yahoo.com

Article type:

Research article

Abstract

Viola tricolor L. of the Violaceae family is used for its antioxidant and pharmaceutical compounds. This study was conducted based on a completely randomized design with four replications to investigate the effect of silver nanoparticles on the photosynthetic systems and gas exchange of the *Viola tricolor* L. Treatments included silver nanoparticles with three concentrations (10, 50, and 100 ppm) and a control (distilled water). Results of the study showed that relative water content, stomatal conductance, chlorophyll a concentration, and total chlorophyll concentration, maximum fluorescence, soluble carbohydrate, and antioxidant activity were higher in the treated plants compared with the control plants. Stomatal conductance showed a significant improvement under 50 mg/L silver nanoparticles compared with the other treatments. Maximum chlorophyll b was observed in 10 ppm concentration of silver nanoparticles. Moreover, the highest chlorophyll a content was observed in the plants treated with 50 mg/L concentration of nanoparticles. Carotenoid contents significantly improved in the plants treated with silver nanoparticles. CO₂ content and insoluble carbohydrate were higher in the control group compared with the other treatments. A number of effective flavonoids were assayed, including Rutin, Quercetin, and Apigenin which showed a significant difference compared with the control group in 10, 50, and 10 ppm treatments, respectively. The results of this study showed that silver nanoparticles stimulate antioxidant activity and increase the secondary metabolites (flavonoid content) of *Viola tricolor* L.

Article history

Received: 07.02.2022

Revised: 11.05.2022

Accepted: 13.05.2022

Published: 20.04.2023

Keywords

Rutin

Carotenoid

Chlorophyll

Antioxidant activity

Stomatal conductance

Cite this article as: hassanvand, A., Saadatmand, S., Lari Yazdi, H., Iranbakhsh, A.R. (2023). Evaluation of photosynthetic pigments, fluorescence indexes, gas exchange, and some active flavonoid substances Pansy (*Viola tricolor* L.) under the effect of Bio-Silver Nanoparticles. *Journal of Plant Environmental Physiology*, 69(1): 80-98.



©The author(s)

Doi: 10.30495/iper.2022.690248

Publisher: Islamic Azad University, Gorgan branch

Dor: 20.1001.1.24237671.1402.18.69.7.5

ارزیابی رنگیزه‌های فتوسنتزی، شاخص‌های فلورسانس، تبالات گازی و برخی ترکیبات فلاونوئیدی موثر در گیاه بنفشه سه‌رنگ (*Viola tricolor L.*) تحت تاثیر نانوذرات نقره‌زیستی

عارفه حسونند^۱، سارا سعادت‌مند^{۲*}، حسین لاری یزدی^۳، علیرضا ایرانبخش^۴

۱ گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران، رایانامه: a.hassanvand@pnu.ac.ir

۲ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران، رایانامه: s_saadatmand@srbiau.ac.ir

۳ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران، رایانامه: lariyazdi_hossein@yahoo.com

۴ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران، رایانامه: iranbakhsh@iau.ac.ir

| نوع مقاله: | چکیده |
|---------------------------|--|
| مقاله پژوهشی | بنفشه سه رنگ با نام علمی <i>Viola tricolor L.</i> از خانواده بنفشه گان یا <i>Violaceae</i> است. که به دلیل دارا بودن ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرد. به منظور بررسی اثر نانوذرات نقره بر سیستم فتوسنتزی و تبالات گازی گیاه بنفشه سه رنگ آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار انجام شد. تیمارها شامل نانو ذرات نقره در سه سطح (۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ پی‌پی‌ام) و یک شاهد (آب مقطر) بود. نتایج نشان داد محتوای نسبی آب، هدایت روزنه‌ای، غلظت کلروفیل‌های a و کل، فلورسانس بیشینه، کربوهیدرات محلول و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در گیاهان تیمار شده نسبت به شاهد بیشتر شد. هدایت روزنه برگ در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نسبت به سطوح دیگر افزایش معنی‌دار نشان داد. بیشینه مقدار کلروفیل b در غلظت ۱۰ پی‌پی‌ام مشاهده شد. همچنین نمونه‌های گیاهی تیمار شده با غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات نقره بیشترین مقدار کلروفیل a را داشتند. کارتنوئیدها در تیمار گیاهان با نانو نقره افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد نشان داد. میزان CO_2 زیر اتاقک روزنه و کربوهیدرات نا محلول در شاهد نسبت به سایر تیمارها بیشتر بود. برخی ترکیبات فلاونوئیدی موثر در گیاه اندازه گیری شد، از جمله روتین، کلروفیل، کوئرستین و آپیزین که به ترتیب در تیمار ۱۰، ۵۰ و ۱۰ پی‌پی‌ام نانوذرات نقره نسبت به شاهد افزایش معنی‌دار نشان دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذرات نقره فعالیت آنتی‌اکسیدانی را تحریک کرده و متابولیت‌های ثانویه (مقدار فلاونوئیدها) بنفشه سه رنگ را افزایش می‌دهد. |
| تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۱۸ | |
| تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۰۲/۲۱ | |
| تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۲/۲۳ | |
| تاریخ چاپ: ۱۴۰۲/۰۱/۳۱ | |
| واژه‌های کلیدی: | |
| روتین | |
| کارتنوئید | |
| کلروفیل | |
| فعالیت آنتی‌اکسیدانی | |
| هدایت روزنه‌ای | |

استناد: حسونند، عارفه؛ سعادت‌مند، سارا؛ لاری یزدی، حسین؛ ایرانبخش، علیرضا. (۱۴۰۲). ارزیابی رنگیزه‌های فتوسنتزی، شاخص‌های فلورسانس، تبالات گازی و برخی ترکیبات فلاونوئیدی موثر در گیاه بنفشه سه‌رنگ (*Viola tricolor L.*) تحت تاثیر نانوذرات نقره‌زیستی. *فیزیولوژی محیطی گیاهی*، ۶۹ (۱)، ۸۰-۹۸.

Doi: 10.30495/iper.2022.690248

Dor: 20.1001.1.24237671.1402.18.69.7.5

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان

© نویسندگان.



مقدمه

تمایل به تولید و استفاده از مواد با ابعاد نانومتری با توجه به خصوصیات جالب این مواد روز به روز در حال افزایش است. در میان نانو ذرات فلزی، نانو ذرات نقره به عنوان یک محصول قوی در حوزه فناوری نانو پدید آمده است (Rai et al., 2018). امروزه سنتز بیولوژیکی نانوذرات به عنوان یک جایگزین آسان و مناسب برای روش‌های شیمیایی و فیزیکی مطرح شده است (Khatami & Pourseyedi, 2015). به همین دلیل استفاده از عصاره گیاه بنفشه سه‌رنگ جهت سنتز نانو ذرات فلزی باتوجه به متابولیت‌های مهم تشکیل دهنده آن از اهمیت بالایی برخوردار است.

بنفشه سه رنگ با نام علمی *Viola tricolor L.* از خانواده بنفشه گان یا *Violaceae* است. این گیاه سرشار از ترکیبات آنتی‌اکسیدان طبیعی است. بیشتر فعالیت‌های بیولوژیکی و دارویی این گیاه مربوط به فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن می‌باشد. این گیاه به خاطر وجود اسید سالیسیلیک و روتین، ضد التهاب و ضد درد است (Anand David et al., 2016; JURCA et al., 2019). فلاونوئیدها گروه مهمی از متابولیت‌های ثانویه این گیاه هستند که به دلیل انباشت جایگزین‌های احتمالی هیدروکسیل، متوکسیل و گلیکوزیل تنوع ساختاری زیادی نشان می‌دهند. از این گیاه برای درمان اختلالات مختلف پوستی، مشکلات تنفسی فوقانی، روماتیسم، ورم ممانه و همچنین به عنوان تسکین دهنده و آرامبخش استفاده شده است (Vukics et al., 2008).

نانوذرات از طریق القای پاسخ‌های دفاعی باعث بیوستنز و انباشت متابولیت‌های ثانوی می‌شوند (Namdeo et al., 2007). نانو ذرات نقره نیز یکی از عواملی است که روی بسیاری از فرایندهای مورفولوژی و فیزیولوژی گیاهان اثر می‌گذارد. این ذره

نانویی به خاطر اندازه کوچک آن، به سرعت به درون سلول نفوذ کرده و منجر به افزایش میزان پروتئین و بیان ژن در سلول‌های گیاهی می‌شود (Bondarian et al., 2013).

افزایش میزان کاروتنوئیدها و آنتوسانین‌ها تحت تنش به واسطه نقش حفاظتی این رنگیزه‌هاست که باعث محافظت کلروفیل در برابر اکسیداسیون نوری می‌شود (Rigane et al., 2013). Hashemi و همکاران (۲۰۱۵) بیان کرده‌اند که نانوذره نقره باعث افزایش محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی در گندم و جو شده است. اهمیت رنگیزه‌های فتوسنتزی اساساً جذب فوتون‌های نوری و شرکت در انجام واکنش‌های نوری فتوسنتز است. در این مرحله از فتوسنتز انرژی و پتانسیل هیدروژن لازم برای احیای دی‌اکسید کربن در چرخه کالوین تامین می‌شود. در مطالعه ای دیگر اثر نانوذرات نقره و میدان مغناطیسی به‌صورت جداگانه و باهم بر ویژگی‌های رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه *Phausalus vulgaris* بررسی گردید مشاهده شد که تیمار نانونقره باعث افزایش رشد گیاه و افزایش برخی متابولیت‌های ثانویه مانند فلاونوئیدها و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌شود (Najafi et al., 2013).

مطالعه تبادلات گازی برگ، ارزیابی مستقیم پاسخ‌های فیزیولوژیکی گیاه به شرایط محیطی مختلف را امکان‌پذیر می‌سازد (De Palma, 1998). رابطه بین هدایت روزنه‌ای با فتوسنتز، نشان از اهمیت آن در تولید دارد. فتوسنتز در متابولیسم گیاهان عالی نقش بسیار تعیین کننده‌ای دارد. بنابراین، سرعت فتوسنتز عامل اصلی تعیین کننده تولید ماده خشک و توان تولید گیاهان زراعی می‌شود. تغییرات کربوهیدرات‌ها به دلیل ارتباط مستقیم‌شان با فرآیندهای فیزیولوژیکی نظیر فتوسنتز، انتقال و تنفس اهمیت خاصی دارند (Chehregani Rad et al., 2016).

مطالعه تأثیر نانوذرات نقره بر برخی متابولیت‌های ثانویه گیاه بومادران نشان داد که در گیاه بومادران هزار برگ تحت تأثیر نانو ذرات نقره با حفظ تمامیت غشا، محتوای ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی افزایش یافته و ویژگیهای آنتی‌اکسیدانی گیاه نیز تحت تأثیر قرار گرفته است (Kayhani Behrouz et al., 2013). اثر محرک‌ها بر میزان تولید برخی مواد آنتی‌اکسیدانی، فنلی و ترکیبات فلاونوئیدی برخی گیاهان از جمله خشخاش (Khodayari et al., 2015)، فندق (Hazrati et al., 2017)، بذرابنج (Parsa et al., 2016)، بادرنجبویه (Riahi-Madvar et al., 2014) و نعناع فلفلی (Kheiry et al., 2017) بررسی شده و نتایج مطلوبی به دست آمده است.

درک اینکه چگونه اندازه نانوذرات فرآیند فتوسنتز را تغییر می دهد مانند ارزیابی تغییرات احتمالی میزان جذب CO₂ و کارایی فتوسنتز (PSII) II، بسیار مهم است. لذا با توجه به گرایش جهانی تولید و تکثیر گیاهان دارویی در سیستم‌های کشاورزی پایدار، انجام پژوهش‌هایی مبتنی بر سنتز طبیعی به شکل نانو و اثر آن بر فعالیت فتوسنتزی گیاه و ترکیباتی فلاونوئیدی، ضروری است. به همین منظور، در راستای این اهداف، تحقیق حاضر بر روی فعالیت‌های فتوسنتزی، آنتی‌اکسیدانی، شاخص فلورسانس و محتوای کلروفیل و کربوهیدرات‌ها در برگ و شناسایی کمی فلاونوئیدهای گیاه بنفشه سه رنگ انجام شده است.

مواد و روش‌ها

سنتز نانو نقره زیستی: ابتدا گیاه بنفشه سه رنگ از مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی استان لرستان تهیه شد. جهت سنتز نانوذره نقره ۱۰ گرم از گل این گیاه، با آب دیونیزه شسته شده و سپس خشک و پودر شدند. سپس ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر استریل اضافه شد و

به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد جوشانده شدند و بعد از عبور دادن مخلوط حاصل از کاغذ واتمن در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا زمان سنتز نانوذرات نقره نگهداری شد. از عصاره جهت احیا و سنتز نانوذره استفاده شد. سپس ۴۰ میلی لیتر عصاره آبی تازه تهیه شده به ۱۰ میلی لیتر از نمک ۰/۱ مولار نیترات نقره افزوده شده بدین ترتیب با تغییر رنگ محلول از قرمز کم رنگ به خاکستری مایل به قهوه‌ای نانوذرات نقره حاصل شد. رسوب محلول توسط سانتریفوژ ۱۲۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه برداشت و دوبار با آب دیونیزه شده شسته و در دمای ۴۵ درجه در آن خشک شد و برای مطالعه ذخیره شد (Keshari et al., 2020). تشکیل نانوذرات نقره با طیف UV-VIS مدل (Agilent, Spectrophotometer, USA) در محدوده ۷۰۰-۲۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

تصاویر مورفولوژی و اندازه نانوذرات نقره تیمار شده در این تحقیق با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) (VEGA3 TESCAN, Czech Republic)، با ابزار Zeiss-EM10C بر روی شبکه های مس کربن دار ولتاژ شتاب دهنده ۸۰ کیلوولت با بزرگنمایی‌های مختلف عکس برداری شده است.

اعمال تیمار: این پژوهش در سال ۱۳۹۸ در شرایط کشت گلدانی در مرکز تحقیقات گیاهان دارویی رازی خرم آباد، لرستان اجرا گردید. گلدان‌ها با مخلوط ۱:۱ از ماسه بادی و کود دامی پوسیده و خاک زراعی پر شد و در هر گلدان ۳۰ بذر (تهیه شده از شرکت پاکان بذر اصفهان) در عمق ۰/۵ سانتی متری کاشته شد. گلدان‌ها در گلخانه با دمای ثابت ۲۰ الی ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگه داشته شد و روشنایی مورد نیاز گیاهان به وسیله نور طبیعی خورشید تامین شد. آبیاری با آب معمولی انجام گرفت. بعد از سبز شدن گیاه و قبل از اعمال تیمار نانوذرات نقره، عمل تنک

موج ۴۴۵ نانومتر، جذب، اندازه‌گیری و با کمک معادله ۱ محاسبه شد. (Jensen, 1978).

$$C = \frac{V * A * F * 10}{2500} \quad \text{معادله (۱)}$$

C = میزان رنگیزه بر حسب میلی‌گرم بر گرم بافت تر،
V = حجم عصاره، A = میزان جذب با دستگاه اسپکتروفتومتر، F = یک در نظر گرفته شد

سنجش شاخص‌های فلورسانس کلروفیل: اندازه‌گیری میزان فلورسانس و عملکرد کوانتومی فتوسیستم II، ۲۴ ساعت بعد از اعمال آخرین تیمار نانونقره انجام شد. سطح برگ توسعه یافته از گیاه توسط کلیپس‌های دستگاه به مدت ۳۰ دقیقه پوشانده و به تاریکی عادت داده شد. سپس سنسور دستگاه (Junior PamWaltz - Germany) به آن متصل و با روشن نمودن دستگاه نور در طول موج ۶۹۵ نانومتر به برگ تابیده شد. پارامترهای فلورسانس از قبیل: F₀ (فلورسانس کمینه)، F_m (فلورسانس بیشینه)، F_v (فلورسانس متغیر) و F_v/F_m (عملکرد کوانتوم فتوسیستم II) ثبت شدند. عملکرد کوانتومی فتوسیستم از رابطه ۲ محاسبه شد (Maxwell & Johnson, 2000). معادله (۲):

$$F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m \quad \text{معادله (۲)}$$

اندازه‌گیری فتوستتز، هدایت روزنه‌ای و CO₂ اتاقت زیر روزنه‌ای: برای این منظور، در وسط روز از سطح پائینی برگ‌هایی که بطور کامل در معرض آفتاب قرار داشتند و از قسمت بالایی برگ-های ساقه (دو برگ از هر گیاه) با کمترین تغییر مکانی برگ نسبت به وضعیت اصلی درون اتاقت اندازه‌گیری، طوری قرار داده شد که سطح فوقانی برگ به طرف بالا قرار گرفته و نور کافی دریافت کند. داده‌های اصلی هدایت روزنه‌ای براساس مول CO₂ بر مترمربع بر ثانیه و سرعت فتوستتز بر اساس میکرومول CO₂ بر مترمربع بر ثانیه با استفاده از دستگاه فتوستتز متر (IRGA مدل LCA4) با

کردن گلدان‌ها در چند مرحله انجام شد و برای هر تیمار در هر گلدان ۴ گیاه گذاشته شد و سایر گیاهان حذف شدند. زمانی که گیاهچه‌ها به مرحله ۶ تا ۸ برگگی رسیدند گیاهان به صورت اسپری برگگی در غلظت‌های مختلف (۰، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی-گرم در لیتر) با نانوذرات نقره ۲۱ روز تیمار شدند (سه بار در سه هفته). بعد از ۲۴ ساعت از آخرین مرحله محلول پاشی، نمونه‌های برگ جهت اندازه‌گیری و سنجش‌های فیزیولوژیک مورد استفاده قرار گرفت و برای انجام آزمایش‌هایی که نیاز به اندام تر گیاه داشتند، نمونه‌های گیاه در فویل آلومینیومی برداشت و به فریزر -۸۰ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند (Ramezani et al., 2019). آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار با اعمال تیمار نانوذرات نقره در چهار غلظت (۰، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) انجام شد.

سنجش رنگدانه‌های گیاهی: استخراج و سنجش کلروفیل و کارتنوئیدها بر اساس روش لیختن‌تالر (Lichtenthaler, 1987) انجام شد. شدت جذب آن در طول موج‌های ۶۶۳/۲ و ۶۴۶/۸ برای کلروفیل a، b و کلروفیل کل عصاره و در طول موج ۴۷۰ نانومتر برای کاروتنوئید با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (مدل SHIMADZU UV/mini 1240) خوانده شد.

سنجش گزانتوفیل: برای سنجش گزانتوفیل ۲۰ میلی‌لیتر از عصاره استونی حاصل از اندازه‌گیری کلروفیل برداشته و همان مقدار اتر نفت اضافه گردید و پس از هموژن کردن، بخش بالایی، برداشته و هم حجم آن، متانول اضافه شد. پس از هموژن کردن، ۱۰ میلی‌لیتر آب نمک ۳ درصد اضافه و دو فاز بالایی (اتر نفت) و پایینی (متانول) جدا شد. به اتر نفت، پتاس متانولی اضافه شد و پس از سانتیفریوژ، فاز بالایی آن جدا گردید که کاروتن است. فاز پایینی که شامل گزانتوفیل است، جدا شد و با دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول

شدند. جداسازی در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

جهت تهیه محلول استاندارد، ۵ میلی‌گرم روتین، کامپرفرول، آپیزین، کوئرستین و لوتئین در ۵۰ میلی‌لیتر متانول حل شد، سپس از این محلول، غلظت‌های پایین‌تر تهیه شد. پس از آن، محلول از فیلتر ۰/۲ میکرولیتر عبور داده شد. مقدار ۲۵ میلی‌گرم از گل خشک بنفشه سه رنگ در ۲۵ میلی‌لیتر متانول حل و از فیلتر ۰/۲ میکرولیتر عبور داده شد. مقدار ۱۰ میکرولیتر از عصاره بعد از عبور از فیلتر سرنگی ۰/۲ میکرون به ستون HPLC تزریق گردید. با مقایسه زمان تأخیر و سطح زیر منحنی نمونه با نمونه‌های استاندارد، شناسایی و میزان این ترکیبات با رسم منحنی‌های استاندارد تعیین گردید. در این مطالعه برای اندازه‌گیری ترکیبات فلاونوئیدی از ۳ تکرار استفاده گردید.

قندهای محلول و قندهای نامحلول: برای تعیین غلظت کربوهیدرات از روش Irigoyen و همکاران (۱۹۹۲) استفاده و شدت جذب با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۸۳ قرائت شد.

سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی (DPPH): سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی (DPPH) به روش Bhakya و همکاران (۲۰۱۶) و طول موج ۷۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. میزان مهار توسط معادله زیر تعیین شده است:

معادله (۴)

$$A\% = 100 - \frac{sampel(OD) - ethanol(OD)}{DPPH(OD)} \times 100$$

آنالیز آماری داده‌ها: برای آنالیزهای آماری از نرم‌افزار SPSS ver. 22 و Graphpad. 7 استفاده گردید. این آنالیزها از طریق ANOVA یک طرفه و آزمون دانکن در سطح (P≤۵%) انجام شد.

میانگین‌گیری از چهار قرائت، انجام گردید (Ritchie et al 1990).

میزان آب نسبی برگ (RWC): به‌منظور اندازه‌گیری محتوای نسبی آب برگ، در ساعت ۱۰ صبح از آخرین برگ کاملاً توسعه یافته گیاهان به طور تصادفی نمونه‌برداری انجام شد. بلافاصله بعد از نمونه‌برداری، وزن تر برگ‌ها اندازه‌گیری شد. سپس برگ‌ها در آب مقطر به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق و نور کم برای محاسبه وزن اشباع، غوطه‌ور شدند و پس از این مدت نمونه‌ها به سرعت خشک و وزن اشباع آنها اندازه‌گیری شد. میزان آب نسبی برگ طبق معادله (۳) انجام شد (Chartzoulakis et al., 2002).

$$RWC = \frac{F_w - D_w}{S_w - D_w} \times 100 \quad (3)$$

F_w : وزن تر برگ بلافاصله بعد از نمونه‌برداری، D_w : وزن خشک برگ بعد از قرار گرفتن در آون و S_w : وزن اشباع برگ بعد از قرار گرفتن در آب مقطر
سنجش میزان فلاونوئید: مقادیر فلاونوئیدها در نمونه عصاره‌های گیاهی به روش Chang و همکاران (2002) اندازه‌گیری شدند.

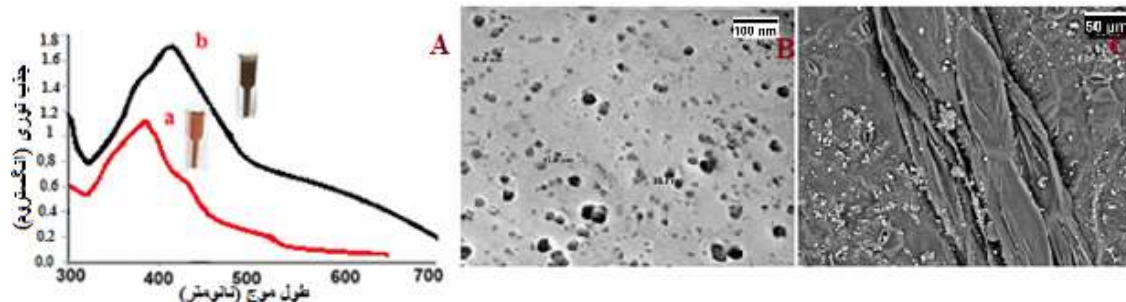
شناسایی فلاونوئیدهای غالب در برگ گیاه *Viola*

***tricolor L* با HPLC:** برای آنالیز از دستگاه HPLC مدل (Agilent, USA) Infinity 1260 استفاده شد. ستون مورد استفاده C18 با طول ۲۵ سانتی‌متر و قطر داخلی ۴ میلی‌متر بود. سیستم مورد استفاده در این بررسی، گرادیان و فاز متحرک شامل آب با ۰/۲٪ اسیدسولفوریک ۰/۱ مولار (حلال ۱) و متانول (حلال ۲)، سرعت جریان فاز متحرک در ستون ۰/۶ میلی‌لیتر در هر دقیقه، دمای ستون ۸۰ درجه سانتیگراد و طول موج ۲۲۰ تا ۴۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. ابتدا آشکارساز UV به مدت ۱۰ دقیقه گرم شد و پیش از تزریق نمونه فاز متحرک به مدت ۲۰ دقیقه در شرایط آزمایش از ستون جداسازی عبور داده شد. سپس، ۲۰ میکرولیتر از نمونه‌ها به دستگاه تزریق

نتایج

تغییر اندازه آن‌ها به سمت نانو تغییر می‌کند. تصویر SEM، در تایید سنتز نانوذرات نقره به اندازه ۱۰ تا ۸۵ نانومتر، ایجاد ساختار کروی شکل را نشان می‌دهد (شکل ۱).

مشخصه یابی نانوذرات نقره سنتز شده: آنالیز UV-Vis در محدوده ۴۰۰ الی ۴۵۰ نانومتر مصداق تشکیل نانوذرات نقره می‌باشد. خصوصیات مواد با



شکل ۱- (A): طیف جذبی عصاره (a)، طیف جذبی نانو نقره (b)؛ (B) و (C): تیمار نانو نقره روی برگ بنفشه سه رنگ با میکروسکوپ SEM.

تبادلات گازی تحت تیمارهای مختلف نانونقره معنی‌دار شد (جدول ۱). محلول‌پاشی ۵۰ پی‌پی‌ام از نانونقره هدایت روزنه‌ای را نسبت به شاهد افزایش داد. به طوری که ماکزیمم افزایش معنی‌دار ($P \leq 5\%$) در تیمار ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر با میانگین 0.094 مول H_2O بر مترمربع بر ثانیه مشاهده شد (شکل ۲).

روند تغییرات فتوسنتز خالص در غلظت‌های مختلف نانونقره، نسبت به کنترل معنی‌دار بود. ماکزیمم افزایش معنی‌دار ($P \leq 5\%$) در تیمار ۵۰ پی‌پی‌ام حاصل شد. نمودر میزان فتوسنتز و CO_2 روند عکسی را داشتند. به طوری که حداکثر میزان فتوسنتز و CO_2 به ترتیب در تیمار ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نانونقره و تیمار شاهد مشاهده شد.

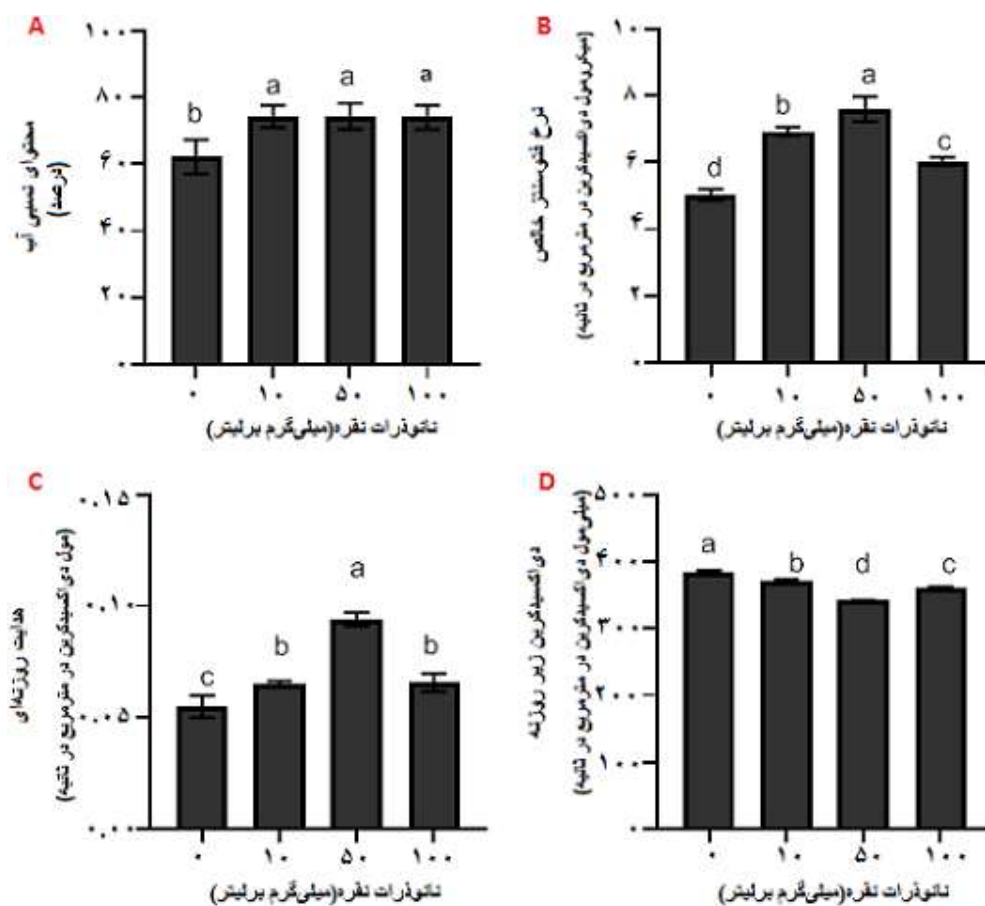
تاثیر نانو نقره بر میزان کارتنوئیدها: نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان رنگیزه‌های گیاهی (جدول ۱) نشان داد که در گیاه بنفشه سه رنگ تیمار شده با غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره تغییرات معنی‌داری بر روی محتوای این رنگدانه‌ها ایجاد کرد به طوری که غلظت ۱۰ پی‌پی‌ام نانو ذرات نقره سبب افزایش مقدار کارتنوئیدها شد. همچنین نتایج مقایسه

تاثیر نانو نقره بر میزان کلروفیل a، b و کل: آنالیز واریانس محتوای کلروفیل تحت تیمارهای مختلف نانوذرات نقره معنی‌دار گردید. بررسی‌ها نشان داد میانگین مقدار کلروفیل a در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات نقره نسبت به کنترل و ۱۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر افزایش معنی‌دار ($P \leq 5\%$) نشان داد. روند تغییرات زیادی بین تیمار ۱۰ پی‌پی‌ام و کنترل مشاهده نشد. محتوی کلروفیل b در تیمار ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر (پی‌پی‌ام) افزایش معنی‌دار ($P \leq 5\%$) را نسبت به سایر سطوح و کنترل نشان داد و تغییرات معنی‌داری بین تیمار ۵۰ پی‌پی‌ام و کنترل مشاهده نگردید. با توجه به نتایج بدست آمده از پژوهش حاضر، افزایش معنی‌دار ($P \leq 5\%$) مقدار کلروفیل کل در سطح ۵۰ پی‌پی‌ام نسبت به سایر سطوح و کنترل حاصل شد (جدول ۲). حفظ غلظت کلروفیل در تیمار ۵۰ پی‌پی‌ام به ثبات فتوسنتز در این شرایط کمک می‌کند.

تبادلات گازی: حساس‌ترین شاخص برای بررسی وضعیت فیزیولوژیکی گیاه به ویژه، تحت شرایط ایستورها، بررسی رفتار روزنه‌ها است. آنالیز واریانس

۱۰ و ۵۰ پی‌پی‌ام نانوذرات نقره اختلاف معنی داری از نظر رنگیزه گزانتوفیل مشاهده نشد.

میانگین‌ها نشان داد بیشترین مقدار رنگیزه گزانتوفیل در گیاهان تیمار شده با غلظت ۱۰ و ۵۰ پی‌پی‌ام نانوذرات نقره مشاهده گردید (جدول ۲). بین غلظت

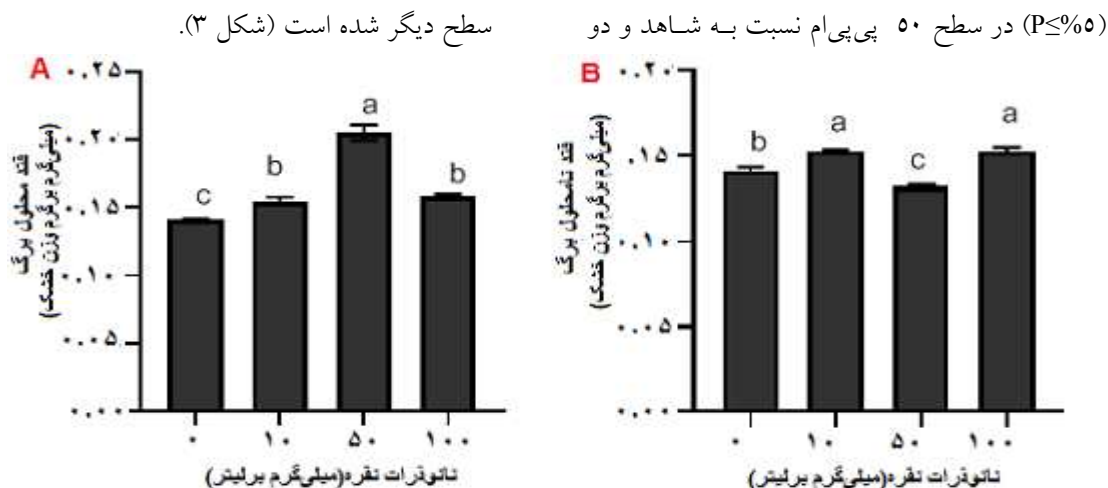


شکل ۲: مقایسه میانگین (A) درصد رطوبت نسبی (RWC، B) میزان فتوسنتز خالص Pn،

(C) هدایت روزنه‌ای gs و (D) میزان CO_2 اتاقت زیر روزنه Ci بنفشه سه رنگ در سطوح مختلف نانوذرت نقره (حروف مشترک بیان کننده عدم تفاوت معنی دار در سطح $P \leq 5\%$) با استفاده از آزمون دانکن است.

تاثیر نانو نقره بر قندهای محلول و نامحلول: در پژوهش حاضر، با بررسی آنالیز واریانس، میزان قندهای محلول برگ بنفشه سه رنگ تحت نانو نقره معنی دار بود (جدول ۱). میانگین تغییرات در تیمار نانو ذرات نقره در هر سه غلظت افزایش معنی داری ($P \leq 5\%$) نسبت به شاهد نشان دادند. همانطوری که مقایسه میانگین داده‌های قند نامحلول برگ در تحقیق حاضر نشان داده شد نانو نقره موجب کاهش معنی دار

تاثیر نانو نقره بر محتوای نسبی آب: نتایج آنالیز واریانس محتوای نسبی آب نشان داد که تیمار نانو نقره تاثیر معنی داری بر محتوای نسبی آب بر روی گیاه بنفشه سه رنگ داشت. با محلول پاشی نانو نقره بر روی بنفشه سه رنگ محتوای نسبی آب افزایش معنی دار ($P \leq 5\%$) یافت (شکل ۲). همچنین بین غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره اختلاف معنی داری از نظر این شاخص مشاهده نگردید.



شکل ۳: مقایسه میانگین (A) قند محلول (B) قند نامحلول در بنفشه سه رنگ در سطوح مختلف نانوذرات نقره حروف مشترک بیان کننده عدم تفاوت معنی دار در سطح (P≤%5) با استفاده از آزمون دانکن است.

تمام غلظت‌ها نانوذرات نقره (۱۰۰ و ۵۰ و ۱۰ پی پی ام) نسبت به گروه شاهد شده که از نظر آماری این افزایش در سطح احتمال ۵ درصد معنی دار بود (جدول ۱). بیشترین میزان شاخص فعالیت آنتی-اکسیدان و مربوط به غلظت ۵۰ پی پی ام نانوذرات نقره بود (جدول ۲).

فلورسانس کلروفیل: شکل ۴ نشان می‌دهد، اثر نانوذرات نقره بر پارامتر شاخص فلورسانس کلروفیل از قبیل مقدار فلورسانس کمینه (F0)، بیشینه فلورسانس (Fm) و فلورسانس متغییر (Fv) در سطح احتمال ۵ درصد معنی دار شد، به طوری که حداکثر میزان Fm در غلظت ۵۰ میلی گرم در لیتر نانوذرات نقره مشاهده گردید. مقایسه میانگین‌ها نشان داد، در محلول پاشی با ۵۰ میلی گرم در لیتر نانوذرات نقره بر روی بنفشه سه رنگ مقدار فلورسانس کمینه (F0) کاهش معنی داری (P≤%۵) یافت (شکل ۴). افزایش محتوای کلروفیل باعث کمتر شدن فلورسانس حداقل (F0) می‌شود که با افزایش محتوای کلروفیل کل در غلظت موثر از نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد. بین غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ پی پی ام نانوذرات نقره از نظر میزان Fm اختلاف معنی داری مشاهده نشد. همچنین مقایسه

شناسایی فلاونوئیدهای غالب در برگ گیاه *Viola tricolor L* با HPLC: نانوذرات نقره تاثیر بسزایی در افزایش میزان فلاونوئید در تمام غلظت‌ها (۱۰۰ و ۵۰ و ۱۰ پی پی ام) نسبت به گروه شاهد داشت که از نظر آماری این افزایش در سطح احتمال ۵ درصد معنی دار بود (جدول ۱). بیشترین میزان فلاونوئید در غلظت ۱۰ و ۵۰ پی پی ام نانوذرات نقره مشاهده گردید (جدول ۲). نوع و میزان ترکیبات فلاونوئیدی موجود در عصاره متانولی برگ استخراج شده در جدول ۲ به نمایش در آمده است در پژوهش حاضر، با بررسی آنالیز واریانس میزان ترکیبات فلاونوئیدی شناسایی شده برگ بنفشه سه رنگ تحت نانوذرات نقره معنی دار بود (جدول ۱). میانگین تغییرات روتین، کوئرستین و آپیزین به ترتیب در تیمار ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ پی پی ام نانوذرات نقره افزایش معناداری (P≤%۵) نسبت به شاهد نشان داد. طبق مشاهدات، روتین با مقدار ۴/۴۱ میکروگرم بر گرم بیشترین ترکیبات فلاونوئیدی موجود در عصاره متانولی برگ بنفشه سه رنگ بود (جدول ۲).
تاثیر نانو نقره بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی: نانوذرات نقره منجر به افزایش میزان فعالیت سنجش DPPH در

میانگین داده‌ها نشان داد حداکثر میزان FV در گیاهان تیمار شده با نانو درات نقره مشاهده گردید. جدول ۱: تجزیه واریانس پارامترهای اندازه گیری شده گیاه بنفشه سه رنگ تحت تأثیر مقادیر مختلف نانوذرات نقره

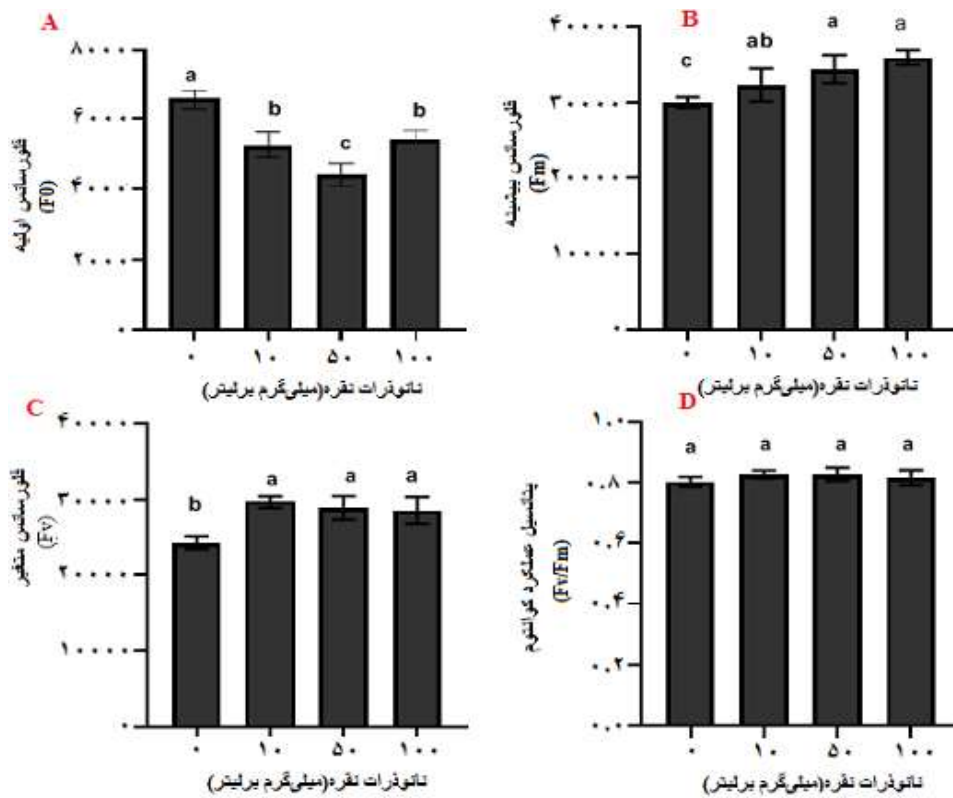
| پارامترها | منابع تغییرات | |
|--|---------------|----|
| | خطا | کل |
| درجه آزادی | ۱۲ | ۱۵ |
| کلروفیل a (میلی‌گرم بر گرم وزن تر) | ۶/۷۲۸** | - |
| کلروفیل b (میلی‌گرم بر گرم وزن تر) | ۱/۰۷۷** | - |
| کلروفیل کل (میلی‌گرم بر گرم وزن تر) | ۷/۷۹۰** | - |
| کارتونوئید (میلی‌گرم بر گرم وزن تازه) | ۱/۴۰۸** | - |
| گزانتوفیل (میکروگرم بر میلی‌لیتر) | ۰/۰۳۰۴** | - |
| سنجش DPPH (%) | ۲۴۸/۵۹۶** | - |
| فلاونوئید (میلی‌گرم بر گرم وزن تازه) | ۳۵۴۱/۴۲** | - |
| هدایت روزنه‌ای (مول دی‌اکسیدکربن در مترمربع در ثانیه) | ۰/۰۰۱** | - |
| دی‌اکسیدکربن زیر روزنه (میلی‌مول دی‌اکسیدکربن در مترمربع در ثانیه) | ۱۲۳۶/۴** | - |
| محتوای نسبی آب (درصد) | ۱۶/۵۶ | - |
| نرخ توستتزر خالص (میکرومول دی‌اکسیدکربن در مترمربع در ثانیه) | ۴/۹۸** | - |
| فلورسانس اولیه (Fo) | ۹۲۵۵۵ | - |
| فلورسانس بیشینه (Fm) | ۲۴۲۱۲۶۰/۳۵ | - |
| فلورسانس متغیر (Fv) | ۱۷۱۹۱۳۳ | - |
| پتانسیل عملکرد کوانتوم (Fv/Fm) | ۰/۰۰۰۳۷۴۶ | - |
| روتین (میلی‌گرم بر لیتر) | ۷/۲۰۵** | - |
| کوئرتستین (میلی‌گرم بر لیتر) | ۰/۰۰۰۱** | - |
| آپیژنین (میلی‌گرم بر لیتر) | ۰/۰۰۳۲۵۱ | - |
| قندمحلول (میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) | ۰/۰۰ | - |
| قندنامحلول (میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) | ۰/۰۰ | - |

ns. * و ** به ترتیب عدم تأثیر معنی‌دار، تأثیر معنی‌دار در سطح ۵ درصد و تأثیر معنی‌دار در سطح ۱ درصد**

جدول ۲: مقایسه میانگین پارامترهای اندازه گیری شده گیاه بنفشه سه رنگ تحت تأثیر مقادیر مختلف نانوذرات نقره

| پارامترها | مقایسه میانگین نانوذرات نقره (میلی‌گرم بر لیتر) | | | |
|---------------------------------------|---|---------|---------|---------|
| | ۱۰۰ | ۵۰ | ۱۰ | ۰ |
| کلروفیل a (میلی‌گرم بر گرم وزن تر) | ۵/۱۸b | ۶/۶۲a | ۴/۳۴c | ۳/۵۹c |
| کلروفیل b (میلی‌گرم بر گرم وزن تر) | ۱/۵۱b | ۰/۷۴c | ۱/۹۱a | ۰/۹۴d |
| کلروفیل کل (میلی‌گرم بر گرم وزن تر) | ۶/۵۹b | ۷/۵۸a | ۷/۰۸b | ۴/۴۱c |
| کارتونوئید (میلی‌گرم بر گرم وزن تازه) | ۱/۴۰c | ۲/۱۳b | ۲/۴۴a | ۱/۱۸d |
| گزانتوفیل (میکروگرم بر میلی‌لیتر) | ۰/۴۱b | ۰/۵۲۲a | ۰/۵۰a | ۰/۳۲۲c |
| سنجش DPPH (%) | ۳۳/۵۰b | ۴۰/۲۵a | ۲۵/۷۵c | ۲۲/۷۵d |
| فلاونوئید (میلی‌گرم بر گرم وزن تازه) | ۲۱۶/۲۵a | ۲۱۳/۵a | ۱۸۵/۲۵b | ۱۵۲/۵c |
| روتین (میلی‌گرم بر لیتر) | ۳/۰۳۳c | ۳/۳۰۳b | ۴/۴۱۳۷a | ۰/۷۲۳۳d |
| کوئرتستین (میلی‌گرم بر لیتر) | ۰/۰۰۱۳c | ۰/۰۰۸۰a | ۰/۰۰۵۰b | ۰/۰۰۱۳c |
| آپیژنین (میلی‌گرم بر لیتر) | ۰/۰۷۱۷b | ۰/۰۴۷۷b | ۰/۰۹۶۷a | ۰/۰۱۸۳c |

حروف مشترک بیان‌کننده عدم تفاوت معنی‌دار در سطح (P≤5%) با استفاده از آزمون دانکن است.



شکل ۴: مقایسه میانگین بر (A) فلورسانس مینیمم کلروفیل (F0)، (B) فلورسانس ماکزیمم (FM)، (C) فلورسانس متغییر (FV) و (D) نسبت فلورسانس متغیر به فلورسانس ماکزیمم (FV/FM) بنفشه سه رنگ در سطوح مختلف نانوذرت نقره. حروف مشترک بیان کننده عدم تفاوت معنی دار در سطح (P≤5%) با استفاده از آزمون دانکن است.

جدول ۳: ضرایب همبستگی صفات آنتی اکسیدان و ترکیبات فلاونوئیدی با HPLC

| آپیزنین | کوئرستین | روتین | آنتی اکسیدان | |
|---------|----------|--------|--------------|--------------|
| ۰/۸* | ۰/۶* | ۰/۴* | ۱ | آنتی اکسیدان |
| ۰/۷* | ۰/۹* | ۱ | ۰/۴* | روتین |
| ۰/۲* | ۱ | ۰/۹* | ۰/۶* | کوئرستین |
| ۱ | ۰/۲* | ۰/۷۲۳* | ۰/۸* | آپیزنین |

* نشان دهنده معنی دار بودن همبستگی‌ها در سطح احتمال یک درصد است.

جدول ۴: ضرایب همبستگی صفات فتوسنتزی اندازه گیری شده

| دی اکسیدکربن زیر روزنه | سرعت فتوستتز | محتوای نسبی آب | |
|------------------------|--------------|----------------|------------------------|
| -۰/۸۷۷* | ۰/۸۶۷* | ۱ | محتوای نسبی آب |
| -۰/۹۱* | ۱ | ۰/۸۶۷* | سرعت فتوستتز |
| ۱ | -۰/۹۱* | -۰/۸۷۷* | دی اکسیدکربن زیر روزنه |

* نشان دهنده معنی دار بودن همبستگی‌ها در سطح احتمال یک درصد است.

بحث

با توجه به نتایج طیف سنجی ماوراءبنفش - مرئی حداکثر پیک جذبی ناشی از پلاسمون نانوذرت نقره در منحنی بدست آمده از عصاره پس از سنتز نانو ذرات نقره در محدوده ۴۰۰ الی ۴۵۰ نانومتر می باشد . تشدید مداوم جذب به عنوان یک تابع از زمان نشان دهنده قدرت کاهش عصاره است. تغییر رنگ و تفاوت منحنی های طیف را می توان به تحریک ارتعاشات سطح پلاسمون در نانوذرات و کاهش یون‌های نقره توسط عصاره گیاه نسبت داد. پلاسمون سطحی حاصل از برانگیختگی نوسانات تجمعی بار در فصل مشترک فلز و دی‌الکتریک است. زمانی که فرکانس پلاسمون سطحی با فرکانس نور برخوردی به نانوذرات فلزی، برابر باشد، تشدید پلاسمون سطحی اتفاق می‌افتد (Thirumurugan et al., 2010). فراوانی و عرض جذب پلاسمون سطحی به اندازه، شکل نانوذرات فلزی و همچنین به ثابت دی الکتریک خود فلز و محیط اطراف آن بستگی دارد (Ahmed et al., 2016).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی (سنجش DPPH): در گیاهان بنفشه سه رنگ تیمار شده با نانوذرات نقره در مقایسه با شاهد بیشتر بود . علت این افزایش رامی توان به عمل نانوذرات نقره در بلوکه کردن مسیر اتیلن و حذف رادیکال‌های آزاد و افزایش متابولیت‌های ثانویه از جمله فلاونوئیدها و آنتوسیانین نسبت داد. نتایج این تحقیق با Mehrian و Karimi (۲۰۱۷) مطابقت داشت این محققین اثر نانوذرات را بر گیاه ذرت مطالعه کردند و گزارش کردند که نانوذرات اثرافزایش بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه ذرت داشته است.

تاثیر نانو نقره بر رنگیزه‌های گیاهی، فلورسانس کلروفیل، فتوستت و تبادلات گازی: محتوی کلروفیل برگ‌ها یکی از عوامل کلیدی در تعیین سرعت فتوستت و تولید ماده خشک است. بررسی‌ها نشان داد

میانگین مقدار کلروفیل *a* در غلظت ۵۰ پی‌پی‌ام نسبت به کنترل و ۱۰ و ۱۰۰ پی‌پی‌ام افزایش معنی‌دار (P≤%۵) نشان داد. مطالعات نشان داد بین محتوای کلروفیل برگی و سرعت فتوستت آن همبستگی بالایی وجود دارد. به طوریکه، محتوای پایین کلروفیل نشانه‌ای از تنش اکسیداتیو است که ممکن است باعث اکسیداسیون نوری رنگدانه و تخریب کلروفیل شود (Ribaut et al., 2012). غلظت ۱۰ پی‌پی‌ام نانوذرات نقره در مطالعه حاضر بیشترین تاثیر را بر میزان کلروفیل *b* داشت. حفظ غلظت کلروفیل در غلظت ۵۰ پی‌پی‌ام به ثبات فتوستت در این شرایط کمک می‌کند. بهبود فعالیت‌های فتوستت با افزایش میزان کلروفیل کل در غلظت موثر از نانوذرات نقره بدست آمد. افزایش محتوای کلروفیل در اثر تیمار با نانوذرات نقره می‌تواند به دلیل اثر بازدارندگی آن بر روی رادیکال‌آزاد و افزایش جذب نیتروژن با جذب آب باشد (Kumar et al., 2009). نانو نقره با تاثیری که در افزایش رطوبت نسبی می‌دهد در جذب نیتروژن موثر است و از این طریق باعث حفظ کلروفیل میشود. تخریب کلروفیل‌ها در تیمار شاهد می‌تواند به وسیله اکسیژن‌های فعال تولید شده و رادیکال‌های آزاد در محیط باشد که از مهمترین دلایل کاهش کلروفیل‌ها می‌باشد. رادیکال‌های آزاد در همه گیاهان در درجات و مقادیر مختلف و در نتیجه متابولیسم طبیعی تولید می‌شوند ولی افزایش و تجمع بیش از حد آنها منجر به تنش و آسیب اکسیداتیومی گردد (Anderson et al., 1995). احتمالاً در مطالعه حاضر نانوذرات نقره در غلظت‌های به کار گرفته شده از طریق افزایش توان آنتی‌اکسیدانی سلول از دستگاه فتوستتزی حمایت و انتقال انرژی به کلروفیل باعث افزایش محتوای کلروفیل و بیوستت آن در گیاهان تحت تیمار نانوذرات نقره شده است. Abou-Zeid و همکاران (۲۰۱۴) بیان کرده اند که نانوذرات نقره

رنگریزه کارتوتوئیدها و گزانتوفیل در بنفشه سه رنگ تیمار شده با نانوقره نسبت به کنترل افزایش نشان داد. افزایش مشاهده شده در مقدار کارتوتوئیدهای می تواند به دلیل افزایش خواص آنتی اکسیدانی و جلوگیری از تخریب ساختار آنها باشد. تیمار نانو نقره سبب افزایش رشد گیاه و در نهایت افزایش خاصیت آنتی اکسیدانی در غلظت های پایین نانو نقره می شود (Ramezani, Gerami, et al., 2019). استفاده از نانوذرات نقره بوسیله ممانعت از اثرات اتیلن و جلوگیری از تنش اکسیداتیو سبب افزایش میزان رنگریزه های گیاهی در مطالعه حاضر شده است. با توجه به فعالیت آنتی اکسیدانی بالای نانو نقره می توان افزایش رنگریزه گیاهی را به فعالیت بالای آنتی اکسیدانی آن نسبت داد.

نتایج ما در این پژوهش نشان داد که نانوقره سبب کاهش میزان FO نسبت به شاهد شد. درحقیقت FO هر چه کمتر باشد، بدین معناست که فعالیت های فتوسنتزی به نحو مطلوب تری در جریان هستند و تثبیت کربن یا به عبارتی انتقال الکترون سریع تر آغاز شده است. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که در نمونه های تیمار شده با نانوقره، پارامترهای Fm و پتانسیل عملکرد کوانتوم (Fv/Fm) برای تبدیل انرژی نور جذب شده به انرژی شیمیایی افزایش می یابد. وقتی همه مراکز واکنشی فتوسیستم II بسته است، نشان دهنده افزایش تدریجی عملکرد فلورسانس و کاهش سرعت واکنش های فتوشیمیایی است و هرچه سیستم دیرتر بسته شود، یعنی قادر باشد تعداد الکترون های بیشتری را بپذیرد، Fm آن بالاتر یا سیستم کارا تر خواهد بود (Mehta et al., 2010). فلورسانس کلروفیل برگ گیاه بنفشه سه رنگ در مطالعه حاضر در گیاهان تیمار شده با نانوقره نسبت به شاهد بیشتر بود. علت افزایش Fv/Fm در تیمارها نسبت به

باعث افزایش محتوای رنگریزه های فتوسنتزی در گندم و جو شده است. در مطالعه حاضر میتوان علت افزایش در کلروفیل a و کل بر اثر تیمار با نانوقره را به نقش یون نقره در مهار فعالیت اتیلن از طریق رقابت با کوفاکتور مسی بر سر جانشینی در جایگاه اتصال به گیرنده این هورمون و همچنین به خاصیت آنتی اکسیدانی آن در مهار رادیکال آزاد نسبت داد. گیرنده اتیلن، ETR1 شامل یک جایگاه اتصال به اتیلن است که با کمک یک یون مس این اتصال صورت می گیرد. جایگزینی کوفاکتور مسی با یون نقره باعث قفل شدن این گیرنده برای اتصال به اتیلن می شود (Sarmast & Salehi, 2021). همچنین کاهش عملکرد اتیلن به واسطه اکسید شدن اتیلن به وسیله یک سیستم آنزیمی یون فلزی صورت می گیرد (Zhao et al., 2002). همکاران (Alimoradi و همکاران (۲۰۱۳) گزارش دادند که اتیلن باعث افزایش فعالیت آنزیم کلروفیلاز و تخریب غشاء داخلی کلروپلاست می شود، در حالی که نیترات نقره ۱۰۰ پی پی ام باعث کاهش تولید اتیلن و کاهش تخریب کلروفیل در گل آلسترومریا می شود.

نانوقره در غلظت بهینه امکان محافظت از رنگریزه ها را فراهم می کند و باعث افزایش محتوای کلروفیل گیاه دارویی بنفشه سه رنگ شده است. نقش رنگریزه های فتوسنتزی در فرآیند فتوسنتز از نظر دریافت تشعشعات فعال فتوسنتزی، کاهش دادن انرژی بالای فوتون ها و تعدیل این انرژی به منظور جلوگیری از تخریب رنگریزه ها، توسعه تشعشعات دریافتی و انتقال آن ها به مراکز واکنش در فتوسیستم ها است (Tanaka & Tanaka, 2006). افزایش میزان کلروفیل، کارتوتوئیدها تحت تیمار نانو نقره در مطالعه حاضر بر نقش حفاظتی نانو نقره به عنوان بازدارنده رادیکال آزاد دلالت می کند. در مطالعه حاضر میزان

تقریباً نسبت به دی‌اکسیدکربن غیر قابل نفوذ است. بنابراین تنها مسیر اصلی برای ورود دی‌اکسیدکربن به داخل برگ، روزنه‌ها هستند. دی‌اکسیدکربن از طریق روزنه به اتاقک زیر روزنه رفته و به داخل فضای بین سلولی سلول‌های مزوفیلی می‌رسد. این بخش از مسیر انتشار دی‌اکسیدکربن به داخل کلروپلاست، فاز گازی است. مسیر باقیمانده‌ی انتشار به سوی کلروپلاست، فاز مایع است که از لایه‌های آبی که دیواره‌های سلولی سلول‌های مزوفیل را خیس می‌کند شروع می‌شود و از میان غشاهای سلولی سیتوسول و بخش کلروپلاست ادامه می‌یابد بازماندن روزنه‌ها سبب افزایش هدایت روزنه و در نتیجه افزایش فتوستتوز شده است (Askari et al., 2014). در مطالعه حاضر حداکثر هدایت روزنه‌ای و فتوستتوز در غلظت ۵۰ پی‌پی‌ام مشاهده گردید. احتمال می‌رود نانوذرات نقره از طریق مهار کردن رادیکال‌آزاد و بهبود مسیرهای متابولیکی، موجب باز شدن روزنه‌ها شده در نتیجه سبب افزایش هدایت روزنه‌ای شده و از این طریق سبب افزایش فعالیت فتوستتوزی گیاه شود. تغییرات در فتوستتوز اغلب تا حد زیادی همسو با مصرف دی‌اکسیدکربن است. لذا با توجه به منفی بودن ضریب همستگی بین سرعت فتوستتوز و غلظت دی‌اکسیدکربن زیر اتاقک روزنه می‌توان نتیجه گرفت که با افزوده شدن سرعت فتوستتوز و مصرف دی‌اکسیدکربن از غلظت دی‌اکسیدکربن زیر اتاقک روزنه کاسته می‌شود. همچنین با توجه به معنی دار بودن ضریب همبستگی بین محتوای نسبی آب و سرعت می‌توان بیان نمود که نانوذرات نقره از طریق محتوای نسبی آب بالا در برگ می‌تواند مسیر دوم انتشار دی‌اکسیدکربن را که فاز مایع است، تسهیل و تسریع نموده و در نتیجه دی‌اکسیدکربن بیشتری جهت انجام فتوستتوز فراهم گردد (جدول ۴).

تیمارشاهد حاکی از کارایی بالاتر فتوسیستم II و افزایش کلروفیل می‌باشد.

کارایی فتوسیستم (II) به صورت نسبت (Fv/Fm) بیان می‌شود. بنابراین وجود رادیکال‌های آزاد باعث کاهش این نسبت می‌شوند. بنابراین کاهش مشاهده شده در کارایی عملکرد کوانتومی فتوسیستم (II) در شاهد، اشاره به کاهش سرعت انتقال الکترون در زنجیره انتقال الکترون کلروپلاستی دارد و کاهش پذیرنده‌های الکترون ممکن است باعث افزایش احتمال تولید رادیکال‌های آزاد شود، که این رادیکال آزاد می‌تواند به اجزای فتوسیستم (II) آسیب وارد نمایند. کند بودن روند کاهش پتانسیل عملکرد کوانتوم (II) نشانه افزایش مقدار محافظت نوری است (Li et al., 2010). در مطالعه حاضر نانونقره در غلظت‌های به کار گرفته شده سبب افزایش عملکرد کوانتومی شد که علت این افزایش را می‌توان به نقش نانوذرات نقره در افزایش توان آنتی‌اکسیدانی سلول و مهار رادیکال‌های آزاد نسبت داد (Paknejad et al., 2007). بنابراین به نظر می‌رسد غلظت مطلوب از نانونقره، تاثیر مثبت بر ظرفیت پذیرش و انتقال الکترون دارد و باعث می‌شود سیستم به کندی به (Fm) برسد.

محلول پاشی با ۵۰ پی‌پی‌ام از نانونقره‌ها کمترین افزایش هدایت روزنه‌ای را نسبت به شاهد نشان داد. حساس‌ترین شاخص برای بررسی وضعیت فیزیولوژیکی گیاه به ویژه، تحت شرایط الیستورها، بررسی رفتار روزنه‌ها است. روزنه‌ها نقش بسیار حیاتی در توازن اتلاف آب از گیاهان و فرایند فتوستتوز و نیز سازگاری آن‌ها به محیط اطراف ایفا می‌کند. اصولاً هدایت روزنه‌ای معیاری از وضعیت باز ماندن روزنه‌ها است. در دسترس بودن دی‌اکسیدکربن در کلروپلاست توسط هدایت روزنه‌ای تنظیم می‌شود (Hopkinsho et al., 1999). کوتیکول سطح برگ،

و اساسس ها بوده است (Ebrahimzadeh et al., 2010). کوئرسیتین یکی فلاونول و همچنین از قوی ترین آنتی اکسیدان های طبیعی به حساب می آید. اثرات آنتی اکسیدانی کوئرسیتین ناشی از مهار کردن رادیکالها، شلاته کردن فلزات و تحریک بیان آنزیم های آنتی اکسیدانی است. روتین یکی از معروفترین فلاونوئیدهاست که به فرم گلیکوزید می باشد و یک ترکیب پلی فنلی است که خاصیت آنتی اکسیدانی و آنتی باکتری دارد. روتین با اتصال به یون Fe^{2+} و ممانعت از اتصال آن به پراکسید هیدروژن در جلوگیری از واکنش های رادیکال آزاد که ممکن است به سلول صدمه بزنند نقش دارد (Anand David et al., 2016). به علاوه روتین به عنوان یک عامل مهار کننده فاکتور رشد در کنترل برخی از سرطانها نقش دارد. قدرت آنتی اکسیدانی ترکیبات فلاونوئیدی با افزایش تعداد گروه های هیدروکسیل رابطه مستقیم دارد (Koda et al., 2008). در اکثر مطالعات گزارش شده است بین ترکیبات فلاونوئیدی با فعالیت آنتی اکسیدانی رابطه معنی داری وجود دارد (JURCA et al., 2019). نتایج مطالعه حاضر نشان داد، حضور ترکیبات فلاونوئیدی نظیر روتین، کوئرسیتین و آپیزین در عصاره گیاه بنفشه سه رنگ با فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره رابطه مستقیم دارد (جدول ۳). این بدین معنا است که افزایش ترکیبات فلاونوئیدی سبب افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی گیاه می شود. در نهایت نتایج بدست آمده در آنالیز ترکیبات فلاونوئیدی عصاره برگ بنفشه و نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر، مهر تاییدی به نوآوری این پژوهش می زند.

قندهای محلول و نامحلول: قندهای محلول گروهی از اسمولیت های سازگارند که در شرایط خشکی تجمع یافته و به عنوان عامل محافظت اسمزی عمل می نماید و افزایش قندها در اثر تنش با تنظیم اسمزی و نگهداری تورژسانس و همچنین با پایدار کردن غشاها و

تاثیر نانو نقره بر محتوای نسبی آب: نتایج ما در این پژوهش نشان داد که نانو نقره سبب افزایش میزان محتوای نسبی آب نسبت به شاهد شد. نانو نقره توانست با بسته تر نگه داشتن روزهها به طور قابل ملاحظه ای کمبود آب گیاه را جبران کند، محتوای نسبی آب گیاه را افزایش دهد و از این طریق از صدمه به گیاه جلوگیری کند. بنابراین، استفاده از نانو نقره می تواند با افزایش مقاومت روزه ای، میزان هدر رفت آب گیاه را کاهش دهد. مشخص شده است که وضعیت آبی برگ با هدایت روزه ای همبستگی دارد (Rodríguez et al., 2005). نانوذرات به واسطه خاصیت آبدوستی با آزاد کردن کم کم ذرات آب به گیاه کمک می نمایند که در شرایط تنش به خوبی عمل نمایند (Sabertanha et al., 2017). در مطالعه حاضر به نظر می رسد نانو نقره بدلیل خاصیت آنتی اکسیدانی خود از گیاه در برابر تنشها محافظت می کند. لذا با افزایش دادن مقاومت روزه ای میزان تعرق راکاهش می دهد و از هدر رفت آب جلوگیری می کند و از این طریق سبب بهبود وضعیت آبی گیاه و افزایش محتوای نسبی آب، بهبود رشد، عملکرد بیولوژیک گیاه بنفشه سه رنگ و افزایش فعالیت فتوسنتزی گیاه شود.

شناسایی فلاونوئیدهای غالب در برگ گیاه *Viola tricolor L.* با HPLC: طبق مشاهدات، روتین با مقدار ۴/۴۱ میکرو گرم بر گرم بیشترین ترکیبات فلاونوئیدی موجود در عصاره متانولی برگ بنفشه سه رنگ بود فلاونوئیدها بازدارنده های قوی رادیکال های هیدروکسیل و پراکسید هستند. گونه بنفشه سه رنگ یک گیاه دارویی سنتی است که منبعی غنی از ترکیبات فلاونوئیدی همچون روتین، کوئرسیتین و کامپفرول و یولاننتین، و یولانگزاننتین، و یولا کوئرسیتین ویتگس، گلیکوزیدهای آنتوسیانیدین و مقادیری ساپونین، آسکوربیک اسید و آلفا توکوفرول و آکالوئید

مطالعه حاضر نانو نقره از طریق حفظ مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی و احتمالاً با حفظ ساختار و فعالیت روبیسکو باعث افزایش مقدار قندها میشود.

نتیجه‌گیری کلی

ورود نانوذرات نقره به عنوان الیسیتور زیستی کارآمد به بخش کشاورزی موجب افزایش بهبود بخشیدن بیوستز متابولیت‌های ثانویه و کیفیت گیاه می‌شود. بررسی‌ها نشان داد محتوای نسبی آب، هدایت روزنه‌ای، غلظت کلروفیل‌های a و کل، فلورسانس بیشینه، کربوهیدرات محلول و فعالیت آن‌تی‌اکسیدانی در گیاهان تیمار شده بیشتر بود. مقدار فتوستز در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نسبت به کنترل و سطوح دیگر افزایش معنی‌دار نشان داد. کاهش قند نامحلول در ۵۰ پی‌پی‌ام منعکس کننده افزایش تقاضای انرژی برای رشد است. بنابراین بکارگیری الیسیتور زیستی نسبت به الیسیتورهای شیمیایی به عنوان تکنیکی در جهت بهبود کیفیت محصول در صنعت کشاورزی ضروری به نظر می‌رسد. در مجموع نتایج این پژوهش نشان می‌دهد کاربرد ۵۰ پی‌پی‌ام نانوذرات نقره به عنوان محرکی در جهت افزایش توان آن‌تی‌اکسیدانی، افزایش ترکیبات فلاونوئیدی گیاه بنفشه سه رنگ، تغییر در رنگیزه‌ها، کارایی فتوستزی و فتوشیمیایی فتوسیستم گیاه بنفشه سه رنگ کم می‌کند. با توجه به کاربردهای دارویی گیاه بنفشه سه رنگ و اهمیت آن در صنعت داروسازی، در مطالعه حاضر، محلول‌پاشی با نانوذرات نقره به عنوان روشی که بتوان کیفیت محصول این منبع دارویی مهم را ارتقا داد پیشنهاد می‌گردد.

پروتئین‌ها در ارتباط است (Bohnert et al., 1995). تغییرات کربوهیدرات‌ها به دلیل ارتباط مستقیم شان با فرآیندهای فیزیولوژیکی نظیر فتوستز، انتقال و تنفس اهمیت خاصی دارند. در تحقیق حاضر نانو نقره موجب افزایش میزان قندهای محلول نسبت به شاهد و دو سطح دیگر شده است. در مطالعه حاضر نانوذرات نقره، میزان تعادل آب درون سلولی را تنظیم کرده و سبب تغییرات فراساختاری در اندامک‌های سلولی و آنزیم‌های مسیر متابولیسم قندها میشود. همچنین نانونقره ممکن است سبب فعالیت آنزیم اینورتاز را کاهش دهد. به دنبال تجمع نانو نقره در سلول، میزان کربوهیدرات‌ها در برگ‌ها افزایش می‌یابد. در واقع افزایش قندها یک نوع مکانیسم تطابقی و سازگار یافته برای حفظ و نگهداری پتانسیل اسمزی در گیاه است (Ghosh & Singh, 2005). تجمع کربوهیدرات‌ها در حفظ غشای سلولی و تنظیم اسمزی موثر است (Sato et al., 2004). علت افزایش قندهای محلول در مطالعه حاضر به علت این است که نانو نقره جذب عناصری مانند Mg، Fe و Mn را افزایش می‌دهد. این عناصر در ساختار کلروفیل و کمپکس آزاد کننده اکسیژن در فتوسیم II نقش دارند. به این ترتیب میزان فتوستز و قندهای حاصل از فعالیت فتوستزی نیز افزایش می‌یابد. کاهش مقدار نشاسته نیز بر اثر نانونقره دلیلی بر این ادعاست که نشاسته تجزیه شده و قندهای محلول را ایجاد می‌کند. افزایش نسبت ساکارز به نشاسته و تجزیه نشاسته همچنین کاهش انتقال ساکارز به خارج از برگ‌ها منجر به افزایش کربوهیدرات‌های محلول می‌گردد (Alaoui-Sossé et al., 2004).

References

- Abou-Zeid, H.M., and Moustafa, Y. (2014). Physiological and cytogenetic responses of wheat and barley to silver nanopriming treatment. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, 5(3): 265-278.
- Ahmed, S., Saifullah, Ahmad, M., Swami, B.L., and Ikram, S. (2016). Green synthesis of silver nanoparticles using *Azadirachta indica* aqueous leaf extract. *Journal of Radiation Research*

- and Applied Sciences, 9(1): 1–7.
- Alaoui-Sossé, B., Genet, P., Vinit-Dunand, F., Toussaint, M.L., Epron, D., & Badot, P. M. (2004). Effect of copper on growth in cucumber plants (*Cucumis sativus*) and its relationships with carbohydrate accumulation and changes in ion contents. *Plant Science*, 166(5): 1213–1218.
- Alimoradi, M., Jafararpour, M., Golparvar, A., and others. (2013). Improving the keeping quality and vase life of cut Alstroemeria flowers by post-harvest nano silver treatments. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences (IJACS)*, 6(11): 632–635.
- Anand David, A.V., Arulmoli, R., and Parasuraman, S. (2016). Overviews of biological importance of quercetin: A bioactive flavonoid. *Pharmacognosy Reviews*, 10(20):84–89.
- Anderson, M.D., Prasad, T.K., and Stewart, C.R. (1995). Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. *Plant Physiology*, 109(4): 1247–1257.
- Askari, M., Saffari, V.R. and A.A.M.M. (2014). Study of some physiological characteristics and yield of corn hybrids (*Zea mays* L.) under salinity stress conditions. *Journal of Production and Processing of Crop and Gardening*, 3(9):93–103.
- Bhakya, S., Muthukrishnan, S., Sukumaran, M., and Muthukumar, M. (2016). Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their antioxidant and antibacterial activity. *Applied Nanoscience*, 6(5):755–766.
- Bohnert, H.J., Nelson, D.E., and Jensen, R.G. (1995). Adaptations to environmental stresses. *The Plant Cell*, 7(7): 1099.
- Bondarian, F., Omid, M., and Torabi, S. (2013). The effect of nanoelicitors on alkaloid production of *Papaver somniferum* in suspension cell culture. Msc thesis Azad university of Tehran. 2013, (In Persian).
- Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M., and Chern, J.C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colometric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3): 178–182.
- Chartzoulakis, K., Patakas, A., Kofidis, G., Bosabalidis, A., & Nastou, A. (2002). Water stress affects leaf anatomy, gas exchange, water relations and growth of two avocado cultivars. *Scientia Horticulturae*, 95(1–2): 39–50.
- Chehregani Rad, A., Khorzaman, N., LariYazdi, H., and Shirkhani, Z. (2016). Changes in growth characteristics and physiological indices in Zn-Stressed *Phaseolus vulgaris* plants on hydroponic medium. *Developmental Biology*, 8(2): 31–39.
- De Palma, L. (1998). Photosynthetic characteristics of six Pistachio cultivars. X GREMPA Seminar= Xeme Colloque Du GREMPA. Zaragoza: CIHEAM-IAMZ: 45–49.
- Ebrahimzadeh, M.A., Nabavi, S.M., Nabavi, S.F., Bahramian, F., Bekhradnia, A.R., and others. (2010). Antioxidant and free radical scavenging activity of *H. officinalis* L. var. *angustifolius*, *V. odorata*, *B. hyrcana* and *C. speciosum*. *Pak J Pharm Sci*, 23(1):29–34.
- Ehsan Pour, A.A., and Nejati, Z. (2013). Effect of nanosilver on chlorophyll, gibberellic acid content and electrophoresis pattern of proteins of potato (*Solanum tuberosum* L.) under in vitro culture. *Applied Biology*, 25(2):13–26.
- Ghosh, M., and Singh, S.P. (2005). A comparative study of cadmium phytoextraction by accumulator and weed species. *Environmental Pollution*, 133(2): 365–371.
- Hashemi, H., Secrets, Z., and Poursidi, S. (2015). The effect of biosynthesized silver nanoparticles on growth characteristics and flavonoid content of wheat. *Journal of Agriculture*, 111: 49–54.
- Hazrati Jahan, R., Zare, N., Dezhsetan, S., and Sheikhzadeh Mosaddeg, P. (2017). Enhanced Taxol production in cell suspension cultures of hazelnut (*Corylus avellana* L.) by combination of elicitor and precursor. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, 33(1):73–89.
- Irigoyen, J.J., Einerich, D.W., and Sánchez- Díaz, M. (1992). Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Physiologia Plantarum*, 84(1):55.
- Jensen, A. (1978). Chlorophylls and carotenoids. In 'Handbook of phycological methods: physiological and biochemical methods'. (Ed. JS Craigie) PP:59-70. Cambridge University

- Press: Cambridge.
- Jurca, T., Pallag, A., Marian, E., and Eugenia, M. (2019). The histo-anatomical investigation and the polyphenolic profile of antioxidant complex active ingredients from three viola species. *farmacia*, 67(4): 634–640.
- Kayhani Behrouz, M., Mohammad Parast, B., and Qanati, F. (2013). Investigating the effect of silver nanoparticles on some secondary metabolites of (*Achillea millefolium* L.) Thesis, University of Malayer.
- Keshari, A.K., Srivastava, R., Singh, P., Yadav, V.B., and Nath, G. (2020). Antioxidant and antibacterial activity of silver nanoparticles synthesized by *Cestrum nocturnum*. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*, 11(1):37–44.
- Khatami, M., and Pourseyedi, S. (2015). Phoenix dactylifera (date palm) pit aqueous extract mediated novel route for synthesis high stable silver nanoparticles with high antifungal and antibacterial activity. *IET Nanobiotechnology*, 9(4):184–190.
- Kheiry, A., Tori, H., and Mortazavi, N. (2017). Effects of drought stress and jasmonic acid elicitors on morphological and phytochemical characteristics of peppermint (*Mentha piperita* L.). *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, 33(2): 268–280.
- Koda, T., Kuroda, Y., and Imai, H. (2008). Protective effect of rutin against spatial memory impairment induced by trimethyltin in rats. *Nutrition Research*, 28(9):629–634.
- Khodayari M, Omidi M, Shah Nejat Bushehri A, Yazdani D, Naqvi MR and Kadkhoda Z . (2015). Effect biological elicitor and nano elicitor on increasing the production of alkaloids in opium poppy (*Papaver somniferum*). *Iran. Horticult. Sci.* 2015; 45: 287-295.
- Kumar, V., Parvatam, G., and Ravishankar, G. A. (2009). AgNO₃: a potential regulator of ethylene activity and plant growth modulator. *Electronic Journal of Biotechnology*, 12(2): 8–9.
- Li, G., Wan, S., Zhou, J., Yang, Z., and Qin, P. (2010). Leaf chlorophyll fluorescence, hyperspectral reflectance, pigments content, malondialdehyde and proline accumulation responses of castor bean (*Ricinus communis* L.) seedlings to salt stress levels. *Industrial Crops and Products*, 31(1):13–19.
- Lichtenthaler, H.K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148:350–382.
- Maxwell, K., and Johnson, G. N. (2000). Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51(345):659–668.
- Mehrian, S.K., and Karimi, N. (2017). Biological testing of the chemically synthesized silver nano-particles for nitrate, chloride, potassium and sodium contents, and some physiological and biochemical characteristics of tomato plants. *Indian Journal of Plant Physiology*, 22(1):48–55.
- Mehta, P., Jajoo, A., Mathur, S., and Bharti, S. (2010). Chlorophyll a fluorescence study revealing effects of high salt stress on Photosystem II in wheat leaves. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(1):16–20.
- Najafi, S., Heidari, R. and 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*: 2812-2816.
- Namdeo, A.G., & others. (2007). Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. *Pharmacogn Rev*, 1(1):69–79.
- Paknejad, F., Nasri, M., Moghadam, H.R.T., Zahedi, H., and Alahmadi, M.J. (2007). Effects of drought stress on chlorophyll fluorescence parameters, chlorophyll content and grain yield of wheat cultivars. *J. Biol. Sci*, 7(6): 841–847.
- Parsa, M., Zeinali, A., & others. (2016). Effects of salicylic acid elicitor on the production of tropane alkaloids (atropine and scopolamine) in hairy roots and in vitro roots cultures of *Hyoscyamus niger* L. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 32(4).
- Patra, J.K., and Baek, K.H. (2016). Biosynthesis of silver nanoparticles using aqueous extract of silky hairs of corn and investigation of its antibacterial and anticandidal synergistic activity and antioxidant potential. *IET Nanobiotechnology*, 10(5): 326–333.
- Rai, P.K., Kumar, V., Lee, S.S., Raza, N., Kim, K.H., Ok, Y.S., and Tsang, D.C.W. (2018). Nanoparticle-plant interaction: Implications in energy, environment, and agriculture.

- Environmental International, 119:1-19.
- Ramezani, M., Asghari, S., Gerami, M., Ramezani, F., and Abdolmaleki, M. K. (2019). Effect of silver nanoparticle treatment on the expression of key genes involved in glycosides biosynthetic pathway in *Stevia rebaudiana* B. *Plant. Sugar Tech*: 1-10.
- Ramezani, M., Gerami, M., and Majlesi, Z. (2019). Comparison between various concentrations of commercial and synthesized silver nanoparticles on biochemical parameters and growth of *Stevia rebaudiana* B. *Plant Physiology Reports*, 24(1): 141-152.
- Riahi-Madvar, A., Yousefi, K., and Nasiri-Bezenjani, M. (2014). Positive effect of Cu and yeast extract elicitors on the content of rosmarinic acid in *Melissa officinalis* L. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, 30(5):714-723.
- Ribaut, J. M., Bertioli, D. J., Raatz, B., Roberts, P., Vadez, V., Varshney, R. K., and Diop, N. N. (2012). Innovative approaches to increase tropical legume productivity in Africa and South Asia. *Proceedings of International Conference on Legume Genetics and Genomics (ICLGG) VII-GAB01*.
- Rigane, G., Younes, S. Ben, Ghazghazi, H., and Salem, R. Ben. (2013). Investigation into the biological activities and chemical composition of *Calendula officinalis* L. growing in Tunisia. *International Food Research Journal*, 20(6): 3001.
- Ritchie, S. W., Nguyen, H.T., and Holaday, A.S. (1990). Leaf water content and gas-exchange parameters of two wheat genotypes differing in drought resistance. *Crop Science*, 30(1): 105-111.
- Rodríguez, P., Torrecillas, A., Morales, M. A., Ortuño, M.F., and Sánchez-Blanco, M. J. (2005). Effects of NaCl salinity and water stress on growth and leaf water relations of *Asteriscus maritimus* plants. *Environmental and Experimental Botany*, 53(2): 113-123.
- Rosen, W. G., Meyer, B. S., Anderson, D. B., Böhring, R. H., and Bohning, R. H. (1960). *Introduction to Plant Physiology*. In *AIBS Bulletin* (Vol. 10, Issue 3). John Wiley and Sons.
- Sabertanha, B., Fakheri, B., Mahdinezhad, N. and Alizade, Z. (2017). 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.). *Crop Biotech. Spring*, 17: 1-13.
- Sarmast, M. K., and Salehi, H. (2021). Sub-lethal concentrations of silver nanoparticles mediate a phytostimulatory response in tobacco via the suppression of ethylene biosynthetic genes and the ethylene signaling pathway. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*:1-14.
- Sato, F., Yoshioka, H., Fujiwara, T., Higashio, H., Uragami, A., and Tokuda, S. (2004). Physiological responses of cabbage plug seedlings to water stress during low-temperature storage in darkness. *Scientia Horticulturae*, 101(4): 349-357.
- Tanaka, A., and Tanaka, R. (2006). Chlorophyll metabolism. *Current Opinion in Plant Biology*, 9(3): 248-255.
- Thirumurugan, A., Tomy, N. A., Ganesh, R. J., Gobikrishnan, S., and others. (2010). Biological reduction of silver nanoparticles using plant leaf extracts and its effect on increased antimicrobial activity against clinically isolated organism. *Der Pharma Chemica*, 2(6):279-284.
- Vukics, V., Hevesi Toth, B., Ringer, T., Ludanyi, K., Kery, A., Bonn, G.K., and Guttman, A. (2008). Quantitative and qualitative investigation of the main flavonoids in heartsease (*Viola tricolor* L.). *Journal of Chromatographic Science*, 46(2):97-101.
- Zhao, X.-C., Qu, X., Mathews, D.E., and Schaller, G. E. (2002). Effect of ethylene pathway mutations upon expression of the ethylene receptor ETR1 from *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 130(4): 1983-1991.