

## Original article

# Sodium nitroprusside to enhance wheat drought tolerance in water deficit conditions

Sakineh Moradkhani\* 

Assistant Professor, Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran

Received 16 July 2024; Revised 5 October 2024; Accepted 7 October 2024

## Extended abstract

### Introduction

The economic importance of wheat, both in terms of production and nutrition, is greater than that of other agricultural crops in the world. Wheat has a special place in terms of production and area under cultivation, and increasing its yield depends on certain factors, among which determining its water requirement is of great importance. Failure to meet the water requirement of wheat plants causes water stress in the plant, and the yield of the plant's grain decreases depending on the severity of the stress. Iran has a warm and dry climate and its annual rainfall is low. In addition, the distribution of rainfall is also inappropriate in Iran, and the rainiest regions of Iran also need irrigation in the summer. The presence of sufficient water is essential to maintain turgor pressure, growth, and physiological processes in plant cells. Plants maintain osmotic pressure in cells under drought stress conditions using physiological mechanisms. One of these mechanisms is the biosynthesis of metabolites such as soluble sugars, potassium, free organic acids, and chlorides. Studies have shown that water deficit stress causes growth reduction, leaf area reduction, stomatal closure, photosynthetic pigment reduction, photosynthesis reduction, enzyme degradation, and oxidative damage. Water deficit stress is one of the main factors reducing the quantity and quality of agricultural products worldwide, and one of its most common effects is the disruption of the production and quenching of reactive oxygen species (ROS). Reactive oxygen species are highly reactive and, in the absence of effective protective mechanisms, cause cell damage including serious damage to the plant by lipid peroxidation, protein degradation, and DNA chain breakage. Plant cells tolerate reactive oxygen species using endogenous mechanisms such as enzymatic and non-enzymatic mechanisms. It is thought that plants first detect water deficit conditions in the roots, then several molecular messages are transmitted from the roots to the stems. Finally, a phytohormone, abscisic acid (ABA), is mainly synthesized in leaves. However, the precise molecular mechanisms of stress sensors and regulators that initiate ABA biosynthesis in response to water stress conditions are still unclear. Additionally, there are few studies that indicate that the nitric oxide molecule (NO) is one of these signaling molecules in sensing and responding to water stress. Many studies have shown the role of the nitric oxide signaling molecule in growth, development, and defense responses. Sodium nitroprusside (SNP) is a water-soluble salt consisting of iron combined with NO and five cyanide ions. This compound acts as a nitric oxide generator. Various studies have shown that sodium nitroprusside, as a nitric oxide generator, delays senescence and reduces chlorophyll and protein degradation in some plants, including wheat. However, there are few details regarding the role of exogenous NO signaling in modulating water deficit stress. Developing suitable methods to enhance plant tolerance under water-deficient conditions is of great importance. The objective of the present research was to investigate the effects of sodium nitroprusside on nitric oxide signaling and induction of the antioxidant defense mechanisms of wheat (*Triticum aestivum* L.) (Gaskogen genotype) under water-deficient conditions.

### Materials and methods

The experiment was conducted in a completely randomized design with three replicates to examine the effects of drought and sodium nitroprusside on wheat morphological and physiological traits. The

\* Corresponding author: Sakineh Noradkhani; E-Mail: [S.Moradkhani@pnu.ac.ir](mailto:S.Moradkhani@pnu.ac.ir)

experiment was conducted in the Biology Laboratory of Payame Noor University, Khoy, in 2021. Germinated seeds were transferred to pots containing perlite and pretreated with 0.2 mM sodium nitroprusside and full-strength Hoagland's solution immediately before the water-deficit treatment was imposed.

### **Results and discussion**

According to the analysis of variance, the effects of the treatments and their interactions were significant on the morphological and physiological traits of the seedlings. Sodium nitroprusside treatment increased nitric oxide levels on the second day, whereas the highest nitric oxide levels in the other treatments were observed on the third day of seedling growth. Plant fresh weight and photosynthetic pigment contents were significantly increased by sodium nitroprusside under water-deficient conditions compared with the control. Hydrogen peroxide levels and the lipid peroxidation index were significantly reduced due to the antioxidant activity induced by sodium nitroprusside treatment.

### **Conclusion**

Overall, treating wheat (Gaskogen genotype) with sodium nitroprusside under control and water-deficit conditions enhanced wheat tolerance in water-deficit conditions by early activation of nitric oxide signaling and the induction of antioxidant responses, including the synthesis of antioxidant enzymes. The application of sodium nitroprusside is recommended to alleviate the adverse effects of water-deficit stress on wheat growth and physiology.

### **Acknowledgments**

The author would like to thank Abtinberkeh Scientific Ltd. Company (<https://Abtinberkeh.com>), including Abtinberkeh Academy (<https://Academy.Abtinberkeh.com>), Isfahan, Iran, for editing and revising the manuscript to meet the journal's format requirements.

**Keywords:** Antioxidant enzymes, Hoagland's solution, Hydrogen peroxide, Plant protein, Oxidative stress

## استفاده از سدیم نیتروپروساید برای افزایش تحمل گندم در تنش کم آبی

سکینه مرادخانی\*

استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران

چکیده	مشخصات مقاله
<p>ارائه روش‌های مناسب برای افزایش تحمل گیاه در شرایط تنش حائز اهمیت فراوان است. این پژوهش با هدف بررسی تأثیر سدیم نیتروپروساید بر پیام‌رسانی نیتریک‌اکساید و تحریک دفاع آنتی‌اکسیدانی به منظور افزایش تحمل تنش کم آبی در گیاه گندم رقم گاسکوژن حساس به تنش کم آبی به صورت طرح کاملاً تصادفی با تیمارهای کنترل، کم آبی و نیتروپروساید، در آزمایشگاه زیست‌شناسی دانشگاه پیام نور مرکز خوی در سال ۱۴۰۰ انجام شد. پس از جوانه‌زنی بذرها، دانه‌رست‌ها به گلدان حاوی پرلیت منتقل شده و قبل از شروع تنش کم آبی با ۰/۲ میلی‌مولار سدیم نیتروپروساید و محلول هوگلند ۱۰۰ درصد پیش‌تیمار شدند. ویژگی‌های مرفولوژیکی و فیزیولوژیکی گیاهچه‌ها بررسی گردیدند. آنالیز واریانس مشخص نمود که اثرات تیمارهای آزمایش بر پارامترهای گیاه معنی‌دار بود. تیمار سدیم نیتروپروساید باعث افزایش زودهنگام سطح نیتریک‌اکساید در روز دوم شد، در حالی که اوج غلظت نیتریک‌اکساید در سایر تیمارها (کنترل و کم آبی) در روز سوم مشاهده گردید. وزن تر و رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی با پیش‌تیمار سدیم نیتروپروساید نسبت به تنش کم آبی بدون پیش‌تیمار، افزایش معنی‌دار داشتند. میزان پراکسید هیدروژن و شاخص پراکسیداسیون چربی‌های غشایی در نتیجه‌ی افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در تیمارهای سدیم نیتروپروساید به‌طور معنی‌دار کاهش یافت. نتایج کلی نشان داد که تیمار گیاه گندم رقم گاسکوژن با سدیم نیتروپروساید و نیز تیمار توأم سدیم نیتروپروساید با تنش کم آبی، با افزایش زودهنگام سطح نیتریک‌اکساید، پیام‌رسانی، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و تحریک زودهنگام دفاع آنتی‌اکسیدان، باعث درک زودهنگام، پاسخ سریع‌تر به تنش کم آبی و افزایش تحمل تنش در این گیاه شد. استفاده از مولکول نیتروپروساید برای افزایش تحمل گونه‌های حساس به کم آبی گندم در شرایط تنش پیشنهاد می‌گردد.</p>	<p>واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان پراکسید هیدروژن پروتئین گیاه تنش اکسیداتیو محلول هوگلند</p> <p>تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۴/۲۶ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۷/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۷/۱۶</p> <p>تاریخ انتشار: بهار ۱۴۰۵ ۳۹-۲۳ (۱): ۱۹</p>

### مقدمه

فشار تورژسانس، رشد و فرآیندهای فیزیولوژیک در سلول گیاهی ضروری است. گیاهان در شرایط تنش خشکی با استفاده از مکانیسم‌هایی، فشار اسمزی را در سلول‌ها حفظ می‌کنند. یکی از این مکانیسم‌ها بیوسنتز متابولیت‌هایی مانند قندهای محلول، پتاسیم، اسیدهای آلی آزاد و کلریدها است (Mohammad Aslam et al., 2022). مطالعات نشان داده است که تنش کم آبی باعث کاهش رشد، کاهش سطح برگ، بسته شدن روزنه‌ها، کاهش رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی، کاهش فتوسنتز، تخریب آنزیم‌ها و آسیب اکسیداتیو می‌شود (Ullah et al., 2021). تنش کم آبی یکی از اصلی‌ترین عوامل کاهش کمیت و کیفیت محصولات کشاورزی در کل جهان است و از متداول‌ترین اثرات آن ایجاد اختلال در تولید و خاموش‌سازی

اهمیت اقتصادی گندم چه از نظر تولید و چه از نظر تغذیه در دنیا بیش از سایر محصولات کشاورزی است (Emam, 2007). گندم از نظر تولید و سطح زیر کشت جایگاه ویژه‌ای دارد و افزایش عملکرد محصول آن تابع عوامل خاصی است که در این میان تعیین‌کننده‌ی نیاز آبی آن از اهمیت شایانی برخوردار است. عدم تأمین نیاز آبی گیاه گندم موجب بروز تنش کم آبی در گیاه می‌شود و عملکرد دانه‌ی گیاه بسته به شدت تنش کاهش می‌یابد (Emam et al., 2007). کشور ایران دارای اقلیم گرم و خشک بوده و میزان بارندگی سالانه‌ی آن کم است. علاوه بر این، توزیع بارندگی نیز در ایران نامناسب بوده و پرباران‌ترین مناطق ایران در فصل تابستان هم نیاز به آبیاری دارند (Shaban et al., 2010). وجود آب کافی برای حفظ

هیپوکلریت سدیم به مدت پنج دقیقه، در پرلیت و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد تا زمان جوانه‌زنی در آزمایشگاه نگهداری شد. پس از جوانه‌زنی بذرها، دانه‌رست‌ها به گلدان (یک گیاه در هر گلدان) حاوی پرلیت منتقل شده و قبل از شروع تنش کم‌آبی با ۰/۲ میلی‌مولار سدیم نیتروپروساید و محلول هوگلند ۱۰۰ درصد پیش‌تیمار شدند. این پژوهش به صورت طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار طی سال ۱۴۰۰ در آزمایشگاه زیست‌شناسی (درجه حرارت اتاق، نور فلورسنت) دانشگاه پیام نور مرکز خوی انجام شد. آزمایش دارای چهار تیمار ترکیبی شامل دو سطح رطوبتی (۱۰۰ درصد و ۲۵ درصد ظرفیت زراعی مزرعه) و دو سطح SNP (صفر و ۰/۲ میلی‌مولار) به صورت پیش‌تیمار (محلول پاشی) سه روز قبل از شروع تنش کم‌آبی به‌عنوان تیمارهای آزمایش استفاده شدند. برای کنترل از آب مقطر استفاده گردید. در روزهای یک تا شش از شروع تنش کم‌آبی، میزان بیوسنتز مولکول‌های نیتریک‌اکساید و همچنین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاهان پایش شد. پس از پایان هفته‌ی دوم (مرحله ۴ برگ‌گی) پارامترهای رشد شامل رشد اندام هوایی و ریشه، محتوای پراکسید هیدروژن و شاخص پراکسیداسیون چربی‌های غشایی اندازه‌گیری شد.

پروتئین‌های محلول کل نمونه‌ها به روش بردفورد (Bradford, 1976) اندازه‌گیری شد. به‌منظور سنجش مولکول NO، از روش فرسی و همکاران (Foresi et al., 2016) و به‌منظور سنجش میزان پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ ) از روش هاریناسوت (Harinasut et al., 2003) استفاده گردید. شدت پراکسیداسیون چربی‌های غشایی توسط سنجش میزان مالون دی‌آلدئید (MDA) تولیدشده مشخص گردید (Heath and Packer, 1968). به‌منظور سنجش فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) از روش (Giannopolitis and Ries, 1977) و به‌منظور سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز (POD) از روش چانس و ماهلی (Chance and Maehly, 1955) استفاده شد. فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) با روش سیمون و همکاران (Simon et al., 1974)؛ و فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) مطابق با روش بومیناتان و دران (Boominathan and Doran, 2002) برحسب میکرومول آسکوربیک اسید در میلی‌گرم پروتئین در دقیقه محاسبه شد.

گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) است (Ozturk et al., 2021). گونه‌های فعال اکسیژن بسیار واکنش‌پذیر بوده و در صورت عدم وجود سازوکارهای محافظتی مؤثر، با پراکسیداسیون لیپیدها، تخریب پروتئین‌ها و شکستن زنجیره‌ی DNA باعث توقف فعالیت‌های سلول و آسیب جدی به گیاه می‌شوند (Demidchik, 2015). سلول‌های گیاهی با استفاده از سازوکارهای درون‌زا مانند سازوکارهای آنزیمی و همچنین غیر آنزیمی گونه‌های فعال اکسیژن را تحمل می‌کنند (Gechev and Petrov 2020).

تصور می‌شود که گیاهان ابتدا شرایط کمبود آب را در ریشه‌ها تشخیص می‌دهند، سپس چندین پیام مولکولی از ریشه به ساقه‌ها منتقل می‌شود. در نهایت، یک فیتوهورمون، یعنی اسید آبسزیک (ABA)، عمدتاً در برگ‌ها سنتز می‌شود. با این حال، مکانیسم‌های مولکولی دقیق حس‌گرهای تنش و تنظیم‌کننده‌هایی که بیوسنتز ABA را در پاسخ به شرایط تنش کم‌آبی آغاز می‌کنند، هنوز نامشخص است (Takahashi et al., 2020). با این وجود مطالعات اندکی وجود دارد که نشان می‌دهد مولکول نیتریک‌اکساید (NO) یکی از این مولکول‌های پیام‌رسان در درک و پاسخ به تنش کم‌آبی است (Majeed et al., 2020). در بسیاری از مطالعات نقش مولکول پیام‌رسان نیتریک‌اکساید در رشد، نمو و واکنش‌های دفاعی نشان داده شده است (Moreau et al., 2010). سدیم نیتروپروساید (SNP) یک نمک محلول در آب است که از آهن ترکیب شده با NO و پنج یون سیانور تشکیل شده است. این ترکیب به‌عنوان تولیدکننده نیتریک‌اکساید عمل می‌کند (Holme and Sharman, 2020). مطالعات مختلف نشان داده است که سدیم نیتروپروساید به‌عنوان تولیدکننده نیتریک‌اکساید باعث تأخیر پیری و کاهش تخریب کلروفیل و پروتئین در برخی گیاهان از جمله گندم می‌شود (Ullah et al., 2024). با این وجود، جزئیات کمی در رابطه با نقش پیام‌رسانی مولکول NO برون‌زا در تعدیل تنش کم‌آبی وجود دارد. در این مطالعه با استفاده از سدیم نیتروپروساید به‌عنوان دهنده‌ی NO پیام‌رسانی و نقش NO در تخفیف اثر تنش کم‌آبی در گندم رقم گاسکوژن حساس به تنش کم‌آبی بررسی شد.

#### مواد و روش‌ها

بذر گندم رقم گاسکوژن (*Triticum aestivum* cv. Gascogen) پس از استریل توسط محلول ۱۰ درصد

افزایش معنی دار این پارامترها نسبت به تیمار کم آبی شد. (جدول های ۱ و ۲).

آزمایش با استفاده از فقط یک گیاه در گلدان در طول دوره آزمایش کمتر از ۲۰ روز انجام گردید. با توجه به خصوصیات مرفولوژیکی و فیزیولوژیکی ژنوتیپ گندم و با توجه به نحوه تغذیه گیاه در مدت زمان آزمایش، رسیدن گیاهچه های به مرحله چهار برگگی پس از دو هفته محتمل است که با استفاده از روش زادوکس قابل تشخیص است. با توجه به اینکه گیاه در مرحله رشد گیاهچه دارای بیشترین حساسیت به تنش است، می توان اثرات تنش کم آبی در این مدت را بر روی رشد گیاهچه ها آزمود. گیاهان برای کاهش اثرات تنش از مکانیسم های خودتنظیمی استفاده می کنند و خصوصیات ژنی گیاه و همچنین سطح تنش، میزان مقاومت گیاه در برابر تنش را مشخص می نماید.

تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار SAS (نسخه ۲۶) انجام و برای رسم شکل ها از روش Proc Plot استفاده شد.

## نتایج و بحث

### پارامترهای رشد

اثرات تیمارهای آزمایش بر صفات مختلف به جز نیتروپروساید، سوپر اکسید دیسموتاز، پروکسید هیدروژن و آسکوربات پراکسیداز اندام هوایی، معنی دار بود (جدول ۱). تنش کم آبی باعث کاهش معنی دار زیست توده ی گندم به میزان ۵۴٪ اندام هوایی و ۸۲٪ ریشه نسبت به کنترل شد که اعمال ۰/۲ میلی - مولار سدیم نیتروپروساید باعث افزایش معنی دار میزان زیست توده در اندام های هوایی (۵۸٪) و در ریشه (۸۳٪) شد. همچنین تیمار توأم کم آبی و سدیم نیتروپروساید باعث

جدول ۱. آنالیز واریانس برای بررسی اثرات تیمارهای آزمایش بر صفات اندازه گیری شده

Table 1. Analysis of variance of the experimental treatments on the measured traits

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی d.f.	وزن خشک	وزن خشک	پروتئین	پروتئین ریشه	نیتروپروساید	پرواکسید هیدروژن
		اندام هوایی Aerial part dry weight	ریشه Root dry weight	اندام هوایی Aerial part protein	پروتئین ریشه Root protein	نیتروپروساید Nitroprusside	اندام هوایی Aerial part hydrogen peroxide
تیمارها Treatments	3	0.105**	0.003**	0.660**	2.683**	0.002	0.002**
خطا Error	8	0.002	0.000	0.049	0.007	0.001	0.000
ضریب تغییرات C.V%		17.36	13.7	4.31	3.41	55.28	6.84
منابع تغییرات S.O.V		سوپراکسید	پروکسید	آسکوربات	مالون دی آلدئید	Malondialdehyde	
		پروکسید	هیدروژن	پراکسیداز	اندام	اندام	ریشه
		هیدروژن ریشه	اندام هوایی	اندام هوایی	کاتالاز ساقه	اندام هوایی	اندام هوایی
		Root hydrogen peroxide	Aerial part superoxide dismutase	Aerial part hydrogen peroxide	Aerial part catalase	Aerial part ascorbate peroxidase	Aerial part
تیمارها Treatments	3	0.002**	22.208	18.028	174.859**	1.656	0.18**
خطا Error	8	0.000	13.282	9.770	9.384	0.650	0.002
ضریب تغییرات C.V%		7.86	25.42	34.41	17.15	12.09	5.16
							7.22

\*\* : Significant at  $P \leq 0.05$

\*\* : معنی دار در سطح ۰/۰۱

به شدت آسیب می بینند. بررسی حاضر نشان داد که تنش کم آبی رشد گندم را در مقایسه با گیاهانی که آبیاری مناسب گردیده اند به طور قابل توجهی کاهش داد. این کاهش اغلب به اختلالات القاء شده توسط تنش کم آبی در تمام ویژگی های

آنالیز واریانس اثرات معنی دار تیمارهای آزمایش یعنی کنترل، تنش کم آبی و سدیم نیتروپروساید را بر پارامترهای رشدی و ویژگی های فیزیولوژیکی گیاه در شرایط تنش مشخص نمود (جدول ۱). گیاهان پس از رشد در شرایط تنش

فعال زیستی، نقشی کلیدی در تعدادی از فرآیندهای فیزیولوژیکی گیاه، مانند تنظیم رشد و نمو، القای جوانه‌زنی بذر و غیره دارد (Hayat et al., 2010). در مطالعه‌ی حاضر، سدیم نیتروپروساید، اهداکننده‌ی نیتریک اکساید در غلظت ۰/۲ میلی‌مولار مثرم ثمر بود و وزن تر نمونه‌های ریشه و اندام‌های هوایی گیاه گندم را افزایش داد (جدول ۲). دلیل احتمالی این است که نیتریک اکساید از فعالیت اگزو- و اندو-β-D-گلوکاناز در دیواره‌ی سلولی حمایت می‌کند (Terasaki et al., 2001). این موضوع قبلاً با استفاده از جهش‌یافته‌هایی با کمبود نیتریک اکساید، با کاهش فعالیت آنزیم‌های مذکور و به تبع آن رشد محدودشده‌ی گیاه مورد تأیید قرار گرفته است. پیوند گلیکوزیدی بین واحدهای گلوکز در دیواره‌ی سلولی توسط این آنزیم‌ها شکسته می‌شود تا به سست شدن و افزایش قابلیت گسترش آن کمک کند (Zhang et al., 2003). این امر با افزایش فشار تورژانس داخلی به دنبال افزایش محتوای نسبی آب، باعث رشد می‌شود (Hayat et al., 2013).

بیوشیمیایی و ریخت‌شناختی، از جمله جلوگیری از انتقال آب و فتوآسیمیلات‌ها (Blum, 2017)، سرکوب کارایی فتوسنتزی گیاه و اختلال در بیوسنتز ATP موردنیاز برای نمو (Lawlor and Cornic, 2002) و جلوگیری از جذب یون و ظرفیت فتوسنتزی و تولید بیش‌ازحد گونه‌های فعال اکسیژن (Shehzad et al., 2020; Siddiqui et al., 2020) مرتبط است. متناوباً، کاربرد سدیم نیتروپروساید به‌عنوان اهداکننده نیتریک اکساید به‌طور مثبت رشد گیاه گندم را در شرایط کم‌آبی افزایش داد. اثر تقویتی سدیم نیتروپروساید بر پارامترهای رشد احتمالاً مربوط به سست شدن دیواره‌ی سلولی و حفاظت از دولایه‌ی فسفولیپیدی، افزایش سیالیت غشاء و حمایت گسترش سلول (Zhang et al. 2024a; Hussain et al. 2024) و نیز حذف گونه‌های فعال اکسیژن از طریق تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی (Siddiqui et al., 2020) است و نیز تغییر در بیان ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش را در ارتباط با افزایش رشد گیاه القاء می‌کند (Ahmad et al., 2016). درواقع، نیتریک اکساید، یک مولکول سیگنال

جدول ۲. مقایسه میانگین تأثیر تنش کم‌آبی و تیمار سدیم نیتروپروساید بر وزن تر اندام هوایی و ریشه‌ی گندم برای هر تیمار با استفاده از یک گیاه در گلدان

Table 2. Mean comparison of water deficit and sodium nitroprusside treatments affecting wheat fresh biomass using one plant per pot

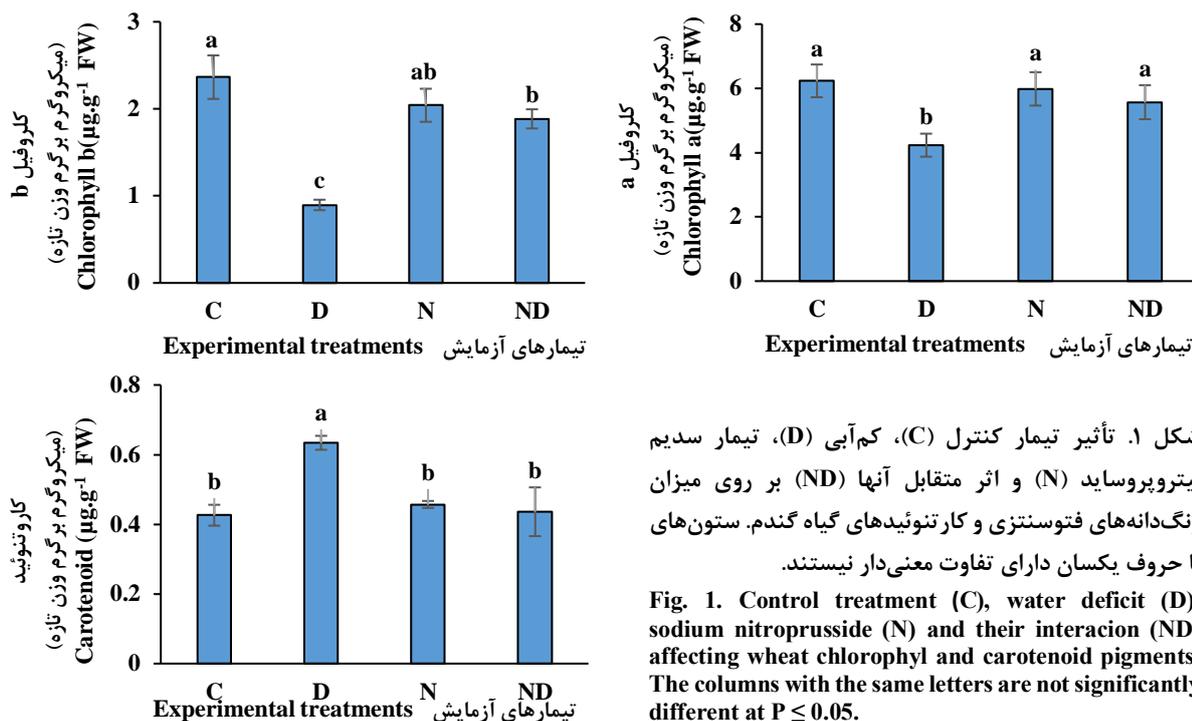
		تیمارها			
		کنترل Control	کم‌آبی Water deficit	نیتروپروساید Nitroprusside	نیتروپروساید و کم‌آبی Nitroprusside and water deficit
وزن تر اندام هوایی Aerial part fresh weight	(g.pot <sup>-1</sup> )	2.300. ± 0.25 <sup>a</sup>	1.04 ± 0.02 <sup>c</sup>	2.49 ± 0.32 <sup>a</sup>	2.26 ± 0.25 <sup>b</sup>
وزن تر ریشه Root fresh weight	(g. pot <sup>-1</sup> )	0.84 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.148 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.89 ± 0.12 <sup>a</sup>	0.75 ± 0.05 <sup>a</sup>

در هر ردیف میانگین‌هایی (همراه با انحراف معیار) که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند بر اساس آزمون دانکن تفاوت معنی‌داری ندارند. Mean values (and their corresponding standard deviation) with the same letter are not significant at  $P \leq 0.05$  using Duncan multivariate comparison

رابطه با محتوای رنگیزه‌های کارتنوئیدی، در گیاهان تحت تنش کم‌آبی افزایش قابل‌ملاحظه‌ای مشاهده گردید که با تیمار ۰/۲ میلی‌مولار سدیم نیتروپروساید محتوای این رنگیزه‌ها در حد گیاهان شاهد کاهش یافت. تیمار توأم کم‌آبی و نیتریک اکساید محتوای رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی را نسبت به تنش کم‌آبی افزایش داد ولی باعث کاهش غلظت کارتنوئیدها نسبت به تنش کم‌آبی شد (شکل ۱).

### رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی

تنش کم‌آبی باعث کاهش معنی‌دار محتوای کلروفیل a و b در گیاه گندم شد (شکل ۱). با این حال، در گیاه گندم تیمار شده با ۰/۲ میلی‌مولار سدیم نیتروپروساید میزان محتوای کلروفیل a و کلروفیل b افزایش معنی‌داری نسبت به محتوای این رنگیزه‌ها در گیاهان تحت تنش کم‌آبی نشان دادند. در



شکل ۱. تأثیر تیمار کنترل (C)، کم آبی (D)، تیمار سدیم نیتروپروساید (N) و اثر متقابل آنها (ND) بر روی میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی و کارتنوئیدهای گیاه گندم. ستون‌های با حروف یکسان دارای تفاوت معنی‌دار نیستند.

Fig. 1. Control treatment (C), water deficit (D), sodium nitroprusside (N) and their interacion (ND) affecting wheat chlorophyll and carotenoid pigments. The columns with the same letters are not significantly different at  $P \leq 0.05$ .

ساخت کلروفیل می‌گردد (Farouk and Al-Ghamdi, 2021).

#### پروتئین‌های محلول

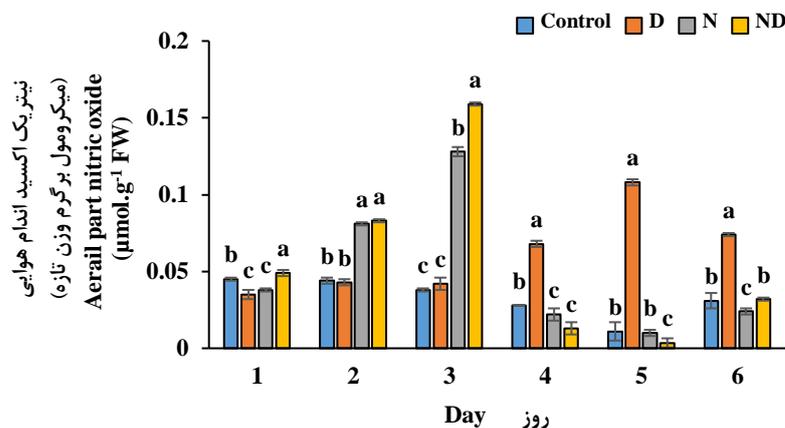
تنش کم آبی باعث افزایش غلظت پروتئین‌های محلول کل اندام‌های هوایی گندم گاسکوژن نسبت به کنترل شد، هرچند این افزایش معنی‌دار نبود. سدیم نیتروپروساید ۰/۲ میلی-مولار به تنهایی و در ترکیب با تنش کم آبی موجب اختلاف معنی‌دار با کنترل نگردید (شکل‌های ۲ و ۶). گیاهان با استفاده از مسیرهای پیام‌رسانی متفاوت برای تعدیل تنش، ترکیبات پروتئینی و غیرپروتئینی سنتز می‌کنند. در مطالعات متعدد مشابه که تنش خشکی اعمال گردیده محتوای بالای پروتئین‌ها ملاحظه گردیده است که این افزایش میزان پروتئین‌ها تحت شرایط تنش نشان‌دهنده‌ی افزایش بیوسنتز آنزیم‌های دفاعی و پروتئین‌های غیرآنزیمی دخیل در فرآیند دفاع است (Hai et al., 2020). محلول‌پاشی سدیم نیتروپروساید موجب افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، پروتئین محلول و کاهش فعالیت مالون دی‌آلدئید و در نتیجه کاهش آسیب به غشاء سلولی در گیاه در شرایط تنش خشکی گردید (Qu et al. 2023; Zhang et al. 2024a). گیاه با استفاده از افزایش غلظت پروتئین محلول موجب تنظیم غلظت اسمزی سلول در شرایط تنش می‌گردد.

در اغلب تنش‌های غیرزیستی محتوای کلروفیل کل کاهش می‌یابد که دلیل آن عمدتاً مربوط به آسیب اکسیداتیو ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن است (Ming-Yi, 1999). در مطالعه‌ی حاضر، تیمار سدیم نیتروپروساید با تعدیل تنش کم آبی از طریق کاهش گونه‌های فعال اکسیژن باعث افزایش میزان کلروفیل تا حد کنترل گردید. افزایش محتوای کلروفیل پس از تیمار با نیتریک اکساید در مطالعات قبلی نیز ملاحظه گردیده است (Pahwa et al., 2009; Hussain et al., 2024). مشخص گردیده است که نیتریک اکساید از کلروفیل‌ها در برابر آسیب ناشی از پاتوژن‌ها (Laxalt et al., 2007) محافظت می‌کند، محتوای کلروفیلی برگ را از طریق رفع بی‌رنگ شدگی افزایش می‌دهد و در سبز شدن دانه‌رست‌ها با واسطه نور شرکت می‌کند (Zhang et al., 2006). در اغلب تنش‌ها محتوای کارتنوئیدها برای محافظت از دستگاه فتوسنتزی در برابر گونه‌های فعال اکسیژن ناشی از واکنش با کلروفیل برانگیخته افزایش می‌یابد (Sairam et al., 1998). در این مطالعه نیز سدیم نیتروپروساید با کاهش آسیب اکسیداتیو ناشی از تنش باعث کاهش میزان محتوای کارتنوئید شده است. سدیم نیتروپروساید با افزایش فعالیت ژن‌هایی که موجب کاهش تجزیه کلروفیل می‌گردند، مانع از کاهش میزان کلروفیل گیاه در شرایط تنش می‌شود؛ همچنین سدیم نیتروپروساید با تنظیم هموستازی آهن از طریق کاهش فعالیت اکونیتاز، موجب تنظیم غلظت آهن در گیاه برای

(شکل‌های ۳ و ۶). نیتریک‌اکساید یک مولکول گازی پیام-رسان است که در تنش‌های زیستی و غیرزیستی با تأثیر بر فعالیت آنزیم‌های دفاعی نقش مهمی در تعدیل تنش به عهده دارد (Antoniou et al., 2013). مطابق با نتایج، سدیم نیتروپروساید به سرعت موجب افزایش نیتریک اکسید تا روز سوم گردید و سپس میزان نیتریک اکسید کاهش یافت که نشان‌دهنده استفاده مولکول نیتریک اکسید برای کاهش اثرات تنش کم‌آبی بر رشد گیاه گندم است. نیتروپروساید به‌عنوان یک دهنده نیتریک اکسید می‌تواند به‌موقع موجب افزایش میزان مولکول پیام‌رسان نیتریک اکسید گردد که می‌تواند با افزایش فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی گیاه در شرایط تنش کم‌آبی موجب کاهش اثرات تنش شود (Zhang et al., 2024b).

### فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

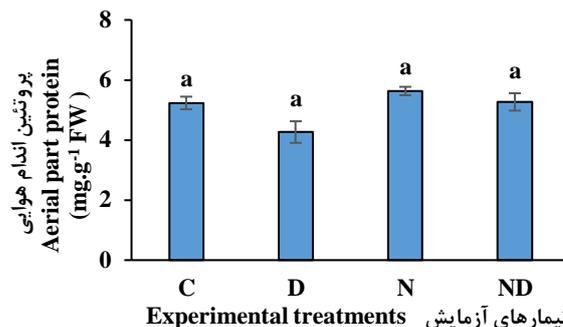
در این مطالعه، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان با اعمال تیمار سدیم نیتروپروساید نه تنها نسبت به کنترل و تنش کم‌آبی افزایش نشان داد، بلکه تغییر در فعالیت آنزیم‌ها زودتر از سایر تیمارها مشاهده شد که احتمالاً باعث درک زودتر تنش و مقابله زودتر با گونه‌های فعال اکسیژن شده است (شکل‌های ۴ و ۶).



شکل ۳. اثرات تنش خشکی (D) و سدیم نیتروپروساید (N) بر میزان مولکول نیتریک‌اکساید اندام‌های هوایی گیاه گندم. حروف یکسان نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها است.

Fig. 3. Water deficit (D) and sodium nitroprusside (N) affecting the molecule of nitric oxide in wheat aerial part. Similar letters indicate non-significant differences among experimental treatments

عدم تعادل در پتانسیل اکسیداسیون و احیای سلول گیاهی می‌گردد که نتیجه‌ی آن تولید بیش‌از حد و خارج از کنترل گونه‌های فعال اکسیژن است که این امر باعث تنش ثانویه‌ی



شکل ۲. اثرات کنترل (C)، تنش کم‌آبی (D)، سدیم نیتروپروساید (N)، و اثر متقابل آنها (ND) بر میزان پروتئین‌های محلول کل اندام‌های هوایی گیاه گندم. حروف یکسان نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها است.

Fig. 2. Control treatment (C), water deficit (D), sodium nitroprusside (N) and their interaction (ND) affecting wheat total protein in the aerial part. Means with the same letter are not significant at  $P \leq 0.05$ .

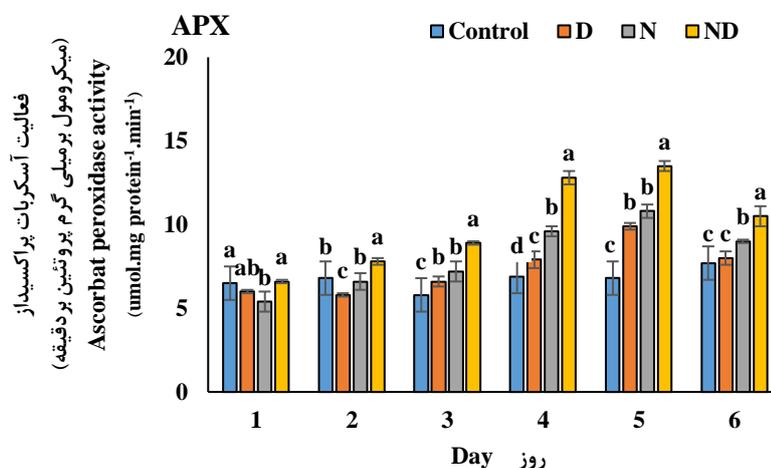
### مولکول نیتریک اکساید

پس از سه روز از اعمال تنش کم‌آبی میزان نیتریک اکساید در اندام‌های هوایی افزایش و در روز ششم کاهش یافت. در صورتی‌که حداکثر میزان نیتریک اکساید در تیمار سدیم نیتروپروساید و نیز به‌صورت توأم با تنش کم‌آبی از روز دوم مشاهده شد و این افزایش نه تنها نسبت به تنش کم‌آبی به تنهایی بیشتر بود، بلکه این افزایش زود هنگام نیز بود

نتایج مشابهی در برگ‌های کلزا (Kazemi et al., 2010) و ریشه‌ی گندم (Wang et al., 2010) با کاربرد نیتریک اکسید نیز ملاحظه گردیده است. شرایط تنش، موجب ایجاد

(Zhang et al., 2008). این موضوع نشان می‌دهد که تیمار نیتریک اکساید روی گیاهان گندم می‌تواند به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را فعال کند. برخی گزارش‌ها نیز فعال‌سازی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان را با واسطه‌ی نیتریک اکساید و بیان ژن‌های کد کننده‌ی آنزیم‌ها نشان داده‌اند (Zhang et al. 2024b). از این یافته‌ها می‌توان چنین استنباط کرد که نیتریک اکساید متابولیسم آنتی-اکسیدانی را با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان تحریک می‌کند و در نتیجه از سلول‌ها در برابر اثرات مضر گونه‌های فعال اکسیژن محافظت می‌کند.

اکسیداتیو، آسیب و حتی توقف رشد سلول می‌شود (Demidchik, 2015). یکی از راه‌های مقابله با گونه‌های فعال اکسیژن در گیاهان دفاع آنزیمی است که عمدتاً آنزیم‌های POD، CAT، APX و SOD ایفای نقش می‌کنند (García-Caparrós et al., 2020). افزایش فعالیت این آنزیم‌ها توسط نیتریک اکساید ممکن است به دلیل افزایش دسترسی به آهن در گیاهان با واسطه‌ی نیتریک اکساید و بهبود بیوسنتز این آنزیم‌ها باشد (Kazemi, 2012). علاوه بر این، مشخص گردیده است که نیتریک اکسید به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان عمل می‌کند و گونه‌های فعال اکسیژن تولیدشده به علت تنش اکسیداتیو را خاموش می‌کند



شکل ۴. اثرات تنش خشکی (D) و سدیم نیتروپروساید (N) بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز اندام‌های هوایی گیاه گندم. حروف یکسان نشان‌دهنده‌ی عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها است.

Fig. 4. Water deficit and sodium nitroprusside (N) affecting the activity of ascorbate peroxidase. Similar letters indicate non-significant differences among experimental treatments

آنتی‌اکسیدانی در گیاهان تحت تأثیر تنش خشکی، با کاهش آسیب اکسیداتیو موجب افزایش تحمل گیاه در این شرایط می‌گردد. بهبود فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان ممکن است به دلیل تغییر تطبیقی در خواص کاتالیزوری یا رونویسی ژن خاموش باشد (Sohag et al., 2020). معمولاً سدیم نیتروپروساید می‌تواند به‌عنوان (۱) خنثی‌کننده‌ی گونه‌های اکسیژن فعال به‌طور مستقیم و (۲) یک القاکننده‌ی سیستم آنتی‌اکسیدانی برای بهبود بیان ژن‌های کد کننده‌ی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (Ahmad et al., 2016) عمل کند. همچنین، محلول‌پاشی سدیم نیتروپروساید می‌تواند بیوسنتز نیتریک اکساید درون‌زا را تحریک کند که به‌نوبه‌ی خود می‌تواند جایگزین مولکول پیام‌رسان یا جاذب گونه‌های اکسیژن فعال

به‌طور کلی در شرایط تنش، گیاهان یک استراتژی دفاعی متمایز برای حذف گونه‌های فعال اکسیژن و حفظ هموستاز پتانسیل اکسیداسیون و احیاء دارند (Sohag et al., 2020). سیستم حفاظت آنتی‌اکسیدانی شامل ترکیبات آنتی‌اکسیدان با وزن مولکولی کم و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان است (Sohag et al., 2020; Shehzad et al., 2020). فراتنظیمی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در شرایط تنش خشکی یک راهبرد تطبیقی است که در محصولات زراعی به‌خوبی شناخته شده است. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان معمولاً با گونه‌های فعال اکسیژن واکنش می‌دهند و محصول نهایی غیرسمی تولید می‌کنند (Laxa et al., 2019). مطالعه‌ی حاضر نشان داد که کاربرد سدیم نیتروپروساید از طریق تحریک فعالیت آنزیم‌های

را کنترل می‌کند (Nazir et al., 2020)، اما در شرایط تنش تولید بی‌رویه‌ی آن باعث آسیب اکسیداتیو به سایر مولکول‌های زیستی و پراکسیداسیون چربی‌های غشایی می‌شود (Jiménez et al., 2021). در پژوهش حاضر، تنش کم‌آبی باعث القای انباشتگی قابل توجه  $H_2O_2$  در اندام‌های هوایی گیاه گندم گردید ولی تیمار توأم کم‌آبی و نیتریک اکساید آن را کاهش داد (شکل‌های ۵ و ۶). در واقع، نتایج نشانگر اختلال در تعادل گونه‌های فعال اکسیژن تحت تأثیر تنش کم‌آبی است (Ullah et al. 2024).

### میزان پراکسیداسیون چربی‌های غشایی

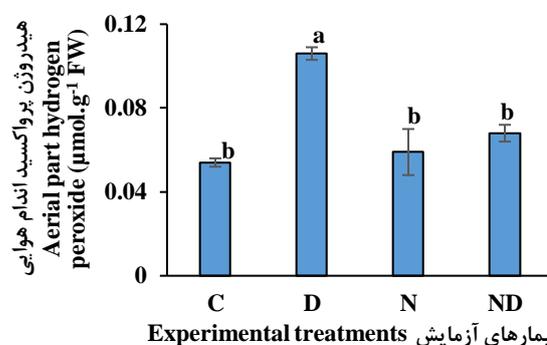
میزان مالون دی‌آلدئید در تیمار تنش کم‌آبی نسبت به کنترل افزایش معنی‌داری داشت که نشان‌دهنده‌ی پراکسیداسیون بالای چربی‌های غشایی است. تیمار سدیم نیتروپروساید باعث کاهش معنی‌داری تولید مالون دی‌آلدئید در تیمار تنش کم‌آبی گردید که نشان‌دهنده‌ی کاهش پراکسیداسیون چربی‌های غشایی در نتیجه‌ی تحریک زود هنگام سیستم دفاعی است. در تیمار توأم کم‌آبی و نیتریک اکساید کاهش غلظت مالون دی‌آلدئید تا حد کنترل مشاهده گردید (شکل‌های ۶ و ۷). نتایج مطالعه‌ی حاضر با نتایج فاروق و همکاران (Farooq et al., 2020) و ساداک و همکاران (Sadak et al., 2020) همخوانی دارد. با افزایش میزان گونه‌های فعال اکسیژن در موقع تنش، شدت پراکسیداسیون چربی‌های غشایی افزایش می‌یابد که باعث آسیب گسترده مخصوصاً به دستگاه فتوسنتزی می‌شود (Guo et al., 2018).

تنش خشکی به‌طور قابل توجهی تجمع  $H_2O_2$  را افزایش می‌دهد که منجر به تجمع بیش‌ازحد مالون دی‌آلدئید و افزایش نشت الکترولیت می‌شود. در میان گونه‌های فعال اکسیژن، بحث‌های زیادی روی  $H_2O_2$  متمرکز شده است که به‌عنوان یک اکسیدان اصلی تجمع آن در طول تنش اکسیداتیو در اکثر گیاهان مورد بررسی قرار گرفته است (Farooq et al., 2020). مکمل سدیم نیتروپروساید برای گیاهان تحت تأثیر کم‌آبی تا حدی تنش اکسیداتیو را با کاهش تولید  $H_2O_2$  و مالون دی‌آلدئید کاهش می‌دهد، بنابراین از آسیب به تمامیت غشا جلوگیری می‌کند (Borhannuddin Bhuyan et al., 2020; Sadak et al., 2020).

تحت عوامل تنش توسعه‌یافته شود (Fan and Liu, 2012). بیان ژن‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز، سازگار با تجمع آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در شرایط خشکی، چه به‌تنهایی و چه به‌صورت هم‌زمان با سدیم نیتروپروساید، نیز در گیاهان تیمار شده فراتنظیم شده است، بنابراین مقاومت بهتری در برابر تنش اکسیداتیو ایجاد می‌کنند (Ahmad et al., 2016).

### میزان پراکسید هیدروژن

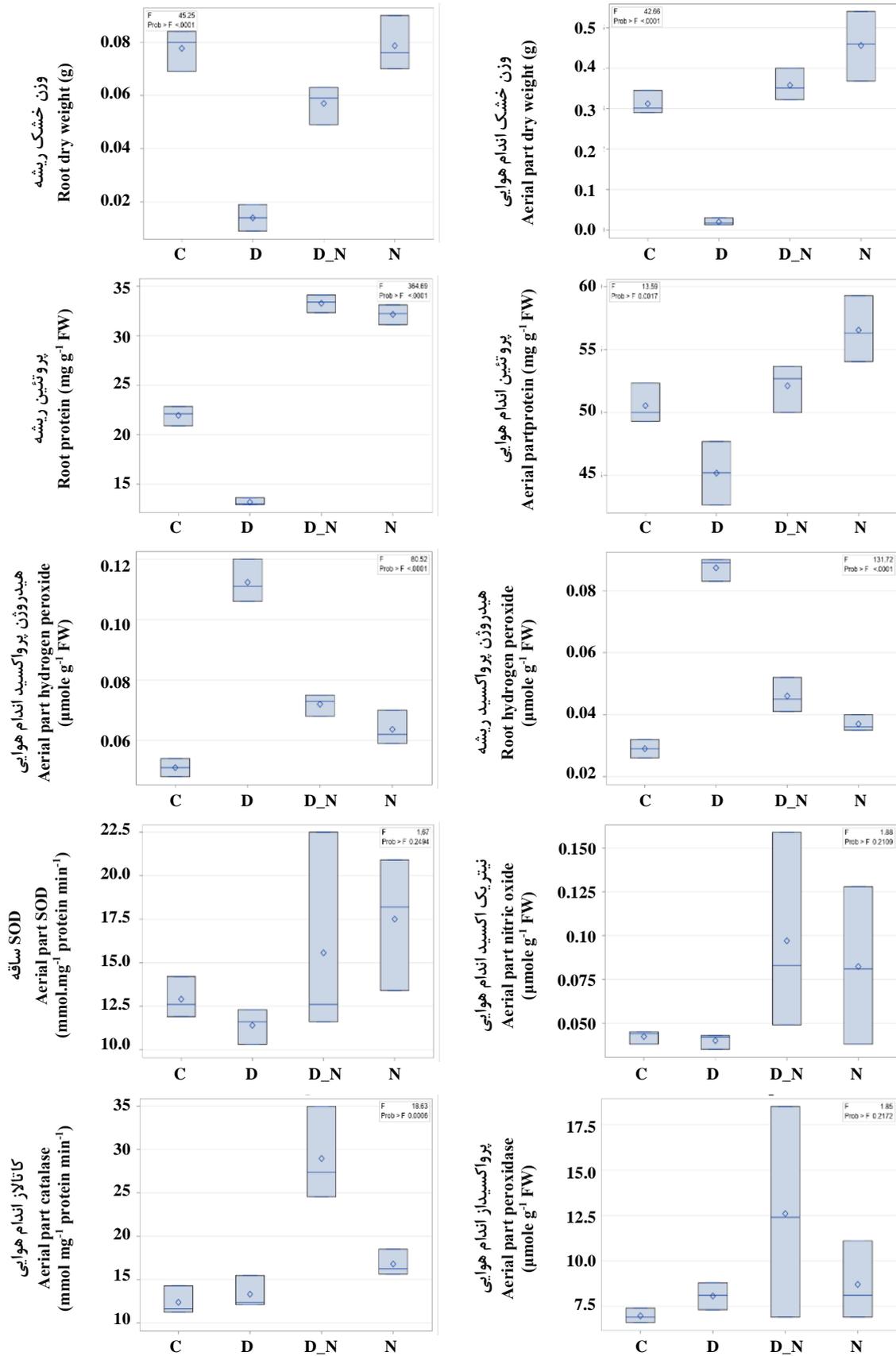
در این مطالعه تنش کم‌آبی باعث افزایش معنی‌دار غلظت پراکسید هیدروژن شد و تیمار سدیم نیتروپروساید باعث کاهش معنی‌دار میزان  $H_2O_2$  نسبت به تنش کم‌آبی گردید (شکل ۵).

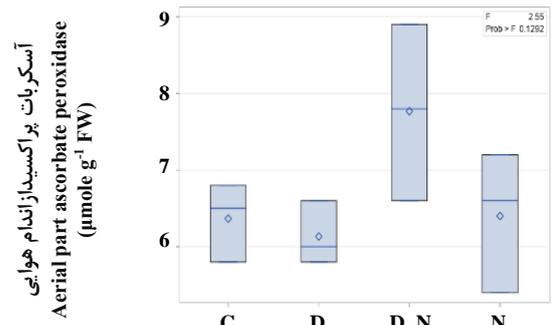
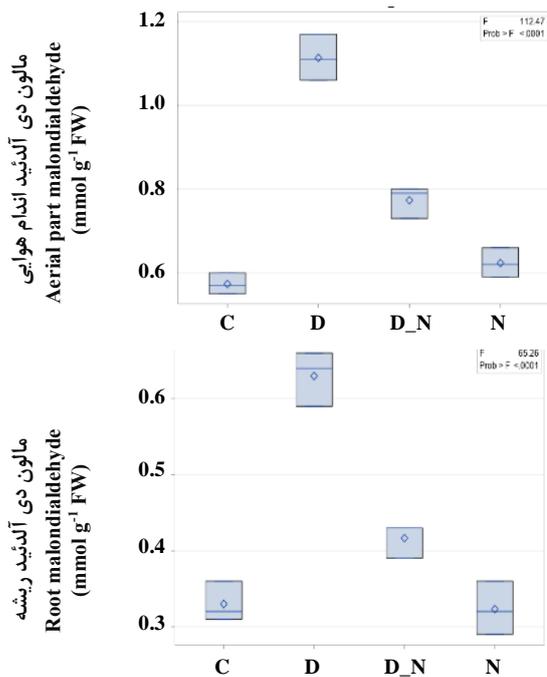


شکل ۵. اثرات کنترل (C)، تنش کم‌آبی (D)، سدیم نیتروپروساید (N) و اثرات متقابل آنها (ND) بر میزان پراکسید هیدروژن اندام‌های هوایی گیاه گندم. حروف یکسان نشان‌دهنده‌ی عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها است.

Fig. 5. Control treatment (C), water deficit (D), sodium nitroprusside (N), and their interaction (ND) affecting the activity of hydrogen peroxide in wheat aerial part

این نتایج می‌تواند مربوط به افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان باشد. هنگامی که گیاهان تحت تنش‌های محیطی مانند شوری، خشکی و دماهای شدید قرار می‌گیرند، آسیب اکسیداتیو به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم با تحریک افزایش گونه‌های فعال اکسیژن ایجاد می‌شود (Suzuki et al., 2012). پراکسید هیدروژن یکی از ترکیبات مهم گونه‌های فعال اکسیژن است که به‌عنوان محصولات فعالیت‌های انتقال الکترون متصل به غشاء و همچنین توسط تعدادی از مسیرهای متابولیک تولید می‌شود (Blokhina and Fagerstedt, 2010) و اگرچه در شرایط طبیعی به‌عنوان یک مولکول پیام‌رسان بسیاری از فرآیندهای رشد و نمو در گیاهان

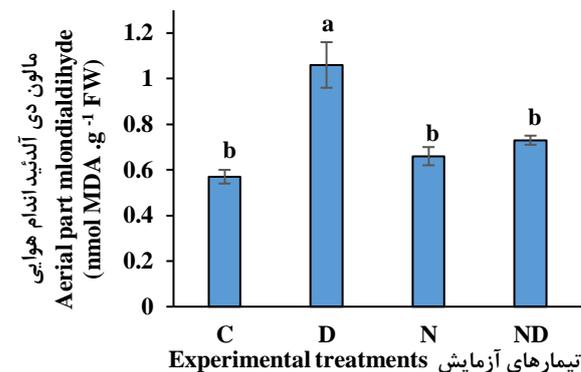




شکل ۶. اثرات تیمارهای آزمایش شامل کنترل (C)، کم‌آبی (D)، برهم‌کنش کم‌آبی و نیتروپروساید (D\_N) و نیتروپروساید (N) بر صفات آزمایش، جعبه‌ها تغییرات پارامترهای آزمایش در پاسخ به تیمارهای آزمایش را مشخص می‌نمایند.

Fig. 6. The experimental treatments including control (C), water deficit (D), interaction of water deficit and nitroprusside (D\_N) and nitroprusside (N) affecting the experimental traits, SOD: superoxide dismutase, Cat: catalase, MDA: malondialdehyde The presented boxes indicate the responses of the measured parameters to the experimental treatments

متمایزی برای انجام هم‌زمان فرآیندهای بیوشیمیایی مختلف و استراتژی‌های حفاظتی دارد (Borhannuddin Bhuyan et al., 2020). به‌طور کلی مشخص گردیده است که گیاهان تحت تیمار سدیم نیتروپروساید، آسیب اکسیداتیو کمتری، در مقایسه با گیاهان کنترل، در شرایط کمبود آب (تنش خشکی) نشان می‌دهند که احتمالاً به دلیل دهیدراسیون سلولی کمتر به‌عنوان راهبردی اصلی در مواجهه با تنش خشکی باشد (Mohasseli and Sadeghi, 2019; Sadak et al., 2020) که گیاهان را در برابر تولید گونه‌های فعال اکسیژن محافظت می‌کند. همچنین، کاربرد سدیم نیتروپروساید با از بین بردن آنیون سوپراکسید ( $O_2^-$ ) و فعال کردن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به‌ویژه SOD، از گیاهان در برابر آسیب اکسیداتیو محافظت می‌کند (Borhannuddin et al., 2020). با این وجود، شواهد فزاینده‌ای وجود دارد که نیتریک اکساید به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان زنجیرشکن پراکسیداسیون لیپیدی مؤثر عمل می‌کند و بیان ژن‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را تنظیم می‌کند (Zottini et al., 2002). از طرفی دیگر، نیتریک اکساید احتمالاً اثرات سیتوتوکسیک ناشی از آنیون سوپراکسید را با تبدیل آن به پراکسی نیتريت خنثی می‌کند، بنابراین باعث ایجاد مقاومت گیاه در برابر تنش اکسیداتیو می‌شود (Borhannuddin et al., 2020) که نشانگر خاصیت آنتی‌اکسیدانی



شکل ۷. اثرات کنترل (C)، تنش کم‌آبی (D)، سدیم نیتروپروساید (N) و اثرات متقابل آنها (ND) بر میزان پراکسیداسیون چربی‌های غشایی اندام‌های هوایی گیاه گندم. حروف یکسان نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها است.

Fig. 7. Control treatment (C), water deficit (D), sodium nitroprusside (N) and their interaction (ND) affecting membrane peroxidation of wheat. Means with the same letters are not significantly different at  $P \leq 0.05$ .

همان‌طور که در تحقیق حاضر نشان داده شد، تیمار با سدیم نیتروپروساید باعث کاهش تولید مالون دی‌آلدئید و اکسیداسیون پروتئین می‌شود که باعث حفظ پایداری و ساختار غشای زیستی و آنزیم‌ها، فراتنظیمی سیستم آنتی-اکسیدانی و تسریع سیالیت، ثبات و عملکرد غشا می‌شود. نیتریک اکساید برهمکنش‌های فیزیکی بیوشیمیایی کافی و

گیاهان با سدیم نیتروپروساید و سپس اعمال تنش کم آبی افزایش زوددهنگام در میزان نیتریک اکساید و متعاقباً افزایش زوددهنگام در فعالیت آنزیم‌های دفاعی ملاحظه گردید که نتیجه‌ی آن درک زودتر و پاسخ زوددهنگام به تنش بود که باعث تخفیف اثر تنش گردید.

#### سیاسگزاری

نویسنده مقاله از شرکت علمی (مشاوره مهندسی) آبتین برکه (<https://Abtinberkeh.com>) شامل آکادمی آبتین برکه (<https://Academy.abtinberkeh.com>)، اصفهان، ایران، برای اصلاح و ویرایش مقاله تشکرو قدردانی می‌نماید

نیتریک اکساید در جهت سرکوب سطوح بالای گونه‌های فعال اکسیژن ناشی از تنش کم آبی است.

#### نتیجه‌گیری نهایی

مولکول نیتریک اکساید یک مولکول پیام‌رسان بوده که نقش کلیدی و مرکزی در درک تنش و پاسخ گیاهان بر عهده دارد. نیتریک‌اکساید با بسیاری از آنزیم‌های دفاعی برهمکنش داشته و به‌صورت مستقیم باعث تنظیم فعالیت این آنزیم‌ها می‌شود. در بسیاری از مطالعات نقش سدیم نیتروپروساید به‌عنوان تولیدکننده نیتریک اکساید در کاهش اثرات تنش در گیاهان به‌وضوح دیده شده است. در این مطالعه با پیش‌تیمار

#### منابع

- Ahmad, P., Abdel Latef, A. A., Hashem, A., AbdAllah, E. F., Gucel, S., Tran, L. S. P., 2016. Nitric oxide mitigates salt stress by regulating levels of osmolytes and antioxidant enzymes in chickpea. *Frontiers in Plant Science*. 7, 347. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00347>
- Antoniou, C., Filippou, P., Mylona, P., Fasoula, D., Ioannides, I., Polidoros, A., Fotopoulos, V., 2013. Developmental stage-and concentration-specific sodium nitroprusside application results in nitrate reductase regulation and the modification of nitrate metabolism in leaves of *Medicago truncatula* plants. *Plant Signaling & Behavior*. 8, 25479. <https://doi.org/10.4161/psb.25479>
- Bhuyan, M.B., Hasanuzzaman, M., Parvin, K., Mohsin, S.M., Al Mahmud, J., Nahar, K., Fujita, M., 2020. Nitric oxide and hydrogen sulfide: two intimate collaborators regulating plant defense against abiotic stress. *Plant Growth Regulation*. 90, 409-424. <https://doi.org/10.1007/s10725-020-00594-4>
- Blokhina, O., Fagerstedt, K.V., 2010. Oxidative metabolism, ROS and NO under oxygen deprivation. *Plant Physiology and Biochemistry*. 48, 359-373. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.01.007>
- Blum, A., 2017. Osmotic adjustment is a prime drought stress adaptive engine in support of plant production. *Plant, Cell and Environment*. 40, 4-10. <https://doi.org/10.1111/pce.12800>
- Boominathan, R., Doran, P.M., 2002. Ni-induced oxidative stress in roots of the Ni hyperaccumulator, *Alyssum bertolonii*. *New Phytologist*. 156, 205-215. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00506.x>
- Borhannuddin Bhuyan, M., Hasanuzzaman, M., Parvin, K., Mohsin, S.M., Al Mahmud, J., Nahar, K., Fujita, M., 2020. Nitric oxide and hydrogen sulfide: two intimate collaborators regulating plant defense against abiotic stress. *Plant Growth Regulation* 90, 409-424. <https://doi.org/10.1007/s10725-020-00594-4>
- 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. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Chance, B., Maehly, A.C., 1955. Assay of catalase and peroxidase. *Methods in Enzymology*. 2, 764-775. [https://doi.org/10.1016/S0076-879\(55\)02300-8](https://doi.org/10.1016/S0076-879(55)02300-8)
- Demidchik, V., 2015. Mechanisms of oxidative stress in plants: from classical chemistry to cell biology. *Environmental and Experimental Botany*. 109, 212-228. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.06.021>
- Domingos, P., Prado, A.M., Wong, A., Gehring, C., Feijo, J.A., 2015. Nitric oxide: a multitasked signaling gas in plants. *Molecular Plant*. 8, 506-520. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.12.010>

- Emam, Y., 2007. Cereal Crops. Shiraz University Press, 190p. [In Persian].
- Emam, Y., Ranjbar, A. M., Bahrani, M. J., 2007. Evaluation of yield and yield components in wheat genotypes under post-anthesis drought stress. *Journal of Water and Soil Science*. 11, 317-328 [In Persian].
- Fan, Q.J., Liu, J.H., 2012. Nitric oxide is involved in dehydration/drought tolerance in *Poncirus trifoliata* seedlings through regulation of antioxidant systems and stomatal response. *Plant Cell Reports*. 31, 145-154. <https://doi.org/10.1007/s00299-011-1148-1>
- Farooq, A., Bukhari, S. A., Akram, N. A., Ashraf, M., Wijaya, L., Alyemeni, M. N., Ahmad, P., 2020. Exogenously applied ascorbic acid-mediated changes in osmoprotection and oxidative defense system enhanced water stress tolerance in different cultivars of safflower (*Carthamus tinctorious* L.). *Plants*. 9, 104. <https://doi.org/10.3390/plants9010104>
- Farouk, S., Al-Ghamdi, A. A. M., 2021 Sodium nitroprusside application enhances drought tolerance in marjoram herb by promoting chlorophyll biosynthesis and enhancing osmotic adjustment capacity. *Arabian Journal of Geosciences*. 14, 430. <https://doi.org/10.1007/s12517-021-06846-5>
- Foresi, N., Correa-Aragunde, N., Amenta, M., Arruebarrena, A., Creus, C., Lamattina, L., 2016. Detection of nitric oxide and determination of nitrite concentrations in *Arabidopsis thaliana* and *Azospirillum brasilense*. *Bio-protocol*. 6, 1765-1765. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.1765>
- García-Caparrós, P., De Filippis, L., Gul, A., Hasanuzzaman, M., Ozturk, M., Altay, V., Lao, M.T., 2020. Oxidative stress and antioxidant metabolism under adverse environmental conditions: a review. *The Botanical Review*. 87, 421-466. <https://doi.org/10.1007/s12229-020-09231-1>
- Gechev, T., Petrov, V., 2020. Reactive oxygen species and abiotic stress in plants. *International Journal of Molecular Sciences*. 21, 7433. <https://doi.org/10.3390/ijms21207433>
- Giannopolitis, C. N., Ries, S. K., 1977. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology*. 59, 309-314. <https://doi.org/10.1104/pp.59.2.309>
- Guo, Y.Y., Yu, H.Y., Yang, M.M., Kong, D.S., Zhang, Y.J., 2018. Effect of drought stress on lipid peroxidation, osmotic adjustment and antioxidant enzyme activity of leaves and roots of *Lycium ruthenicum* Murr. seedling. *Russian Journal of Plant Physiology*. 65, 244-250. <https://doi.org/10.1134/S1021443718020127>
- Hai, N.N., Chuong, N.N., Tu, N.H.C., Kisiala, A., Hoang, X.L.T., Thao, N.P., 2020. Role and regulation of cytokinins in plant response to drought stress. *Plants*. 9, 422. <https://doi.org/10.3390/plants9040422>
- Harinasut, P., Poonsopa, D., Roengmongkol, K., Charoensataporn, R., 2003. Salinity effects on antioxidant enzymes in mulberry cultivar. *Science Asia*. 29, 109-113.
- Hayat, S., Hasan, S. A., Mori, M., Fariduddin, Q., Ahmad, A., 2010. Nitric oxide: chemistry, biosynthesis, and physiological role. *Nitric Oxide in Plant Physiology*. 69, 1-15. <https://doi.org/10.1002/9783527629138>
- Hayat, S., Yadav, S., Nasser Alyemeni, M., Irfan, M., Wani, A. S., Ahmad, A., 2013. Alleviation of salinity stress with sodium nitroprusside in tomato. *International Journal of Vegetable Science*. 19, 164-176. <https://doi.org/10.1080/19315260.2012.697107>
- Heath, R.L., Packer, L., 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 125, 189-198. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1)
- Holme, M. R., Sharman, T., 2020. Sodium Nitroprusside. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Jiménez, A., Sevilla, F., Martí, M. C., 2021. Reactive oxygen species homeostasis and circadian rhythms in plants. *Journal of Experimental Botany*. 72, 5825-5840. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab318>
- Hussain, I., Shehzad, M.A., Akhtar, G., Shafique Ahmad, K., Mubeen, K., Hassan, W., Faried, H.N., Ahmad, S., Aziz, M., Yasin, S., Al-Abbadi, G.A., 2024. Supplemental sodium nitroprusside and spermidine regulate water balance and chlorophyll pigments to improve sunflower yield under terminal drought. *ACS Omega*. 9, 30478-30491. <https://doi.org/10.1021/acsomega.4c02061>
- Kazemi, N., 2012. Effect of exogenous nitric oxide on alleviating nickel-induced oxidative

- stress in leaves of tomato plants. *International Journal of AgriScience*. 2, 799-809.
- Kazemi, N., Khavari-Nejad, R. A., Fahimi, H., Saadatmand, S., Nejad-Sattari, T., 2010. Effects of exogenous salicylic acid and nitric oxide on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in leaves of *Brassica napus* L. under nickel stress. *Scientia Horticulturae*. 126, 402-407. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.07.037>
- Lawlor, D. W., Cornic, G., 2002. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant, Cell & Environment*. 25, 275-294. <https://doi.org/10.1046/j.0016-8025.2001.00814.x>
- Laxa, M., Liebthal, M., Telman, W., Chibani, K., Dietz, K.J., 2019. The role of the plant antioxidant system in drought tolerance. *Antioxidants*. 8, 94. <https://doi.org/10.3390/antiox8040094>
- Laxalt, A.M., Raho, N., Ten Have, A., Lamattina, L., 2007. Nitric oxide is critical for inducing phosphatidic acid accumulation in xylanase-elicited tomato cells. *Journal of Biological Chemistry*. 282, 21160-21168. <https://doi.org/10.1074/jbc.M701212200>
- Lazalt, A. M., Beligni, M. V., Lamattina, L., 1997. Nitric oxide preserves the level of chlorophyll in potato leaves infected by *Phytophthora infestans*. *European Journal of Plant Pathology*. 103, 643-651. <https://doi.org/10.1023/A:1008604410875>
- Majeed, S., Nawaz, F., Naeem, M., Ashraf, M. Y., Ejaz, S., Ahmad, K. S., Tauseef, S., Farid, G., Khalid, I., Mehmood, K., 2020. Nitric oxide regulates water status and associated enzymatic pathways to inhibit nutrients imbalance in maize (*Zea mays* L.) under drought stress. *Plant Physiology and Biochemistry*. 155, 147-160. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.07.005>
- Ming-Yi, J.I.A.N.G., 1999. Generation of hydroxyl radicals and its relation to cellular oxidative damage in plants subjected to water stress. *Journal of Integrative Plant Biology*. 41, 229-234.
- Muhammad Aslam, M., Waseem, M., Jakada, B.H., Okal, E.J., Lei, Z., Saqib, H.S.A., Yuan, W., Xu, W., Zhang, Q., 2022. Mechanisms of abscisic acid-mediated drought stress responses in plants. *International Journal of Molecular Sciences*. 23, 1084. <https://doi.org/10.3390/ijms23031084>
- Mohasseli, V., Sadeghi, S., 2019. Exogenously applied sodium nitroprusside improves physiological attributes and essential oil yield of two drought susceptible and resistant specie of *Thymus* under reduced irrigation. *Industrial Crops and Products*. 130, 130-136. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.12.058>
- Moreau, M., Lindermayr, C., Durner, J., Klessig, D.F., 2010. NO synthesis and signaling in plants—where do we stand?. *Physiologia Plantarum*. 138, 372-383. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2009.01308.x>
- Nazir, F., Fariduddin, Q., Khan, T.A., 2020. Hydrogen peroxide as a signalling molecule in plants and its crosstalk with other plant growth regulators under heavy metal stress. *Chemosphere*. 252, 126486. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.12.6486>
- Ozturk, M., Turkyilmaz Unal, B., García-Caparrós, P., Khursheed, A., Gul, A., Hasanuzzaman, M., 2021. Osmoregulation and its actions during the drought stress in plants. *Physiologia Plantarum*. 172, 1321-1335. <https://doi.org/10.1111/ppl.13297>
- Pahwa, S.P., Setia, R.C., Neelam Setia, N.S., 2009. Effect of exogenous nitric oxide on chlorophyll content and Hill reaction activity in leaves of *Brassica napus* L. *Environment and Ecology*. 27, 278-280.
- Qu, Z., Tian, Y., Zhou, X., Li, X., Zhou, Q., Wang, X., Dong, S., 2023. Effects of exogenous sodium nitroprusside spraying on physiological characteristics of soybean leaves at the flowering stage under drought stress. *Plants*. 12, 1598. <https://doi.org/10.3390/plants12081598>
- Sadak, M.S., El-Enany, M.A.M., Bakry, B.A., Abdallah, M.M.S., El-Bassiouny, H.M.S., 2020. Signal molecules improving growth, yield and biochemical aspects of wheat cultivars under water stress. *Asian Journal of Plant Sciences*. 19, 35-53. <https://doi.org/10.3923/ajps.2020.35.53>
- Sairam, R.K., Deshmukh, P.S., Saxena, D.C., 1998. Role of antioxidant systems in wheat genotypes tolerance to water stress. *Biologia Plantarum*. 41, 387-394. <https://doi.org/10.1023/A:1001898310321>
- Shaban, M., Khajeddin, S. J., Karimzade, H. R., Panahpoor, E., 2009. The investigation of drought resistance in wood species for Isfahan

- greenery development. *Journal of Research in Agricultural Science*. 5, 57-68 [In persian].
- Shalini, P., Setia, R.C., Neelam, S., 2009. Effect of exogenous nitric oxide on chlorophyll content and Hill reaction activity in leaves of *Brassica napus* L. *Environment and Ecology*. 27, 278-280.
- Shehzad, M. A., Nawaz, F., Ahmad, F., Ahmad, N., Masood, S., 2020. Protective effect of potassium and chitosan supply on growth, physiological processes and antioxidative machinery in sunflower (*Helianthus annuus* L.) under drought stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 187, 109841. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109841>
- Siddiqui, M.H., Alamri, S., Alsubaie, Q.D., Ali, H.M., Khan, M.N., Al-Ghamdi, A., Ibrahim, A.A., Alsadon, A., 2020. Exogenous nitric oxide alleviates sulfur deficiency-induced oxidative damage in tomato seedlings. *Nitric Oxide*. 94, 95-107. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2019.11.002>
- Simon, L. M., Fatrai, Z., Jonas, D. E., Matkovics, B., 1974. Study of peroxide metabolism enzymes during the development of *Phaseolus vulgaris*. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*. 166, 387-392. [https://doi.org/10.1016/S0015-3796\(17\)30073-2](https://doi.org/10.1016/S0015-3796(17)30073-2)
- Sohag, A.A.M., Tahjib-Ul-Arif, M.D., Brestic, M., Afrin, S., Sakil, M.A., Hossain, M.T., Hossain, M.A., Hossain, M.A., 2020. Exogenous salicylic acid and hydrogen peroxide attenuate drought stress in rice. *Plant, Soil and Environment*. 66, 7-13. <https://doi.org/10.17221/472/2019-PSE>
- Suzuki, N., Koussevitzky, S. H. A. I., Mittler, R. O. N., Miller, G. A. D., 2012. ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant, Cell and Environment*. 35, 259-270. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02336.x>
- Takahashi, F., Kuromori, T., Urano, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., 2020. Drought stress responses and resistance in plants: From cellular responses to long-distance intercellular communication. *Frontiers in Plant Science*. 11, 1407. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.556972>
- Terasaki, S., Sakurai, N., Yamamoto, R., Wada, N., Nevins, D. J., 2001. Changes in cell wall polysaccharides of kiwifruit and the viscoelastic properties detected by a laser Doppler method. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*. 70, 572-580. <https://doi.org/10.2503/jjshs.70.572>
- Ullah, A., Al-Rajhi, R.S., Al-Sadi, A.M., Farooq, M., 2021. Wheat genotypes with higher intercellular CO<sub>2</sub> concentration, rate of photosynthesis, and antioxidant potential can better tolerate drought stress. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. 21, 2378-2391. <https://doi.org/10.1007/s42729-021-00529-6>
- Ullah, F., Saqib, S., Khan, W., Ayaz, A., Batool, A., Wang, W.Y. and Xiong, Y.C., 2024. The multifaceted role of sodium nitroprusside in plants: Crosstalk with phytohormones under normal and stressful conditions. *Plant Growth Regulation*. 103, 453-470. <https://doi.org/10.1007/s10725-024-01128-y>
- Wang, H., Zhang, S., Zhang, W., Wei, C., Wang, P., 2010. Effects of nitric oxide on the growth and antioxidant response of submerged plants *Hydrilla verticillata* (Lf) Royle. *African Journal of Biotechnology*. 9, 7470-7476. <https://doi.org/10.5897/AJB10.671>
- Zhang, L. P., Mehta, S. K., Liu, Z. P., Yang, Z. M., 2008. Copper-induced proline synthesis is associated with nitric oxide generation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant and Cell Physiology*. 49, 411-419. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcn017>
- Zhang, M., An, L., Feng, H., Chen, T., Chen, K., Liu, Y., Tang, H., Chang, J., Wang, X., 2003. The Cascade Mechanisms of Nitric Oxide as a Second Messenger of Ultraviolet B in Inhibiting *Mesocotyl elongations*. *Photochemistry and Photobiology*. 77, 219-225. [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2003\)0770219TCMONO2.0.CO2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2003)0770219TCMONO2.0.CO2)
- Zhang, Y., Wang, L., Liu, Y., Zhang, Q., Wei, Q., Zhang, W., 2006. Nitric oxide enhances salt tolerance in maize seedlings through increasing activities of proton-pump and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport in the tonoplast. *Planta*. 224, 545-555. <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0242-z>
- Zhang, X., Qi, S., Liu, S., Mu, H., Jiang, Y., 2024a. Exogenous sodium nitroprusside alleviates drought stress in *Lagenaria siceraria*. *Plants*. 13, 1972. <https://doi.org/10.3390/plants13141972>
- Zhang, Y., Jia, R., Hui, T., Hu, Y., Wang, W., Wang, Y., Wang, Y., Zhu, Y., Yang, L., Xiang, B., 2024b. Transcriptomic and physiological analysis of the response of *Spirodela polyrrhiza* to sodium nitroprusside. *BMC Plant Biology*.

- 24, 95. <https://doi.org/10.1186/s12870-024-04766-6>
- Zottini, M., Formentin, E., Scattolin, M., Carimi, F., Lo Schiavo, F., Terzi, M., 2002. Nitric oxide affects plant mitochondrial functionality in vivo. FEBS Letters. 515, 75-78. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)02438-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)02438-9)