

Original article

Effect of biotic stimuli melatonin and sodium nitroprusside on mitigating heavy metal stress in corn (*Zea mays* L.)

Mohammad Azimi Gandomani¹, Mostafa Alinaghizadeh¹, Kamyar kazemi¹

1. Assistant Professor of Agriculture Department, Faculty of Technical and Engineering, Payame Noor University, P. O. Box 19395-4697, Tehran, Iran

Received 26 December 2024; Revised 6 February 2024; Accepted 15 February 2024

Extended abstract

Introduction

Heavy metals (HMs) pose a serious threat to corn (*Zea mays* L.), a key crop for global food security. Melatonin (MT) enhances tolerance to abiotic stresses by regulating antioxidant enzyme activities and reducing oxidative damage. Similarly, sodium nitroprusside (SNP) has been reported to alleviate heavy metal toxicity and enhance stress tolerance in various crops by modulating nitric oxide signaling pathways. Therefore, this study aimed to: (i) evaluate the effects of lead (Pb) and cadmium (Cd) accumulation on corn growth and biomass production, (ii) investigate the physiological responses of corn to heavy metal stress, including changes in dry matter partitioning among plant organs, and (iii) examine the interactive effects of heavy metals with MT and SNP on stress tolerance mechanisms and the phytoremediation potential of corn.

Materials and methods

This pot experiment was conducted in 2024 at the research farm of Payame Noor University, Gandoman, Borujan County, Chaharmahal and Bakhtiari Province, Iran, under controlled conditions in a rain-protected shelter. The corn cultivar used in this experiment was Single Cross 704. The experiment was arranged as a factorial experiment based on a randomized complete block design (RCBD) with four replications. Treatments consisted of four levels of heavy metals as the first factor: (i) control (no heavy metals), (ii) lead (Pb), (iii) cadmium (Cd), and (iv) combined Pb + Cd; and seven levels of melatonin and sodium nitroprusside as the second factor: (i) control, (ii) 0.05 mM melatonin (MT), (iii) 0.1 mM MT, (iv) 0.5 mM sodium nitroprusside (SNP), (v) 1.5 mM SNP, (vi) 0.05 mM MT + 0.5 mM SNP, and (vii) 0.1 mM MT + 1.5 mM SNP. Data were analyzed using SAS software (version 9.2), and figures were prepared using Microsoft Excel (2013). Mean comparisons were carried out using Duncan's multiple range test at a 95% confidence level.

Results and discussion

Exposure to Pb and Cd significantly increased peroxidase (POD) activity by 24% and 12%, respectively, and enhanced superoxide dismutase (SOD) activity compared to the control. The combined Cd + Pb treatment increased peroxidase (POD) activity by 32% compared with the control. The combined Cd + Pb treatment also increased malondialdehyde (MDA) and hydrogen peroxide (H₂O₂) contents by 42% and 46%, respectively, compared with the control. The combined Cd + Pb treatment reduced microbial biomass carbon (MBC) and microbial biomass nitrogen (MBN) by 8% and 33%, respectively. According to quantitative data, total plant dry weight decreased by 24% under combined Cd + Pb stress compared with the control. In contrast, MT-treated plants under combined Cd + Pb stress showed a 26% increase in total dry weight compared with the control. Similarly, SNP application resulted in a 20% increase in total dry weight.

* Corresponding author: Mohammad Azimi Gandomani; E-Mail: Mohammad.Azimi@pnu.ac.ir

Conclusion

This study demonstrated that exogenous application of melatonin and sodium nitroprusside effectively mitigates the detrimental effects of heavy metal stress on corn growth. The results demonstrated that both treatments enhanced corn resistance to heavy metal stress. Specifically, the findings highlighted the positive effects of MT and SNP in improving corn tolerance to combined Cd and Pb stress. The results confirmed that MT and SNP treatments significantly reduced oxidative stress markers such as H₂O₂ and MDA while enhancing aboveground biomass and photosynthetic pigment content. These findings suggest that MT and SNP have the potential to improve crop resilience and productivity in heavy metal-contaminated soils. Future research should aim to elucidate the molecular pathways involved in MT- and SNP-mediated stress tolerance, validate these findings under field conditions, and develop practical application strategies for large-scale agricultural use.

Keywords: Cadmium, Hydrogen peroxide, Lead, Malondialdehyde, Microbial biomass carbon

تأثیر محرک‌های زیستی ملاتونین و نیتروپروساید سدیم در کاهش اثرات فلزات سنگین در گیاه ذرت (*Zea mays L.*)

محمد عظیمی گندمانی^۱، مصطفی علی‌نقی‌زاده^۱، کامیار کاظمی^۱

۱. استادیار، گروه کشاورزی، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه پیام نور، صندوق پستی ۴۶۹۷-۱۹۳۹۵، تهران، ایران

مشخصات مقاله	چکیده
واژه‌های کلیدی: پراکسید هیدروژن سرب کادمیوم کربن زیست توده میکروبی مالون‌دی‌آلدهید	فلزات سنگین تأثیر قابل توجهی بر ذرت (<i>Zea mays L.</i>) دارد که برای امنیت غذایی جهانی حیاتی است. هدف این مطالعه ارزیابی اثربخشی نیتروپروساید سدیم و ملاتونین در کاهش اثرات مضر تنش‌های فلزات سنگین بر رشد و توسعه ذرت بود. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در چهار تکرار در سال ۱۴۰۲ اجرا شد. تیمارهای آزمایش شامل ۴ سطح فلزات سنگین به‌عنوان عامل اول و هفت سطح ترکیبات ملاتونین و نیتروپروساید سدیم به‌عنوان عامل دوم بود. تیمارهای کادمیوم و سرب و فعالیت پراکسیداز را به ترتیب ۲۴ و ۱۲ درصد افزایش دادند و باعث افزایش متقابل در فعالیت سوپراکسیددیسموگاز شدند در حالی که تیمار ترکیبی فلزات سنگین میزان فعالیت پراکسیداز را ۲۲ درصد افزایش داد. این تیمارهای ترکیبی همچنین سطح مالون‌دی‌آلدهید را ۴۲ درصد و سطح پراکسید هیدروژن را ۴۶ درصد افزایش دادند. تیمارهای کادمیوم + سرب صفت کربن بیومیکروبی خاک را ۸ درصد و نیتروژن بیومیکروبی خاک را ۳۳ درصد کاهش دادند. بر اساس داده‌های کمی این مطالعه، در شرایط ترکیبی فلزات سنگین (کادمیوم + سرب) وزن خشک کل گیاه تا ۲۴ درصد در مقایسه با تیمار شاهد کاهش یافت. در مقایسه با تیمار شاهد، گیاهان تیمار شده با ملاتونین تحت تنش ترکیبی افزایش ۲۶ درصدی وزن خشک کل را نشان دادند. به‌طور مشابه، تیمارهای نیتروپروساید سدیم باعث افزایش ۲۰ درصدی وزن خشک کل شدند. نتایج نشان می‌دهند که ملاتونین و نیتروپروساید سدیم زیست‌توده، رنگدانه‌های فتوسنتزی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی را در ذرت افزایش داده و بنابراین مقاومت گیاه به تنش فلزات سنگین را تقویت می‌کنند.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۰/۰۶ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۱۱/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۱/۲۷ تاریخ انتشار: تابستان ۱۴۰۵ ۱۹(۲): ۳۲۳-۳۲۹	

مقدمه

فیزیولوژیکی گیاه را مختل می‌کنند، بلکه پایداری اکولوژیکی و تولیدات کشاورزی را نیز به خطر می‌اندازند (Farooq et al., 2012). درک چگونگی پاسخ گیاهان به این تنش‌ها برای طراحی راهکارهایی به‌منظور کاهش اثرات آن‌ها بر بهره‌وری کشاورزی و سلامت محیط‌زیست ضروری است.

سرب (Pb) و کادمیوم (Cd) دو فلز سنگینی هستند که بیشترین اثرات منفی را بر اراضی کشاورزی در سطح جهان دارند. تجمع این فلزات در گیاهان، که عمدتاً به دلیل فعالیت‌های انسانی در خاک رخ می‌دهد، رشد گیاهان را تحت تأثیر قرار داده و سلامت مصرف‌کنندگان را به خطر می‌اندازد. به دلیل توانایی ذرت در تحمل و تجمع فلزات سنگین، این

ذرت (*Zea mays L.*) یکی از محصولات مهم غلات در جهان است که نقش حیاتی در تأمین امنیت غذایی ایفا می‌کند؛ چراکه کاربردهای متعددی از جمله در فرآیندهای صنعتی، تغذیه دام و تولید سوخت‌های زیستی دارد. این محصول که غذای اصلی در بسیاری از کشورهای در حال توسعه به‌شمار می‌رود، دارای محتوای پروتئین ۸ تا ۱۲ درصد، چربی ۳ تا ۸ درصد و کربوهیدرات ۶۰ تا ۷۰ درصد است (Langyan et al., 2022).

تنش‌های محیطی متعدد مانند آلودگی با فلزات سنگین (HM)، موانع جدی برای بقای گیاه و رشد آن به‌شمار می‌روند (Ghori et al., 2019). این تنش‌ها نه تنها فرآیندهای

چهارم‌حال و بختیاری در شرایط کنترل‌شده زیر یک پناهگاه محافظت‌شده از باران انجام شد. در این آزمایش از ذرت سینگل کراس ۷۰۴ استفاده شد. این رقم مقاومت خوبی در برابر تنش‌های خشکی و گرما از خود نشان می‌دهد که آن را مناسب کشت در مناطق گرم و خشک ایران کرده است. محدوده دمای روز و شب به ترتیب ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد و ۱۰ تا ۱۵ درجه سانتی‌گراد بود. در داخل این پناهگاه، رطوبت نسبی به‌طور میانگین ۶۰ تا ۸۵ درصد حفظ شد.

فلزات سنگینی (HMs) که در این تحقیق استفاده شدند، سرب (Pb) و کادمیوم (Cd) بودند که به ترتیب به‌صورت نیترات سرب ($Pb(NO_3)_2$) با غلظت 0.05×10^{-3} مول در لیتر و کلرید کادمیوم ($CdCl_2$) با غلظت ۱۰۰ میکرومولار اعمال شدند. این نمک‌ها به دلیل شیوع آن‌ها در خاک‌های آلوده و اثرات فیتوتوکسیک شناخته‌شده بر محصولات کشاورزی انتخاب شدند (Zulfiqar et al., 2022). نیترات سرب و کلرید کادمیوم از تأمین‌کنندگان شیمیایی معتبر تهیه شدند تا از خلوص بالا برای استفاده‌های آزمایشی اطمینان حاصل شود.

تیمارها و شرایط آزمایش

آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در چهار تکرار اجرا شد. تیمارهای آزمایش شامل ۴ سطح فلزات سنگین (۱- شاهد بدون فلزات سنگین، ۲- سرب (Pb)، ۳- کادمیوم (Cd) و ۴- ترکیب Cd + Pb) به‌عنوان عامل اول و هفت سطح ترکیبات ملاتونین و نیتروپروساید سدیم به‌عنوان عامل دوم بود. سطوح ترکیبات ملاتونین و نیتروپروساید سدیم عبارت بودند از (۱) شاهد، (۲) 0.05 میلی‌مولار ملاتونین، (۳) 0.1 میلی‌مولار ملاتونین، (۴) 0.5 میلی‌مولار نیتروپروساید سدیم، (۵) $1/5$ میلی‌مولار نیتروپروساید سدیم، (۶) ترکیب 0.05 میلی‌مولار ملاتونین + 0.5 میلی‌مولار نیتروپروساید سدیم و (۷) ترکیب 0.1 میلی‌مولار ملاتونین + $1/5$ میلی‌مولار نیتروپروساید سدیم.

طراحی آزمایش

در این مطالعه از طراحی آزمایش، ۱۱۲ واحد آزمایشی استفاده شد. هر واحد آزمایشی شامل یک گلدان پلاستیکی بود که حاوی ترکیب خاک و پرلیت (نسبت حجمی ۲:۱) به وزن حدود ۱۰ کیلوگرم بود.

محصول که از نظر جهانی حائز اهمیت است، می‌تواند گزینه‌ای مناسب برای پروژه‌های گیاه‌پالایی باشد (Ahmad et al., 2011; Akram et al., 2021). مطالعات پیشین توانایی ذرت را در تحمل و تجمع فلزات سنگین در خاک‌های آلوده به فلزات، به‌ویژه کادمیوم، نشان داده‌اند (Akram et al., 2021). تحمل گیاه به فلزات سنگین بر اساس مکانیسم‌های جذب مؤثر، انتقال و جداسازی این فلزات در بافت‌ها و اندامک‌های ویژه داخل سلول‌ها شکل می‌گیرد (Akram et al., 2021). با این حال، سمیت فلزات سنگین همچنان یک معضل زیست‌محیطی قابل توجه است که بر تنوع زیستی اکوسیستم، سلامت خاک و رشد گیاه تأثیر می‌گذارد (Srivastava et al., 2017).

مطالعات اخیر نشان داده‌اند که ملاتونین (MT) نقش کلیدی در بهبود مقاومت گیاه به تنش‌های غیرزیستی ایفا می‌کند و با تعدیل فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و کاهش آسیب اکسیداتیو اثرات مثبتی دارد (Arnao and Hernández-Ruiz, 2015; Colombage et al., 2023). به‌طور مشابه، نیتروپروساید سدیم (SNP) با تقویت مسیرهای سیگنال‌دهی نیتریک اکسید، می‌تواند سمیت فلزات سنگین را کاهش داده و تحمل تنش را در محصولات مختلف افزایش دهد (Niyofasha et al., 2023). این مطالعه با بررسی اثرات تجمع فلزات سنگین بر ذرت، اهداف زیر را دنبال می‌کند: ۱- ارزیابی اثر تجمع سرب (Pb) و کادمیوم (Cd) بر رشد و تجمع زیست‌توده در ذرت، ۲- بررسی واکنش‌های فیزیولوژیکی گیاه به این تنش، از جمله تغییرات در توزیع وزن خشک در بخش‌های مختلف گیاه، ۳- ارزیابی اثرات متقابل فلزات سنگین و ترکیبات ملاتونین و نیتروپروساید سدیم بر مکانیسم‌های تحمل گیاه و توان بالقوه آن برای گیاه‌پالایی.

فرضیه این پژوهش این است که ذرت در شرایط تنش فلزات سنگین، واکنش‌های فیزیولوژیکی و تحمل متفاوتی از خود نشان می‌دهد. استفاده از این واکنش‌ها می‌تواند در تکنیک‌های گیاه‌پالایی مفید واقع شود و به حفظ پایداری کشاورزی در مناطق آلوده کمک کند.

مواد و روش‌ها

محل و طرح تحقیق

این آزمایش گلدانی در سال ۱۴۰۲ در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه پیام نور مرکز گندمان از توابع بروجن در استان

اجرای آزمایش

درجه سانتی‌گراد نگهداشته شد (Zhao et al., 2017; Xu and Yuan 2017). پس از مدت ۲۴ ساعت، هر دو نمونه فومیناسیون شده و غیر فومیناسیون شده تحت استخراج با ۲۵ میلی‌لیتر K_2SO_4 ۰/۵ مولار به مدت ۶۰ دقیقه روی شیکر قرار گرفتند. مقادیر MBC و MBN با استفاده از آنالیزگر چندگانه C-N (مدل Multi N/C 3100، Analytik Jena، آلمان) اندازه‌گیری شدند. مقادیر MBC و MBN با کسر کردن اندازه‌گیری‌های نمونه‌های فومیناسیون شده از نمونه‌های غیر فومیناسیون شده و سپس تنظیم نتایج با استفاده از عوامل تصحیح ۰/۴۵ و ۰/۵۴ به ترتیب محاسبه شدند (Thomas et al., 2016).

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

پراکسیداسیون لیپیدها با اندازه‌گیری میزان مالون‌دی‌آلدئید به روش هس و پاکر (Heath and Packer, 1968) انجام شد. برای این منظور، ۱۰۰ میلی‌گرم برگ تازه در ۱۰۰۰ میکرولیتر تری‌کلرو استیک اسید هموژنایز و پس از سانتریفیوژ در ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۰۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه، ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره جدا شد. سپس این عصاره با ۸۰۰ میکرولیتر تری‌کلرو استیک ۲۰ درصد حاوی ۰/۵ درصد تیوبوتریک ترکیب شد. پس از ۳۰ دقیقه نگهداری در حمام آب گرم، جذب نمونه‌ها در ۶۰۰ و ۵۳۲ نانومتر ثبت و تفاوت آن‌ها برای محاسبه مالون‌دی‌آلدئید استفاده شد (ضریب خاموشی $1/55 \times 10^4$ مولار در سانتی‌متر). در نهایت مقدار مالون دی‌آلدئید نمونه، مطابق فرمول زیر محاسبه شد.

$$\text{مالون دی‌آلدئید (میلی‌گرم بر گرم وزن خشک)} = (A532-A600/155) \times 1000$$
 [۱]

برای سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، ۱۰۰ میلی‌گرم نمونه بذری با روش استخراج سرد-یخ با ۱۰۰۰ میکرولیتر بافر پتاسیم-فسفات ۰/۱ مولار (pH=7.8) حاوی اتیلن‌دی‌آمین‌تتراستیک‌اسید ($EDTA^1$) یک میلی‌مولار هموژنایز شد. پس از سانتریفیوژ در ۱۲۰۰۰ جی به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، فاز شفاف جدا شد.

فعالیت پراکسیداز بر اساس روش سرینیوس و همکاران (Srinivas et al., 1999)، با اندازه‌گیری تترآگایاکول تشکیل‌شده از جذب در ۴۷۰ نانومتر و استفاده از ضریب خاموشی ۲۶/۶ میلی‌مولار، محاسبه گردید. مخلوط واکنش

در ابتدا سه بذر در هر گلدان کشت شد، اما پس از جوانه‌زنی، تعداد گیاهان به یک گیاه در هر گلدان کاهش یافت تا یکنواختی در بین تیمارها حفظ شود. برای تضمین توزیع و جذب یکنواخت توسط گیاهان، تیمارهای MT و SNP از طریق آبیاری خاک اعمال شدند. محلول‌های آبی فلزات سنگین Cd و Pb به خاک اضافه شدند تا غلظت‌های مورد نظر به دست آید.

تهیه محلول ملاتونین

ملاتونین (MT) به صورت محلول آبی تهیه شد که در آن از حلال آلی مانند دی‌متیل سولفوکسید (DMSO)، برای حل کردن ملاتونین و دستیابی به غلظت‌های ۰/۰۵ میلی‌مولار و ۰/۱ میلی‌مولار برای تیمارهای کم و زیاد استفاده شد. به طور خاص، ۱۰ میلی‌گرم ملاتونین در یک میلی‌لیتر DMSO حل شد و سپس با آب مقطر رقیق شد تا به غلظت‌های مورد نظر برسد. برای حذف اثرات احتمالی حلال آلی بر رشد گیاه و واکنش‌های فیزیولوژیکی، تیمارهای شاهد نیز در نظر گرفته شدند که در آن‌ها همان حجم DMSO به گروه‌های شاهد اضافه شد، بدون اینکه ملاتونین اضافه شود. این رویکرد اطمینان حاصل کرد که هرگونه اثر مشاهده‌شده به ملاتونین نسبت داده شود و نه حلال خود.

اندازه‌گیری صفات

ارزیابی صفات رشدی

برای اندازه‌گیری وزن خشک ریشه، برگ و ساقه، بوته ذرت را در مرحله برداشت و پس از جدا کردن قسمت‌های مختلف آن‌ها را در آون در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت نگهداری و خشک شدند. در ادامه با ترازوی دیجیتال به دقت ۰/۰۰۱ اندام‌های مختلف وزن شدند.

اندازه‌گیری کربن بیومیکروبی خاک (MBC) و نیتروژن بیومیکروبی خاک (MBN)

برای اندازه‌گیری MBC و MBN خاک از روش فومیناسیون-استخراج کلروفورم ($CHCl_3$) استفاده شد. یک نمونه خاک به وزن ۱۰ گرم با کلروفورم بدون الکل تیمار شد، در حالی که نمونه دیگری به وزن ۱۰ گرم بدون تیمار و در دمای ۴

¹- Ethylenediaminetetraacetic acid

$$Chlb=27.43 A648 - 8.12 A664 \quad [۳]$$

$$C(x+c) = (1000 \times A470 - 2.13 \times Ca - 97.64 \times Cb) / 209 \quad [۴]$$

A: جذب نور در طول موج‌های ۶۶۴، ۶۴۸ و ۴۷۰ نانومتر

تجزیه و تحلیل آماری

برای محاسبات آماری در این مطالعه از نرم‌افزار SAS 9.2 و برای ترسیم از Excel (Ver. 2013) استفاده شد. مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون دانکن انجام شد و سطح احتمال به کار رفته در کلیه تجزیه و تحلیل‌ها ۹۵ درصد در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

با توجه به نتایج تجزیه واریانس صفات، اثرات اصلی فلزات سنگین و محرک زیستی بر صفات پراکسیداز، کربم زیست‌توده میکروبی و نیتروژن زیست‌توده میکروبی معنی‌دار بود ولی اثرات متقابل آن‌ها معنی‌دار نبود. همچنین تجزیه واریانس نشان داد اثرات اصلی فلزات سنگین و محرک زیستی و برهمکنش آنها بر صفات مالون‌دی‌آلدهید، پراکسید هیدروژن و سوپراکسید دیسموتاز معنی‌دار بود (جدول ۱).

فعالیت‌های آنزیمی

مقایسه میانگین صفات برای فلزات سنگین نشان داد تفاوت کم‌ترین (شاهد بدون فلز سنگین) و بیشترین (تیمار ترکیبی Cd + Pb) میزان فعالیت پراکسیداز ۳۲ درصد بود. همچنین نتایج محرک‌های زیستی نشان داد مقادیر بالای تیمار ترکیبی ملاتونین و نیتروپروسید سدیم به همراه مقادیر بالای ترکیبات جداگانه آنها دارای بیشترین فعالیت آنزیمی پراکسیداز بودند. تفاوت بیشترین (۲۴۱) واحد فعالیت آنزیمی بر میلی‌گرم پروتئین در تیمار ترکیبی (MT-H + SNP-H) و کمترین (۱۹۲) واحد فعالیت آنزیمی بر میلی‌گرم پروتئین در تیمار شاهد) میزان فعالیت پراکسیداز برای تیمارهای مختلف ۲۶ درصد می‌باشد (جدول ۲).

از سوی دیگر، برهمکنش فلزات سنگین و محرک‌های زیستی نشان داد تیمارهای فلزات سنگین میزان فعالیت سوپراکسید دیسموتاز را افزایش داد، همچنین با اعمال تیمار محرک‌های زیستی بخصوص تیمارهای ملاتونین بر میزان

شامل یک میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۲۰ میلی‌مولار (pH=6)، ۵ میلی‌مولار گایاکول (2-methoxy phenol) و ۱ میلی‌مولار پراکسید هیدروژن به همراه آنزیم استخراجی بود. واکنش در مدت یک دقیقه انجام شد و یک واحد فعالیت پراکسیداز برابر با اکسیداسیون یک میکرومول گایاکول در یک دقیقه تعریف شد.

اندازه‌گیری سوپراکسید دیسموتاز (SOD) طبق روش جیانوپولیتیس و ریس (Giannopolitis and Ries, 1977) انجام گرفت. فعالیت آنزیم به صورت فتوترومیک بررسی شد. دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج ۵۶۰ نانومتر کالیبره شد. برای اندازه‌گیری پراکسید هیدروژن (H_2O_2) در بافت‌های گیاهی، از روش اسپکتروفوتومتری مبتنی بر واکنش با پرکلریک اسید ($HClO_4$) و تیتانیوم تتراکلرید ($TiCl_4$) استفاده شد. ابتدا، نمونه‌های گیاهی تازه برداشت‌شده با دقت توزین و در نیتروژن مایع منجمد شدند تا از فعالیت آنزیم‌ها جلوگیری شود. سپس، بافت گیاهی در حضور محلول پرکلریک اسید ۰/۱ مولار همگن‌سازی شد و محلول حاصل با سانتریفیوژ در سرعت بالا ($12000 \times g$) به مدت ۱۵ دقیقه شفاف‌سازی گردید. فاز فوقانی جمع‌آوری و محلول معرف تیتانیوم کلرید به آن اضافه شد. در این واکنش، پراکسید هیدروژن موجود در نمونه با تیتانیوم کلرید ترکیب شد و کمپلکس پایدار زردرنگی ایجاد کرد که در طول موج ۴۱۰ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری گردید. میزان جذب نوری این کمپلکس به‌طور مستقیم با غلظت H_2O_2 نمونه ارتباط داشت و برای محاسبه آن از منحنی استاندارد پراکسید هیدروژن استفاده شد. تمامی مراحل در دمای پایین و تحت شرایط کنترل‌شده انجام گرفت تا از تخریب پراکسید هیدروژن جلوگیری شود (Brennan and Frenkel, 1977).

رنگدانه‌های فتوسنتزی

اندازه‌گیری رنگدانه‌های فتوسنتزی به روش دری و همکاران (Dere et al., 1998) انجام گرفت. برای این منظور، ۱۰۰ میلی‌گرم از برگ‌های جوان کاملاً توسعه‌یافته به وسیله اتانول ۹۶ درصد استخراج و میزان جذب در طول موج‌های ۴۷۰، ۶۴۸ و ۶۶۴ نانومتر با اسپکتروفوتومتر ثبت شد. بر اساس معادلات (۲، ۳ و ۴)، غلظت کلروفیل a، b و کاروتنوئیدها محاسبه گردید.

$$Chla=13.36 \times A664 - 5.19 \times A648 \quad [۲]$$

جدول ۱. تجزیه واریانس صفات بیوشیمیایی تحت تاثیر فلزات سنگین و ملاتونین و نیتروپروساید سدیم

Table 1. Analysis of variance for biochemical traits influenced by heavy metals, melatonin, and sodium nitroprusside (Mean Square) میانگین مربعات

منابع تغییر Sources of Variation	درجه آزادی DF	مالون‌دی‌آلدهید Malondialdehyde	پراکسید هیدروژن H ₂ O ₂	پراکسیداز Peroxidase	سوپراکسید دیسموتاز Superoxide dismutase	کربن زیست توده میکروبی	نیتروژن زیست توده میکروبی
						microbial biomass carbon	microbial biomass nitrogen
بلوک Block	3	2.30**	0.217 ^{ns}	1240**	0.324 ^{ns}	1241**	146 ^{ns}
فلز سنگین Heavy metal (A)	3	57.1**	22.0**	18847**	24.7**	1933**	1116**
محرک زیستی Biostimulant (B)	6	3.73**	1.52**	1879**	3.20**	700*	254**
A × B	18	1.65**	0.790**	199 ^{ns}	0.312*	53.8 ^{ns}	34.6 ^{ns}
خطای کل Total error	81	0.519	0.226	285	0.159	286	74.3
ضریب تغییرات C. V(%)		9.93	9.99	7.93	8.35	7.05	16.4

ns, * و ** به ترتیب عدم معنی داری، معنی داری در سطح پنج درصد و معنی داری در سطح یک درصد می‌باشد.

ns, * and ** indicate non-significance, significance at the five percent level, and significance at the one percent level, respectively.

جدول ۲. اثرات اصلی فلزات سنگین و محرک زیستی بر صفات پراکسیداز، کربن زیست توده میکروبی و نیتروژن زیست توده میکروبی

Table 2. Main effects of heavy metals and Biostimulant on peroxidase activity, microbial biomass carbon, and microbial biomass nitrogen traits

تیمارهای مختلف Different treatments		پراکسیداز Peroxidase U. mg ⁻¹	کربن زیست توده میکروبی microbial biomass carbon mg kg ⁻¹	نیتروژن زیست توده میکروبی microbial biomass nitrogen
فلز سنگین Heavy metal				
control	شاهد	182 ^d	249 ^a	60 ^a
Cd	کادمیوم	226 ^b	243 ^{ab}	55 ^b
Pb	سرب	203 ^c	237 ^{bc}	50 ^c
Cd + Pb		241 ^a	230 ^c	45 ^c
محرک زیستی Biostimulant				
CT		192 ^d	228 ^c	46 ^c
SNP-H		220 ^{ab}	243 ^{ab}	55 ^{ab}
MT-H + SNP-H		227 ^a	248 ^a	60 ^a
SNP-L		207 ^c	238 ^{a-c}	50 ^{ab}
MT-L + SNP-L		213 ^{a-c}	240 ^{a-c}	50 ^{bc}
MT-H		221 ^{ab}	246 ^{ab}	55 ^{ab}
MT-L		212 ^{bc}	236 ^{bc}	51 ^{bc}

CT: شاهد، MT-L: 0.05 میلی‌مولار ملاتونین، MT-H: 0.1 میلی‌مولار ملاتونین، SNP-L: 0.5 میلی‌مولار نیتروپروساید سدیم، SNP-H: 1.5 میلی‌مولار نیتروپروساید سدیم، MT-L + SNP-L: ترکیب 0.05 میلی‌مولار ملاتونین + 0.5 میلی‌مولار نیتروپروساید سدیم، MT-L + SNP-L: ترکیب 0.05 میلی‌مولار ملاتونین + 0.5 میلی‌مولار نیتروپروساید سدیم.

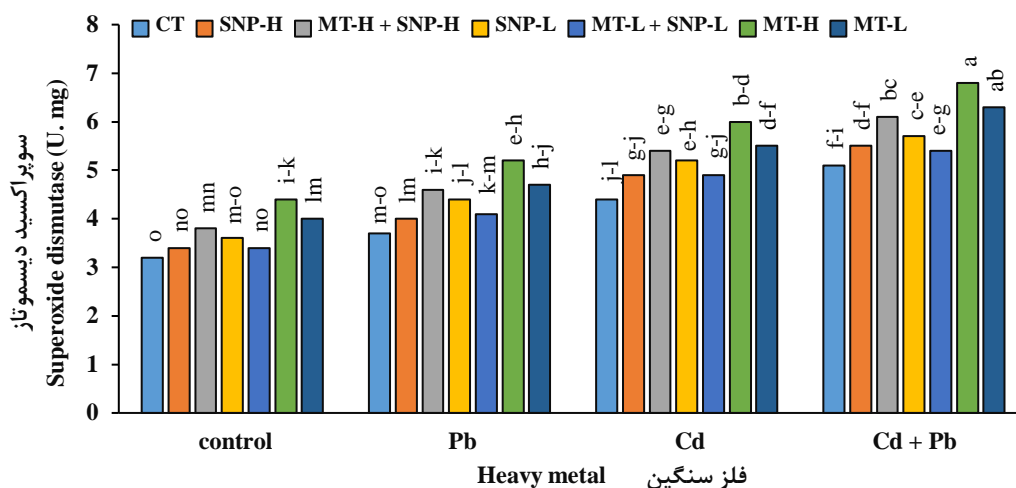
0.1 میلی‌مولار نیتروپروساید سدیم، 0.05 میلی‌مولار ملاتونین + 0.5 میلی‌مولار نیتروپروساید سدیم، 0.1 میلی‌مولار ملاتونین + 1.5 میلی‌مولار نیتروپروساید سدیم.

Different letters in each column indicate significance at the 5% probability level.

Different letters in each column indicate significance at the 5% probability level.

بدون فلزات سنگین و محرک زیستی) میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز برای تیمارهای مختلف ۱/۱۳ برابر می‌باشد (شکل ۱).

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز افزوده شد. تفاوت بیشترین (۶/۸) واحد فعالیت آنزیمی بر میلی‌گرم پروتئین در تیمار ترکیبی Cd + Pb و در تیمار (MT-H) و کمترین (۳/۲) واحد فعالیت آنزیمی بر میلی‌گرم پروتئین در تیمار شاهد

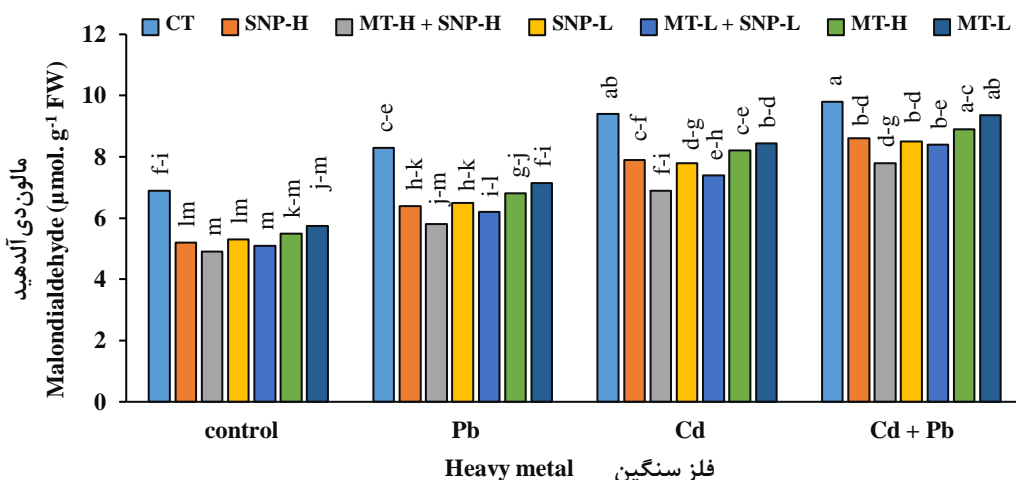


شکل ۱. برهمکنش فلز سنگین و محرک زیستی بر سوپراکسید دیسموتاز

Fig. 1. Interaction of heavy metal and Biostimulant on Superoxide dismutase

تفاوت در تیمار سرب، کادمیوم و ترکیب سرب + کادمیوم به ترتیب ۴۳، ۳۶ و ۲۶ درصد می‌باشد. تفاوت بیشترین (۹/۸) میکرومول بر گرم وزن تر در تیمار ترکیبی Cd + Pb و در تیمار شاهد بدون محرک زیستی) و کمترین (۴/۹) میکرومول بر گرم وزن تر در تیمار شاهد بدون فلزات سنگین و تیمار ترکیبی (MT-H + SNP-H) میزان برای تیمارهای مختلف ۱۰۰ درصد می‌باشد (شکل ۲).

مقایسه میانگین صفات نشان داد با اعمال تیمار فلزات سنگین بر میزان مالون‌دی‌آلدهید افزوده شد. همچنین در هر چهار سطح تیمار فلزات سنگین، اعمال محرک‌های زیستی میزان مالون‌دی‌آلدهید را کاهش داد. در تیمار شاهد بدون فلزات سنگین، تفاوت میزان مالون‌دی‌آلدهید برای تیمار شاهد بدون محرک زیستی (بیشترین میزان مالون‌دی‌آلدهید) و مقادیر بالای تیمار ترکیبی ملاتونین و نیتروپروساید سدیم (کمترین میزان مالون‌دی‌آلدهید) ۴۱ درصد می‌باشد. این

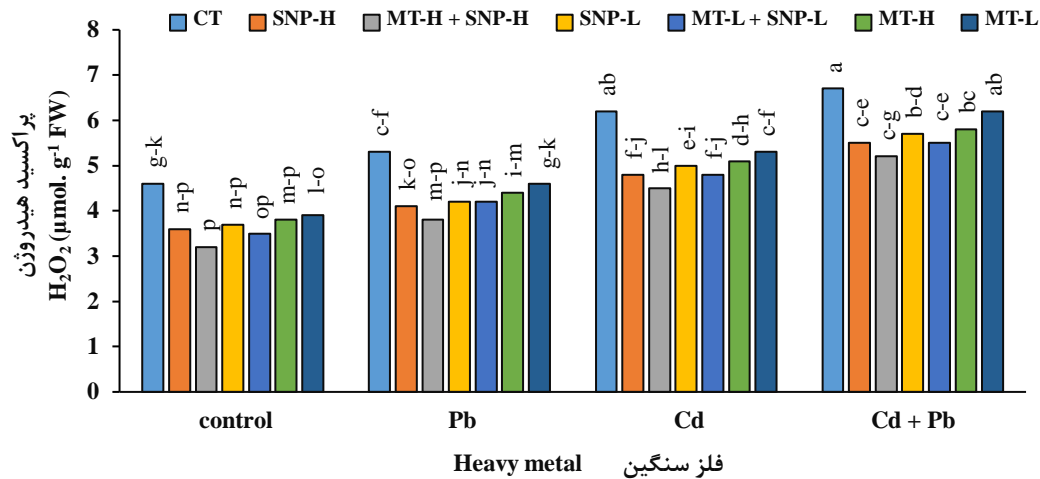


شکل ۲. برهمکنش فلز سنگین و محرک زیستی بر مالون‌دی‌آلدهید

Fig. 2. Interaction of heavy metal and Biostimulant on malondialdehyde (MDA)

در تیمار شاهد بدون محرک زیستی) و کمترین (۳/۲ میکرومول بر گرم وزن تر در تیمار شاهد بدون فلزات سنگین و تیمار ترکیبی MT-H + SNP-H) میزان آنزیم پراکسید هیدروژن برای تیمارهای مختلف ۱/۰۹ برابر می‌باشد (شکل ۳).

برهمکنش فلزات سنگین و محرک‌های زیستی نشان داد تیمارهای فلزات سنگین میزان آنزیم پراکسید هیدروژن را افزایش داد، از سوی دیگر، با اعمال تیمار محرک‌های زیستی بر میزان آنزیم پراکسید هیدروژن افزوده شد. تفاوت بیشترین (۶/۷ میکرومول بر گرم وزن تر در تیمار ترکیبی Cd + Pb و



شکل ۳. برهمکنش فلز سنگین و محرک زیستی بر پراکسید هیدروژن

Fig. 3. Interaction of heavy metal and Biostimulant on H₂O₂

فلزات سنگین مانند کادمیوم و سرب تنش اکسیداتیو را تحت تنش ترکیبی تشدید کردند. تیمارهای Pb و Cd فعالیت POD را به ترتیب ۲۴ و ۱۲ درصد افزایش دادند و باعث افزایش متقابل در فعالیت SOD شدند در حالی که تیمار ترکیبی فلزات سنگین میزان فعالیت POD را ۳۲ درصد افزایش داد. این تیمارهای ترکیبی همچنین سطح MDA را ۴۲ درصد و سطح H₂O₂ را ۴۶ درصد افزایش دادند. مکانیسم اصلی تأثیر این فلزات به توانایی آنها در تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) مانند سوپراکسید و پراکسید هیدروژن برمی‌گردد. SOD، که وظیفه تبدیل سوپراکسید به پراکسید هیدروژن را بر عهده دارد، معمولاً در مواجهه با تنش فلزات سنگین افزایش فعالیت نشان می‌دهد تا از آسیب بیشتر جلوگیری کند. با این حال، سطوح بالای ROS می‌تواند ساختار و کارایی این آنزیم را مختل کند (Hong et al., 2024).

پراکسیدازها نیز که نقش تجزیه پراکسید هیدروژن را دارند، ابتدا ممکن است فعالیت خود را افزایش دهند، اما در صورت تجمع بیش از حد فلزات سنگین و آسیب به پروتئین‌ها و گروه‌های تیول موجود در آنزیم، فعالیت آنها کاهش می‌یابد (Jomova et al., 2024). علاوه بر این، فلزات سنگین می‌توانند با جایگزینی یون‌های فلزی ضروری مانند آهن یا مس در جایگاه‌های فعال این آنزیم‌ها، عملکرد آنها را مختل کنند. این تغییرات در فعالیت SOD و POD تعادل سیستم آنتی‌اکسیدانی را بر هم زده و منجر به تشدید آسیب اکسیداتیو در سلول می‌شود (Prejano et al., 2020). این تغییرات با مطالعات پیشین که نشان می‌دهند فلزات سنگین باعث ایجاد تنش اکسیداتیو در گیاهان می‌شود و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به‌عنوان مکانیزم دفاعی افزایش می‌یابد، همسو است (Gill and Tuteja, 2010). همچنین، این افزایش نشانگرهای تنش اکسیداتیو مانند MDA و H₂O₂ در شرایط تنش، که نشان‌دهنده پراکسیداسیون لیپیدها و افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) است، به طور گسترده‌ای در مطالعات قبلی گزارش شده است (Anjum et al., 2011).

تیمارهای ملاتونین و نیتروپروپوساید سدیم به طور معناداری تنش اکسیداتیو را کاهش داده و فعالیت POD و SOD را افزایش دادند. تیمار MT تحت شرایط تیمار ترکیبی فلزات سنگین فعالیت SOD را تا ۵۵ درصد افزایش داد، در حالی که تیمار SNP سطح MDA را تا ۶۵ درصد و H₂O₂

تیمارهای ملاتونین و نیتروپروپوساید سدیم به طور معناداری تنش اکسیداتیو را کاهش داده و فعالیت POD و SOD را افزایش دادند. تیمار MT تحت شرایط تیمار ترکیبی فلزات سنگین فعالیت SOD را تا ۵۵ درصد افزایش داد، در حالی که تیمار SNP سطح MDA را تا ۶۵ درصد و H₂O₂

این سطوح تحت تیمارهای MT و SNP افزایش یافت که نشان‌دهنده فعالیت میکروبی بهبودیافته خاک تحت شرایط تنش است. این یافته‌ها با تحقیقات پیشین که تأثیرات مثبت تیمارهای شیمیایی بر زیست‌توده و فعالیت میکروبی خاک تحت شرایط تنش را نشان می‌دهند، همخوانی دارند (Zhang et al., 2018). تیمارهای ملاتونین و نیتروپروساید سدیم به طور قابل توجهی زیست‌توده خاک و فعالیت میکروبی را تحت شرایط تنش فلزات سنگین افزایش دادند. این تیمارها باعث افزایش MBC و MBN تا ۹ و ۳۰ درصد در سخت‌ترین شرایط (تیمار ترکیبی Cd + Pb) شدند که نقش آن‌ها در بهبود سلامت خاک و حمایت از رشد گیاه در شرایط تنش را نشان می‌دهد. این افزایش در فعالیت میکروبی خاک برای حفظ حاصلخیزی خاک و بهره‌وری گیاهان تحت شرایط نامساعد بسیار حیاتی است (Nawaz et al., 2016).

رنگدانه‌های فتوسنتزی

نتایج تجزیه واریانس صفات نشان داد اثرات اصلی فلزات سنگین و محرک زیستی تأثیر معنی‌داری بر کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل داشت ولی برهمکنش دوگانه آنها معنی‌دار نبود. از سوی دیگر، اثرات اصلی فلزات سنگین و محرک زیستی و برهمکنش دوگانه آنها تأثیر معنی‌داری در سطح یک درصد بر میزان کاروتنوئید داشت (جدول ۳).

مقایسه میانگین صفات برای فلزات سنگین نشان داد تفاوت بیشترین (شاهد بدون فلز سنگین) و کمترین (تیمار ترکیبی Cd + Pb) میزان کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل به ترتیب ۶۳، ۳۳ و ۴۶ درصد بود. همچنین نتایج محرک‌های زیستی نشان داد مقادیر بالای تیمار ترکیبی ملاتونین و نیتروپروساید سدیم به همراه مقادیر بالای ترکیبات جداگانه آنها دارای بیشترین میزان کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل بودند. تفاوت بیشترین (به ترتیب ۲/۷۰، ۰/۶ و ۴/۲۷ میلی‌گرم در گرم وزن تر در تیمار ترکیبی MT-H + SNP-H) و کمترین (۱/۷۳، ۰/۵۰۵ و ۳/۱۱ میلی‌گرم در گرم وزن تر در تیمار شاهد) میزان کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل برای تیمارهای مختلف به ترتیب ۵۶، ۱۹ و ۳۷ درصد می‌باشد (جدول ۴).

مقایسه میانگین صفات نشان داد با اعمال تیمار فلزات سنگین از میزان کاروتنوئید کاسته شد. همچنین در هر چهار سطح تیمار فلزات سنگین، اعمال محرک‌های زیستی میزان

را تا ۵۳ درصد کاهش داد. این یافته‌ها با تحقیقات قبلی همخوانی دارد که نشان می‌دهند MT و SNP باعث بهبود دفاع آنتی‌اکسیدانی، کاهش آسیب اکسیداتیو و افزایش تحمل به تنش در گیاهان می‌شوند (Hasanuzzaman et al., 2014a; Arnao and Hernández-Ruiz 2015).

نیتروژن و کربن زیست‌توده میکروبی

با توجه به نتایج مقایسه میانگین صفات، تفاوت بیشترین (شاهد بدون فلز سنگین) و کمترین (تیمار ترکیبی Cd + Pb) میزان MBC و MBN به ترتیب ۸ و ۳۳ درصد بود. همچنین نتایج محرک‌های زیستی نشان داد مقادیر بالای تیمار ترکیبی ملاتونین و نیتروپروساید سدیم به همراه مقادیر بالای ترکیبات جداگانه آنها دارای بیشترین میزان MBC و MBN بودند. تفاوت بیشترین (به ترتیب ۲۴۸ و ۶۰ میلی‌گرم در کیلوگرم در تیمار ترکیبی MT-H + SNP-H) و کمترین (به ترتیب ۲۲۸ و ۴۶ میلی‌گرم در کیلوگرم در تیمار شاهد) میزان MBC و MBN برای تیمارهای مختلف به ترتیب ۹ و ۳۰ درصد می‌باشد (جدول ۲).

سطوح MBC و MBN تحت تیمارهای مختلف تفاوت‌های معناداری نشان دادند. تیمارهای Cd + Pb صفت MBC را ۸ درصد و MBN را ۳۳ درصد کاهش دادند. این فلزات با ایجاد سمیت مستقیم برای میکروارگانیسم‌های خاک، ساختار و عملکرد جوامع میکروبی را مختل می‌کنند. سرب و کادمیوم از طریق اتصال به غشاهای سلولی و اختلال در فرآیندهای زیستی، رشد و فعالیت متابولیکی میکروارگانیسم‌ها را کاهش می‌دهند (Abd Elnabi et al., 2023). این فلزات همچنین با افزایش گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و ایجاد تنش اکسیداتیو، تخریب اجزای سلولی مانند پروتئین‌ها، لیپیدها و DNA را تسریع می‌کنند (Kou et al., 2024). کاهش فعالیت میکروارگانیسم‌ها منجر به کاهش MBC و MBN می‌شود، زیرا این شاخص‌ها بیانگر میزان کربن و نیتروژن ذخیره‌شده در بیومیکروب‌ها هستند (Qu et al., 2023). علاوه بر این، فلزات سنگین می‌توانند با تغییر در ترکیب جوامع میکروبی و کاهش تنوع زیستی، توانایی تجزیه مواد آلی و چرخه عناصر غذایی در خاک را محدود کنند (Qu et al., 2023). در نتیجه، کاهش MBC و MBN نشان‌دهنده تأثیر منفی فلزات سنگین بر پایداری اکوسیستم خاک و کارایی آن در چرخه عناصر غذایی است.

جدول ۳. تجزیه واریانس رنگدانه‌های فتوسنتزی تحت تأثیر فلزات سنگین و محرک زیستی

Table 3. Analysis of variance for photosynthetic pigments influenced by heavy metals and Biostimulant

Sources of Variation	منابع تغییر	درجه آزادی DF	میانگین مربعات (Mean Square)			
			کلروفیل a Cl a	کلروفیل b Cl b	کاروتنوئید Carotenoid	کلروفیل کل Total chlorophyll
Block	بلوک	3	0.310 ^{ns}	0.072 ^{**}	0.035 ^{**}	0.821 [*]
Heavy metal (A)	فلز سنگین	3	6.10 ^{**}	0.131 ^{**}	0.153 ^{**}	10.4 ^{**}
Biostimulant (B)	محرک زیستی	6	1.23 ^{**}	0.015 [*]	0.036 ^{**}	1.49 ^{**}
A × B	فلز سنگین × محرک زیستی	18	0.073 ^{ns}	0.003 ^{ns}	0.016 ^{**}	0.196 ^{ns}
Total error	خطای کل	81	0.160	0.006	0.005	0.221
C.V. (%)	ضریب تغییرات		17.9	13.6	7.38	12.4

ns, * و ** به ترتیب عدم معنی داری، معنی داری در سطح پنج درصد و معنی داری در سطح یک درصد می‌باشد.

ns, * and ** indicate non-significance, significance at the five percent level, and significance at the one percent level, respectively

جدول ۴. اثرات اصلی فلزات سنگین و محرک زیستی بر صفات

کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل

Table 4. Main effects of heavy metals and Biostimulant on Chlorophyll a, chlorophyll b and total chlorophyll traits.

تیمارهای مختلف Different treatments	کلروفیل a Cl a	کلروفیل b Cl b	کلروفیل کل Total chlorophyll
	----- mg. g ⁻¹ FW -----		
فلز سنگین			
Heavy metal			
Control شاهد	2.77 ^a	0.630 ^a	4.47 ^a
Cd کادمیوم	2.44 ^b	0.579 ^b	4.04 ^b
Pb سرب	2.04 ^c	0.517 ^c	3.52 ^c
Cd + Pb	1.70 ^d	0.474 ^d	3.07 ^d
محرک زیستی			
Biostimulant			
CT	1.73 ^d	0.505 ^{bc}	3.11 ^c
SNP-H	2.33 ^{bc}	0.573 ^{ab}	3.89 ^b
MT-H + SNP-H	2.70 ^a	0.600 ^a	4.27 ^a
SNP-L	2.10 ^{cd}	0.510 ^c	3.66 ^b
MT-L + SNP-L	2.18 ^{cd}	0.545 ^{a-c}	3.87 ^b
MT-H	2.40 ^b	0.590 ^a	3.97 ^{ab}
MT-L	2.23 ^{bc}	0.528 ^{bc}	3.66 ^b

CT: شاهد، MT-L: 0.05 میلی‌مولار ملاتونین، MT-H: 0.1 میلی‌مولار ملاتونین، SNP-L: 0.5 میلی‌مولار نیتروپروساید سدیم، SNP-H: 1.5 میلی‌مولار نیتروپروساید سدیم، MT-L + SNP-L: ترکیب 0.05 میلی‌مولار ملاتونین + 0.5 میلی‌مولار نیتروپروساید سدیم و MT-L + SNP-L: ترکیب 0.1 میلی‌مولار ملاتونین + 1.5 میلی‌مولار نیتروپروساید سدیم. حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده معنی داری در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد.

(CT: Control, MT-L: 0.05 mM Melatonin, MT-H: 0.1 mM Melatonin, SNP-L: 0.5 mM Sodium Nitroprusside, SNP-H: 1.5 mM Sodium Nitroprusside, MT-L + SNP-L: combination of 0.05 mM Melatonin + 0.5 mM Sodium Nitroprusside, MT-H + SNP-H: combination of 0.1 mM Melatonin + 1.5 mM Sodium Nitroprusside). Different letters in each column indicate significance at the 5% probability level.

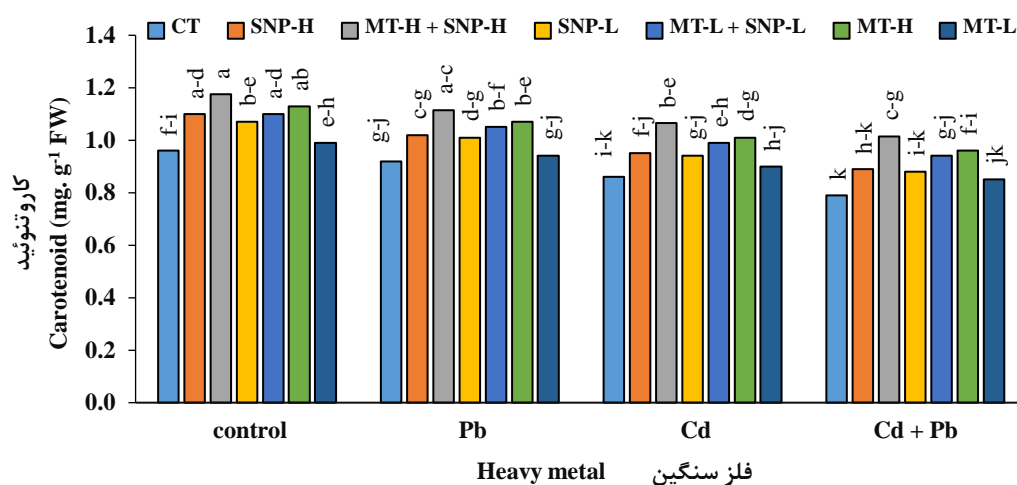
کاروتنوئید را افزایش داد. در تیمار شاهد بدون فلزات سنگین، تفاوت میزان کاروتنوئید برای تیمار شاهد بدون محرک زیستی (کمترین میزان کاروتنوئید) و مقادیر بالای تیمار ترکیبی ملاتونین و نیتروپروساید سدیم (بیشترین میزان کاروتنوئید) ۲۲ درصد می‌باشد. این تفاوت در تیمار سرب، کادمیوم و ترکیب سرب + کادمیوم به ترتیب ۲۱، ۲۴ و ۲۹ درصد می‌باشد. تفاوت بیشترین (۱/۱۷۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر در تیمار شاهد بدون فلزات سنگین و در تیمار تیمار ترکیبی (MT-H + SNP-H) و کمترین (۰/۷۹ میلی‌گرم بر گرم وزن تر در تیمار ترکیبی Cd + Pb و تیمار شاهد بدون محرک زیستی) میزان کاروتنوئید برای تیمارهای مختلف ۴۹ درصد می‌باشد (شکل ۴).

فلزات سنگین مانند سرب (Pb) و کادمیوم (Cd) اثرات منفی قابل توجهی بر رنگدانه‌های فتوسنتزی مانند کلروفیل‌ها و کاروتنوئیدها دارند. این فلزات می‌توانند با اختلال در سنتز و پایداری رنگدانه‌ها، کاهش غلظت آنها را به دنبال داشته باشند (Yuan et al., 2024). مکانیسم اصلی این اثرات شامل القای تنش اکسیداتیو از طریق تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) است که به ساختار رنگدانه‌ها آسیب می‌رساند و آنها را تخریب می‌کند (Yuan et al., 2024). علاوه بر این، سرب و کادمیوم با اتصال به جایگاه‌های فعال آنزیم‌هایی که در مسیرهای بیوسنتزی کلروفیل نقش دارند (مانند آنزیم پروتوپورفیرینوزن اکسیداز)، از سنتز کلروفیل جلوگیری می‌کنند (Koch et al., 2004). این فلزات همچنین با اختلال در جذب مواد معدنی ضروری مانند منیزیم و آهن، که اجزای کلیدی کلروفیل هستند، تأثیر منفی بیشتری بر

آنتی‌اکسیدانی بهبود دادند که مشابه نتایج ما گزارش شده است (Ullah et al., 2024؛ Muhammad et al., 2023). علاوه بر این، استفاده از نیتروپروپوساید سدیم برای کاهش سمیت فلزات سنگین در محصولات مختلف مستند شده است، که نتیجه‌گیری‌های ما را درباره اثر بخشی آن در ارتقای رشد ذرت تحت شرایط تنش تقویت می‌کند. مطالعات نشان داده‌اند که MT کارایی رنگدانه‌های فتوسنتزی و دفاع آنتی‌اکسیدانی را در گیاه ذرت به‌ویژه تحت تنش افزایش می‌دهد (Farooq et al., 2022).

ساختار و عملکرد این رنگدانه‌ها می‌گذارند (Giannakoula et al., 2021).

یافته‌های ما با مطالعات اخیر که نقش فیتوهورمون‌ها در افزایش مقاومت گیاهان تحت تنش‌های غیرزیستی را برجسته می‌کنند، هم‌خوانی دارد. افزایش مشاهده‌شده در رنگدانه‌های فتوسنتزی با نتایج مطالعات قبلی مطابقت دارد که به نقش فیتوهورمون‌ها در افزایش مقاومت گیاهان در شرایط تنش اشاره دارند (Ullah et al., 2024؛ Khan et al., 2024). ملاتونین و نیتروپروپوساید سدیم به طور معناداری تحمل خشکی را در ذرت با افزایش رنگدانه‌های فتوسنتزی و فعالیت



شکل ۴. برهمکنش فلز سنگین و محرک زیستی بر کاروتنوئید

Fig. 4. Interaction of heavy metal and Biostimulant on carotenoid

خصوصیات رشدی

خصوصیات رشدی) و مقادیر بالای تیمار ترکیبی ملاتونین و نیتروپروپوساید سدیم (بیشترین میزان خصوصیات رشدی) به ترتیب ۳۳، ۲۰، ۲۰، ۱۹ و ۲۳ درصد می‌باشد. تفاوت بیشترین (به ترتیب ۱/۰۹، ۱/۶۱، ۲/۳۰، ۳/۹۱ و ۵ گرم در تیمار شاهد بدون فلزات سنگین و در تیمار ترکیبی MT-H + SNP-H) و کمترین (۰/۶۹، ۱/۰۷، ۱/۵۴، ۲/۶۱ و ۳/۳۰ گرم در تیمار ترکیبی Cd + Pb و تیمار شاهد بدون محرک زیستی) میزان وزن خشک ریشه، وزن خشک ساقه، وزن خشک برگ، وزن خشک اندام هوایی و وزن خشک کل گیاه برای تیمارهای مختلف به ترتیب ۵۸، ۵۱، ۴۹، ۵۰ و ۵۲ درصد می‌باشد (جدول ۶).

بیومس گیاه و وزن بافت‌ها به طور قابل توجهی تحت تأثیر تنش فلزات سنگین قرار گرفتند و با اعمال تنش فلزات سنگین، کاهش محسوسی مشاهده شد. این الگو با تحقیقات

با توجه به نتایج تجزیه واریانس صفات، اثرات اصلی فلزات سنگین و محرک زیستی و برهمکنش دوگانه آنها تأثیر معنی‌داری در سطح یک درصد بر صفات وزن خشک ریشه، وزن خشک ساقه، وزن خشک برگ، وزن خشک اندام هوایی و وزن خشک کل گیاه معنی‌دار بود (جدول ۵).

با توجه به نتایج مقایسه میانگین صفات، با اعمال تیمار فلزات سنگین از میزان خصوصیات رشدی (وزن خشک ریشه، وزن خشک ساقه، وزن خشک برگ، وزن خشک اندام هوایی و وزن خشک کل گیاه) کاسته شد. همچنین در هر چهار سطح تیمار فلزات سنگین، اعمال محرک‌های زیستی میزان خصوصیات رشدی را افزایش داد. در تیمار شاهد بدون فلزات سنگین، تفاوت میزان وزن خشک ریشه، وزن خشک ساقه، وزن خشک برگ، وزن خشک اندام هوایی و وزن خشک کل گیاه برای تیمار شاهد بدون محرک زیستی (کمترین میزان

نشان داده‌اند SNP و MT با تنظیم فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مقاومت به فلزات سنگین را افزایش می‌دهند (Wang et al., 2013؛ Hasanuzzaman et al., 2014b). همچنین گزارش شده است که SNP با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاه ذرت سمیت کادمیوم را کاهش می‌دهد، که با یافته‌های این مطالعه همخوانی دارد (Sayyadi et al., 2023). مطالعات متعددی نشان داده‌اند که MT و SNP با استفاده از فرآیندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مختلف به مقاومت گیاه در برابر چالش‌های غیرزیستی کمک می‌کنند (Tan et al., 2013؛ Kaur and Bhatla 2016؛ Kaur and Shyu 2018).

دیگر که نشان می‌دهند فلزات سنگین جذب آب و مواد مغذی را در گیاهان محدود کرده و باعث کاهش فتوسنتز و تجمع بیومس می‌شود، همخوانی دارد (Farooq et al., 2009). بر اساس داده‌های کمی این مطالعه، در شرایط ترکیبی فلزات سنگین (Cd + Pb) وزن خشک کل گیاه تا ۲۴ درصد در مقایسه با تیمار شاهد کاهش یافت. از سوی دیگر، تأثیرات منفی فلزات سنگین به طور قابل توجهی توسط تیمارهای ملاتونین و نیتروپروساید سدیم کاهش یافت. در مقایسه با تیمار شاهد، گیاهان تیمار شده با MT تحت تنش ترکیبی افزایش ۲۶ درصدی وزن خشک کل را نشان دادند. به طور مشابه، تیمارهای SNP باعث افزایش ۲۰ درصدی وزن خشک کل شدند. این نتایج با مطالعات قبلی مطابقت دارد که

جدول ۵- تجزیه واریانس خصوصیات رشدی ذرت تحت تأثیر فلزات سنگین و محرک زیستی

Table 5- Analysis of variance for growth characteristics of maize influenced by heavy metals and Biostimulant

Sources of Variation	منابع تغییر	درجه آزادی DF	میانگین مربعات (Mean Square)				
			وزن خشک ریشه Root dry weight	وزن خشک ساقه Root dry stem	وزن خشک برگ Root dry leaf	وزن خشک اندام هوایی Root dry shoot	وزن خشک کل گیاه Root dry whole plant
Block	بلوک	3	0.035**	0.014 ^{ns}	0.080 ^{ns}	0.136 ^{ns}	0.274**
Heavy metal (A)	فلز سنگین	3	0.133**	0.239**	0.411**	1.28**	2.23**
Biostimulant (B)	محرک زیستی	6	0.047**	0.081**	0.180**	0.500**	0.833**
A × B	فلز سنگین × محرک زیستی	18	0.017**	0.033**	0.080*	0.216**	0.351**
Total error	خطای کل	81	0.005	0.012	0.046	0.053	0.063
C.V. (%)	ضریب تغییرات		8.48	7.99	10.9	6.92	6.00

ns, * و ** به ترتیب عدم معنی داری، معنی داری در سطح پنج درصد و معنی داری در سطح یک درصد می‌باشد.

ns, * and ** indicate non-significance, significance at the five percent level, and significance at the one percent level, respectively

نتیجه‌گیری

پتانسیل این ترکیبات در بهبود مقاومت و تولید محصولات کشاورزی در مناطق مستعد تنش را نشان می‌دهد. مطالعات بعدی باید مسیرهای مولکولی مرتبط با افزایش تحمل تنش توسط MT و SNP را بررسی کنند، آزمایش‌های میدانی برای ارزیابی کاربردپذیری آن‌ها در کشاورزی انجام دهند و روش‌های کاربردی را برای استفاده گسترده در گونه‌های مختلف زراعی و شرایط محیطی متنوع اصلاح نمایند. به طور کلی، این بهبودها به عملکرد بهتر رشد و پتانسیل افزایش عملکرد تحت شرایط چالش‌برانگیز کمک می‌کنند. بر اساس یافته‌های این تحقیق، به دینفعان کشاورزی توصیه می‌شود که این تیمارها را به‌عنوان بخشی از استراتژی‌های مدیریت

این مطالعه با هدف بررسی اثربخشی ملاتونین و نیتروپروساید سدیم در کاهش اثرات مضر فلزات سنگین (HMs) بر رشد ذرت انجام شد. یافته‌ها نشان داد که هر دو تیمار مقاومت گیاه در برابر این چالش‌های محیطی را بهبود می‌بخشند. نتایج تحقیق به‌طور مشخص تأثیرات مثبت MT و SNP در افزایش مقاومت ذرت در برابر تنش‌های ترکیبی (Cd + Pb) فلزات سنگین را روشن کرد. یافته‌های آزمایش تأیید می‌کند که تیمارهای MT و SNP با کاهش نشانگرهای تنش اکسیداتیو مانند H₂O₂ و MDA و همچنین افزایش معنادار اندام هوایی و کارایی رنگدانه‌های فتوسنتز تأثیر بسزایی دارند. این نتایج،

روش‌های کشاورزی، به‌ویژه در مناطقی که با تنش‌های محیطی متعدد روبرو هستند، تأکید دارد. ترکیب نوآورانه تیمارها در این تحقیق، رویکردی امیدوارکننده برای افزایش بهره‌وری و پایداری تولید ذرت ارائه می‌دهد.

یکپارچه محصولات زراعی به کار گیرند. این بینش‌ها نه تنها مبنایی برای کاربردهای عملی در کشاورزی فراهم می‌کنند، بلکه مسیر تحقیقات آینده برای بهینه‌سازی این تیمارها در گونه‌های زراعی گسترده‌تر را نیز هموار می‌سازند. این مطالعه بر اهمیت ادغام محرک‌های زیستی مانند MT و SNP در

جدول ۶. برهمکنش فلز سنگین و محرک زیستی بر صفات رشدی ذرت

Table 6. Interaction of heavy metal and Biostimulant on growth characteristics of maize.

تیمارهای مختلف	محرک زیستی Foliar spraying	وزن خشک ریشه	وزن خشک ساقه	وزن خشک برگ	وزن خشک اندام هوایی	وزن خشک کل گیاه
Different treatments	spraying	Root dry weight (g)	Root dry stem (g)	Root dry leaf (g)	Root dry shoot (g)	Root dry whole plant (g)
شاهد control	CT	0.820 ^{c-i}	1.34 ^{e-j}	1.92 ^{c-f}	3.26 ^{e-g}	4.08 ^{f-j}
	SNP-H	0.950 ^{b-d}	1.51 ^{a-d}	2.12 ^{a-d}	3.63 ^{a-d}	4.58 ^{b-d}
	MT-H + SNP-H	1.09 ^a	1.61 ^a	2.30 ^a	3.91 ^a	5.00 ^a
	SNP-L	0.860 ^{d-g}	1.40 ^{c-h}	1.98 ^{b-e}	3.38 ^{c-f}	4.24 ^{d-i}
	MT-L + SNP-L	0.950 ^{b-d}	1.52 ^{a-d}	2.15 ^{a-d}	3.67 ^{a-c}	4.62 ^{b-c}
	MT-H	1.00 ^{a-c}	1.57 ^{ab}	2.19 ^{a-c}	3.76 ^{ab}	4.76 ^{ab}
کادمیوم Cd	MT-L	0.910 ^{c-e}	1.46 ^{a-f}	2.06 ^{a-d}	3.52 ^{b-e}	4.43 ^{b-f}
	CT	0.780 ^{g-j}	1.25 ^{h-k}	1.74 ^{e-h}	2.99 ^{g-i}	3.77 ^{j-l}
	SNP-H	0.910 ^{c-e}	1.42 ^{b-g}	2.03 ^{a-e}	3.45 ^{b-f}	4.36 ^{c-g}
	MT-H + SNP-H	1.03 ^{ab}	1.53 ^{a-c}	2.22 ^{ab}	3.75 ^{ab}	4.78 ^{ab}
	SNP-L	0.820 ^{e-i}	1.32 ^{e-k}	1.86 ^{d-g}	3.18 ^{fg}	4.00 ^{h-k}
	MT-L + SNP-L	0.900 ^{c-e}	1.47 ^{a-e}	2.07 ^{a-d}	3.54 ^{b-e}	4.44 ^{b-e}
سرب Pb	MT-H	0.940 ^{b-d}	1.50 ^{a-d}	2.11 ^{a-d}	3.61 ^{a-d}	4.55 ^{b-d}
	MT-L	0.860 ^{d-g}	1.38 ^{c-i}	1.94 ^{b-f}	3.32 ^{d-f}	4.18 ^{e-i}
	CT	0.730 ^{h-j}	1.19 ^{j-l}	1.62 ^{gh}	2.81 ^{ij}	3.54 ^{lm}
	SNP-H	0.860 ^{d-g}	1.37 ^{d-i}	1.95 ^{b-f}	3.32 ^{d-f}	4.18 ^{e-i}
	MT-H + SNP-H	0.945 ^{b-d}	1.47 ^{a-e}	2.13 ^{a-d}	3.60 ^{a-d}	4.55 ^{b-d}
	SNP-L	0.760 ^{g-j}	1.24 ^{i-k}	1.74 ^{e-h}	2.98 ^{g-i}	3.74 ^{j-l}
Cd + Pb	MT-L + SNP-L	0.830 ^{e-h}	1.41 ^{c-g}	1.99 ^{b-e}	3.40 ^{c-f}	4.23 ^{d-i}
	MT-H	0.890 ^{d-f}	1.43 ^{b-g}	2.03 ^{a-e}	3.46 ^{b-f}	4.35 ^{c-h}
	MT-L	0.810 ^{e-i}	1.31 ^{f-k}	1.86 ^{d-g}	3.17 ^{f-h}	3.98 ^{i-k}
	CT	0.690 ^{de}	1.07 ^{b-g}	1.54 ^h	2.61 ^{b-f}	3.30 ^{c-g}
	SNP-H	0.790 ^{f-j}	1.30 ^{g-k}	1.86 ^{d-g}	3.16 ^{f-h}	3.95 ^{i-k}
	MT-H + SNP-H	0.895 ^j	1.42 ^l	2.05 ^{a-d}	3.47 ^j	4.37 ^m
	SNP-L	0.720 ^{ij}	1.18 ^{kl}	1.67 ^{f-h}	2.85 ^{h-j}	3.57 ^{lm}
	MT-L + SNP-L	0.790 ^{f-j}	1.34 ^{e-j}	1.92 ^{c-f}	3.26 ^{e-g}	4.05 ^{g-k}
	MT-H	0.830 ^{e-h}	1.38 ^{c-i}	1.96 ^{b-f}	3.34 ^{d-f}	4.17 ^{e-i}
	MT-L	0.750 ^{h-j}	1.20 ^{j-l}	1.75 ^{e-h}	2.95 ^{g-i}	3.70 ^{kl}

CT): شاهد، MT-L: ۰/۰۵ میلی‌مولار ملاتونین، MT-H: ۰/۱ میلی‌مولار ملاتونین، SNP-L: ۰/۵ میلی‌مولار نیتروپروساید سدیم، SNP-H: ۱/۵ میلی‌مولار نیتروپروساید سدیم، MT-L + SNP-L: ترکیب ۰/۰۵ میلی‌مولار ملاتونین + ۰/۵ میلی‌مولار نیتروپروساید سدیم و MT-L + SNP-L: ترکیب ۰/۱ میلی‌مولار ملاتونین + ۱/۵ میلی‌مولار نیتروپروساید سدیم). حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده‌ی معنی داری در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد. (CT: Control, MT-L: 0.05 mM Melatonin, MT-H: 0.1 mM Melatonin, SNP-L: 0.5 mM Sodium Nitroprusside, SNP-H: 1.5 mM Sodium Nitroprusside, MT-L + SNP-L: combination of 0.05 mM Melatonin + 0.5 mM Sodium Nitroprusside, MT-H + SNP-H: combination of 0.1 mM Melatonin + 1.5 mM Sodium Nitroprusside). Different letters in each column indicate significance at the 5% probability level.

منابع

Abd Elnabi, M.K., Elkaliny, N.E., Elyazied, M.M., Azab, S.H., Elkhalfifa, S.A., Elmasry, S., Mouhamed, M.S., Shalamesh, E.M.,

Alhoriény, N.A., Abd Elaty, A.E., 2023. Toxicity of heavy metals and recent advances

- in their removal: A review. *Toxics*. 11, 580. <https://doi.org/10.3390/toxics11070580>.
- Ahmad, M.S.A., Ashraf, M., Tabassam, Q., Hussain, M., Firdous, H., 2011. Lead (Pb)-induced regulation of growth, photosynthesis, and mineral nutrition in maize (*Zea mays* L.) plants at early growth stages. *Biological Trace Element Research*. 144, 1229–1239. <https://doi.org/10.1007/s12011-011-9099-5>.
- Akram, M.A., Wahid, A., Abrar, M., Manan, A., Naeem, S., Zahid, M.A., Gilani, M.M., Paudyal, R., Gong, H.Y., Ran, J.Z., 2021. Comparative study of six maize (*Zea mays* L.) cultivars concerning cadmium uptake, partitioning and tolerance. *Applied Ecology and Environmental Research*. 19(3), 2305–2331. https://DOI:10.15666/aeer/1903_23052331.
- Anjum, S. A., Farooq, M., Wang, L. C., Xue, L. L., Wang, S. G., Wang, L., Zhang, S., Chen, M., 2011. Gas exchange and chlorophyll synthesis of maize cultivars are enhanced by exogenously applied glycinebetaine under drought conditions. *Plant, Soil and Environment*. 57(7), 326–331. <https://doi.org/10.17221/41/2011-pse>.
- Arnao, M. B., Hernández-Ruiz, J. (2015). Melatonin: Synthesis from tryptophan and its role in higher plants. In: D'Mello, J.P.F. (ed.), *Amino Acids in Higher Plants* (pp. 390–435). CAB International. <https://doi.org/10.1079/9781780642635.0390>
- Brennan, T., Frenkel, C., 1977. Involvement of hydrogen peroxide in the regulation of senescence in pear. *Plant Physiology*. 59(3), 411–416. <https://doi.org/10.1104/pp.59.3.411>.
- Colombage, R., Singh, M.B., Bhalla, P.L. 2023. Melatonin and abiotic stress tolerance in crop plants. *International Journal of Molecular Sciences*. 24, 7447. <https://doi.org/10.3390/ijms24247447>.
- Dere, S., Gines, T., Sivaci, R., 1998. Spectrophotometric determination of chlorophyll a, b and total carotenoid contents of some algae species using different solvents. *Turkish Journal of Botany*. 22, 13–17.
- Farooq, M.A., Islam, F., Ayyaz, A., Chen, W., Noor, Y., Hu, W., Hannan, F., Zhou, W., 2022. Mitigation effects of exogenous melatonin-selenium nanoparticles on arsenic-induced stress in *Brassica napus*. *Environmental Pollution*. 292, 118473. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118473>.
- Farooq, M., Hussain, M., Wahid, A., Siddique, K.H.M. (2012). Drought Stress in Plants: An Overview. In: Aroca, R. (ed.), *Plant Responses to Drought Stress*. Springer, Berlin, Heidelberg. pp. 1–33. https://doi.org/10.1007/978-3-642-32653-0_1
- Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D., Basra, S.M.A., 2009. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. In: Lichtfouse, E., Navarrete, M., Debaeke, P., Véronique, S., Alberola, C. (eds.), *Sustainable Agriculture*. Springer, Dordrecht. pp. 153–188. https://doi.org/10.1007/978-90-481-2666-8_12
- Ghori, N.H., Ghori, T., Hayat, M.Q., Imadi, S.R., Gul, A., Altay, V., Ozturk, M., 2019. Heavy metal stress and responses in plants. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 16, 1807–1828. <https://doi.org/10.1007/s13762-019-02215-8>.
- Giannakoula, A., Therios, I., Chatzissavvidis, C., 2021. Effect of lead and copper on photosynthetic apparatus in *Citrus* (*Citrus aurantium* L.) plants: The role of antioxidants in oxidative damage as a response to heavy metal stress. *Plants* (Basel). 10(1), 155. <https://doi.org/10.3390/plants10010155>.
- Giannopolitis, C.N., Ries, S.K., 1977. Superoxide dismutases, I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology*. 59, 309–314. <https://doi:10.1104/pp.59.2.309>.
- Gill, S.S., Tuteja, N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. 48, 909–930. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.004>.
- Hasanuzzaman, M., Alam, M.M., Rahman, A., Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Fujita, M., 2014a. Exogenous proline and glycine betaine mediated upregulation of antioxidant defense and glyoxalase systems provides better protection against salt-induced oxidative stress in two rice (*Oryza sativa* L.) varieties. *BioMed Research International*. 2014, 757219. <https://doi.org/10.1155/2014/757219>.
- Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M.H.M.B., Nahar, K., Hossain, M.S., Mahmud, J.A., Hossen, M.S., Masud, A.A.C., Moumita, Fujita, M., 2018. Potassium: A vital regulator of plant responses and tolerance to abiotic stresses. *Agronomy*. 8, 31. <https://doi.org/10.3390/agronomy8010031>.
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Alam, M.M., Bhowmik, P.C., Hossain, M.A., Rahman,

- M.M., Prasad, M.N.V., Ozturk, M., Fujita, M., 2014b. Potential use of halophytes to remediate saline soils. *BioMed Research International*. 2024, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2014/589341>.
- Heath, R.L., Packer, L., 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 125(1), 850–857. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1).
- Hong, Y., Boiti, A., Vallone, D., Foulkes, N. S. 2024. Reactive oxygen species signaling and oxidative stress: Transcriptional regulation and evolution. *Antioxidants*. 13, 312. <https://doi.org/10.3390/antiox13030312>
- Jomova, K., Alomar, S.Y., Alwasel, S.H., 2024. Several lines of antioxidant defense against oxidative stress: antioxidant enzymes, nanomaterials with multiple enzyme-mimicking activities, and low-molecular-weight antioxidants. *Archives of Toxicology*. 98, 1323–1367. <https://doi.org/10.1007/s00204-024-03696-4>.
- Kaur, H., Bhatla, S.C. 2016. Melatonin and nitric oxide modulate glutathione content and glutathione reductase activity in sunflower seedling cotyledons accompanying salt stress. *Nitric Oxide*. 59, 42–53. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2016.02.005>.
- Kaur, T., Shyu, BC., 2018. Melatonin: A new-generation therapy for reducing chronic pain and improving sleep disorder-related pain. In: Shyu, BC., Tominaga, M. (eds), *Advances in Pain Research: Mechanisms and Modulation of Chronic Pain*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 1099. Springer, Singapore. pp. 229–251. https://doi.org/10.1007/978-981-13-1756-9_19
- Khan, W., Zhu, Y., Khan, A., Zhao, L., Yang, Y.M., Wang, N., Hao, M., Ma, Y., Nepal, J., Ullah, F., 2024. Above- and below-ground feedback loop of maize is jointly enhanced by plant growth-promoting rhizobacteria and arbuscular mycorrhizal fungi in drier soil. *Science of the Total Environment*. 917, 170417. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.170417>.
- Koch, M., Breithaupt, C., Kiefersauer, R., Freigang, J., Huber, R., Messerschmidt, A., 2004. Crystal structure of protoporphyrinogen IX oxidase: A key enzyme in haem and chlorophyll biosynthesis. *EMBO Journal*, 23(8), 1720–1728. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600189>.
- Kou, Z., Tran, F., Dai, W. 2024. Heavy metals, oxidative stress, and the role of AhR signaling. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 482, 116769. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2023.116769>
- Langyan, S., Bhardwaj, R., Kumari, J., Jacob, S. R., Bisht, I.S., Pandravada, S.R., Singh, A., Singh, P.B., Dar, Z.A., Kumar, A., 2022. Nutritional diversity in native germplasm of maize collected from three different fragile ecosystems of India. *Frontiers in Nutrition*. 9, 812599. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.812599>.
- Muhammad, I., Yang, L., Ahmad, S., Farooq, S., Khan, A., Muhammad, N., Ullah, S., Adnan, M., Ali, S., Liang, Q.P., 2023. Melatonin-priming enhances maize seedling drought tolerance by regulating the antioxidant defense system. *Plant Physiology*. 191, 2301–2315. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiad027>.
- Nawaz, M. A., Huang, Y., Bie, Z., Ahmed, W., Reiter, R.J., Niu, M., Hameed, S., 2016. Melatonin: Current status and future perspectives in plant science. *Frontiers in Plant Science*. 6, 180101. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01230>
- Niyofasha, C.J., Borena, B.M., Ukob, I.T., Minh, P.N., Al Azzawi, T.N.I., Imran, M., Ali, S., Inthavong, A., Mun, B.G., Lee, I.J., 2023. Alleviation of Hg-, Cr-, Cu-, and Zn-induced heavy metals stress by exogenous sodium nitroprusside in rice plants. *Plants*. 12, 1299. <https://doi.org/10.3390/plants12051299>.
- Prejanò, M., Alberto, M.E., Russo, N., Toscano, M., Marino, T., 2020. The effects of the metal ion substitution into the active site of metalloenzymes: A theoretical insight on some selected cases. *Catalysts*. 10, 1038. <https://doi.org/10.3390/catal10091038>
- Qu, Q., Wang, Z., Gan, Q., Liu, R., Xu, H., 2023. Impact of drought on soil microbial biomass and extracellular enzyme activity. *Frontiers in Plant Science*. 14, 1221288. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1221288>
- Qu, Q., Wang, Z., Gan, Q., Liu, R., Xu, H. 2024. Corrigendum: Impact of drought on soil microbial biomass and extracellular enzyme activity. *Frontiers in Plant Science*. 15, 1393574. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1393574>.

- Sayyadi, G., Niknezhad, Y., Fallah, H., 2023. Sodium nitroprusside ameliorates lead toxicity in rice (*Oryza sativa* L.) by modulating the antioxidant scavenging system, nitrogen metabolism, lead sequestration mechanism, and proline metabolism. *Environmental Science and Pollution Research*. 30, 24408–24423. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-23913-w>.
- Srinivas, N.D., Rashmi, K.R., Raghavarao, K.R., 1999. Extraction and purification of a plant peroxidase by aqueous two-phase extraction coupled with gel filtration. *Process Biochemistry*. 35, 43–48. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(99\)00030-8](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(99)00030-8).
- Srivastava, V., Sarkar, A., Singh, S., Singh, P., De Araujo, A.S.F., Singh, R.P., 2017. Agroecological responses of heavy metal pollution with special emphasis on soil health and plant performances. *Frontiers in Environmental Science*. 5, 64. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2017.00064>.
- Tan, B.C., Chin, C.F., Alderson, P., 2013. Effects of sodium nitroprusside on shoot multiplication and regeneration of *Vanilla planifolia* Andrews. *In Vitro Cell Developmental Biology-Plant*. 49, 626–630. <https://doi.org/10.1007/s11627-013-9526-8>.
- Thomas, B.W., Whalen, J.K., Sharif, M., Chantigny, M., Zebarth, B.J., 2016. Labile organic matter fractions as early-season nitrogen supply indicators in manure-amended soils. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. 179, 94–103. <https://doi.org/10.1002/jpln.201500282>.
- Ullah, F., Saqib, S., Khan, W., Zhao, L., Khan, W., Li, M.Y., Xiong, Y.C., 2024. Sodium nitroprusside and melatonin improve physiological vitality and drought acclimation via synergistically enhancing antioxidant response in dryland maize. *Journal of Plant Growth Regulation*. <https://doi.org/10.1007/s00344-024-11498-2>.
- Wang, Y., Chantreau, M., Sibout, R., Hawkins, S., 2013. Plant cell wall lignification and monolignol metabolism. *Frontiers in Plant Science*. 4, 220. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00220>.
- Xu, W., Yuan, W., 2017. Responses of microbial biomass carbon and nitrogen to experimental warming: a meta-analysis. *Soil Biology and Biochemistry*. 115, 265–274. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.08.019>.
- Yuan, Z., Cai, S., Yan, C., Rao, S., Cheng, S., Xu, F., Liu, X., 2024. Research progress on the physiological mechanism by which selenium alleviates heavy metal stress in plants: A review. *Agronomy*. 14, 1787. <https://doi.org/10.3390/agronomy14081787>
- Zhang, L., Jing, Y., Xiang, Y., Zhang, R., Lu, H., 2018. Responses of soil microbial community structure changes and activities to biochar addition: A meta-analysis. *Science of the Total Environment*. 643, 926–935. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.207>.
- Zhao, H., Sun, J., Xu, X., Qin, X., 2017. Stoichiometry of soil microbial biomass carbon and microbial biomass nitrogen in China's temperate and alpine grasslands. *European Journal of Soil Biology*. 83, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2017.02.001>.
- Zulfiqar, U., Jiang, W., Xiukang, W., Hussain, S., Ahmad, M., Maqsood, M.F., Ali, N., Ishfaq, M., Kaleem, M., Haider, F.U., 2022. Cadmium phytotoxicity, tolerance, and advanced remediation approaches in agricultural soils: a comprehensive review. *Frontiers in Plant Science*. 13, 773815. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.773815>.