

اثر محلول پاشی نیتریک اکسید بر خصوصیات فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و عناصر معدنی در گیاه بامیه تحت تنش مس

سرور عارفی و جلیل خارا*

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۲/۲۷، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۴۰۳/۰۴/۱۹)

چکیده

مس به عنوان یک عنصر ریزمغذی برای سنتز آنزیم‌ها و پروتئین‌ها ضروری می‌باشد. اما، غلظت‌های بالا و سمی مس می‌تواند مسیرهای فتوسنتزی و متابولیسمی را در گیاهان مهار کند و در نهایت منجر به کاهش زیست‌توده و تأخیر در گلدهی و میوه‌دهی شود. سدیم نیتروپروساید، یک ترکیب رهاکننده نیتریک اکسید است که نقش مهمی در رشد و نمو گیاهی از شروع جوانه‌زنی تا پیری اندام‌ها، انتقال پیام، تنظیم سیستم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی و کاهش سمیت ناشی از فلزات سنگین دارد. در پژوهش حاضر، تأثیر توأم غلظت‌های مختلف سولفات مس (۶۰۰ و ۱۲۰۰ میکرومولار) و سدیم نیتروپروساید (۱۵۰ میکرومولار) در کشت هیدروپونیک بر برخی از فعالیت‌های فیزیولوژیکی و نیز مورفولوژی گیاه بامیه رقم کلمسون مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی و با سه تکرار در هر تیمار انجام پذیرفت. براساس نتایج حاصل از این پژوهش غلظت بالای مس موجب کاهش محتوای رنگیزه فتوسنتزی، عناصر غذایی ضروری، پارامترهای رشد و افزایش میزان مالون دی‌آلدئید، پراکسید هیدروژن، نشت یونی، محتوای پروتئین، پرولین، قندهای محلول، فعالیت آنزیم‌های پاداکساینده و محتوای مس در ریشه و برگ گیاه بامیه در مقایسه با گیاه شاهد شد. در مقابل، محلول پاشی سدیم نیتروپروساید باعث افزایش کلروفیل کل، جذب عناصر ضروری شامل منیزیم، آهن، روی و فعالیت آنزیم‌های پاداکساینده و کاهش غلظت مس، محتوای مالون دی‌آلدئید، پراکسید هیدروژن و نشت یونی در گیاه شد. با توجه به نتایج حاصل، کاربرد سدیم نیتروپروساید توانست اثرات منفی ناشی از تنش سولفات مس را به‌طور معنی‌داری تعدیل نماید و تحمل گیاه بامیه را در شرایط تنش مس افزایش دهد.

کلمات کلیدی: آنزیم‌های پاداکساینده، تنش اکسیداتیو، سدیم نیتروپروساید، نشت یونی

مقدمه

سنگین را به یکی از خطرناک‌ترین گروه آلاینده‌های زیست-محیطی تبدیل کرده است (Vodyanitskii, 2016). استفاده گسترده از مواد مبتنی بر مس مانند کودها، سموم دفع آفات و نماتدکش‌ها، منجر به آلودگی گسترده خاک‌ها به مس در کشاورزی شده است (Adrees et al., 2015; Rehman et al., 2019; Xin et al., 2020). مس یک ریزمغذی حیاتی در گیاهان

آلودگی ناشی از حضور فلزات سنگین در خاک‌های کشاورزی، یکی از مهم‌ترین مشکلات زیست‌محیطی و اکولوژیکی در سطح جهان است (Alengebawy et al., 2021). مشکل اصلی مربوط به فلزات سنگین آن است که این آلاینده‌های غیرآلی برخلاف آلاینده‌های آلی تجزیه‌پذیر نیستند. این واقعیت، فلزات

* نویسنده مسؤول، نشانی پست الکترونیکی: j.khara@urmia.ac.ir

فیزیولوژیکی مهم شامل اندام‌زایی ریشه، رشد هیپوکوتیل، پاسخ‌های دفاعی، حرکات روزنه‌ای، جوانه‌زنی بذر، مرگ برنامه‌ریزی شده سلول، پاسخ فوق حساسیت، فتوسنتز، رشد و نمو و تولید فیتوالکسین‌ها در شرایط تنش‌زای مختلف مشارکت داشته باشد (Sami et al., 2018; Wei et al., 2020). نیتریک اکسید یک رادیکال آزاد گازی شکل با خواص لیپوفیلی (چربی‌دوست) است که برای عبور از غشاهای سلولی و رسیدن به هدف خاص درون سلول، نیازی به حامل خاصی ندارد؛ زیرا به دلیل ماهیت گازی و ماندگاری متوسط، می‌تواند به راحتی پراکنده شود (Gupta et al., 2019; Lau et al., 2021; Song et al., 2023). سنتز نیتریک اکسید از آرژینین در گیاهان توسط آنزیم نیتریک اکسید سنتتاز انجام می‌شود که در حضور اکسیژن و NADPH به هیدروکسی آرژینین تبدیل می‌شود. این محصول بسیار ناپایدار است و بلافاصله به سیترولین و نیتریک اکسید تبدیل می‌شود (Wendehenne et al., 2001). نیتریک اکسید به عنوان یک مولکول سیگنالینگ کوچک همه جا حاضر، نقش مهمی در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی در گیاهان متعدد به ویژه کاهش سمیت ناشی از فلزات سنگین دارد. علاوه بر این، مطالعات متعددی در سال‌های اخیر نشان داده که تجمع بیش از حد فلزات سنگین می‌تواند بر تجمع و تولید NO درون‌زا تأثیر بگذارد (Wei et al., 2020). سدیم نیتروپروساید (SNP) به عنوان اهداکننده NO، یک مولکول فعال زیستی است که می‌توان از طریق آب آبیاری، پاشیدن روی گیاهان یا تزریق به آپوپلاست برگ از آن استفاده کرد (Nabi et al., 2019). گزارش شده است که SNP اثرات نامطلوب تنش‌های غیرزیستی، از جمله تنش فلزات سنگین را به روشی کارآمد کاهش می‌دهد (Wei et al., 2020). در پژوهش‌های اخیر، از سدیم نیتروپروساید به عنوان یک منبع اکسید نیتریک به علت توانایی بی‌ظنیرش در آزادسازی اکسید نیتریک در بافت گیاهی در یک بازه نسبتاً طولانی و همچنین به دلیل مقرون به صرفه بودن این فرآیند، استفاده می‌شود (Rahim et al., 2022). این موضوع به گونه‌ای بسیار چشم‌گیر در دنیای تحقیقات جلب توجه کرده و از جمله دلایلی است

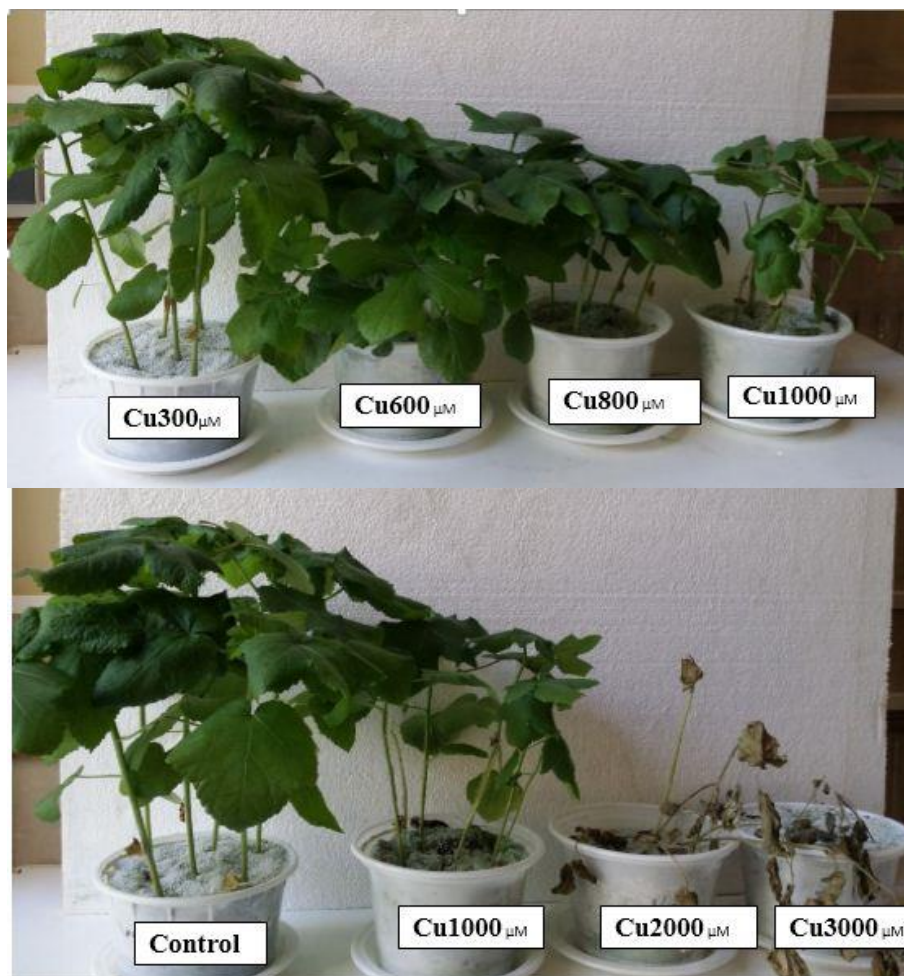
است با این حال تجمع زیاد مس در گیاهان، فرآیندهای فتوسنتز، تنفس، فعالیت آنزیم‌ها و یکپارچگی غشاها را تحت تأثیر قرار می‌دهد و رشد را محدود می‌کند (Hippler et al., 2018). مهمترین آسیب بیوشیمیایی سمیت مس در گیاه، بروز تنش اکسیداتیواست. مس مازاد می‌تواند باعث تولید گونه‌های مضر و فعال اکسیژن شامل رادیکال‌های هیدروکسی (OH)، فنوکسی (RO)، پراکسی (ROO)، سوپراکسید (O_2)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و اکسیژن منفرد شود. رادیکال‌های آزاد چون بیشتر با غشای سلولی، سیتوپلاسم و DNA سلول واکنش می‌دهند، باعث آسیب به سلول و DNA می‌شوند. همچنین، تولید ATP (آدنوزین تری فسفات) را مهار می‌کنند. تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) ناشی از تنش اکسیداتیو به دلیل غلظت بالای مس می‌تواند منجر به پراکسیداسیون لیپیدی غشا گردد. تنش فلزات سنگین می‌تواند با جذب عناصر کلسیم (Ca)، فسفر (P)، پتاسیم (K)، منیزیم (Mg) و سایر فلزات تداخل داشته باشد و تعادل عناصر را در گیاهان مختل کند (Ghori et al., 2019; Liu et al., 2023). در شرایط تنش فلزات سنگین، گیاهان از سیستم‌های دفاع پاداکسایشی که متشکل از آنزیم‌هایی نظیر سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و آسکوربات پراکسیداز (APX) برای مهار تجمع بیش از حد رادیکال‌های آزاد استفاده می‌کنند (Karalija and Paric, 2024). از دیگر مکانیسم‌های دفاعی اتخاذ شده توسط گیاه در شرایط تنش فلز سنگین می‌توان به تجمع پرولین (Spormann et al., 2022)، پلی‌آمین‌ها (Chen et al., 2019)، افزایش ذخیره کربوهیدرات‌ها (Ghori et al., 2019) و سنتز پروتئین (Noreen et al., 2018) اشاره کرد. پرولین از طریق مکانیسم‌هایی نظیر محافظت از غشا، تنظیم اسمزی، محافظت از ساختار و عملکرد آنزیم‌ها می‌تواند سبب محافظت از گیاه در برابر تنش شود (Zhou, 2019). نیتریک اکسید یک مولکول پیام‌رسان مهم در ارتباط با بسیاری از فرایندهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیک در گیاهان است که حتی به عنوان یک فیتوهورمون نیز طبقه‌بندی شده است. این ماده می‌تواند به عنوان یک تنظیم‌کننده وابسته به غلظت، در فرآیندهای

که در دهه‌های اخیر به‌عنوان یک رویکرد نوین و پیشرفته در تحقیقات مرتبط با گیاهان و تنش‌های محیطی به‌شمار می‌آید. بامیه با نام علمی *Abelmoschus esculentus* گیاهی یک‌ساله متعلق به خانواده Malvaceae است (Dantas et al., 2021). این گیاه در تمام انواع خاک‌ها رشد می‌کند، جز سبزیجات فصل گرم است و به خوبی در آب‌وهوای گرمسیری و نیمه‌گرمسیری قابل کشت است؛ اما به دمای کم شب و خشکسالی حساس است. پراکندگی رویش گیاه بامیه در منطقه خاورمیانه گزارش شده است (Kontogiorgos et al., 2012; Chowdhury and Kumar, 2019). تاکنون هیچ مطالعه‌ای در مورد تأثیر SNP بر افزایش تحمل گیاه بامیه در برابر تنش سولفات مس انجام نشده؛ لذا در این پژوهش به بررسی کاربرد سدیم نیتروپروساید تحت سمیت مس از نظر تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی و میزان عناصر معدنی بر روی گیاه بامیه پرداخته می‌شود. تمرکز اصلی این تحقیق، ارزیابی افزایش تحمل گیاه با تحریک مکانیسم‌های مربوطه مانند فعالیت آنتی‌اکسیدانی و بررسی تجمع و فرایند انتقال آن از ریشه به اندام هوایی با استفاده از SNP است.

مواد و روش‌ها

بذر بامیه با رقم Clemson Spineless از یک شرکت هلندی (Bakker brother) تهیه شد. ابتدا بذرها به مدت ۱۰ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۰.۲٪ ضدعفونی و چند بار با آب معمولی و یک‌بار با آب مقطر آبکشی شدند. بذرها به تعداد چهار عدد در گلدان‌های پلاستیکی (۳۰×۲۰ سانتی‌متر مربع) حاوی پرلیت با سه تکرار کاشته شدند. تا ظهور اولین جوانه گلدان‌ها با آب مقطر آبیاری و در تاریکی نگهداری شدند. بعد از مشاهده اولین علائم جوانه‌زنی گلدان‌ها به اتاقک کشت با دمای کمینه ۲۵ و بیشینه ۳۰ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۸۰٪ و دوره نوری ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی قرار گرفتند. گیاهان در مرحله چهار برگی با محلول غذایی هوگلند (Hoagland and Arnon, 1950) با ۱/۴ و ۱/۲ قدرت (هر غلظت به مدت یک هفته) و در نهایت با هوگلند تمام

قدرت و آب‌مقطر یک روز در میان آبیاری شدند. گیاهان در مرحله ۸-۶ برگی، دو مرتبه با فاصله یک هفته تحت محلول‌پاشی برگی سدیم نیتروپروساید در سطح ۱۵۰ میکرومولار قرار گرفتند. پس از گذشت ۲۴ ساعت از اسپری برگی، گیاهان به مدت ۱۴ روز تحت تنش سولفات مس (CuSO_4) در سطوح ۶۰۰ و ۱۲۰۰ میکرومولار تیمار شدند. برای تعیین سطوح بهینه مس، آزمایش بهینه‌سازی غلظت انجام شد که شامل تیمار تعداد زیادی گلدان با غلظت‌های مختلف سولفات مس (از ۵۰ تا ۳۰۰۰ میکرومولار) بود. در غلظت‌های ۲۰۰۰ میکرومولار گیاهان خشک شدند. در نهایت، غلظت‌های ۶۰۰ و ۱۲۰۰ میکرومولار به‌عنوان بهترین غلظت‌ها انتخاب شدند، زیرا در این غلظت‌ها گیاهان از بین نرفته و پاسخ فیزیولوژیکی مناسبی نیز نشان دادند (شکل ۱). پس از تیمار گیاهان با سولفات مس و انجام محلول‌پاشی برگی سدیم نیتروپروساید بعد از ۳۵ روز اندام هوایی و ریشه گیاهان برداشت شدند. نمونه‌های تازه بعد از جداسازی در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای اندازه‌گیری وزن تر اندام هوایی و ریشه گیاه از ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ گرم استفاده شد. وزن خشک اندام هوایی و ریشه از طریق خشک‌کردن نمونه‌ها در آون به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد به دست آمد. طول گیاه نیز با استفاده از خط‌کش اندازه‌گیری شد. برای سنجش کلروفیل کل از ۰/۲ گرم برگ‌های تازه گیاه در ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد ساییده و سپس رنگدانه‌ها استخراج و سانتریفیوژ شدند. میزان جذب عصاره در ۶۶۳ و ۶۴۶ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر (Shimadzu, 1700, Japan) و بر اساس روش Lichtenthaler (1987) محاسبه شد. ارزیابی محتوای مالون دی‌آلدئید (MDA) توسط روش Heath و Packer (1968) تعیین شد. برگ‌ها یا ریشه‌های تازه (۰/۲ گرم) وزن شده و سپس در یک هاون چینی با ۵ میلی‌لیتر اسید تری کلرواستیک (TCA) ۱ درصد ساییده شدند. عصاره حاصل به مدت ۵ دقیقه در $10000 \times \text{g}$ سانتریفیوژ شد. به ۱ میلی‌لیتر از محلول رویی حاصل، ۴/۵ میلی‌لیتر از محلول TCA حاوی ۰/۵ درصد اسید



شکل ۱- تهیه تیمارهای مختلف مس و انتخاب بهترین غلظت‌ها برای گیاه بامیه

بود. جذب مخلوط واکنش در طول موج ۳۹۰ نانومتر خوانده شد. برای ارزیابی میزان نشت یونی (EL) از روش Dionisio-Sese و Tobita (۱۹۹۸) استفاده شد. بدین منظور ۰/۱ میلی‌گرم برگ در ۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر غوطه‌ور شد و به مدت دو ساعت بر روی شیکر در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه تکان داده شد. هدایت الکتریکی اولیه (EC_1) ثبت شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شدند تا حداکثر نشت ایجاد شود. پس از سرد شدن نمونه‌ها تا دمای محیط، هدایت ثانویه (EC_2) اندازه‌گیری شد. هدایت نسبی الکترولیت با استفاده از رابطه $(EC_1/EC_2) \times 100$ به دست آمد. در این پژوهش، غلظت پرولین با روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) تعیین شد. ۰/۲ گرم نمونه برگ تازه و ریشه در اسید سولفوسالیسیلیک ۳ درصد ساییده شد. پس از آن ۲ میلی‌لیتر

تیوباریتوریک (TBA) اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد در حمام آب گرم حرارت داده شد و سپس بلافاصله در یخ سرد قرار داده شد. سپس مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در $10000 \times g$ سانتریفیوژ شد. جذب این محلول با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. در نهایت، محتوای MDA در نمونه‌ها بر حسب میکرومول در گرم وزن تر ($\mu M g^{-1} FW$) اندام هوایی و ریشه گیاه محاسبه شد. تعیین محتوای پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، با استفاده از روش Velikova و همکاران (۲۰۰۰) انجام پذیرفت. در این روش ۰/۵ گرم اندام هوایی و ریشه گیاهان شاهد و تیمار شده در ۰/۱ درصد (وزنی/حجمی) TCA ساییده شدند. مخلوط واکنش حاوی عصاره بافت، بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی‌مولار ($pH = 7$) و یدید پتاسیم ۱ مولار

نین هیدرین و اسید استیک گلاسیال اضافه شد و یک ساعت در حمام آب گرم و سپس بلافاصله در حمام آب سرد قرار گرفت. در مرحله بعد با اضافه کردن ۴ میلی لیتر تولوئن جذب لایه بالایی در طول موج ۵۲۰ نانومتر خوانده شد. محتوای قندهای محلول به روش فنل سولفوریک (Dubios *et al.*, 1956) سنجش شد. ابتدا ۰/۵ گرم بافت تر ریشه و اندام هوایی از هر تیمار توزین و در ۵ میلی لیتر آب مقطر به وسیله هاون خوب له شد. سپس با پارچه صاف شده و از عصاره گیاهی حاصل ۲ میلی لیتر به یک لوله آزمایش دیگر منتقل شد. روی آن ۱ میلی-لیتر فنل ۵٪ (وزنی/حجمی) و ۳ میلی لیتر اسید سولفوریک ۹۸٪ اضافه شد. میزان جذب در ۴۸۵ نانومتر اندازه گیری شد. برای تعیین غلظت قندهای محلول منحنی استاندارد با غلظت های معلوم گلوکز رسم شد و معادله این منحنی برای تعیین غلظت های مجهول قندهای محلول مورد استفاده قرار گرفت. برای سنجش محتوای پروتئین محلول کل و فعالیت آنزیم های پاداکساینده ابتدا نمونه های ریشه و اندام هوایی (۰/۱ گرم) در بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار و pH=۷ استخراج شد و سپس در $10000 \times g$ در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. پروتئین های محلول کل و فعالیت آنزیم های پاداکساینده از جمله کاتالاز (CAT)، گایاکول پراکسیداز (POD) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) با استفاده از مایع رویی اندازه گیری شد. روش Bradford (۱۹۷۶) برای تخمین مقدار پروتئین های محلول کل استفاده شد. جذب نمونه ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر با اسپکتروفتومتر ثبت شد. در این بین، محلول پروتئینی استاندارد با آلبومین سرم گاوی (BSA) تهیه شد. در نهایت، کل پروتئین های محلول بر حسب $mg\ g^{-1}\ FW$ از اندام محاسبه شد. سنجش فعالیت آنزیم های CAT (EC 1.11.1.6) و پراکسیداز (EC 1.11.1.7) از روش Chance و Maehly (۱۹۵۵) با اندکی تغییرات ارزیابی شد. این محلول واکنش CAT (۳ میلی لیتر) شامل ۵۰ میلی مولار بافر فسفات (pH=۷)، ۵/۹ میلی مولار H_2O_2 و ۰/۱ میلی لیتر عصاره آنزیمی است. واکنش با افزودن عصاره آنزیمی آغاز شد. تغییرات در جذب محلول واکنش در طول موج ۲۴۰ نانومتر به

روش اسپکتروفتومتری در هر ۲۰ ثانیه خوانده شد. فعالیت آنزیم CAT بر حسب $U\ mg^{-1}$ پروتئین در دقیقه بیان شد. برای ارزیابی فعالیت POD محلول واکنش (۳ میلی لیتر) حاوی ۵۰ میلی مولار بافر استات سدیم (۵/۰ pH)، ۲۰ میلی مولار گایاکول، ۴۰ میلی مولار H_2O_2 و ۰/۱ میلی لیتر عصاره آنزیمی استفاده شد. تغییرات در جذب محلول واکنش در ۴۷۰ نانومتر به مدت ۳ دقیقه خوانده شد. فعالیت آنزیم خاص در $U\ mg^{-1}$ پروتئین در دقیقه بیان شد. سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (EC 1.15.1.1) با کمک سنجش مهار این واکنش احیای نوری NBT در طول موج ۵۶۰ نانومتر انجام شد. از مخلوط واکنش حاوی نیتروبلوتترازولیم (NBT) ۰/۰۷۵ میکرومولار، ۷۵ میکرومولار ریبوفلاوین، بافر فسفات ۵۰ میلی مولار (pH=۷) ۱۳، میلی مولار متیونین، ۰/۱ میلی مولار Na-EDTA و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی استفاده گردید (Giannopolitis and Ries, 1977). جهت ارزیابی محتوای عناصر از روش Sagner و همکاران (۱۹۹۸) استفاده شد. برای اندازه گیری محتوای مس، آهن، منیزیم و روی ابتدا نمونه های اندام هوایی و ریشه ابتدا به مدت ۷۲ ساعت در آون در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد خشک شدند. سپس ۰/۵ گرم از وزن خشک هر نمونه در ۱۰ میلی لیتر اسید نیتریک (فوق خالص، مرک) ۶۵٪ (وزنی/حجمی) حل شد. در مرحله بعد با استفاده از آب دیونیزه، حجم هر نمونه به ۵۰ میلی لیتر افزایش یافت. سپس غلظت کلی عناصر با استفاده از دستگاه جذب اتمی (Shimadzu, AA-6300, Japan) اندازه گیری شد.

و در نهایت تجزیه آماری داده ها در قالب بلوک های کاملاً تصادفی و با استفاده از نرم افزار کامپیوتری SPSS، سری ۲۴، طی مسیر Tow Way Anova و آزمون دانکن در سطح احتمال آماری $P < 0.05$ انجام گرفت و نمودارها با نرم افزار Excel سری ۲۰۱۳ رسم شدند.

نتایج و بحث

تنش مس موجب کاهش معنی دار وزن تر، خشک، طول اندام هوایی و ریشه در مقایسه با شاهد شد. در سطوح ۱۲۰۰ و ۶۰۰

بتاگلوکوناز در سلول‌های دیواره توسط سمیت مس افزایش یافته و این آنزیم‌ها اتصال گلیکوزیدی بین واحدهای گلوکز دیواره را شکسته و باعث شل شدن دیواره و در نهایت منجر به گسترش سلول شده‌اند. نقش SNP در به حداقل رساندن اثرات مضر فلزات سنگین و بهبود رشد گیاهان چچم (Ryegrass) تحت تنش مس (Dong *et al.*, 2014) و کلم‌چینی تحت سمیت کادمیوم (Lee *et al.*, 2022) گزارش شده است. بررسی نتایج حاصل از اثر SNP بر روی میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی گیاه بامیه نشان داد که تنش مس میزان کلروفیل کل را در مقایسه با نمونه‌های شاهد کاهش داد. اما بیشترین کاهش کلروفیل در تیمار ۱۲۰۰ میکرومولار مس با ۴۹/۲۳٪ کاهش نسبت به شاهد مشاهده شد. در تیمارهای ۱۲۰۰ و ۶۰۰ میکرومولار مس توأم با SNP میزان کلروفیل ۳۰/۷۵ و ۱۱/۸۴٪ افزایش یافته است که نشان‌دهنده تخفیف شرایط تنش مس است. همچنین محلول‌پاشی SNP در تیمارهای بدون تنش مس باعث افزایش ۱۴/۷۴٪ محتوای کلروفیل کل در مقایسه با شاهد شد (جدول ۱). در گیاه بامیه، فتوسنتز و محتوای کلروفیل تحت تأثیر مقادیر مختلف مس کاهش یافت. گزارش شده که تنش فلزات سنگینی مانند مس، کادمیوم و سرب، تکثیر کلروپلاست و تقسیم سلولی کاهش یافته است که در نهایت منجر به مهار بیوسنتز کلروفیل یا اختلال در آن می‌شود (Ali *et al.*, 2015; Mulenga *et al.*, 2020). علاوه بر این، مس اضافی باعث آسیب جدی به سیستم‌های فتوسنتزی، به‌ویژه سیستم فتوسنتزی (PSII) و مهار آن شده است (Prasad and Strzałka, 1999; Emamverdian *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2020). علت کاهش کلروفیل در شرایط تنش فلزات سنگین، تغییر مسیر متابولیسمی به سمت تولید پرولین است، زیرا گلوتامات که پیش‌ساز سنتز کلروفیل و پرولین است، به سمت تولید پرولین می‌رود (Ahmad *et al.*, 2018). تغییرات تراوایی غشا و فراساختار کلروپلاست به علت پراکسیداسیون لیپیدها، که در واکنش به فلزات سنگین القا می‌شود، می‌تواند در کاهش میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی دخیل باشد (Alves *et al.*, 2020).

میکرومولار مس، وزن تر اندام هوایی به ترتیب ۴/۵ و ۱/۴ و ریشه ۷/۱ و ۲/۱ برابر نسبت به نمونه‌های شاهد کاهش نشان داد. همچنین در دو سطح تنش مس وزن خشک اندام هوایی ۵/۷ و ۲/۶ و ریشه ۶/۵ و ۲/۴ برابر کاهش نسبت به شاهد ثبت شد. اثر تنش مس بر طول ریشه و اندام هوایی کاهش بود و بیشترین کاهش در تیمار ۱۲۰۰ میکرومولار مس مشاهده شد (جدول ۱). استفاده از SNP توأم با مس باعث افزایش معنی‌دار تغییرات شاخص‌های رشد گیاه در مقایسه با نمونه‌های شاهد شد. نتایج بدست آمده بیانگر اثر محلول‌پاشی SNP در افزایش وزن تر و خشک اندام هوایی تیمارهای مس ۶۰۰ و ۱۲۰۰ میکرومولار به ترتیب ۷۴/۴ و ۳۲/۹ و در ریشه ۳۳/۳ و ۳/۹ درصد نسبت به تیمارهای مس فاقد SNP است. همچنین اثر محلول‌پاشی SNP در تیمارهای بدون تنش شاخص‌های رشد فقط بر روی طول ریشه معنی‌دار ($P < 0.01$) بود (جدول ۱). مطالعه علائم ظاهری در گیاه بامیه تحت تیمار غلظت‌های مختلف سولفات مس، بیانگر کاهش شدید رشد، ارتفاع، وزن خشک و تر ریشه در گیاه مورد مطالعه است. دلیل کاهش معنی‌دار پارامترهای ذکر شده را می‌توان این‌گونه بیان کرد که ریشه اولین اندامی است که در معرض سمیت قرار دارد و بیش از سایر اندام‌ها در معرض آسیب عوامل بیرونی قرار می‌گیرد. در پژوهش‌های متعددی گزارش شده است که بیش‌بود مس در ریزوسفر باعث تغییراتی در رأس ریشه شده که در نهایت به کوتاه و ضخیم شدن ریشه‌ها منجر می‌شود. تنش مس سرعت تقسیم میتوزی سلول‌ها در ریشه را کاهش داده و رشد ریشه و جذب آب و مواد مغذی را مختل می‌کند (Lequeux *et al.*, 2010; Morsch *et al.*, 2022; Trentin *et al.*, 2019). تنش مس باعث کاهش بیومس، ارتفاع گیاه، وزن خشک و تر ریشه در گیاه مورد مطالعه ما شد. همچنین، در گیاهان کف هندی (*Corchorus capsularis* L.) (Saleem *et al.*, 2019) و *Calendula officinalis* (Afrousheh *et al.*, 2015) اثرات مشابهی گزارش شده است. محلول‌پاشی برگی SNP باعث کاهش سمیت مس، بهبود رشد و عملکرد گیاه بامیه شد. در مطالعه Hayat و همکاران (۲۰۱۴)، فعالیت آگزو و اندو

جدول ۱- اثر غلظت‌های مختلف سولفات مس و سدیم نیتروپروساید بر وزن تر، خشک، طول اندام هوایی، ریشه و کلروفیل کل در گیاه بامیه رقم کلمسون

تیمارها میکرومولار	ریشه		اندام هوایی			
	طول cm	وزن تر g	وزن خشک g	طول cm	کلروفیل کل µg/g FW	وزن تر G
Control	28/23±0/233 ^a	8/32±0/288 ^a	2/92±0/193 ^a	40/16±1/16 ^a	13/14±0/578 ^b	16/75±0/555 ^a
SNP	25/25±0/256 ^b	8/25±0/144 ^a	3/28±0/229 ^a	39/66±0/693 ^a	15/42±0/323 ^a	16/31±0/788 ^a
CuSO ₄ 600	20±0/577 ^c	3/85±0/359 ^{bc}	1/109±0/105 ^c	25±0/577 ^c	10/27±0/201 ^d	11/22±0/588 ^c
CuSO ₄ 600 +SNP	25/96±0/392 ^b	4/58±0/426 ^b	1/66±0/172 ^b	29/76±0/622 ^b	11/65±0/207 ^c	13/75±0/386 ^b
CuSO ₄ 1200	14/96±0/548 ^c	1/66±0/209 ^d	0/512±0/417 ^d	16/66±0/864 ^c	6/67±0/336 ^c	3/64±0/309 ^d
CuSO ₄ 1200+SNP	18±0/288 ^d	0/297±3/03 ^c	0/533±0/326 ^d	20/96±1/25 ^d	9/63±0/113 ^d	4/284±0/219 ^d

حروف متفاوت بر اساس آزمون دانکن تفاوت معنی‌داری را در سطح ۵ درصد نشان می‌دهند.

تیمار SNP باعث کاهش معنی‌دار مقدار H₂O₂ و محتوای MDA در اندام هوایی و ریشه تیمارهای تحت تنش مس گیاه بامیه شد. بیشترین کاهش محتوا در تیمار ۶۰۰ میکرومولار مس توأم با SNP در اندام هوایی و ریشه ثبت شد. این نتایج نشان‌دهنده کاهش تنش اکسیداتیو توسط SNP است؛ اما در شرایط بدون تنش تیمار SNP تأثیر معنی‌داری بر سطح H₂O₂ و محتوای MDA نداشت. در تیمارهای تحت تنش مس نشت الکترولیت‌ها (EL) افزایش یافت و تیمارهای SNP توأم با هر دو سطح تنش مس باعث کاهش معنی‌دار EL در مقایسه با نمونه‌های شاهد گیاه بامیه شد (جدول ۲). مس اضافی از طریق افزایش تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) باعث ایجاد تنش اکسیداتیو در گیاهان می‌شود. پراکسید هیدروژن یکی از پایدارترین و اصلی‌ترین ROS است به نحویکه غلظت بالای آن باعث افزایش پراکسیداسیون لیپیدهای غشا، تغییر در نفوذپذیری غشا (نشت یونی) و خسارت به سلول می‌گردند. در نتیجه غشاهای زیستی آسیب‌دیده و قابلیت نفوذپذیری آنها مختل می‌شود. همین امر باعث نشت الکترولیت‌ها به خارج سلول می‌شود (Khoshbakht et al., 2018; Hajhashemi et al., 2021).

نتایج ارزیابی ما نشان داد که تحت تنش مس میزان H₂O₂، MDA و نیز EL به‌طور قابل‌توجهی در اندام هوایی، ریشه و برگ افزایش یافته است. علیرغم غلظت نسبتاً بالاتر مس در

کاهش محتوای کلروفیل و فتوسنتز تحت تنش مس در گیاهان کف هندی (Saleem et al., 2019) و تحت تنش مس و سرب در گیاهان پرتقال (*Citrus aurantium* L.) (Giannakoula et al., 2021) مشاهده شده است.

نشان داده شده است که SNP از رنگدانه‌های کلروفیل و فتوسنتز با کاهش ROS ناشی از تنش، محافظت می‌کند (Ahmad et al., 2018; Ben Massoud et al., 2022). در پژوهش ما کاربرد SNP باعث بهبود اثر سمی مس در کاهش میزان کلروفیل گیاه بامیه شد که این نتیجه در گیاهان جو (*Hordeum vulgare* L.) (Ben Massoud et al., 2022) و چچم (Dong et al., 2014) تحت تنش مس گزارش شده است.

نتایج پژوهش ما نشان می‌دهد تنش مس سطح H₂O₂ و محتوای MDA را به‌طور معنی‌دار در اندام هوایی و ریشه افزایش داد که بیشترین سطح H₂O₂ و محتوای MDA در تیمار ۱۲۰۰ میکرومولار مس و کمترین در شاهد مشاهده شد. میزان افزایش H₂O₂ در اندام هوایی در تیمار ۱۲۰۰ و ۶۰۰ میکرومولار مس به ترتیب ۴۶/۹۳ و ۳۸/۰۹٪ و ریشه ۵۹/۶۰ و ۶۹/۶۱٪ و نسبت به نمونه‌های شاهد بدست آمد. ارزیابی محتوای MDA در تیمارهای مس ۱۲۰۰ و ۶۰۰ میکرومولار مس در اندام هوایی به ترتیب ۴۹/۳۷ و ۳۶/۴۷٪ و ریشه ۵۳/۰۸ و ۳۲/۷۶٪ در مقایسه با شاهد افزایش نشان داد. در حالی‌که

جدول ۲- اثر غلظت‌های مختلف سولفات مس و سدیم نیتروپروساید بر محتوای مالون دی‌آلدئید، پراکسید هیدروژن، پرولین و کربوهیدرات محلول در اندام هوایی و ریشه گیاه بامیه رقم کلمسون

تیمارها میکرومولار	ریشه			
	مالون دی‌آلدئید ($\mu\text{mol/g FW}$)	پراکسید هیدروژن ($\mu\text{mol/g FW}$)	پرولین ($\mu\text{mol/g FW}$)	کربوهیدرات محلول (mg/g FW)
Control	۰/۴۴۵±۰/۰۲۲ ^e	۰/۹۵±۰/۰۳۵ ^e	۴/۵۱±۰/۲۶۵ ^e	۲۴/۱۲±۰/۰۶۵ ^d
SNP	۰/۴۶۷±۰/۰۲۰ ^e	۱/۰۹±۰/۰۷۲ ^e	۵/۲۳±۰/۳۱۵ ^d	۲۱/۲۷±۰/۲۷ ^e
CuSO ₄ 600	۰/۶۶۲±۰/۰۴۴ ^c	۲/۳۳±۰/۱۳ ^c	۶/۵۹±۰/۲۲۳ ^c	۲۸/۹۴±۰/۹۰۵ ^b
CuSO ₄ 600 +SNP	۰/۵۸۰±۰/۰۱۰ ^d	۱/۹۲±۰/۰۹۳ ^d	۷/۳۴±۰/۱۹۲ ^b	۲۶/۵۶±۰/۲۹ ^c
CuSO ₄ 1200	۰/۹۴۹±۰/۰۲۰ ^a	۳/۱۲±۰/۱۰۲ ^a	۸/۲۱±۰/۱۶۴ ^a	۳۳/۶۳±۰/۸۳۹ ^a
CuSO ₄ 1200+SNP	۰/۸۵۸±۰/۰۲۰۵ ^b	۲/۷۶±۰/۱۱ ^b	۸/۵۶±۰/۲۶۵ ^a	۳۰/۱۳±۰/۶۴۹ ^b

حروف متفاوت بر اساس آزمون دانکن تفاوت معنی‌داری را در سطح ۵ درصد نشان می‌دهند.

ادامه جدول ۲-

تیمارها میکرومولار	اندام هوایی			
	مالون دی‌آلدئید ($\mu\text{mol/g FW}$)	پراکسید هیدروژن ($\mu\text{mol/g FW}$)	پرولین ($\mu\text{mol/g FW}$)	کربوهیدرات محلول (mg/g FW)
Control	۰/۲۰۹±۰/۰۱۲ ^d	۰/۰۸۶±۰/۰۰۳ ^d	۰/۹۰۳±۰/۰۷۱۷ ^d	۳۲/۰۵±۰/۰۰۵ ^e
SNP	۰/۲۰۱±۰/۰۰۹۸ ^d	۰/۰۹±۰/۰۰۵ ^d	۱/۰۵±۰/۰۱۰۳ ^{cd}	۳۴/۸۱±۰/۴۴ ^{de}
CuSO ₄ 600	۰/۳۲۹±۰/۰۲۰ ^b	۰/۱۴±۰/۰۰۵۷ ^b	۴/۱۴±۰/۰۸۱۱ ^{cd}	۴۱/۲۸±۰/۶۴ ^c
CuSO ₄ 600 +SNP	۰/۲۶۵±۰/۰۱۲۸ ^c	۰/۱۲۲±۰/۰۰۳ ^c	۴/۹۹±۰/۲۰۴ ^c	۳۷/۸۲±۰/۰۵۵۸ ^d
CuSO ₄ 1200	۰/۴۱۴±۰/۱۳۸۰ ^a	۰/۱۶۳±۰/۰۰۳ ^a	۵/۷۵±۰/۱۳۸ ^b	۴۹/۱۶±۰/۰۳۱ ^a
CuSO ₄ 1200+SNP	۰/۳۶۲±۰/۰۰۶ ^b	۰/۱۵±۰/۰۰۵ ^b	۶/۳۰±۰/۲۵۰ ^a	۴۴/۴۴±۰/۹۱۲ ^b

حروف متفاوت بر اساس آزمون دانکن تفاوت معنی‌داری را در سطح ۵ درصد نشان می‌دهند.

اثر مطلوب این غلظت‌ها بر کاهش تنش ناشی از سمیت مس است. استفاده از نیتروپروساید سدیم می‌تواند به عنوان یک مولکول پیام‌رسان بیان ژن‌های مرتبط با دفاع آنتی‌اکسیدانی را تنظیم کند که این شامل افزایش تولید پروتئین‌ها و آنزیم‌هایی است که در خنثی‌سازی ROS نقش دارند (Corpas and Barroso, 2015). بنابراین افزایش دفاع آنتی‌اکسیدانی گیاه، آسیب ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن را کاهش دهد و در نتیجه، باعث افزایش پایداری غشا، کاهش نشت یونی و تولید H₂O₂ شود و از پراکسیداسیون لیپیدی جلوگیری کند. این نتایج علاوه بر پژوهش ما در گیاهانی مانند گوجه‌فرنگی (Bali

ریشه، اندام هوایی بامیه سطح بالاتری از MDA را نشان داد که نمایانگر حساسیت بالاتر اندام هوایی این گیاه به تنش ناشی از مس است. در گیاهان *Boehmeria nivea* L. (Rehman et al., 2019)، خردل هندی (*Brassica juncea*) (Mir et al., 2022) و کرفس هندی (*Corchorus capsularis*) (Saleem et al., 2019) افزایش پراکسید هیدروژن، MDA و EL تحت تنش مس گزارش شده است. در این پژوهش غلظت ۱۵۰ میکرومولار SNP باعث کاهش میزان MDA، EL و H₂O₂ در اندام هوایی و ریشه گیاه بامیه تحت سمیت مس نسبت به نمونه‌های فاقد سدیم نیتروپروساید شده است که نشان‌دهنده

(جدول ۲). گیاهان برای سازگاری با تنش‌های محیطی برخی مواد محلول سازگار مثل پرولین و قندهای محلول را انباشته می‌کنند (Sharma et al., 2019; Ghori et al., 2019). پرولین به عنوان یک محافظ اسمزی، آنتی‌اکسیدان و شلاتور فلزی در گیاهان، سمیت فلزات سنگین را خنثی می‌کند (Gajewska and Skłodowska, 2008; Hadi et al., 2016; Spormann et al., 2022). در ارزیابی ما میزان پرولین در ریشه و اندام هوایی گیاه بامیه تحت تنش مس افزایش یافت که در ریشه میزان پرولین چشمگیرتر از اندام هوایی بود. افزایش محتوای پرولین در پاسخ به تنش مس در گیاهان (*Boehmeria nivea* L. (Rehman et al., 2019) و کتان (*Linum usitatissimum* L.) (Saleem et al., 2020b) گزارش شده است. کربوهیدرات‌های محلول نقش مهمی را در سلول‌ها در رابطه با فرآیند ذخیره کربن، تنظیم اسمزی و حفظ فشار تورگر ایفا می‌کنند (Shaki et al., 2018). در پژوهش ما میزان کربوهیدرات‌های محلول در اندام هوایی و ریشه گیاه بامیه نسبت به نمونه‌های شاهد به‌طور قابل‌توجهی افزایش یافت.

به نظر می‌رسد عواملی مثل توقف رشد، تجزیه پلی‌ساکاریدهایی مانند نشاسته، سنتز قندها از مسیر غیرفتوسنتزی و عدم تبادل محصولات فتوسنتزی به یکدیگر محتوای قندهای محلول را در شرایط تنش فلزات سنگین افزایش داده است (Ghori et al., 2019). علاوه بر گیاه مورد مطالعه ما، در گیاه *Spartina alterniflora* تحت تنش مس نیز افزایش قند محلول گزارش شده است (Chai et al., 2014). کاربرد خارجی SNP با انباشتگی اسمولیت‌ها، هموستازی یونی و بهبود سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی، تحمل گیاه به تنش‌های غیرزیستی را افزایش می‌دهد (Sharma et al., 2020; Guo et al., 2009). ارزیابی کاربرد جداگانه و توأم SNP در ریشه و برگ گیاه بامیه تحت تنش مس در مقایسه با شاهد میزان پرولین و قند محلول افزایشی بود؛ اما در تیمار SNP در مقایسه با سطوح تنش کاهش این اسمولیت مشاهده شد. یافته‌های ما با نتایج به دست آمده از گیاه *Sorghum vulgare* مطابقت داشت (Singh et al., 2022).

(et al., 2018)، سویا (Ahmad et al., 2021) و برنج (Niyofasha et al., 2023) تحت تنش فلزات سنگین گزارش شده است. بررسی نتایج حاصل از اثر تنش مس بر کربوهیدرات محلول گیاه بامیه نشان داد که محتوای کربوهیدرات محلول در اندام هوایی ۳۴/۰۸ و ۲۴/۳۴٪ و ریشه ۲۸/۳۲ و ۱۶/۶۵٪ در مقایسه با نمونه‌های شاهد افزایش معنی‌داری داشته است. بیشترین محتوای کربوهیدرات محلول در شرایط تنش تحت تنش ۱۲۰۰ میکرومولار مس مشاهده شد. ارزیابی کاربرد SNP و توأم آنها، با هر دو سطح تنش، کاهش معنی‌داری در محتوای کربوهیدرات در اندام هوایی ۸/۳۷٪ و ۹/۶٪ و ریشه ۱۰/۴۴٪ و ۸/۲۲٪ نسبت به تیمارهای مس مشاهده شد. استفاده از SNP در تیمارهای بدون تنش تغییری در محتوای کربوهیدرات اندام هوایی به همراه نداشت؛ اما در ریشه، کاهش معنی‌داری مشاهده شد. نتایج پژوهش ما نشان داد که تأثیر تنش مس بر محتوای پرولین در اندام هوایی و ریشه گیاه افزایشی بوده است (جدول ۲). بیشترین مقدار پرولین، با افزایش شش برابری، در تیمار ۱۲۰۰ میکرومولار مس در اندام هوایی نسبت به گروه شاهد مشاهده شد. محتوای پرولین در اندام هوایی و ریشه در محلول پاشی SNP توأم با مس نسبت به شاهد افزایش یافت. در تیمارهای بدون تنش استفاده از SNP تغییری در محتوای پرولین به همراه نداشت. به‌طور کلی تأثیر تنش مس بر محتوای پرولین اندام هوایی و ریشه در گیاه پژوهش ما افزایشی بود و بیشترین محتوای پرولین با شش برابر افزایش در تیمار ۱۲۰۰ میکرومولار مس اندام هوایی نسبت به شاهد مشاهده شد. این افزایش نشان‌دهنده آن است که پرولین به عنوان یک متابولیت سازگارکننده در پاسخ به تنش‌های محیطی مانند تنش مس نقش مهمی دارد و افزایش محتوای آن می‌تواند به گیاه در مقابله با شرایط تنش‌زا کمک کند. کاربرد SNP توأم با دو سطح ۶۰۰ و ۱۲۰۰ میکرومولار مس باعث افزایش پرولین در اندام هوایی به ترتیب ۴۷/۳۲ و ۳۸/۵۸٪ و ریشه ۸۱/۹۲ و ۸۵/۶۶٪ نسبت به گروه شاهد شد. در تیمارهای بدون تنش، استفاده از SNP تغییری در محتوای پرولین به همراه نداشت

نتایج حاصل از بررسی تیمار مس و SNP نشان داد که محتوای پروتئین فقط در تیمار ۱۲۰۰ میکرومولار مس اندام هوایی ۲۳/۹۳٪ و تیمار ۶۰۰ میکرومولار مس ریشه ۱۸/۹۸٪ افزایش معنی‌داری نسبت به نمونه‌های شاهد داشته است. محلول‌پاشی SNP باعث افزایش محتوای پروتئین در تیمارهای تحت تنش مس شد که بیشترین میزان پروتئین در تیمار SNP توأم با ۱۲۰۰ میکرومولار مس اندام هوایی گیاه بامیه بدست آمد (جدول ۳). در تیمارهای بدون تنش استفاده از SNP فقط در ریشه باعث افزایش محتوای پروتئین شد. افزایش پروتئین تحت شرایطی که گیاه در معرض ترکیبات سمی قرار دارد می‌تواند یک مکانیسم جبرانی برای پروتئین‌هایی باشد که با اتصال به فلز غیرفعال شده‌اند و یا می‌تواند به افزایش سنتز پروتئین‌های تنشی (پروتئین‌های شوک حرارتی و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان‌ها) مربوط باشد (Koentjoro *et al.*, 2021). با افزایش مقدار مس، محتوای پروتئین در برگ و ریشه گیاه بامیه افزایش یافت که مشابه این نتیجه در گیاه گندم نیز گزارش شده است (Noreen *et al.*, 2018). در تحقیق ما، استفاده از SNP جداگانه و توأم باعث تحریک سنتز پروتئین در اندام هوایی و ریشه گیاه بامیه تحت تنش مس شد. در پژوهشی دیگر، کاربرد SNP بر روی گیاه برنج تحت تنش سطوح مختلف مس منجر به افزایش محتوای پروتئین گردیده است (Niyofasha *et al.*, 2023) که با نتایج تحقیق حاضر هم راستا است. به نظر می‌رسد نقش محلول‌پاشی SNP (به‌عنوان یک دهنده NO) در افزایش مقدار پروتئین‌ها ممکن است مربوط به توانایی بالای NO در واکنش با رادیکال‌های آزاد و در نتیجه کاهش تنش اکسیداتیو در گیاه باشد. گزارش شده است که SNP با تنظیم هموستازی ردوکس سلولی از پروتئین‌ها در برابر اکسیداسیون محافظت می‌کند (Ben Massoud *et al.*, 2022). نتایج بدست آمده نشان می‌دهد که با افزایش غلظت مس میزان فعالیت برخی پاداکساینده‌ها شامل SOD، POD و CAT در اندام هوایی و ریشه افزایش یافته است که این افزایش در نمونه‌های تحت تیمار مس در مقایسه با نمونه‌های شاهد (P<0.01) معنی‌دار بود. کمترین میزان فعالیت آنزیم‌های

ذکرشده در شاهد و بیشترین در تیمار ۱۲۰۰ میکرومولار مس در ریشه و اندام هوایی گیاه بامیه ثبت شد. در تیمارهای ۱۲۰۰ و ۶۰۰ میکرومولار مس کاربرد SNP توأم با سطوح تنش باعث افزایش بیشتر فعالیت آنزیم CAT در اندام هوایی به میزان ۶۴/۴۷٪ و ۴۰/۰۵٪ و در ریشه به میزان ۶۰/۷۲٪ و ۳۶/۴۴٪ نسبت به شاهد شد. فعالیت آنزیم POD در تیمارهای توأم با SNP در اندام هوایی معنی‌دار نبود. با این حال فعالیت این آنزیم در تیمارهای ۱۲۰۰ و ۶۰۰ میکرومولار مس توأم با SNP ریشه به ترتیب ۷۰/۹۰٪ و ۷۸/۴۳٪ نسبت به شاهد افزایش نشان داد. فعالیت آنزیم SOD در تیمارهای ۱۲۰۰ و ۶۰۰ میکرومولار مس توأم با SNP افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد و تیمارهای تنش هم سطح داشت. بیشترین افزایش فعالیت SOD در اندام هوایی و ریشه در تیمار ۱۲۰۰ میکرومولار مس به ترتیب ۱۳ و ۱۱ برابر در مقایسه با گیاه شاهد بدست آمد. در شرایط بدون تنش، تیمار با SNP تأثیر معنی‌داری بر فعالیت CAT، POD و SOD نداشت (جدول ۳). آنتی‌اکسیدان‌ها مولکول‌های دفاعی ممانعت‌کننده از فعالیت رادیکال‌های آزاد هستند که از تخریب سلول‌ها جلوگیری می‌کنند. فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های مبتنی بر آنزیم، کاتالاز (CAT)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، آسکوربات پراکسیداز (APX)، گایاکول پراکسیداز (GPX) و مولکول‌های آنتی‌اکسیدانی غیرآنزیمی در واقع بخش‌هایی از استراتژی‌های دفاعی هستند که توسط گیاهان برای از بین بردن ROS اضافی و حفظ ردوکس سلولی توسعه یافته‌اند (Zulfiqar *et al.*, 2022; Zandi and Schnug, 2022). در مطالعه حاضر افزایش فعالیت آنزیم‌های پاداکساینده تحت تأثیر فلز سنگین مس در اندام هوایی و ریشه گیاه بامیه در مقایسه با نمونه‌های شاهد مشاهده شد. این نتیجه در گیاه *Hibiscus cannabinus* L. (Saleem *et al.*, 2020a) تحت تنش مس نیز گزارش شده است. Saleem و همکاران (۲۰۱۹) در بررسی سمیت مس بر گیاه کنف هندی، افزایش فعالیت آنزیم‌های SOD، POD، CAT و APX در اندام هوایی و ریشه را گزارش کرده‌اند. در مطالعه دیگری بر روی گیاه کتان (*Linum usitatissimum* L.)

جدول ۳- اثر غلظت‌های مختلف سولفات مس و سدیم نیتروپروساید (SNP) بر محتوای پروتئین و فعالیت پاداکساینده‌ها: کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و گایاکول پراکسیداز در گیاه بامیه رقم کلمسون

ریشه				تیمارها
گایاکول پراکسیداز unit mg ⁻¹ protein	سوپراکسید دیسموتاز unit mg ⁻¹ protein	کاتالاز unit mg ⁻¹ protein	پروتئین (mg/g FW)	میکرومولار
۱/۴۷±۰/۱۷۷ ^e	۵/۳۶±۰/۴۱۶ ^e	۱۸/۰۱±۰/۵۳۳ ^f	۷/۹۲±۰/۱۹۳ ^e	Control
۱/۶±۰/۳۰۵ ^e	۵/۹۳±۰/۵۰۰ ^e	۲۰/۸۳±۰/۴۴۰ ^e	۹/۲۲±۰/۲۲۹ ^d	SNP
۵/۵۶±۰/۱۹۰ ^d	۱۹/۸۱±۱/۶۶ ^d	۲۵/۶۲±۰/۸۸۱ ^d	۱۱/۰۸±۰/۲۸۹ ^c	CuSO ₄ 600
۶/۸۴±۰/۳۶۶ ^c	۲۸/۲۹±۲/۶۰۷ ^c	۳۸/۳۵±۰/۵۴۸ ^c	۱۳/۶۸±۰/۶۱۲ ^b	CuSO ₄ 600 +SNP
۱۴/۶۶±۰/۴۰۴ ^b	۵۱/۱۷±۳/۳۹ ^b	۴۲/۸۴±۱/۱۳۱ ^b	۱۸/۴۷±۰/۲۵۲ ^a	CuSO ₄ 1200
۱۵/۸۹±۰/۲۳۳ ^a	۶۰/۵۸±۲/۲۷ ^a	۴۵/۸۸±۰/۸۴۳ ^a	۱۸/۱۳±۰/۹۶۷ ^a	CuSO ₄ 1200+SNP

حروف متفاوت بر اساس آزمون دانکن تفاوت معنی داری را در سطح ۵ درصد نشان می‌دهند.

ادامه جدول ۳-

اندام هوایی				تیمارها
گایاکول پراکسیداز unit mg ⁻¹ protein	سوپراکسید دیسموتاز unit mg ⁻¹ protein	کاتالاز unit mg ⁻¹ protein	پروتئین mg/g FW	میکرومولار
۳/۰۶۶±۰/۴۰۸ ^c	۲/۶۴±۱/۳۳ ^d	۱۱/۷۱±۰/۵۷۲ ^e	۲/۹۷±۰/۴۳۴ ^d	Control
۳/۲۶±۰/۵۶۰ ^c	۴/۰۰±۰/۵۷۷ ^d	۱۴/۳۹±۰/۸۱۱ ^e	۳/۳۱±۰/۲۳۸ ^c	SNP
۵/۳۴±۰/۴۴۹ ^{bc}	۱۹/۶۱±۱/۹۲ ^c	۱۹/۵۴±۰/۴۴۳ ^c	۳/۴۵±۰/۴۲۲ ^{cd}	CuSO ₄ 600
۷/۱۶±۰/۶۴۶ ^b	۲۶/۹۳±۰/۸۸۵ ^b	۲۲/۹۸±۱/۰۹۷ ^d	۴/۲۳±۰/۱۵۸ ^c	CuSO ₄ 600 +SNP
۱۲/۳۸±۰/۵۹۸ ^a	۲۷/۲۳±۱/۵۱ ^b	۲۷/۶۱±۰/۵۲ ^a	۵/۷۰±۰/۴۰۵ ^b	CuSO ₄ 1200
۱۲/۰۶±۰/۱۴۶ ^a	۳۶/۲۱±۱/۶۲ ^a	۳۲/۹۶±۱/۰۳۷ ^b	۷/۴۹±۰/۱۴۶ ^a	CuSO ₄ 1200+SNP

حروف متفاوت بر اساس آزمون دانکن تفاوت معنی داری را در سطح ۵ درصد نشان می‌دهند.

رادیکال‌های آزاد، آسیب اکسیداتیو در گیاه را کاهش می‌دهد (Wu et al., 2011; Hajhashemi et al., 2021). نیتریک اکساید با افزایش بیان ژن‌های تولیدکننده ترکیبات آنتی‌اکسیدانی سبب تقویت سیستم دفاعی در گیاهان می‌شود (Hasanuzzaman et al., 2018). مثلاً، کاربرد SNP به‌طور قابل توجهی فعالیت سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و پلی‌فنل پراکسیداز (PPO) را در گیاه برنج تحت تنش مس افزایش داده است (Niyofasha et al., 2023). به‌علاوه، Singh و همکاران (۲۰۲۲) گزارش کردند که محلول پاشی برگی SNP بر گیاه *Sorghum vulgare* تحت تنش مس موجب افزایش

تحت تنش مس، افزایش فعالیت SOD به میزان ۱۸۹/۲ درصد و POD تا ۳۰۰/۸ درصد در برگ‌های کتان در سطح ۶۰۰ میلی‌گرم مس در کیلوگرم خاک در مقایسه با شاهد گزارش شده است (Saleem et al., 2020b). در این پژوهش افزایش فعالیت SOD، POD و CAT در تیمار SNP جداگانه و توأم آن‌ها در اندام هوایی و ریشه گیاه بامیه تحت تنش مس مشاهده شد. اثر سدیم نیتروپروساید بر بهبود فعالیت آنزیم‌های پاداکساینده و کاهش اثرات منفی تنش‌های محیطی توسط برخی محققین مورد تأکید بوده است (Siddiqui et al., 2017). SNP آگزوزن (برونزا) با عمل به عنوان یک مهارکننده مستقیم

گیاهان (ریشه و اندام هوایی) عمدتاً به سطح مس در بستر کشت، شرایط رشد و گونه‌های گیاهی بستگی دارد. تجمع زیاد مس در قشر ریشه مانع جذب و انتقال مواد مغذی ضروری برای رشد گیاه از جمله فسفر، نیتروژن، پتاسیم، منیزیم، کلسیم، روی، منگنز و آهن در چندین گونه گیاهی شده است (Kopittke and Menzies, 2006; Azeez et al., 2015; Es-sbihi et al., 2020). نتایج پژوهش ما بر روی گیاه بامیه تحت تنش مس نشان داد که انباشتگی مس در ریشه گیاهان بسیار بیشتر از اندام هوایی است (جدول ۴). همچنین محتوای عناصر غذایی منیزیم، روی و آهن با افزایش مقدار مس در بستر کشت کاهش یافت. به نظر می‌رسد این کاهش عمدتاً به دلیل وجود رقابت بین جذب مس و سایر عناصر ضروری است. در همین راستا، Es-sbihi و همکاران (۲۰۲۰) افزایش تجمع مس و کاهش عناصر روی و منیزیم را در گیاه مریم‌گلی (*Salvia officinalis* L.) تحت تنش مس را گزارش کردند. در پژوهشی دیگر، نشان داده شد که در غلظت ۴۰۰ میلی‌مولار سولفات مس، میزان منیزیم، روی، فسفر، نیتروژن و پتاسیم در ریشه کاهش یافته است؛ در حالیکه در غلظت ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌مولار سولفات مس، میزان آهن و کلسیم برگ بدون تغییر باقی مانده است (Shams et al., 2019). نتایج پژوهش‌های دیگر نشان داده که افزایش محتوای مس در محیط کشت موجب کاهش عنصر روی در گیاه *Mentha spicata* (Chrysargyris et al., 2019) و عنصر منیزیم در گندم (Noreen et al., 2018) شده است. در پژوهش ما محلول‌پاشی با SNP به‌طور قابل‌توجهی سبب افزایش محتوای عناصر غذایی ذکرشده در بالا و کاهش تجمع مس در اندام هوایی و ریشه گیاه بامیه تحت تنش مس شد که این کاهش در برگ‌ها بیشتر بود. نتایج چندین مطالعه نشان داده که گیاهان تیمار شده با SNP از طریق مهار انتقال مس و بهبود فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سمیت مس را کاهش داده‌اند. این نتایج در گیاه پنبه (Mei et al., 2015)، برنج (Mostofa et al., 2014) و *Salvia officinalis* L. (Es-sbihi et al., 2020) تحت تنش مس گزارش شده است. علاوه‌براین، Ahmad و همکاران (۲۰۲۱) گزارش کرده‌اند که SNP موجب کاهش انباشتگی فلزات سنگین و افزایش عناصری شامل منگنز، آهن و روی در گیاه سویا

فعالیت SOD و CAT شده است. در پاسخ به استرس اکسیداتیو ناشی از تنش مس و سرب بر برنج، محلول‌پاشی برگی SNP به‌طور قابل‌توجهی تولید ROS را از طریق فعال شدن آنزیم‌های پاداکساینده کاهش داده است (Mostofa et al., 2014; Rahim et al., 2022).

هنگامی که گیاهان بامیه تحت سطوح مختلف تنش مس قرار گرفتند، مشاهده شد که محتوای عنصر روی (Zn) در هر دو سطح ۶۰۰ و ۱۲۰۰ میکرومولار مس در اندام هوایی به ترتیب ۴۹/۴۱٪ و ۳۷/۶۴٪ و در ریشه ۶۳/۸۲٪ و ۴۸/۲۲٪ در مقایسه با نمونه‌های شاهد کاهش یافته است (جدول ۴). کاربرد SNP توأم با مس باعث افزایش معنی‌دار این عنصر در اندام هوایی ۴/۴٪ و ۴۰/۴۴٪ و ریشه ۲۷/۱۴٪ و ۱۶/۰۹٪ در مقایسه با نمونه‌های هم‌سطح تنش خود شد. محتوای منیزیم در هر دو سطح تنش مس ۶۰۰ و ۱۲۰۰ در اندام هوایی ۶۰/۵۵٪ و ۴۷/۹۳٪ و در ریشه ۴۶/۰۵٪ و ۲۶/۷۹٪ نسبت به گیاه شاهد کاهش معنی‌دار داشته است. از سوی دیگر، نتایج نشان داد که تیمارهای SNP همراه با مس سبب افزایش محتوای منیزیم در اندام هوایی بامیه به میزان ۳۲/۳۷٪ و ۲۶/۱۶٪ و در ریشه به اندازه ۱۴/۸۳٪ و ۸/۹۵٪ در مقایسه با تیمارهای تنش مس شد (جدول ۴). بررسی نتایج حاصل از اندازه‌گیری محتوای آهن نشان داد که تحت تأثیر تیمار ۱۲۰۰ و ۶۰۰ میکرومولار سولفات مس محتوای آهن در اندام هوایی به ترتیب ۷۰/۸۶٪ و ۴۲/۸۲٪ و در ریشه ۷۰/۹۹٪ و ۴۲/۸۴٪ نسبت به شاهد کاهش یافت. تیمار گیاهان تحت تنش مس ۶۰۰ و ۱۲۰۰ میکرومولار با SNP باعث افزایش معنی‌دار محتوای آهن در اندام هوایی گیاه بامیه ۵۱/۵۲٪ و ۳۰٪ و در ریشه ۲۶/۴۸٪ و ۱۹/۲۷٪ در مقایسه با تیمار تحت تنش مس فاقد SNP شد. نتایج تحقیق ما نشان داد به دلیل جذب بیشتر مس از محیط کشت توسط گیاه ناشی از غلظت‌های بالای مس، محتوای مس اندام هوایی و ریشه در تیمار ۱۲۰۰ میکرومولار سولفات مس ۷ و ۱۳ برابر در مقایسه با گیاه شاهد افزایش یافت. تیمارهای SNP توأم با مس ۶۰۰ و ۱۲۰۰ میکرومولار سبب کاهش محتوای مس به ترتیب در اندام هوایی ۱۵٪ و ۵۸٪ و در ریشه ۲۰٪ و ۵۴٪ نسبت به تیمارهای مس بدون SNP شد. جذب و انباشتگی مس در همه اندام‌های

جدول ۴- اثر غلظت‌های مختلف سولفات مس و سدیم نیتروپروپوساید بر محتوای عناصر در گیاه بامیه رقم کلمسون

ریشه				تیمارها
Cu ($\mu\text{g/g DW}$)	Mg (mg/g DW)	Zn (mg/g DW)	Fe (mg/g DW)	میکرومولار
۹۳/۷۳±۶/۶۹ ^e	۲/۸۷±۰/۰۳۵ ^a	۰/۰۴۷±۰/۰۰۱ ^a	۱/۵±۰/۰۵۹۷ ^a	Control
۱۳۵±۱۰/۵۵ ^e	۳/۱۱±۰/۲۲۹ ^a	۰/۰۴۷±۰/۰۰۳ ^a	۱/۴۷±۰/۰۳ ^a	SNP
۵۹۹±۹۹/۳۶ ^c	۲/۱۰±۰/۰۵ ^c	۰/۰۲۴±۰/۰۰۲ ^c	۰/۸۶۴±۰/۰۳۶ ^c	CuSO ₄ 600
۲۶۹±۲۲/۲۸ ^d	۲/۵۹±۰/۱۱ ^b	۰/۰۲۹±۰/۰۰۱ ^b	۱/۰۷۰±۰/۰۵۹ ^d	CuSO ₄ 600 +SNP
۱۲۸۹±۲۳/۱۷ ^a	۱/۵۵±۰/۰۸۳ ^c	۰/۰۱۷±۰/۰۰۰۶ ^d	۰/۴۳۸±۰/۰۶۱ ^d	CuSO ₄ 1200
۱۰۲۷±۹/۲۰ ^b	۱/۸۲۳±۰/۰۶ ^d	۰/۰۲۳±۰/۰۰۰۶ ^d	۰/۵۹۶±۰/۰۷۲ ^d	CuSO ₄ 1200+SNP

حروف متفاوت بر اساس آزمون دانکن تفاوت معنی داری را در سطح ۵ درصد نشان می‌دهند.

ادامه جدول ۴-

اندام هوایی				تیمارها
Cu ($\mu\text{g/g DW}$)	Mg (mg/g DW)	Zn (mg/g DW)	Fe (mg/g DW)	میکرومولار
۳۶±۱/۶۱ ^d	۴/۲۹±۰/۰۶۵ ^b	۰/۰۲۸±۰/۰۰۰۸ ^a	۰/۱۵۱±۰/۰۰۵ ^a	Control
۳۶/۸±۱/۸۹ ^d	۴/۶۳±۰/۱۱ ^a	۰/۲۹±۰/۰۰۱ ^a	۰/۱۴۷±۰/۰۰۳۳ ^a	SNP
۱۳۰/۶۶±۶/۱۵۰ ^c	۲/۲۳±۰/۱۰۴ ^d	۰/۰۱۷±۰/۰۰۰۸ ^c	۰/۰۸۶±۰/۰۰۳۷ ^c	CuSO ₄ 600
۵۴/۲۶±۲/۷۵ ^d	۳/۵۶±۰/۱۰۴ ^c	۰/۰۲۲±۰/۰۰۰۵ ^b	۰/۱۲۳±۰/۰۰۷ ^b	CuSO ₄ 600 +SNP
۲۶۵±۸/۳۴ ^a	۱/۶۹±۰/۰۶۵ ^e	۰/۰۱۴±۰/۰۰۰۶ ^c	۰/۰۴۴±۰/۰۶۰ ^d	CuSO ₄ 1200
۲۴۱±۱۲/۶۶ ^b	۲/۲۹±۰/۱۵۳ ^d	۰/۰۱۵±۰/۰۰۰۵ ^c	۰/۰۹۲±۰/۰۰۸ ^c	CuSO ₄ 1200+SNP

حروف متفاوت بر اساس آزمون دانکن تفاوت معنی داری را در سطح ۵ درصد نشان می‌دهند.

مس در گیاه را افزایش داد. در این پژوهش کاربرد SNP باعث تخفیف شدت تنش در گیاهان تحت سمیت مس گردید. بررسی‌ها نشان داد که SNP با فعال کردن پاداکساینده‌ها و از طریق حفظ تمامیت غشاهای زیستی، کاهش محتوای گونه‌های فعال اکسیژن، افزایش فتوسنتز، بهبود جذب عناصر روی، منیزیم و آهن و تغییر متابولیسم برخی ترکیبات سلولی، آستانه تحمل گیاه در برابر تنش مس را افزایش داد. همچنین SNP باعث کاهش انباشتگی مس در ریشه و اندام هوایی شد. در دید کلی، بهبود رشد گیاه در شرایط تنش مس، تحت تیمار NO مشاهده شد.

تحت تنش جیوه شده است. این ممکن است به دلیل افزایش محتوای NO داخلی باشد. اشاره شده است که NO ناقلین غشایی را فعال می‌کند که در نهایت موجب حذف فلز و افزایش جذب مواد مغذی معدنی می‌شود.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از پارامترهای اندازه‌گیری شده در این پژوهش نشان داد که تیمار مس (با غلظت ۶۰۰ و ۱۲۰۰ میکرومولار) سبب ایجاد سمیت در گیاه بامیه شد. مس رشد گیاه بامیه، زیست‌توده، رنگدانه‌های فتوسنتزی و محتوای عناصر روی، منیزیم و آهن را کاهش داد؛ در حالیکه محتوای پرولین، کربوهیدرات کل، MDA، H₂O₂ و نیز مقدار EL و انباشتگی

- Adrees, M., Ali, S., Rizwan, M., Ibrahim, M., Abbas, F., Farid, M., Zia-ur-Rehman, M., Irshad, M. K., & Bharwana, S. A. (2015). The effect of excess copper on growth and physiology of important food crops: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 8148-8162. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4496-5>
- Afrousheh, M., Shoor, M., Tehranifar, A., & Safari, V. R. (2015). Phytoremediation potential of copper contaminated soils in *Calendula officinalis* and effect of salicylic acid on the growth and copper toxicity. *International Letters of Chemistry Physics and Astronomy*, 50, 159-168. <https://doi.org/10.18052/www.scipress.com/ILCPA.50.159>
- Ahmad, I., Kamran, M., Ali, S., Bilegjargal, B., Cai, T., Ahmad, S., Meng, X., Su, W., Liu, T., & Han, Q. (2018). Uniconazole application strategies to improve lignin biosynthesis, lodging resistance and production of maize in semiarid regions. *Field Crops Research*, 222, 66-77. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2018.03.015>
- Ahmad, P., Alyemeni, M. N., Wijaya, L., Ahanger, M. A., Ashraf, M., Alam, P., Paray, B. A., & Rinklebe, J. (2021). Nitric oxide donor, sodium nitroprusside, mitigates mercury toxicity in different cultivars of soybean. *Journal of Hazardous Materials*, 408, 124852. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124852>
- Alengebawy, A., Abdelkhalik, S. T., Qureshi, S. R., & Wang, M. Q. (2021). Heavy metals and pesticides toxicity in agricultural soil and plants: Ecological risks and human health implications. *Toxics*, 9(3), 42. <https://doi.org/10.3390/toxics9030042>
- Ali, B., Gill, R. A., Yang, S., Gill, M. B., Farooq, M. A., Liu, D., & Zhou, W. (2015). Regulation of cadmium-induced proteomic and metabolic changes by 5-aminolevulinic acid in leaves of *Brassica napus* L. *PLoS One*, 10(4), 1-23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123328>
- Alves, L. R., Rossatto, D. R., Rossi, M. L., Martinelli, A. P., & Gratao, P. L. (2020). Selenium improves photosynthesis and induces ultrastructural changes but does not alleviate cadmium-stress damages in tomato plants. *Protoplasma*, 257, 597-605. <https://doi.org/10.1007/s00709-019-01469-w>
- Azeez, M. O., Adesanwo, O. O., & Adepetu, J. A. (2015). Effect of copper application on soil available nutrients and uptake. *African Journal of Agricultural Research*, 10, 359-364. <https://doi.org/10.5897/AJAR2014.9010>
- Bali, S., Kaur, P., Kohli, S. K., Ohri, P., Thukral, A. K., Bhardwaj, R., Wijaya, L., Alyemeni, M. N., & Ahmad, P. (2018). Jasmonic acid induced changes in physiobiochemical attributes and ascorbate-glutathione pathway in *Lycopersicon esculentum* under lead stress at different growth stages. *The Science of the Total Environment*, 645, 1344-1360. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.164>
- Bates, L. S., Waldren, R. P., & Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39(1), 205-207. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>
- Ben Massoud, M., Kharbech, O., Mahjoubi, Y., Chaoui, A., & Wingler, A. (2022). Effect of exogenous treatment with nitric oxide (NO) on redox homeostasis in barley seedlings (*Hordeum vulgare* L.) under copper stress. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 1-14. <https://doi.org/10.1007/s42729-021-00757-w>
- 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(2), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Chai, M., Shi, F., Li, R., Qiu, G., Liu, F., & Liu, L. (2014). Growth and physiological responses to copper stress in a halophyte *Spartina alterniflora* (Poaceae). *Acta Physiologiae Plantarum*, 36(3), 745-754. <https://doi.org/10.1007/s11738-013-1452-1>
- Chance, B. & Maehly, A. C. (1955). Assay of catalases and peroxidases. *Method in Enzymology*, 2, 764-775. <https://doi.org/10.1002/9780470110171.ch14>
- Chen, D., Shao, Q., Yin, L., Younis, A., & Zheng, B. (2019). Polyamine function in plants: Metabolism, regulation on development, and roles in abiotic stress responses. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1945. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01945>
- Chowdhury, S. & Kumar, S. (2019). Okra breeding: Recent approaches and constraints. *Annals of Biology*, 35(1), 55-60.
- Corpas, F. J. & Barroso, J. B. (2015). Nitric oxide from a "green" perspective. *Nitric Oxide*, 45, 15-19.
- Chrysargyris, A., Papakyriakou, E., Petropoulos, S. A., & Tzortzakis, N. (2019). The combined and single effect of salinity and copper stress on growth and quality of *Mentha spicata* plants. *Journal of Hazardous Materials*, 368, 584-593. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.01.058>
- Dantas, T. L., Alonso Buriti, F. C., & Florentino, E. R. (2021). Okra (*Abelmoschus esculentus* L.) as a potential functional food source of mucilage and bioactive compounds with technological applications and health benefits. *Plants*, 10(8), 1683. <https://doi.org/10.3390/plants10081683>
- Dionisio-Sese M. L. & Tobita, S. (1998). Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. *Plant Science*, 135, 1-9. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(98\)00025-9](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(98)00025-9)
- Dong, Y., Xu, L., Wang, Q., Fan, Z., Kong, J., & Bai, X. (2014). Effects of exogenous nitric oxide on photosynthesis, antioxidative ability, and mineral element contents of perennial ryegrass under copper stress. *Journal of Plant*

- Interactions*, 9(1), 402-411. <https://doi.org/10.1080/17429145.2013.845917>
- Dubios, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Roberts, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Annals of Chemistry*, 28, 350-356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Emamverdian, A., Ding, Y., & Mokhberdoran, F. (2020). The role of salicylic acid and gibberellin signaling in plant responses to abiotic stress with an emphasis on heavy metals. *Plant Signaling and Behavior*, 15(7), 1777372. <https://doi.org/10.1080/15592324.2020.1777372>
- Es-sbihi, F. Z., Hazzoumi, Z., Benhima, R., & Amrani Joutei, K. (2020). Effects of salicylic acid on growth, mineral nutrition, glandular hairs distribution and essential oil composition in *Salvia officinalis* L. grown under copper stress. *Environmental Sustainability*, 3, 199-208. <https://doi.org/10.1007/s42398-020-00109-x>
- Gajewska, E. & Skłodowska, M. (2008). Differential biochemical responses of wheat shoots and roots to nickel stress: Antioxidative reactions and proline accumulation. *Plant Growth Regulation*, 54, 179-188. <https://doi.org/10.1007/s10725-007-9240-9>
- 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*, 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(2), 309-314. <https://doi.org/10.1104/pp.59.2.309>
- Guo, Y., Tian, Z., Yan, D., Zhang, J., & Qin, P. (2009). Effects of nitric oxide on salt stress tolerance in *Kosteletzkya virginica*. *Life Science Journal*, 6, 67-75. ISSN: 1097 – 8135
- Gupta, D. K., Palma, J. M., & Corpas, F. J. (2019). Nitric Oxide and Hydrogen Peroxide Signaling in Higher Plants. Springer Nature Customer Service Center LLC.
- Hadi, F., Ali, N., & Fuller, M. P. (2016). Molybdenum (Mo) increases endogenous phenolics, proline and photosynthetic pigments and the phytoremediation potential of the industrially important plant *Ricinus communis* L. for removal of cadmium from contaminated soil. *Environmental Science and Pollution Research International*, 23, 20408-20430. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7230-z>
- Hajihashemi, S., Skalicky, M., Brestic, M., & Pavla, V. (2021). Effect of sodium nitroprusside on physiological and anatomical features of salt-stressed *Raphanus sativus*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 169, 160-170. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.11.013>
- Hasanuzzaman, M., Oku, H., Nahar, K., Bhuyan, M. H. M. B., Mahmud, J. A., & Baluska, F. (2018). Nitric oxide-induced salt stress tolerance in plants: ROS metabolism, signaling and molecular interactions. *Plant Biotechnology Reports*, 12(2), 77-92. <https://doi.org/10.1007/s11816-018-0480-0>
- Hayat, S., Yadav, S., Alyemeni, M. N., & Ahmad, A. (2014). Effect of sodium nitroprusside on the germination and antioxidant activities of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 20(1), 140-144.
- Heath, R. L. & Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125(1), 189-198. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1)
- Hippler, F. W. R., Boaretto, R. M., Dovis, V. L., Quaggio, J. A., Azevedo, R. A., & Mattos-Jr, D. (2018). Oxidative stress induced by Cu nutritional disorders in citrus depends on nitrogen and calcium availability. *Scientific Reports* 8(1), 1-13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19735-x>
- Hoagland, D. R. & Arnon, D. (1950). The Water Culture Method for Growing Plants without Soil. California College of Agriculture, University of California, Berkley.
- Kumar Jha, A. & Kumar, N. (2024). Antioxidant defense: A key mechanism of cadmium tolerance. In: Cadmium Toxicity Mitigation (Karalija, E. and Paric, A.) Pp. 195-214. Cham: Springer Nature Switzerland.
- Khoshbakht, D., Asghari, M., & Haghghi, M. (2018). Effects of foliar applications of nitric oxide and spermidine on chlorophyll fluorescence, photosynthesis and antioxidant enzyme activities of citrus seedlings under salinity stress. *Photosynthetica*, 56, 1313-1325. <https://doi.org/10.1007/s11099-018-0839-z>
- Koentjoro, Y., Purwanto, E., & Purnomo, D. (2021). The role of silicon on content of proline, protein and abscisic acid on soybean under drought stress, In: IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. IOP Publishing.
- Kontogiorgos, V., Margelou, I., Georgiadis, N., & Ritzoulis, C. (2012). Rheological characterization of okra pectins. *Food Hydrocolloid*, 29(2), 356-362. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.04.003>
- Kopittke, P. M. & Menzies, N. W. (2006). Effect of Cu toxicity on growth of cowpea (*Vigna unguiculata*). *Plant and Soil*, 279, 287-296. <https://doi.org/10.1007/s11104-005-1578-z>
- Lau, S. E., Hamdan, M. F., Pua, T. L., Saidi, N. B., & Tan, B. C. (2021). Plant nitric oxide signaling under drought stress. *Plants*, 10(2), 360. <https://doi.org/10.3390/plants10020360>

- Lee, Y. H., Kim, Y. J., Choi, H. W., Kim, Y. H., & Hong, J. K. (2022). Sodium nitroprusside pretreatment alters responses of Chinese cabbage seedlings to subsequent challenging stresses. *Journal of Plant Interactions*, 17(1), 206-219. <https://doi.org/10.1080/17429145.2021.2024286>
- Lequeux, H., Hermans, C., Lutts, S., & Verbruggen, N. (2010). Plant physiology and biochemistry response to copper excess in *Arabidopsis thaliana*: Impact on the root system architecture, hormone distribution, lignin accumulation and mineral profile. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48, 673-682. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.05.005>
- Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148, 350-382. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1)
- Liu, X., Gong, D., Ke, Q., Yin, L., Wang, S., & Gao, T. (2023). Meta-analysis of the effect of nitric oxide application on heavy metal stress tolerance in plants. *Plants*, 12(7), 67-73. <https://doi.org/10.3390/plants12071494>
- Mei, L., Daud, M. K., Ullah, N., Ali, S., Khan, M., Malik, Z., & Zhu, S. J. (2015). Pretreatment with salicylic acid and ascorbic acid significantly mitigate oxidative stress induced by copper in cotton genotypes. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 9922-9931. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4075-9>
- Mir, A. R., Alam, P., & Hayat, S. (2022). Auxin regulates growth, photosynthetic efficiency and mitigates copper induced toxicity via modulation of nutrient status, sugar metabolism and antioxidant potential in *Brassica juncea*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 185, 244-259. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2022.06.006>
- Morsch, L., Somavilla, L. M., Trentin, E., Silva, K. R., Oliveira, J. M. S., Brunetto, G., & Simao, D. G. (2022). Root system structure as a criterion for the selection of grapevine genotypes that are tolerant to excess copper and the ability of phosphorus to mitigate toxicity. *Plant Physiology and Biochemistry*, 171, 147-156. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.12.034>
- Mostofa, M. G., Seraj, Z. I., & Fujita, M. (2014). Exogenous sodium nitroprusside and glutathione alleviate copper toxicity by reducing copper uptake and oxidative damage in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Protoplasma*, 251, 1373-1386. <https://doi.org/10.1007/s00709-014-0639-7>
- Mulenga, C., Clarke, C., & Meincken, M. (2020). Physiological and growth responses to pollutant-induced biochemical changes in plants: A review. *Pollution*, 6(4), 827-848. <http://doi.org/10.22059/POLL.2020.303151.821>
- Nabi, R. B. S., Tayade, R., Hussain, A., Kulkarni, K. P., Imran, Q. M., Mun, B. G., & Yun, B. W. (2019). Nitric oxide regulates plant responses to drought, salinity, and heavy metal stress. *Environmental and Experimental Botany*, 161, 120-133. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.02.003>
- 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., Khan, M., & Yun, B. W. (2023). Alleviation of Hg, Cr, Cu, and Zn-induced heavy metals stress by exogenous sodium nitroprusside in rice plants. *Plants*, 12(6), 1299. <https://doi.org/10.3390/plants12061299>
- Noreen, S., Akhter, M. S., Yaamin, T., & Arfan, M. (2018). The ameliorative effects of exogenously applied proline on physiological and biochemical parameters of wheat (*Triticum aestivum* L.) crop under copper stress condition. *Journal of Plant Interactions*, 13(1), 221-230. <https://doi.org/10.1080/17429145.2018.1437480>
- Prasad, M. & Strzalka, K. (1999). Impact of heavy metals on photosynthesis. In: *Heavy Metal Stress in Plants*. Springer, New York.
- Rahim, W., Khan, M., Al Azzawi, T. N. I., Pande, A., Methela, N. J., Ali, S., Imran, M., Lee, D. S., Lee, G. M., & Mun, B. G. (2022). Exogenously applied sodium nitroprusside mitigates lead toxicity in rice by regulating antioxidants and metal stress-related transcripts. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 9729. <https://doi.org/10.3390/ijms23179729>
- Rehman, M., Liu, L., Bashir, S., Saleem, M. H., Chen, C., Peng, D., & Siddique, K. H. (2019). Influence of rice straw biochar on growth, antioxidant capacity and copper uptake in ramie (*Boehmeria nivea* L.) grown as forage in aged copper-contaminated soil. *Plant Physiology and Biochemistry*, 138, 121-129. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.02.021>
- Sagner, S., Kneer, R., Wanner, G., Cosson, J. P., Deus-Neumann, B., & Zenk, M. H. (1998). Hyperaccumulation, complexation and distribution of nickel in *Sebertia acuminata*. *Phytochemistry*, 47(3), 339-347. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)00593-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00593-1)
- Saleem, M. H., Ali, S., Seleiman, M. F., Rizwan, M., Rehman, M., Aisha Akram, N., Liu, L., Alotaibi, M., Al-Ashkar, I., & Mubushar, M. (2019). Assessing the correlations between different traits in copper-sensitive and copper-resistant varieties of jute (*Corchorus capsularis* L.). *Plants*, 8(12), 545. <https://doi.org/10.3390/plants8120545>
- Saleem, M. H., Fahad, S., Rehman, M., Saud, S., Jamal, Y., Khan, S., & Liu, L. (2020a). Morpho-physiological traits, biochemical response and phytoextraction potential of short-term copper stress on kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) seedlings. *PeerJ*, 8, 8321. <https://doi.org/10.7717/peerj.8321>
- Saleem, M. H., Kamran, M., Zhou, Y., Parveen, A., Rehman, M., Ahmar, S., Malik, Z., Mustafa, A., Rao, M. A. A., Wang, B., & Liu, L. (2020b). Appraising growth, oxidative stress and copper phytoextraction potential of flax (*Linum usitatissimum* L.) grown in soil differentially spiked with copper. *Journal of Environmental Management*, 257, 109994. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109994>
- Sami, F., Faizan, M., Faraz, A., Siddiqui, H., Yusuf, M., & Hayat, S. (2018). Nitric oxide-mediated integrative

- alterations in plant metabolism to confer abiotic stress tolerance, NO crosstalk with phytohormones and NO-mediated post translational modifications in modulating diverse plant stress. *Nitric Oxid*, 73, 22-38. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2017.12.005>
- Shaki, F., Ebrahimzadeh Maboud, H., & Niknam, V. (2018). Growth enhancement and salt tolerance of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) by salicylic acid. *Current Plant Biology*, 13, 16-22. <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2018.04.001>
- Shams, M., Ekinici, M., Turan, M., Dursun, A., Kul, R., & Yildirim, E. (2019). Growth, nutrient uptake and enzyme activity response of lettuce (*Lactuca sativa* L.) to excess copper. *Environmental Sustainability*, 2, 67-73. <https://doi.org/10.1007/s42398-019-00051-7>
- Sharma, A., Shahzad, B., Kumar, V., Kohli, S. K., Sidhu, G. P. S., Bali, A. S., Handa, N., Kapoor, D., Bhardwaj, R., & Zheng, B. (2019). Phytohormones regulate accumulation of osmolytes under abiotic stress. *Biomolecules*, 9(7), 285. <https://doi.org/10.3390/biom9070285>
- Sharma, A., Sidhu, G. P., Araniti, F., Bali, A. S., Shahzad, B., Tripathi, D. K., Brestic, M., Skalicky, M., & Landi, M. (2020). The role of salicylic acid in plants exposed to heavy metals. *Molecules*, 25, 540. <https://doi.org/10.3390/molecules25030540>
- Siddiqui, M. H., Alamri, S. A., Al-Khaishany, M. Y., Al-Qutami, M. A., Ali, H. M., & Nasir Khan, M. (2017). Sodium nitroprusside and indole acetic acid improve the tolerance of tomato plants to heat stress by protecting against DNA damage. *Journal of Plant Interactions*, 12, 177-186. <https://doi.org/10.1080/17429145.2017.1310941>
- Singh, P., Choudhary, K. K., Chaudhary, N., Gupta, S., Sahu, M., Tejaswini, B., & Sarkar, S. (2022). Salt stress resilience in plants mediated through osmolyte accumulation and its crosstalk mechanism with phytohormones. *Frontiers in Plant Science*, 13, <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1006617>
- Song, X. W., Yao, Y., Zhao, K., Yu, P. C., Zhang, W., Liu, W. F., Wang, L. Y., Zhao, K., Lu, J. C., & Meng, X. C. (2023). Sodium nitroprusside improved the quality of *Radix saposchnikoviae* through constructed physiological state under adversity. *Scientific Reports*, 13, 1-35. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-43153-3>
- Spormann, S., Soares, C., Martins, V., Azenha, M., Geros, H., & Fidalgo, F. (2022). Early activation of antioxidant responses in Ni-stressed tomato cultivars determines their resilience under co-exposure to drought. *Journal of Plant Growth Regulation*, 42, 877-891. <https://doi.org/10.1007/s00344-022-10595-4>
- Trentin, E., Facco, D. B., Hammerschmitt, R. K., Ferreira, P. A. A., Morsch, L., Belles, S. W., Ricachenevsky, F. K., Nicoloso, F. T., Ceretta, C. A., Tiecher, T. L., Tarouco, C. P., Berghetti, A. L. P., Toselli, M., & Brunetto, G. (2019). Potential of vermicompost and limestone in reducing copper toxicity in young grapevines grown in Cu-contaminated vineyard soil. *Chemosphere*, 226, 421-430. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.03.141>
- Velikova, V., Yordanov, I., & Edreva, A. (2000). Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: Protective role of exogenous polyamines. *Plant Science*, 151(1), 59-66. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9452\(99\)00197-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9452(99)00197-1)
- Vodyanitskii, Y. N. (2016). Standards for the contents of heavy metals in soils of some states. *Annals of Agrarian Science*, 14, 257-263. <https://doi.org/10.1016/j.aasci.2016.08.011>
- Wei, L., Zhang, M., Wei, S., Zhang, J., Wang, C., & Liao, W. (2020). Roles of nitric oxide in heavy metal stress in plants: Cross-talk with phytohormones and protein S-nitrosylation. *Environmental Pollution*, 259, 113943. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.113943>
- Wendehenne, D., Pugin, A., & Klessig, D. F. (2001). Nitric oxide: Comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. *Trends in Plant Sciences*, 6(4), 177-183. [https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(01\)01893-3](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(01)01893-3)
- Wu, X., Zhu, W., Zhang, H., Ding, H., & Zhang, H. J. (2011). Exogenous nitric oxide protects against salt-induced oxidative stress in the leaves from two genotypes of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Acta Physiologiae Plantarum*, 33, 1199-1209. <https://doi.org/10.1007/s11738-010-0648-x>
- Xin, X., Zhao, F. L., Rho, J. Y., Goodrich, S. L., Sumerlin, B. S., & He, Z. (2020). Use of polymeric nanoparticles to improve seed germination and plant growth under copper stress. *Science of the Total Environment*, 745, 141055. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141055>
- Yang, Y., Zhang, L., Huang, X., Zhou, Y., Quan, Q., Li, Y., & Zhu, X. (2020). Response of photosynthesis to different concentrations of heavy metals in *Davidia involucreta*. *PLoS One*, 15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228563>
- Zandi, P. & Schnug, E. (2022). Reactive oxygen species, antioxidant responses and implications from a microbial modulation perspective. *Biology*, 11, 155. <https://doi.org/10.3390/biology11020155>
- Zhou, M. X., Renard, M. E., Quinet, M., & Lutts, S. (2019). Effect of NaCl on proline and glycinebetaine metabolism in *Kosteletzkya pentacarpos* exposed to Cd and Zn toxicities. *Plant and Soil*, 441, 525-542. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04143-5>
- Zulfiqar, U., Jiang, W., Xiukang, W., Hussain, S., Ahmad, M., Maqsood, M. F., Ali, N., Ishfaq, M., Kaleem, M., Haider, F. U., Farooq, N., Naveed, M., Kucerik, J., Brtnicky, M., & Mustafa, A. (2022). Cadmium phytotoxicity, tolerance, and advanced remediation approaches in agricultural soils; A comprehensive review. *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.773815>

The effect of nitric oxide foliar application on physiological, biochemical and mineral elements in the okra plant under copper stress

Sorur Arefi and Jalil Khara*

Department of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, Iran
(Received: 2024/03/17, Accepted: 2024/07/09)

Abstract

Copper, as a micronutrient, is essential for the synthesis of enzymes and proteins. However, excessive copper concentrations can be highly toxic and inhibit the photosynthetic and metabolic pathways in plants, ultimately leading to reduced biomass, delayed flowering and fruiting. Sodium nitroprusside (SNP) (as a nitric oxide donor compound) plays a significant role in plant growth and development, from germination to organ senescence, signal transduction, regulation of antioxidant defense systems, and reduction of heavy metal toxicity. In the present study, the combined effects of two levels of copper sulfate (600 and 1200 μM) and sodium nitroprusside (150 μM) were investigated on some physiological and morphological activities of okra (*Abelmoschus esculentus* L. cv. Clemsonspineless) is grown hydroponically. The experiments were conducted in a complete randomized design with three replications. Based on our results, the high copper concentration resulted in a reduction in chlorophyll content, essential nutrients, growth parameters and an increase in malondialdehyde, hydrogen peroxide, electrolyte leakage, total protein, proline, soluble sugars, peroxidase enzyme activity and copper content in both the roots and leaves of okra compared to the control plants. Conversely, SNP foliar spray led to an increase in total chlorophyll, uptake of essential elements, peroxidase enzyme activity and a decrease in copper concentration, malondialdehyde and hydrogen peroxide content, as well as ion leakage in okra plants. Therefore, it seems that the application of SNP was able to mitigate the negative effects of copper sulfate stress significantly and enhance the tolerance of okra plants to copper stress conditions.

Keywords: Oxidative stress, Antioxidant enzymes, Sodium nitroprusside, Electrolyte leakage

Corresponding author, Email: j.khara@urmia.ac.ir