نشریه فیزیولوژی محیطی گیاهی، سال سیزدهم، شماره ۵۱، پاییز ۱۳۹۷ / صفحات: ۳۰-۱۷

بررسی نقش اکسید نیتریک در تحمل به خشکی ماش (*Vigna radiata* L.)

امید صادقی‌پور

دانشیار گروه زراعت، واحد یادگار امام خمینی (ره) شهرری، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۷/۵/۲۰ تاریخ پذیرش:۹۷/۸/۱۲

چکیده

خشکی یکی از مهمترین عوامل نامساعد محیطی است که تولید محصولات زراعی را محدود می‌کند. اکسید نیتریک به‌عنوان یک مولکول پیام‌رسان در واکنش گیاه به تنش‌های محیطی مشارکت دارد. لذا به‌منظور بررسی اثرات این ماده در تحمل به تنش خشکی ماش رقم پرتو آزمایشی مزرعه‌ای در سال ۱۳۹٤ در جنوب تهران اجرا شد. این تحقیق به صورت طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۹ تیمار و ٤ تکرار انجام گرفت. در این آزمایش از محلول سدیم نیتروپروساید به عنوان ماده رها کننده اکسید نیتریک استفاده شد. تیمارها شامل شاهد، تنش خشکی، تیمار بذر، محلول‌پاشی در مرحله رویشی، محلول‌پاشی در مرحله زایشی، تیمار بذر + محلول‌پاشی در مرحله رویشی، تیمار بذر + محلول‌پاشی در مرحله زایشی، محلول‌پاشی در مراحل رویشی و زایشی و تیمار بذر + محلول‌پاشی در مراحل رویشی و زایشی بود. نتایج نشان داد که در اثر تنش خشکی بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز و اسکوربات پراکسیداز و همچنین غلظت مالون دی آلدئید و پرولین اضافه شد، اما محتوی نسبی آب، شاخص سبزینگی، شاخص سطح برگ و عملکرد دانه کاهش یافت. با این وجود، کاربرد سدیم نیتروپروساید از طریق افزایش بیشتر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان و تجمع پرولین، موجب کاهش مالون دی آلدئید و بهبود محتوی نسبی آب، شاخص سبزینگی، شاخص سطح برگ و در نهایت عملکرد دانه تحت تنش خشکی شد. بین تیمارهای کاربرد سدیم نیتروپروساید، تیمار ترکیبی تیمار بذر + محلول‌پاشی در مراحل رویشی و زایشی موثرتر بود، اگرچه با چند تیمار دیگر از جمله محلول‌پاشی در مرحله زایشی تفاوت معنی‌داری نداشت. با توجه به این یافته‌ها، کاربرد اکسید نیتریک می‌تواند به عنوان روشی مفید جهت بهبود تحمل به تنش خشکی ماش توصیه شود.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی اکسیدان، پرولین، تیمار بذر، سدیم نیتروپروساید، محلول‌پاشی.

مقدمه

خشکی یکی از مهمترین تنش‌های محیطی است که رشد و تولید گیاهان زراعی را در بسیاری از نقاط جهان محدود می‌کند. تنش خشکی از طریق ایجاد خسارت اکسیداتیو، اختلال در فرایندهای متابولیکی گیاه از قبیل فتوسنتز، جذب آب و عناصر غذایی و جذب و ساخت مواد موجب کاهش رشد و عملکرد گیاه می‌گردد. گیاهان جهت مقابله با تنش خشکی، سازوکارهای مختلفی را در خود توسعه داده‌اند. بسیاری از تحقیقات نشان داده که در گیاهانی که تحت تنش خشکی قرار می‌گیرند سطح اکسید نیتریک (NO)[۲] افزایش می‌یابد که احتمالاً اثرات منفی تنش خشکی را کاهش می‌دهد (Seabra and Oliveira, 2016). همچنین مشخص شده که متابولیسم NO در

*نویسنده مسئول: osadeghipour@yahoo.com

2. Nitric Oxide

ژنوتیپ‌های متحمل به خشکی فعال‌تر از ژنوتیپ‌های حساس به خشکی است (Silveira et al., 2017). NO به‌عنوان یک رادیکال آزاد گازی شکل که به راحتی می‌تواند از غشاهای زیستی عبور کند نقش مهمی در فرایندهای مختلف فیزیولوژیکی گیاه از جمله شکستن خواب بذر، تحریک جوانه زنی، گلدهی، تنظیم فعالیت برخی آنزیم‌ها، بستن روزنه‌ها، فتوسنتز، نقل و انتقالات سلولی، بیان برخی ژن‌ها و... ایفا می‌کند. این ماده همچنین نقشی کلیدی به‌عنوان مولکول پیام‌رسان در مسیرهای انتقال پیام در تنش‌های زیستی و غیر زیستی بازی می‌کند (Khan et al., 2014). نتایج برخی تحقیقات نشان داده که کاربرد خارجی NO می‌تواند تحمل گیاه را به تنش‌های مختلف زیستی و غیر زیستی از جمله خشکی، شوری، گرما، فلزات سنگین و ازون افزایش دهد (Seabra and Oliveira, 2016; Saroj et al., 2018; Li et al., 2018). طی تحقیقی مشخص شد که کاربرد خارجی NO از طریق حفظ وضعیت آبی گیاه، بهبود فعالیت آنتی اکسیدانی، کاهش خسارت اکسیداتیو و پایداری غشاهای سلولی و فتوسنتز موجب بهبود رشد و تحمل به خشکی در گیاه جو گردید (Gan et al., 2015). در آفتابگردان، کاربرد نیتروپروساید سدیم (SNP)[1] به‌عنوان ماده رها کننده NO موجب کاهش محتوی مالون دی آلدئید (MDA)[2] و نیز تثبیت یکپارچگی غشاها در شرایط تنش آبی گردید. این فعالیت NO به افزایش سطح ترکیبات آنتی اکسیدانی نسبت داده شد (Cechin et al., 2015). در آزمایش دیگری محققان دریافتند که کاربرد SNP در شرایط تنش خشکی موجب افزایش میزان پرولین، رنگدانه‌ها، فنول‌ها، اسید آمینه‌های آزاد، قندها، پروتئین‌های محلول و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاه پنبه و در نهایت بهبود تحمل به خشکی گردید (Shallan et al., 2012). همچنین تیمار نهال‌های نارنج سه برگ (*Poncirus trifoliata*) با SNP تحت شرایط تنش خشکی باعث کاهش نشت غشاء و هدایت روزنه‌ای، افزایش محتوی کلروفیل، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و ظرفیت فتوسنتزی گردید (Fan and Liu, 2012). اگرچه نتایج برخی آزمایش‌ها نشان داده که کاربرد NO سبب بهبود تحمل به تنش خشکی در بعضی از گیاهان شده است، اما اطلاعات بسیار محدودی در مورد تاثیر کاربرد این ماده در تحمل به خشکی ماش وجود دارد، لذا هدف از پژوهش حاضر، بررسی نقش و نحوه اثر روش‌های مختلف کاربرد NO در بهبود تحمل به تنش خشکی این گیاه بود.

مواد و روش‌ها

به‌منظور بررسی اثرات روش‌های مختلف کاربرد NO در تحمل به تنش خشکی ماش رقم پرتو آزمایشی مزرعه‌ای در بهار و تابستان سال ۱۳۹٤ در شهرستان رباط کریم واقع در جنوب تهران با مختصات عرض جغرافیایی ۳۵ درجه و ۲۸ دقیقه، طول جغرافیایی ۵۱ درجه و ۱۲ دقیقه، ارتفاع از سطح دریا ۱۰۵۰ متر، میانگین بارش و دمای سالیانه به ترتیب ۲۱۸ میلیمتر و ۱٦/٤ درجه سانتی‌متر اجرا شد. این تحقیق به‌صورت بلوک‌های کامل تصادفی با ۹ تیمار و ٤ تکرار انجام گرفت. در این پژوهش از محلول SNP با غلظت ۱۰۰ میکرو مولار به عنوان ماده رها کننده NO استفاده شد (Gan et al., 2015; Farooq et al., 2009). بذور به مدت ۱۲ ساعت در محلول SNP خیسانده شدند. محلول‌پاشی نیز در مرحله رویشی (٤ برگی) و زایشی (شروع گلدهی) در صبح زود با سمپاش پشتی انجام شد. تیمارها شامل سطوح زیر بود: ۱) شاهد (آبیاری پس از ٦۰ میلی‌متر تبخیر از تشتک تبخیر کلاس A)، ۲) تنش خشکی

1. Sodium nitroprusside
2. Malondialdehyde

(آبیاری پس از ۱۲۰ میلیمتر تبخیر از تشتک تبخیر کلاس A)، ۳) تنش خشکی همراه با تیمار بذور با محلول SNP، ٤) تنش خشکی همراه با محلول‌پاشی با SNP در مرحله رویشی، ٥) تنش خشکی همراه با محلول‌پاشی با SNP در مرحله زایشی، ٦) تنش خشکی همراه با تیمار بذور با محلول SNP توام با محلول‌پاشی در مرحله رویشی، ۷) تنش خشکی همراه با تیمار بذور با محلول SNP توام با محلول‌پاشی در مرحله زایشی، ۸) تنش خشکی همراه با محلول‌پاشی با SNP در مراحل رویشی و زایشی، ۹) تنش خشکی همراه با تیمار بذور با محلول SNP توام با محلول‌پاشی در مراحل رویشی و زایشی. شخم عمیق در پاییز سال قبل و شخم متوسط، دیسک و ماله ۲ هفته قبل از کشت انجام شد. به‌منظور تجزیه خاک، قبل از اجرای آزمایش، از عمق ۳۰-۰ سانتی‌متری، نمونه برداری صورت گرفت. نتایج تجزیه خاک در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱: ویژگی‌های خاک قطعه آزمایشی

هدایت الکتریکی ($dS\ m^{-1}$)	pH	کربن آلی (%)	نیتروژن (%)	فسفر ($mg\ kg^{-1}$)	پتاس ($mg\ kg^{-1}$)	بافت خاک
۲/۸	۷/۵۲	۲/۳	۰/۱۵	۱٦	۳٤۸	لومی

قبل از دیسک زدن، معادل ۱۰۰ کیلوگرم در هکتار کود فسفات دی آمونیوم به خاک اضافه شد. هر کرت از ٥ خط کاشت به طول ٤ متر تشکیل شد. فاصله بین و روی خطوط به‌ترتیب ٥۰ و ۱۰ سانتی‌متر در نظر گرفته شد. کمی قبل از کاشت با فارویر، جوی و پشته‌هایی به فاصله ٥۰ سانتی‌متر از هم احداث گردید. در ۱٥ خرداد ۱۳۹٤ کاشت روی پشته‌ها و به عمق ۳ سانتی‌متر انجام گرفت. اولین آبیاری بلافاصله پس از کاشت و آبیاری‌های بعدی تا زمان تنک کردن بر اساس نیاز گیاه و شرایط محیطی هر ۷-٥ روز یکبار انجام شد. بعد از تنک بوته‌ها (مرحله ۲ برگی)، آبیاری با توجه به تیمارهای طرح صورت گرفت. در زمان تنک کردن، فاصله بوته‌ها با قطع گیاهان اضافی از یکدیگر ۱۰ سانتی‌متر شد. برای مبارزه با علف‌های هرز، وجین دستی طی دوره رشد و با توجه به میزان آلودگی کرت‌های مختلف انجام گرفت. ضمن این که آفت یا بیماری که جهت کنترل آن نیاز به سمپاشی باشد مشاهده نگردید. پس از اعمال تیمارهای آزمایش شامل تیمار بذور و محلول‌پاشی SNP مطابق نقشه طرح، در اواخر مرحله گلدهی اقدام به نمونه‌برداری و اندازه‌گیری برخی صفات به شرح ذیل گردید: از خط دوم هر کرت و پس از حذف اثرات حاشیه‌ای، چند برگ بالایی و کاملاً توسعه یافته چند بوته جدا شده و در ظروف محتوی یخ جهت سنجش صفات بیوشیمیایی بلافاصله به آزمایشگاه منتقل و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌متر نگهداری شدند.

برای استخراج آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، ۰/٥ گرم از نمونه‌های برگی درهاون چینی محتوی ۳ میلی‌لیتر بافر سولفات پتاسیم با اسیدیته ۷/۸، ۰/۱ میلی‌مولار EDTA ، PVP ۱ درصد (وزنی-حجمی)، تریتون X-100 ۰/٥ درصد و گلیسرول ۲۰ درصد به خوبی ساییده شدند. سپس همگنای حاصل با سرعت ۱٥۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌متر و به‌مدت ۱٥ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از آن، روشناور به دقت جدا شده و جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان استفاده گردید (Kumari et al., 2010).

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) براساس سنجش مهار احیای نوری نیترو بلو تترازولیوم (NBT) اندازه‌گیری شد (Beyer and

Fridovich, 1987). مخلوط واکنش حاوی ۵ میلی‌مولار هیدروکسی اتیل پیپرازین اتان اسید سولفونیک با اسیدیته ۷/۶، ۰/۱ میلی‌مولار EDTA، ۵۰ میلی‌مولار کربنات سدیم با اسیدیته ۱۰، ۱۳ میلی‌مولار متیونین، ۰/۰۲۵ درصد تریتون X-100، ۶۳ میکرومول NBT، ۱/۳ میکرومول ریبوفلاوین و عصاره آنزیمی به‌مدت ۱۵ دقیقه تحت تابش نور (۳۶۰ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه) قرار گرفت و به مخلوط واکنشی دیگر به‌عنوان کنترل برای تصحیح جذب پس‌زمینه، نور تابانده نشد. یک واحد فعالیت SOD به عنوان مقدار آنزیم مورد نیاز برای ایجاد ۵۰ درصد مهار واکنش NBT در ۵۶۰ نانومتر تعریف شد.

فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) توسط پایش تجزیه H_2O_2 در طول موج ۲۴۰ نانومتر سنجیده شد (Aebi, 1984). مخلوط واکنش حاوی ۵۰ میلی‌مولار بافر فسفات با اسیدیته ۷، ۰/۱ درصد تریتون X-100، ۱۰/۵ میلی‌مولار H_2O_2 و عصاره آنزیمی بود. واکنش در دمای ۲۵ درجه سانتی‌متر به مدت ۳ دقیقه با افزودن H_2O_2 آغاز شد. یک میکرومول H_2O_2 تجزیه شده در هر دقیقه به عنوان یک واحد فعالیت CAT تعریف شد.

فعالیت آنزیم اسکوربات پراکسیداز (APX) با محاسبه کاهش جذب آسکوربات در طول موج ۲۹۰ نانومتر محاسبه گردید (Nakano and Asada, 1981). مخلوط آزمایش شامل ۵۰ میلی‌مولار بافر فسفات با اسیدیته ۷، ۰/۱ میلی‌مولار EDTA، ۰/۵ میلی‌مولار آسکوربات، ۰/۱ میلی‌مولار H_2O_2 و عصاره آنزیمی بود. فعالیت APX با استفاده از ضریب خاموشی ۲/۸ mM^{-1} cm^{-1} محاسبه شد. یک واحد فعالیت APX به عنوان یک میکرومول آسکوربات اکسید شده در هر دقیقه در ۲۵ درجه سانتی‌متر تعریف شد.

تعیین میزان MDA به عنوان یکی از آخرین فراورده‌های پراکسیداسیون چربی غشاها به روش Heath و Packer (۱۹۶۸) انجام شد. نمونه‌های تازه برگ (۵۰۰ میلی‌گرم) در ۱۰ میلی‌لیتر اسید تری کلرواستیک ۱ درصد همگن شدند. همگنای حاصل با سرعت ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس، یک میلی‌لیتر روشناور به ٤ میلی‌لیتر اسید تیوباربیتوریک ۰/۵ درصد محتوی اسید تری کلرواستیک ۲۰ درصد اضافه شد. این مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌متر گرم و سپس به سرعت در حمام یخ سرد شد. پس از سانتریفوژ در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه، میزان جذب در طول موج ۵۳۲ نانومتر ثبت گردید. سپس میزان جذب سایر ترکیبات غیر اختصاصی نیز در طول موج ٦۰۰ نانومتر محاسبه و از آن کسر شد. محتوای مالون دی آلدئید با استفاده از ضریب خاموشی ۱۵۵ mM^{-1} cm^{-1} تعیین گردید.

محتوای پرولین بر اساس روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) تعیین شد. نمونه‌های تازه برگ (۵۰۰ میلی‌گرم) در ۱۰ میلی‌لیتر اسیدسولفوسالسیلیک ۳ درصد همگن شدند. همگنای حاصل با سرعت ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس ۲ میلی‌لیتر روشناور به ۲ میلی‌لیتر اسید ناین هیدرین و ۲ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال اضافه شد و به مدت ۱ ساعت در حمام آب با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌متر قرار گرفتند. پس از آن، واکنش در یک حمام یخ متوقف شد. سپس، ٤ میلی‌لیتر تولوئن به مخلوط واکنش اضافه و به مدت ۳۰ ثانیه به خوبی مخلوط شد. ماده رنگی حاوی تولوئن از فاز آب جدا شده و میزان جذب در طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت گردید. غلظت پرولین با استفاده از منحنی استاندارد تعیین شد.

جهت محاسبه محتوی نسبی آب (RWC)[1]، از خط دوم هر کرت دیسک‌هایی از ۱۰ برگ فعال و کاملاً توسعه یافته قسمت فوقانی پنج بوته تهیه و بلافاصله وزن تر آنها توسط ترازوی دقیق یادداشت

1. Relative Water Content

شد. سپس نمونه‌ها در محیط تاریک، درون ظرف‌های محتوی آب مقطر قرار گرفته و پس از ۲٤ ساعت وزن اشباع آنها تعیین گردید. پس از آن، نمونه‌ها به‌مدت ٤۸ ساعت درون آون با دمای ۷۵ درجه سانتی‌متر قرار داده شدند و وزن خشک آنها محاسبه شد. از تقسیم تفاضل وزن تر و خشک بر تفاضل وزن اشباع و خشک، محتوی نسبی آب برگها بدست آمد. برای اندازه‌گیری شاخص سبزینگی از دستگاه Chlorophyll Content Meter, CL-01, Hansatech Instruments, England پس از حذف اثر حاشیه‌ای و به کمک برگهای کاملاً توسعه یافته و فعال بوته‌های خط دوم هر کرت استفاده گردید. جهت تعیین شاخص سطح برگ، سطح برگ‌های ۱۰ بوته از خط دوم هر کرت پس از حذف حاشیه، توسط دستگاه Leaf Area Meter, CI-202, CID, Bioscience, USA اندازه‌گیری شد. با توجه به تراکم ۲۰ بوته در متر مربع، حاصلضرب عدد حاصل در عدد ۲، برابر با شاخص سطح برگ بود. در هفته اول شهریور ۱۳۹٤ و پس از رسیدگی کامل، پس از حذف ۰/۵ متر از ابتدا و انتهای خطوط سوم و چهارم هر کرت، تمامی بوته‌ها برداشت شده، دانه‌ها از غلاف‌ها خارج شده و پس از آفتاب خشک شدن، عملکرد دانه با رطوبت ۱۳ درصد تعیین گردید. در نهایت، داده‌ها توسط نرم‌افزار SAS تجزیه و تحلیل شده و مقایسه میانگین‌ها بوسیله آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد صورت گرفت.

نتایج

براساس نتایج ارائه شده در جدول تجزیه واریانس (جدول ۲)، اثر تیمار بر تمامی صفات اندازه‌گیری شده در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود.

اثر تیمارها بر صفات اندازه گیری شده

میزان مالون دی آلدئید (MDA) و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان: در اثر تنش خشکی، مقدار MDA برگ‌های ماش در مقایسه با تیمار شاهد، ٦۰ درصد افزایش یافت. از سوی دیگر با کاربرد SNP به‌عنوان رها کننده NO، از میزان MDA در شرایط تنش به‌طور معنی‌داری کاسته شد. بین تیمارهای مختلف کاربرد SNP تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۳). فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان SOD، CAT و APX، زمانی که بوته‌های ماش در معرض تنش خشکی قرار گرفتند نسبت به شرایط عدم تنش به‌ترتیب معادل ۳۱، ٦۵ و ۲۷ درصد افزایش یافت. همچنین تحت تنش خشکی، در اثر کاربرد SNP، بر فعالیت این آنزیم‌ها باز هم افزوده گردید. در بین تیمارهای کاربرد SNP، تیمار ترکیبی تیمار بذرها + محلول‌پاشی در مراحل رویشی و زایشی در افزایش فعالیت این آنزیم‌ها موثرتر بود (جدول ۳).

میزان پرولین: تنش خشکی، غلظت پرولین برگ‌های ماش را در مقایسه با شرایط نرمال معادل ۵۳٪ افزایش داد. با کاربرد SNP، در شرایط تنش خشکی، محتوی پرولین به‌طور معنی‌داری افزایش بیشتری یافت. در بین تیمارهای مختلف SNP، تیمار ترکیبی تیمار بذرها + محلول‌پاشی در مراحل رویشی و زایشی میزان پرولین را بیشتر بالا برد، اگرچه با تیمار محلول‌پاشی در مراحل رویشی و زایشی، تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول ۳).

جدول ۲: نتایج تجزیه واریانس صفات اندازه‌گیری شده تحت تاثیر تنش خشکی و کاربرد اکسید نیتریک

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات								
		مالون دی آلدئید	سوپراکسید دیسموتاز	کاتالاز	اسکوربات پراکسیداز	پرولین	محتوی نسبی آب	شاخص سبزینگی	شاخص سطح برگ	عملکرد دانه
بلوک	۳	۵/۶۹ ns	۱۳/۷۹ ns	۱۳/۸۶ ns	۱/۶۷ ns	۵۴/۴۲ ns	۶۴/۳۰*	۱۲/۵۰*	۰/۰۸۸ ns	۲۰۸۹۴/۶۳*
تیمار	۸	۱۱۲۳/۷۱**	۶۹/۴۰**	۲۴۰۷/۵۵**	۶۶/۷۹**	۴۷۶۱/۵۲**	۶۷/۸۴**	۳۶/۸۱**	۰/۱۳**	۲۴۳۱۸۷/۹**
خطا	۲۴	۱۳۲/۶۸	۱۴/۷۷	۲۱۰/۴۱	۱/۶۶	۱۰۷/۶۱	۱۰/۷۲	۲/۲۴	۰/۰۲۷	۴۳۶۳/۳۵
ضریب تغییرات (٪)	–	۷/۳۰	۱۲/۴۴	۱۱/۹۸	۶/۲۴	۸/۴۷	۴/۱۰	۸/۶۰	۱۴/۲۳	۸/۶۴

ns ، * و ** : به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد.

جدول ۳: مقایسه میانگین صفات اندازه‌گیری شده تحت تاثیر تنش خشکی و کاربرد اکسید نیتریک

تیمار	مالون دی آلدئید (nmol g^{-1} F.W.)	سوپراکسید دیسموتاز (Unit mg^{-1} (pro.	کاتالاز ((Unit mg^{-1} pro.	اسکوربات پراکسیداز (Unit mg^{-1} (pro.	پرولین (µmol g^{-1} F.W.)	محتوی نسبی آب (%)	شاخص سبزینگی (Spad unit)	شاخص سطح برگ	عملکرد دانه (g m^{-2})
C	۱۲۳/۷۷ ± ۷/۳۸^{c}	۲۰/۷۷ ± ۲/۰۵^{c}	۶۳/۰۲ ± ۵/۶۷^{e}	۱۲/۷۱ ± ۱/۷۷^{g}	۴۸/۰۷ ± ۲/۳۲^{f}	۹۰/۳۹ ± ۱/۵۵^{a}	۲۴/۰۴ ± ۱/۹۳^{a}	۱/۵۱ ± ۰/۱۸^{a}	۱۴۵/۷۴ ± ۱/۶۹^{a}
D	۱۹۷/۸۱ ± ۱/۸۲^{a}	۲۷/۲۰ ± ۲/۶۸^{bc}	۱۰۴/۱۰ ± ۹/۳۸^{d}	۱۶/۱۵ ± ۱/۹۷^{f}	۷۳/۶۴ ± ۵/۱۰^{e}	۷۲/۵۸ ± ۲/۶۵^{e}	۱۱/۱۹ ± ۱/۹۱^{e}	۰/۷۸ ± ۰/۰۸^{d}	۴۳/۲۹ ± ۲/۴۵^{e}
D+SP	۱۷۴/۰۷ ± ۰/۴۴^{b}	۲۹/۲۷ ± ۲/۸۸^{ab}	۱۰۷/۶۳ ± ۹/۶۴^{cd}	۱۷/۴۵ ± ۱/۰۱^{ef}	۱۰۳/۴۸ ± ۷/۱۹^{d}	۷۶/۶۵ ± ۲/۸۴^{bc}	۱۵/۰۱ ± ۱/۱۹^{d}	۰/۹۷ ± ۱/۱۱^{cd}	۵۷/۹۰ ± ۱/۶۶^{d}
D+VS	۱۷۰/۲۱ ± ۰/۲۰^{b}	۳۰/۲۸ ± ۲/۰۱^{ab}	۱۱۳/۹۳ ± ۰/۲۸^{cd}	۱۹/۵۷ ± ۱/۱۴^{de}	۱۲۵/۳۶ ± ۸/۷۰^{c}	۷۸/۹۳ ± ۲/۹۶^{b}	۱۵/۶۷ ± ۲/۲۷^{cd}	۱/۰۶ ± ۱/۱۲$^{b-d}$	۶۳/۹۱ ± ۱/۱۳^{cd}
D+RS	۱۶۵/۵۷ ± ۹/۹۱^{b}	۳۱/۱۲ ± ۲/۰۸^{ab}	۱۲۱/۵۱ ± ۰/۸۶$^{b-d}$	۲۰/۸۹ ± ۲/۲۶^{cd}	۱۳۶/۴۹ ± ۹/۴۸^{bc}	۷۹/۰۲ ± ۱/۰^{b}	۱۶/۸۶ ± ۳/۳۶$^{b-d}$	۱/۱۲ ± ۱/۱۳^{bc}	۷۱/۲۵ ± ۵/۷۰^{bc}
D+SP+VS	۱۶۴/۰۹ ± ۹/۸۴^{b}	۳۳/۶۷ ± ۲/۴۱^{ab}	۱۳۲/۳۳ ± ۱/۹۱$^{a-c}$	۲۲/۱۲ ± ۳/۳۰^{c}	۱۴۴/۸۰ ± ۰/۰۷^{b}	۷۹/۸۷ ± ۱/۰۲^{b}	۱۷/۹۵ ± ۴/۴۴^{bc}	۱/۱۳ ± ۱/۱۳^{bc}	۷۲/۸۹ ± ۵/۸۶^{bc}
D+SP+RS	۱۶۲/۹۱ ± ۹/۷۲^{b}	۳۴/۰۶ ± ۲/۴۲^{ab}	۱۴۴/۴۷ ± ۲/۹۲^{ab}	۲۴/۳۷ ± ۴/۴۴^{b}	۱۴۷/۵۹ ± ۰/۲۸^{b}	۸۰/۱۲ ± ۱/۰۵^{b}	۱۸/۰۹ ± ۴/۴۶^{bc}	۱/۱۹ ± ۱/۱۴^{bc}	۷۴/۴۵ ± ۵/۹۷^{bc}
D+VS+RS	۱۶۰/۲۷ ± ۹/۵۹^{b}	۳۵/۱۵ ± ۲/۵۳^{ab}	۱۴۷/۰۳ ± ۳/۲۰^{ab}	۲۵/۲۲ ± ۴/۴۸^{b}	۱۵۵/۸۴ ± ۰/۸۲^{ab}	۸۰/۵۲ ± ۱/۰۷^{b}	۱۸/۴۲ ± ۴/۴۹^{bc}	۱/۲۴ ± ۱/۱۵$^{a-c}$	۷۵/۴۴ ± ۱/۰۵^{bc}
D+SP+VS+RS	۱۵۵/۱۸ ± ۹/۳۱^{b}	۳۶/۳۷ ± ۲/۶۶^{a}	۱۵۵/۴۵ ± ۳/۹۹^{a}	۲۷/۴۷ ± ۳/۶۳^{a}	۱۶۶/۸۴ ± ۱/۶۰^{a}	۸۱/۸۴ ± ۱/۱۵^{b}	۱۹/۵۷ ± ۱/۵۸^{b}	۱/۳۵ ± ۱/۱۶^{ab}	۸۲/۶۵ ± ۱/۶۳^{b}

در هر ستون، میانگین‌های دارای حرف مشترک، براساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی‌داری ندارند.

C: شاهد D: خشکی SP: تیمار بذر با اکسید نیتریک VS: محلول‌پاشی با اکسید نیتریک در مرحله رویشی RS: محلول‌پاشی با اکسید نیتریک در مرحله زایشی

محتوی نسبی آب (RWC): با اعمال تیمار خشکی، RWC برگ‌های ماش نسبت به شاهد معادل ۲۰٪ کاهش یافت. با این وجود، طی تنش خشکی، در اثر کاربرد SNP، این ویژگی به طور معنی‌داری بهبود یافت. ضمن اینکه بین تیمارهای مختلف کاربرد این ماده، تفاوت معنی‌داری دیده نشد (جدول ۳).

شاخص سبزینگی: شاخص سبزینگی برگ‌های ماش در اثر تنش خشکی معادل ۵۳٪ در مقایسه با شرایط عدم تنش کاهش یافت. با این حال، کاربرد SNP به طور معنی‌داری موجب افزایش شاخص سبزینگی در شرایط تنش شد. در میان تیمارهای کاربرد SNP، تیمار ترکیبی تیمار بذرها + محلول‌پاشی در مراحل رویشی و زایشی موثرتر بود، اگرچه با تیمارهای محلول‌پاشی در مرحله زایشی، تیمار بذرها + محلول‌پاشی در مرحله رویشی، تیمار بذرها + محلول‌پاشی در مرحله زایشی و همچنین تیمار محلول‌پاشی در مراحل رویشی و زایشی، تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول ۳).

شاخص سطح برگ[1]: تنش خشکی موجب کاهش معنی‌دار شاخص سطح برگ ماش گردید. این کاهش نسبت به شرایط نرمال معادل ٤٨ درصد بود. از سوی دیگر تحت تنش خشکی، با کاربرد SNP، شاخص سطح برگ افزایش یافت. تیمار ترکیبی تیمار بذرها + محلول‌پاشی در مراحل رویشی و زایشی از سایر تیمارهای کاربرد SNP موثرتر بود، اگرچه با سایر تیمارهای کاربرد، به جز تیمار بذر، تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول ۳).

عملکرد دانه: عملکرد دانه ماش تحت تنش خشکی معادل ۷۰ درصد در مقایسه با شرایط عدم تنش کاهش یافت. این در حالی است که کاربرد SNP موجب بهبود معنی‌دار عملکرد دانه در شرایط تنش گردید. در بین تیمارهای کاربرد SNP، تیمار ترکیبی تیمار بذرها + محلول‌پاشی در مراحل رویشی و زایشی موثرتر بود (افزایش ۹۰٪ عملکرد نسبت به شرایط تنش)، اگرچه با تیمارهای محلول‌پاشی در مرحله زایشی، تیمار بذرها + محلول‌پاشی در مرحله رویشی، تیمار بذرها + محلول‌پاشی در مرحله زایشی و همچنین تیمار محلول‌پاشی در مراحل رویشی و زایشی، تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول ۳).

بحث

تنش‌های مختلف غیر زیستی از جمله خشکی، منجر به بیش‌تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS)[2] در سلول‌های گیاهی می‌شوند که بسیار واکنش‌پذیر و سمّی بوده و موجب خسارت به پروتئین‌ها، چربی‌ها، کربوهیدرات‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌شوند که در نهایت سبب بروز تنش اکسیداتیو می‌گردند. ROS شامل رادیکال‌های آزاد سوپر اکسید ($O_2^{\bullet-}$)، هیدروکسیل ($OH^{\bullet}$)، پرهیدروکسیل ($HO_2^{\bullet}$)، و الکوکسیل ($RO^{\bullet}$) و همچنین مولکول‌های غیر رادیکالی همچون پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و اکسیژن منفرد ($^1O_2$) می‌باشند. گیاهان جهت مقابله با تنش اکسیداتیو و پاکسازی ROS دارای سیستم دفاع آنتی اکسیدانی آنزیمی (SOD، CAT، APX،

1. Leaf Area Index

2. Reactive Oxygen Species

گلوتاتیون ردکتاز "GR"، گلوتاتیون پراکسیداز "GPX" و...) و غیر آنزیمی (اسید اسکوربیک، گلوتاتیون، ترکیبات فنولی، پرولین، کاروتنوئیدها، آلکالوئیدها و آلفا توکوفرول‌ها) هستند (Gill and Toteja, 2010). در بسیاری از تنش‌ها، تولید ROS در سلول افزایش یافته به طوری که تعادل بین عوامل اکسیداتیو و آنتی اکسیداتیو به هم می‌خورد. این امر منتج به بروز تنش اکسیداتیو می‌گردد. افزایش میزان MDA به عنوان یکی از فراورده‌های نهایی پراکسیداسیون چربی غشاها، یکی از شاخص‌های سنجش شدت تنش اکسیداتیو است (Cechin et al., 2015). خشکی یکی از مهمترین تنش‌های غیر زیستی است که موجب بیش‌تولید ROS و تشدید پراکسیداسیون چربی‌ها می‌شود. فعالیت آنزیمهای آنتی اکسیدان تاثیر مثبتی بر کاهش خسارت اکسیداتیو حاصل از تنش خشکی دارد. آنزیم SOD موجب تبدیل $O_2^{\bullet-}$ به H_2O_2 می‌شود و آنزیم‌های CAT و APX نیز سبب تبدیل H_2O_2 به H_2O در بخش‌های مختلف سلول می‌شوند (Rahimian Boogar et al., 2014). در آزمایش حاضر، میزان افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان در شرایط تنش خشکی کافی نبود چرا که نتوانست از افزایش میزان MDA به عنوان شاخص پراکسیداسیون چربی غشاها بکاهد. اما با کاربرد NO از تنش اکسیداتیو و در نتیجه میزان MDA کاسته شد. کاهش MDA در اثر کاربرد NO می‌تواند بدلیل اثر مستقیم آن در پاکسازی ROS و همچنین نقش آن در بیان ژنهای کد کننده آنزیمهای آنتی اکسیداتیو باشد (Shehab et al., 2010; Fan et al., 2012; Sidana et al., 2015). یکی دیگر از دلایل اثر مثبت NO بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان، نقش این ماده در تحریک فعالیت آنزیم‌های دارای آهن است (Farooq et al., 2009). NO همچنین می‌تواند از طریق بهبود انعطاف‌پذیری دیواره سلول، تاثیر بر فسفولیپیدها و بهبود سیالیت غشاها باعث حفظ ساختارهای سلولی گردد. علاوه بر این گزارش شده است که NO می‌تواند با رادیکال‌های الکوکسیل (RO•) و پراوکسیل (ROO•) چربی‌ها واکنش داده و منجر به توقف مستقیم اکسیداسیون چربی‌ها گردد (Shehab et al., 2010). همچنین NO می‌تواند مستقیماً با رادیکال‌های آزادی مانند $O_2^{\bullet-}$ واکنش داده و تولید پراکسی نیتریت ($ONOO^-$) نماید که می‌تواند به‌عنوان یک مولکول پیام‌رسان در واکنش به تنش و یا در تنظیم فعالیت پروتئین‌ها شرکت کند (Fan and Liu, 2012). همراستا با مشاهدات آزمایش حاضر، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان در اثر کاربرد خارجی NO و در نتیجه کاهش خسارت اکسیداتیو که نشانه آن کاهش میزان MDA است در بسیاری از گیاهان تحت تنش خشکی گزارش شده است (Tan et al., 2008; Farooq et al., 2009; Shehab et al., 2010; Fan et al., 2012; Santisree et al., 2015; Sidana et al., 2015; Gan et al., 2015).

در این آزمایش، در اثر تنش خشکی بر میزان پرولین برگ‌های ماش افزوده گردید. از سوی دیگر، با کاربرد خارجی NO، غلظت پرولین در شرایط تنش باز هم بیشتر شد. در بسیاری از گونه‌های گیاهی، در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیر زیستی، انباشت اسید آمینه پرولین افزایش می‌یابد. پرولین به‌عنوان یک محافظت کننده اسمزی، علاوه بر تنظیم اسمزی موجب حفظ ساختار اجزای زیرسلولی، تنظیم pH، تامین انرژی و پاکسازی ROS می‌شود (Tan et al., 2008; Gan et al., 2015). کاربرد خارجی NO در بسیاری از گونه‌های گیاهی موجب افزایش غلظت پرولین تحت تنش خشکی شده است (Tan et al., 2008; Farooq et al., 2009; Shallan et al., 2012; Santisree et al., 2015; Cechin et al., 2015; Gan et al., 2015). این نتایج با یافته‌های پژوهش حاضر کاملاً منطبق است. افزایش غلظت پرولین در اثر کاربرد NO به تحریک فعالیت برخی آنزیم‌های کلیدی

در ساخت پرولین نسبت داده شده است (Cechin et al., 2015). افزایش تجمع پرولین در اثر کاربرد NO تحت تنش خشکی می‌تواند به جذب آب توسط سلول‌ها کمک نماید (Gan et al., 2015).

محتوی نسبی آب (RWC) یکی از مهمترین شاخص‌های سنجش وضعیت آبی گیاه است که با جذب آب توسط ریشه‌ها و تعرق آن توسط برگ‌ها مرتبط است. در حقیقت RWC سطح آبداری سلول و بافت را نشان می‌دهد که برای سوخت و ساز فیزیولوژیکی گیاه اهمیت زیادی دارد. فعالیت‌های فیزیولوژیکی گیاه وابسته به محتوی آب گیاه است و تغییر در RWC مستقیماً تمامی مراحل فتوسنتز را دچار اختلال می‌کند (Mofizur Rahman and Hasegawa, 2012). زمانی گیاه دچار تنش خشکی می‌شود که سرعت تعرق از سرعت جذب آب بیشتر باشد، به همین دلیل طی تنش خشکی میزان RWC نیز کاهش می‌یابد. در تحقیق حاضر، تنش خشکی موجب کاهش RWC برگ‌های ماش گردید، با این وجود کاربرد NO سبب افزایش RWC تحت تنش شد. در شرایط تنش خشکی، با کاربرد NO بدلیل افزایش تجمع پرولین و تحریک سلولها به جذب آب، وضعیت آبی و RWC بهبود می‌یابد (Tan et al., 2008). در اثر تنش خشکی، غلظت NO در نوک ریشه افزایش می‌یابد، این امر موجب طویل شدن سلول‌های این ناحیه شده (شبیه به اثر اکسین) که منجر به تحریک رشد ریشه و بهبود جذب آب می‌شود (Sidana et al., 2015). NO همچنین موجب تحریک انتقال پیامهایی می‌شود که منجر به تشکیل تارهای کشنده و افزایش رشد ریشه می‌گردد. وظیفه اصلی تارهای کشنده افزایش سطح جذب و در نتیجه بهبود جذب آب و عناصر غذایی توسط ریشه‌هاست. به عبارت دیگر، افزایش محتوی NO می‌تواند تشکیل ریشه را تحریک نماید که این امر موجب بهبود جذب آب و در نهایت وضعیت آبی گیاه می‌شود (Silveira et al., 2017). در اکثر گیاهان، بسته شدن روزنه‌ها یکی از اولین واکنش‌ها به تنش خشکی است. تولید NO در سلولهای محافظ روزنه در اثر اسید ابسیزیک (ABA)[1] تحریک می‌شود که این امر منجر به بسته شدن روزنه‌ها طی تنش خشکی می‌گردد (Adimulam et al., 2017; Sidana et al., 2015). NO همچنین موجب افزایش غلظت کلسیم درون سلولی در سلولهای محافظ روزنه شده که بسته شدن روزنه‌ها را تحریک می‌کند (Gan et al., 2015). کاهش نسبی هدایت روزنه‌ای تحت تنش ملایم می‌تواند اثر حفاظتی در برابر تنش داشته باشد چرا که سبب حفظ آب و بهبود راندمان مصرف آن می‌شود (Cechin et al., 2015). بنابراین، کاربرد NO از طریق بهبود رشد ریشه و جذب آب و نیز کاهش هدایت روزنه‌ای، موجب حفظ آب گیاه می‌گردد. مشابه با یافته‌های پژوهش فعلی، نتایج سایر تحقیقات نیز نشان داده که کاربرد NO تحت شرایط تنش خشکی موجب بهبود وضعیت آبی گیاه و RWC شد (Tan et al., 2008; Farooq et al., 2009; Fan et al., 2012; Cechin et al., 2015; Gan et al., 2015; Jangid and Dwivedi, 2017).

کاهش محتوی کلروفیل در اثر تنش خشکی بدلیل کاهش ساخت آن و نیز تشدید تخریب و تجزیه آن است (Mofizur Rahman and Hasegawa, 2012). در پژوهش حاضر، شاخص سبزینگی برگ‌های ماش بدلیل تنش خشکی کاهش معنی‌داری یافت، اما با کاربرد NO، این صفت تحت تنش خشکی بهبود یافت. NO از طریق کاهش خسارت اکسیداتیو به کلروپلاستها (پاکسازی مستقیم و غیر مستقیم ROS) و همچنین نقش آن در مسیر متابولیکی کلروفیل سبب بهبود محتوی کلروفیل در شرایط تنش خشکی می‌شود (Fan and Liu, 2012; Sidana et al., 2015).

1. Abscisic acid

یکی دیگر از دلایل بهبود محتوی کلروفیل در اثر تیمار با NO به جذب بیشتر آهن توسط گیاه نسبت داده شده است که نقش مهمی در ساختار کلروفیل دارد. ضمن اینکه در اثر تجزیه SNP آهن نیز آزاد می‌شود که در دسترس گیاه قرار گرفته و می‌تواند در ساخت کلروفیل بکار رود (Santisree et al., 2015).

در اثر تنش خشکی و کاهش تامین آب برای سلولها، فشار تورژسانس آنها کاهش یافته، تقسیم و طویل شدن سلولی مختل شده و در نهایت کاهش سطح و وزن برگ روی می‌دهد (Cechin et al., 2015). در تحقیق حاضر، کاربرد NO تحت تنش خشکی از طریق تجمع پرولین و همچنین بهبود RWC موجب حفظ فشار تورژسانس سلولی و در نهایت بهبود سطح برگ گردید. مشابه با نتایج پژوهش حاضر، کاهش سطح برگ در اثر تنش خشکی و بهبود آن با تیمار NO در پنبه (Shallan et al., 2012)، آفتابگردان (Cechin et al., 2015) و گوجه فرنگی (Jangid and Dwivedi, 2017) نیز گزارش شده است.

تنش خشکی از طریق اثرگذاری منفی بر فرایندهای مختلف رشد و نمو گیاه از قبیل فتوسنتز، وضعیت آبی، جذب و انتقال عناصر غذایی، فعالیت‌های آنزیمی، زوال برگ‌ها و... موجب کاهش رشد و عملکرد گیاه می‌شود (Mofizur Rahman and Hasegawa, 2012). در تحقیق حاضر نیز خشکی با تشدید خسارت اکسیداتیو، بر هم زدن تعادل آبی گیاه و کاهش شاخص سبزینگی و سطح برگ، عملکرد دانه ماش را کاهش داد. از طرف دیگر، اعتقاد بر این است که NO با تنظیم حرکت روزنه‌ها، کنترل فتوسنتز، خاصیت آنتی اکسیدانی، افزایش رشد ریشه و تارهای کشنده و همچنین تحریک تجمع محلول‌های سازگار موجب افزایش تحمل به تنش خشکی می‌شود (Santisree et al., 2015). در پژوهش فعلی نیز مشخص شد که کاربرد خارجی NO با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان و کاهش خسارت اکسیداتیو، تشدید تجمع پرولین و همچنین بهبود RWC و شاخص سبزینگی، سبب افزایش عملکرد دانه در شرایط تنش خشکی گردید. نتایج سایر تحقیقات نیز حاکی از کاهش عملکرد دانه در اثر خشکی و بهبود آن با کاربرد خارجی NO در گیاهان مختلف است (Shallan et al., 2012; Jangid and Dwivedi, 2017; Zangani et al., 2018).

نتیجه‌گیری نهایی

نتایج این تحقیق نشان داد که تنش خشکی از طریق ایجاد خسارت اکسیداتیو، کاهش RWC، شاخص سبزینگی و شاخص سطح برگ موجب کاهش شدید عملکرد دانه ماش گردید. از سوی دیگر کاربرد SNP به عنوان ماده رها کننده NO با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان، تجمع پرولین، بهبود RWC، شاخص سبزینگی و شاخص سطح برگ موجب افزایش تحمل به خشکی و بهبود عملکرد دانه شد. در بین تیمارهای کاربرد SNP، تیمار بذر به تنهایی اثر چشمگیری در بهبود تحمل به تنش نداشت. در بین این تیمارها، تیمار ترکیبی تیمار بذر + محلول‌پاشی در مراحل رویشی و زایشی موثرتر بود، اگرچه با چند تیمار دیگر از جمله محلول‌پاشی SNP در مرحله زایشی تفاوت معنی‌داری نداشت. براساس این یافته‌ها، کاربرد خارجی NO می‌تواند به‌عنوان روشی مفید در بهبود تحمل به تنش خشکی ماش توصیه شود.

References

Adimulam, S.S., Pooja, B.M. and Parankusam, S. (2017). Interaction of nitric oxide with phytohormones under drought stress. Journal of Plant Studies. 6(1): 58-61.

Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. Methods in Enzymology. 105: 121-126.

Bates, L.S., Waldren, R.P. and Teare, J.D. (1973). Rapid determination of proline for water stress studies. Plant and Soil. 39: 205-207.

Beyer, W.F. and Fridovich, I. (1987). Assaying for superoxide dismutase activity: Some large consequences of minor changes in conditions. Analytical Biochemistry. 161(2): 559-566.

Cechin, I., Cardoso, G.S., Fumis, T.F. and Corniani, N. (2015). Nitric oxide reduces oxidative damage induced by water stress in sunflower plants. Bragantia Campinas. 74(2): 200-206.

Fan, H., Li, T., Guan, L., Li, Z., Guo, N., Cai, Y. and Lin, Y. (2012). Effects of exogenous nitric oxide on antioxidation and DNA methylation of *Dendrobium huoshanense* grown under drought stress. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 109: 307-314.

Fan, Q. and Liu, J. (2012). Nitric oxide is involved in dehydration/drought tolerance in *Poncirus trifoliata* seedlings through regulation of antioxidant systems and stomatal response. Plant Cell Reports. 31: 145-154.

Farooq, M., Basra, S.M.A., Wahid, A. and Rehman, H. (2009). Exogenously applied nitric oxide enhances the drought tolerance in fine grain aromatic rice (*Oryza sativa* L.). Journal of Agronomy & Crop Science. 195: 254-261.

Gan, L., Wu, X. and Zhong, Y. (2015). Exogenously applied nitric oxide enhances the drought tolerance in hulless barley. Plant Production Science. 18(1): 52-56.

Gill, S.S. and Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiology & Biochemistry. 48: 909-930.

Heath, R.L. and Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives of Biochemistry & Biophysics. 125: 189-198.

Jangid, K.K. and Dwivedi, P. (2017). Physiological and biochemical changes by nitric oxide and brassinosteroid in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) under drought stress. Acta Physiologea Plantarum. 39: 73.

Khan, M.N., Mobin, M., Mohammad, F. and Corpas, F.J. (2014). Nitric oxide in plants: Metabolism and role in stress physiology (1st ed.). Springer Science.

Kumari, A., Sheokand, S. and Swaraj, K. (2010). Nitric oxide induced alleviation of toxic effects of short term and long term Cd stress on growth, oxidative metabolism and Cd accumulation in chickpea. Brazilian Journal of Plant Physiology. 22: 271-284.

Li, C., Song, Y., Guo, L., Gu, X., Muminov, M.A. and Wang, T. (2018). Nitric oxide alleviates wheat yield reduction by protecting photosynthetic system from oxidation of ozone pollution. Environmental Pollution. 236: 296-303.

Mofizur Rahman, I. and Hasegawa, H. (2012). Water stress (1st ed.). Intech Publisher.

Nakano, Y. and Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant and Cell Physiology. 22(5): 867-880.

Rahimian Boogar, A., Salehi, H. and Jowkar, A. (2014). Exogenous nitric oxide alleviates oxidative damage in turfgrasses under drought stress. South African Journal of Botany. 92: 78-82.

Santisree, P., Bhatnagar-Mathur, P. and Sharma, K.K. (2015). NO to drought-multifunctional role of nitric oxide in plant drought: Do we have all the answers? Plant Science. 239: 44-55.

Saroj, S., Dahire, A., Dewangan, M. and Jain, A. (2018). Assessment the effect of nitric oxide on yield parameters of wheat and maize under different levels of salt stress. International Journal of

Current Microbiology & Applied Sciences. 7(1): 1835-1842.

Seabra, A.B. and Oliveira, H.C. (2016). How nitric oxide donors can protect plants in a changing environment: What we know so far and perspectives. Molecular Science. 3(4): 692-718.

Shallan, M.A., Hassan, H.M.M., Namich, A.A.M. and Ibrahim, A.A. (2012). Effect of sodium niroprusside, putrescine and glycine betaine on alleviation of drought stress in cotton plant. American-Eurasian journal of agricultural & environmental sciences. 12(9): 1252-1265.

Shehab, G.G., Ahmed, O.K. and EL-Beltagi, H.S. (2010). Effects of various chemical agents for alleviation of drought stress in rice plants (*Oryza sativa* L.). Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca. 38(1): 139-148.

Sidana, S., Bose, J., Shabala, L. and Shabala, S. (2015). Nitric oxide in drought stress signalling and tolerance in plants. In: Nitric oxide action in abiotic stress responses in plants, pp. 95-114. Ed. M.N. Khan, M. Mobin, F. Mohammad and F.J. Corpas. Springer Science.

Silveira, N.M., Hancock, J.T., Frungillo, L., Siasou, E., Marcos, F.C.C., Salgado, I., Machado, E.C. and Ribeiro, R.V. (2017). Evidence towards the involvement of nitric oxide in drought tolerance of sugarcane. Plant Physiology & Biochemistry. 115: 354-359.

Tan, J., Zhao, H., Hong, J., Han, Y., Li, H. and Zhao, W. (2008). Effects of exogenous nitric oxide on photosynthesis, antioxidant capacity and proline accumulation in wheat seedlings subjected to osmotic stress. World Journal of Agricultural Sciences. 4(3): 307-313.

Zangani, E., Zehtab-Salmasi, S., Andalibi, B. and Zamani, A.A. (2018). Protective effects of nitric oxide on photosynthetic stability and performance of *Silybum marianum* under water deficit conditions. Agronomy Journal. 110(2): 555-564.