Plant Prod., 2024, 47(3), 337-353
https://plantproduction.scu.ac.ir/
ISSN (P): 2588-543X; **ISSN (E):** 2588-5979
Doi: 10.22055/ppd.2024.46944.2170
Received: 18 May 2024
Accepted: 28 September 2024

Plant Productions
Research Article

Efficacy of nitric oxide and zinc oxide nanoparticles in improving growth, nutrition, metabolism and reproductive development in tomato

Zahra Oraghi Ardebilli[1*], Elham Danaee[2]

1. Associate Professor, Department of Biology, Garmsar Branch, Islamic Azad University, Garmsar, Iran
2. Associate Professor, Department of Horticultural Sciences, Garmsar Branch, Islamic Azad University, Garmsar, Iran

Citation: Oraghi Ardebilli, Z., Danaee, E. (2024) Efficacy of nitric oxide and zinc oxide nanoparticles in improving growth, nutrition, metabolism and reproductive development in tomato. *Plant Productions*, 47(3), 337-353.

Abstract

Introduction

There is no doubt that significant progress is being made in nanoscience and technology, which has paved the way for advancements in many different fields such as agriculture, biology, food, and medicine. Among the different types of nano-scaled metal oxides, zinc oxide nanoparticles (ZnONPs) are among the most widely employed nano-compounds in various industries, including agriculture, food, and medicine. Nitric oxide (NO) is a bioactive signaling substance in living organisms, including plants, which plays vital roles in different stages of plant development during the life cycle. Physiological responses of crop plants to long-term application of NO or ZnONPs individually and mixed manners have not been well investigated and remain largely unknown. The purpose of this research is to investigate the effect of long-term foliar application of NO or ZnONPs on the growth performance and physiology of tomato plants. Considering the necessity of developing a sustainable agricultural approach, this project was designed to evaluate the effect of long-term foliar application of NO or ZnONPs on the growth, performance, nutrition and metabolism of tomato.

Materials and methods

This study was implemented as a completely randomized design with four treatment groups and three independent replications. This experiment was conducted in soilless conditions (cocopeat and perlite) in a greenhouse (Islamic Azad University, Garmsar branch, Garmsar). Tomato seedlings was irrigated with Hoagland nutrient solution. 30-days-old tomato seedlings were sprayed with ZnO-NP at two concentrations (0 and 3 mg/L) or NO (0 and 25 µM) 15 times with an interval of 72 hours.

Results and Discussion

The results showed that NO and ZnONPs treatments, especially in the combined one, caused a significant increase in the biomass in shoot and root compared to the control. The applied treatments also affected the characteristics of the plants in the reproductive stage. The application of NO and ZnONPs treatments significantly reduced the time of entering into the reproductive

* **Corresponding Author:** Zahra Oraghi Ardebilli
E-mail: zahraoraghi@yahoo.com

© 2024 The Author(s). Published by Shahid Chamran University of Ahvaz. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

phase, increased fruit production, and enhanced fruit biomass, which indicated the effectiveness of these treatments on plant reproductive development. Foliar spraying with NO and ZnONPs caused a significant improvement in the content of several essential minerals, including potassium (K+), iron (Fe) and zinc (Zn) in leaves and fruits, compared to the control group. The NO and ZnONPs treatments synergistically and significantly augmented in the concentrations of photosynthetic pigments, including chlorophyll a (Chl a), chlorophyll b (Chl b), and carotenoids in leaves in comparison to the control group. The highest amount of proline amino acid was observed in ZnONP and NO+ZnONP treatment groups, which was significantly higher than the control group. Single and combined treatments of seedlings with NO and ZnONPs led to a significant increase in the content of soluble phenols in leaves compared to the control group. Phenylalanine ammonialyase (PAL) enzyme activity also followed the same trend as soluble phenols. Also, the activity of antioxidant peroxidase enzyme showed a significant up-regulation in response to the application of NO or ZnONPs. The highest activity of nitrate reductase enzyme was recorded in the leaves of plants simultaneously supplemented with NO and ZnONPs.

Conclusion

The results of this research indicated that foliar spraying with NO or ZnONPs at low concentration can lead to the promotion of plant growth and metabolism and also strengthening the plant's defense system, while reducing the risk of possible toxicity. These findings can be useful for designing future studies on nano-fertilizers or pesticides. This study also emphasizes the necessity of providing transcriptome and proteome data in future studies.

Keywords: Biofortification; Elicitor; Metal oxides; Nanoparticles; Nanotechnology

تولیدات گیاهی، ۱۴۰۳، ۴۷(۳)، ۳۳۷ -۳۵۳
https://plantproduction.scu.ac.ir/
ISSN (P): 2588-543X; **ISSN (E):** 2588-5979
Doi: 10.22055/ppd.2024.46944.2170
تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۲/۲۹
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۷/۰۷

تولیدات گیاهی
مقاله پژوهشی

کارایی نیتریک اکسید و نانوذرات زینک اکسید در بهبود رشد، تغذیه، متابولیسم و نمو زایشی در گوجه فرنگی (*Solanum lycopersicum*)

زهرا اوراقی اردبیلی [۱*]، الهام دانائی [۲]

۱- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، واحد گرمسار، دانشگاه آزاد اسلامی، گرمسار، ایران
۲- دانشیار، گروه علوم باغبانی، واحد گرمسار، دانشگاه آزاد اسلامی، گرمسار، ایران

چکیده

شکی نیست که پیشرفت قابل توجهی در علم و فناوری نانو راه را برای پیشرفت در بسیاری از زمینه‌های مختلف مانند کشاورزی، زیست‌شناسی، غذا و پزشکی هموار کرده است. در میان انواع مختلف اکسیدهای فلزی با مقیاس نانو، نانوذرات اکسید روی (ZnONPs) از جمله پرکاربردترین نانوذرات در صنایع مختلف از جمله کشاورزی، غذایی و دارویی هستند. اکسید نیتریک (NO) یک ماده فعال سیگنالینگ در موجودات زنده از جمله گیاهان شناخته می‌شود که نقش‌های حیاتی را در مراحل مختلف نموی گیاهان در طی چرخه زندگی بازی می‌کند. پاسخ‌های فیزیولوژیک گیاهان زراعی به استفاده طولانی مدت از NO و یا نانوزینک اکسید به طور انفرادی و ترکیبی به خوبی بررسی نشده است و تا حد زیادی ناشناخته باقی مانده است. این تحقیق در سال ۱۴۰۰ در دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار انجام شد. هدف این تحقیق، بررسی تاثیر بکارگیری برگی طولانی مدت نیتریک اکسید و نانوزینک اکسید بر رشد، نمو زایشی و فیزیولوژی گیاه گوجه فرنگی است. با توجه به ضرورت رویکرد کشاورزی سازگار، این تحقیق طراحی شد تا اثر کاربرد برگی طولانی مدت نیتریک اکسید و نانوذرات زینک اکسید را بر رشد، نموزایشی، تغذیه و متابولیسم گیاه گوجه فرنگی را ارزیابی کند. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۴ گروه تیماری با ۳ تکرار مستقل اجرا شد. دانه رست‌های ۳۰ روزه گوجه فرنگی با ZnO-NP در دو غلظت (صفر و ۳ میلی‌گرم در لیتر) و یا نیتریک اکسید در دو غلظت صفر و ۲۵ میکرومولار محلول‌پاشی شدند. نتایج نشان داد که تیمارهای NO و ZnONPs به ویژه در تیمار ترکیبی موجب افزایش معنی‌دار زیست توده در اندام هوایی و ریشه نسبت به شاهد شد. تیمارهای بکارگرفته شده ویژگی‌های شاخص در مرحله زایشی گیاه را تحت تاثیر قرارداد. اعمال تیمارهای NO و ZnONPs به مقدار معنی‌داری موجب کاهش زمان ورود به فاز زایشی، افزایش تولید میوه و نیز افزایش زیست توده میوه شدند که دلالت بر اثربخشی این تیمارها بر نمو زایشی گیاه بود. محلول‌پاشی برگی با NO و ZnONPs موجب افزایش میزان عناصر پتاسیم، آهن و روی در برگ و میوه گیاهان تیمارشده نسبت به شاهد شد. تیمارهای NO و ZnONPs به طور تقویت کننده سبب افزایش معنی‌دار محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی شامل کلروفیل a، b و کاروتنوئیدها در برگ نسبت به شاهد شد. بالاترین

* **نویسنده مسئول:** زهرا اوراقی اردبیلی
رایانامه: zahraoraghi@yahoo.com

میزان اسید آمینه پرولین در تیمارهای ZnONP و NO+ZnONP مشاهده شد که به مقدار معنی‌داری بیشتر از گروه شاهد بود. تیمارهای تکی و ترکیبی NO و ZnONPs موجب افزایش معنی‌دار میزان فنل محلول برگ در مقایسه با گروه شاهد شدند. فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز نیز از روندی مشابه فنل محلول تبعیت کرد. همچنین، فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدان پراکسیداز روند افزایشی معنی‌دار نسبت به شاهد در اثر تیمارهای اعمال شده نشان داد. بیشترین فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در برگ گیاهانی ثبت شد که تحت تیمار ترکیبی NO و ZnONPs بودند. نتایج این تحقیق بیانگر این موضوع بود که محلول‌پاشی برگی با نیتریک اکسید و زینک اکسید در غلظت کم به تعداد دفعات زیاد ضمن کاهش ریسک ناشی از سمیت احتمالی می‌تواند منجر به ارتقا رشد و عملکرد متابولیسم گیاه و نیز تقویت سیستم دفاعی گیاه شود که به ویژه در مورد گیاهان دارویی و زراعی این امر بسیار اهمیت دارد. این یافته‌ها می‌تواند برای طراحی مطالعات آینده در مورد نانو کودها یا آفت‌کش‌ها مفید باشد. این مطالعه همچنین بر ضرورت ارائه داده های مولکولی در مطالعات آتی تاکید می‌کند.

کلید واژه ها: اکسید فلزات، الیسیتور، غنی‌سازی زیستی، نانوتکنولوژی، نانوذره

مقدمه

اکسید نیتریک (NO) یک ماده فعال سیگنالینگ در موجودات زنده از جمله گیاهان است که وظایف حیاتی را در مراحل مختلف نموی گیاهان در طی چرخه زندگی بر عهده دارند. این ماده همچنین در کنترل چرخه سلولی و تکثیر سلولی دخیل است (Kushwaha *et al.*, 2019). نقش نیتریک اکسید در فرآیندهای نموی مانند فوتومورفوژنز، نمو سیستم ریشه‌ای و هدایت روزنه‌ای نیز به اثبات رسیده است (Santisree *et al.*, 2019; Sun *et al.*, 2020). یکی از فرآیندهای مهم سلولی، پیری و مرگ سلولی است که نیتریک اکسید در این فرآیند نقش کلیدی تنظیمی ایفا می‌کند (Hussain *et al.*, 2022). در گیاهان، NO می‌تواند در بخش‌های مختلف سلولی، به ویژه سیتوپلاسم، پراکسیزوم، میتوکندری و کلروپلاست از طریق مسیرهای مختلف شامل مسیرهای احیایی از نیتریت و مسیر اکسیداتیو از ال-آرژنین، پلی آمین‌ها یا هیدروکسیل آمین تولید شود (Sami *et al.*, 2018).

نیتریک اکسید برای سلول‌های گیاهی می‌تواند در حالتی وابسته به غلظت مفید یا خطرناک و مرحله نموی باشد. شواهد تحقیقاتی، عملکردهای این ماده سیگنال دهنده در غلظت بهینه را در بهبود متابولیسم اولیه (Nazerieh *et al.*, 2018)، متابولیسم ثانویه (Kong *et al.*, 2016)، رشد گیاه (Santisree *et al.*, 2019; Raya-González *et al.*, 2019; Abedi *et al.*, 2020)، تحمل به تنش‌ها (Nazerieh *et al.*, 2018; Nabi *et al.*, 2019) و محصول (Kong *et al.*, 2016; Abedi *et al.*, 2020) تایید کرده‌اند.

دهه اخیر شاهد پیشرفت چشمگیری در علم و فناوری نانو بوده است که راه را برای پیشرفت در بسیاری از زمینه‌ها مانند کشاورزی، زیست‌شناسی، غذا و پزشکی هموار کرده است. در میان محصولات نانو که بیشترین کاربرد را دارند، بررسی سنتز (روش‌های فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی) و مزایا / خطرات احتمالی اکسیدهای فلزی به دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد خود بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند (Abbasi *et al.*, 2019; Ullah *et al.*, 2020). اکسید روی (ZnO) و نانو ذرات آن (ZnO-NPs) به طور گسترده‌ای در بسیاری از فعالیت‌های صنعتی کاربردی شده‌اند (Vafaee Moghadam *et al.*, 2021). در میان انواع مختلف مواد با مقیاس نانو، نانوذرات اکسید روی (ZnONPs) از جمله پرکاربردترین نانوذرات در صنایع مختلف از جمله کشاورزی هستند. چندین مطالعه خطرات و مزایای بالقوه استفاده از ZnONPs در کشاورزی را بررسی کرده‌اند. استفاده از ZnONPs

به عنوان یک استراتژی کارآمد برای برآورده کردن انتظارات کشاورزان با افزایش متابولیسم کربن و نیتروژن (Sun *et al.*, 2020)، تنظیم سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی (Faizan *et al.*, 2018; Danaee and Abdossi, 2018)، افزایش تجمع زیستی روی (Hussain *et al.*, 2022) پیشنهاد شده است. همچنین شواهدی نشان داده است که ZnONP ها تحمل گیاه را در برابر شرایط تنش‌زا مانند آرسنیک (Yan *et al.*, 2021)، کادمیوم (Hussain *et al.*, 2018; Adrees *et al.*, 2020) و خشکی (Semida *et al et al.*, 2021; Alhverdizadeh and Danaee, 2022) بهبود می‌بخشند. از سوی دیگر، ZnONPs موجب سمیت سلولی و آسیب های ژنتیکی در گیاهان مختلف مثل برنج و داتوره شده است. برخی مطالعات، عملکردهای بالقوه ZnO-NPs را برای بهبود جوانه‌زنی بذر (Hu *et al.*, 2017)، افزایش زیست توده (Babajani *et al.*, 2019; Vafaee Moghadam *et al.*, 2021; Mirakhorli *et al.*, 2022) ، تقویت تغذیه، به ویژه تجمع زیستی روی (Babajani *et al.*, 2019)، تنظیم متابولیسم اولیه (Vafaee Moghadam *et al.*, 2021) تایید کرده‌اند. همچنین گزارشاتی وجود دارد که بکارگیری این ترکیب متابولیسم ثانویه را تحریک می‌کنند (Vafaee Moghadam *et al.*, 2021) و عملکرد تولید محصول را بهبود می‌بخشند (Vafaee Moghadam *et al.*, 2021). علاوه بر این، ZnO-NPs در غلظت مطلوب تحمل شرایط تنشی، مانند خشکی در سورگوم (Dimkpa *et al.*, 2019)، Cd در گندم (Khan *et al.*, 2019) و Cd در ذرت (Hussain *et al.*, 2018) را افزایش داد.

با این حال، این مطالعات بیشتر به مراحل اولیه رشد محدود شده است. در حالی که مشخص نیست که آیا استفاده از ZnONPs روی تغییر رشد به مرحله زایشی، کارایی عملکرد، توسعه دانه و کیفیت بذر در محصولات تأثیر می‌گذارد یا خیر. پاسخ‌های فیزیولوژیک گیاهان زراعی به استفاده طولانی مدت از NO و یا نانوزینک اکسید به طور انفرادی و ترکیبی به خوبی بررسی نشده است و تا حد زیادی ناشناخته باقی مانده است. هدف از این تحقیق، بررسی بکارگیری طولانی مدت نیتریک اکسید و نانوزینک اکسید بر رشد، نموزایشی و متابولیسم گیاه گوجه فرنگی است.

مواد و روش‌ها

آماده سازی و اعمال تیمارها

بذر گوجه‌فرنگی رقم کارناک از شرکت فیتو هند و محصول نانوزینک اکسید با اندازه ۳۰-۱۰ نانومتر (US research nanomaterials, Inc; 3302 Twig Leaf Lane Houston, TX 77084, USA) تهیه شد. سدیم نیتروپروساید (Merck) به عنوان منبع نیتریک اکسید نیز خریداری شد. این آزمایش در شرایط بدون خاک (گلدان‌های حاوی کوکوپیت و پرلیت به نسبت ۷۰ به ۳۰) در شرایط گلخانه ای در گرمسار با میانگین دما ۱۶/۲۷ درجه سانتی گراد در روز/شب، شدت نور ۹۵ میکرومول فوتون بر متر مربع در ثانیه و رطوبت نسبی ۶۰٪ انجام شد. برای تهیه محلول هوگلند محلول‌های پایه شامل نیترات کلسیم ۱ مولار، نیترات پتاسیم۱ مولار، فسفات پتاسیم (KH_2PO_4) ۱ مولار، سولفات منیزیوم ۱ مولار، محلول میکروالمان‌ها ($2.8\ gL^{-1}\ H_3B0_3$, $1.8\ gL^{-1}\ MnCl_2.4H_2O$, $0.2\ gL^{-1}\ ZnSo_4.7H2O$, $0.1\ gL^{-1}\ CuSO_4.5H_2O$, $0.025\ gL^{-1}\ H_2MoO_4$) و کلات آهن (Fe-EDTA) تهیه شد. برا ی تهیه ۱ لیتر محلول غذایی هوگلند با استفاده از محلول‌های پایه فوق، ۵ میلی لیتر از محلول پایه نیترات کلسیم، ۵ میلی لیتر نیترات پتاسیم، ۱ میلی لیتر فسفات پتاسیم، ۲ میلی لیتر سولفات منیزیم، ۱ میلی لیتر میکروالمان ها و ۱ میلی لیتر کلات آهن با آب به حجم نهایی ۱ لیتر رسانده شد. سپس pH محلول حاصله روی ۶/۸ تنظیم شد. آبیاری بوته‌های گوجه فرنگی در ماه اول با استفاده از محلول غذایی هوگلند یک روز در میان و مابقی با آب انجام

شد. در بقیه مراحل زندگی گیاه، آبیاری گیاهان هر روز با محلول غذایی هوگلند انجام شد. لازم بذکر است که برای ثابت ماندن غلظت مواد در بستر کشت، محلول قبلی بر طبق ظرفیت مزرعه شستشو داده شد. این طرح در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۴ گروه تیماری با ۳ تکرار مستقل اجرا شد. دانه رست‌های ۳۰ روزه با ZnO-NP در دو غلظت (صفر و ۳ میلی‌گرم در لیتر) و یا نیتریک اکسید در دو غلظت صفر و ۲۵ میکرومولار ۱۵ دفعه با فاصله ۷۲ ساعت تیمار شدند. شش گلدان در هر گروه تیمار وجود داشت که نیمی از آن ها برای سنجش های فیزیولوژیک یک هفته پس از آخرین محلول‌پاشی (گیاهان ۳ ماهه) برداشت شدند. در مرحله دوم، گیاهان ۱۳۰ روزه برای ارزیابی میوه های تولید شده برداشت شدند.

اندازه‌گیری غلظت رنگیزه‌های فتوسنتزی

برای تعیین تغییرات مرتبط با تیمارها در فتوسنتز، حلال استون برای خالص سازی رنگدانه‌های فتوسنتزی از برگ‌ها استفاده شد. میزان جذب عصاره‌های استونی در طول موج‌های ۴۷۰، ۶۶۳ و ۶۴۶ نانومتر به روش اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد. پس از آن، غلظت کلروفیل a (Chla) و b (Chlb) و کاروتنوئیدها با استفاده از معادلات ارائه شده توسط Lichtenaler (1987) تعیین شد.

سنجش غلظت پرولین و فنل محلول کل

برای اندازه‌گیری پرولین، از سولفوسالیسیلیک ۳ درصد برای عصاره‌گیری استفاده شد. روی ۲ میلی‌لیتر از عصاره‌های صاف شده، مقدار ۲ میلی‌لیتر معرف نین هیدرین و ۲ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال اضافه شد و به مدت یک ساعت در آب ۱۰۰ درجهٔ سانتی‌گراد قرارداده شدند. پس از سرد کردن لوله‌ها به هر کدام مقدار ۴ میلی‌لیتر تولوئن اضافه گشت و با استفاده از دستگاه ورتکس لوله‌ها تکان داده شد. سرانجام فاز رویی را برداشته و جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت شد و غلظت پرولین بر حسب میلی‌گرم بر گرم بافت تازه برگ با استفاده از منحنی استاندارد تعیین شد (Bates *et al.* 1973). محتوای فنل کل در عصاره اتانولی، با استفاده از معرف فولین ۵۰ درصد و کربنات سدیم اندازه‌گیری شد. مخلوط حاصل به مدت یک ساعت در تاریکی نگهداری شد و پس از آن جذب هر نمونه در طول موج ۷۲۵ نانومتر خوانده شد و با منحنی استاندارد اسید تانیک غلظت فنل‌های کل بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه شد.

سنجش فعالیت آنزیم‌های نیترات ردوکتاز و فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز

برای استخراج آنزیم‌ها از برگ‌ها، از بافر فسفات (۱۰۰ میلی‌مولار، (pH 7.2)) استفاده شد. پس از آن، هموژن‌های به‌دست آمده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند و مایع رویی به عنوان عصاره آنزیمی در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. فعالیت نیترات ردوکتاز طبق روش Sym (1984) تعیین شد و بر حسب میکرومول نیتریت در ساعت در هر گرم وزن تر بیان شد. طبق پروتکل توضیح داده شده توسط Beaudoin-Eagan و Thorpe (1985)، فعالیت آنزیم PAL در هر گروه تیماری بر اساس نرخ تبدیل اسید آمینه فنیل آلانین (Phe) به سینامات در مخلوط واکنش آنزیم شامل بافر Tris-Hcl ۰/۵M با pH ۸ و فنیل آلانین ۶ میکرومولار در طی ۱ ساعت با ثبت جذب نمونه‌ها در ۲۹۰nm توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد.

سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز پس از استخراج عصاره پروتئینی، مقدار ۲ میلی‌لیتر بافر تریس ۱۰۰ میلی‌مولار با pH برابر ۷ و ۰/۳ میلی‌متر آب اکسیژنه ۵ میلی‌مولار و ۰/۲ میلی‌لیتر پیروگالل ۱۰ میلی‌مولار، در حمام یخ با ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی مخلوط و پس از ۲ دقیقه تغییرات جذب در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد (Putter, 1974).

اندازه‌گیری پتاسیم، روی و آهن در برگ و میوه

برای اندازه گیری محتوای پتاسیم، روی و آهن، خاکستر خشک برگ و میوه با استفاده از روش تجزیه حرارتی در یک کوره (۶۸۰ درجه سانتیگراد) تهیه شد. سپس، مخلوط حلال متشکل از اسید نیتریک و اسید کلریدریک (۲: ۱) برای حل کردن خاکستر حاصل استفاده شد. پس از آن، محتوای K توسط فلیم‌فتومتر (Flame photometer, JENWAY) مورد سنجش قرارگرفت. علاوه بر این، سطوح آهن و روی با استفاده از روش طیف‌سنجی جذب اتمی (Atomic Absorption Spectrophotometer; VARIAN; AA240) تعیین شد.

آنالیز آماری داده‌ها

پس از برداشت گیاهان، اندازه گیری پارامترها و انجام سنجش‌ها، براساس آزمون ANOVA، مقایسه میانگین‌ها براساس آزمون Tukey و تعیین سطح معنی‌داری از نرم‌افزار Graphpad Prism استفاده گردید.

نتایج و بحث

نتایج نشان داد تیمارهای نیتریک اکسید و نانو اکسید روی موجب افزایش معنی‌دار وزن تر اندام هوایی گیاه نسبت به شاهد شد (شکل 1a). بالاترین وزن تر اندام هوایی در تیمارهای NO+ZnONP و NO مشاهده شد در روندی مشابه، تیمارهای نیتریک اکسید و یا نانو اکسید روی سبب افزایش معنی‌دار وزن تر ریشه گیاه نسبت به شاهد شد (شکل 1b) و بالاترین وزن تر ریشه در تیمارهای NO+ZnONP و NO مشاهده شد. بکارگیری مکمل‌های اشاره شده موجب کاهش معنی‌دار زمان میوه‌دهی گیاه نسبت به شاهد شد (شکل 1c). پایین‌ترین زمان میوه‌دهی در تیمار ZnONP مشاهده شد. تعداد میوه‌های تشکیل شده نیز تحت تاثیر بکارگیری نیتریک اکسید و نانوزینک اکسی به ویژه تیمار ترکیبی افزایش معنی‌داری در تعداد میوه‌های تشکیل شده بدنبال داشت (شکل 1d). بالاترین وزن تر میوه نیز در تیمار NO+ZnONP مشاهده شد (شکل1e).

آنالیز آماری نشان داد که محلول‌پاشی برگی با نیتریک اکسید و نانو اکسید روی موجب بهبود معنی‌دار میزان پتاسیم برگ و میوه گیاه نسبت به شاهد شد. بالاترین میزان پتاسیم در گروه تیماری NO+ZnONP مشاهده شد (شکل 2a, b). درحالی که استفاده از تیمار مجزای نیتریک اکسید از نظر پتاسیم برگی افزایش معنی‌داری نسبت به تیمار مجزای نانوزینک اکسید داشت، اما تفاوت بین این دو گروه در میوه معنی‌دار نبود. در روندی مشابه پتاسیم، برگ و میوه گیاهان تیمار شده با نیتریک اکسید و نانو اکسید محتوای آهن بیشتری داشتند (شکل 2c,d). تیمار نانو اکسید روی به شکل تکی و ترکیبی با نیتریک اکسید به طور کارمدی موجب افزایش معنی‌دار میزان روی برگ و میوه نسبت به شاهد شد. تفاوت بین دو گروه ZnONP و NO+ZnONP در میزان روی برگ معنی‌دار بود، درحالی که در میوه از نظر آماری تفاوت معنی‌دار نبود (شکل 2e,f).

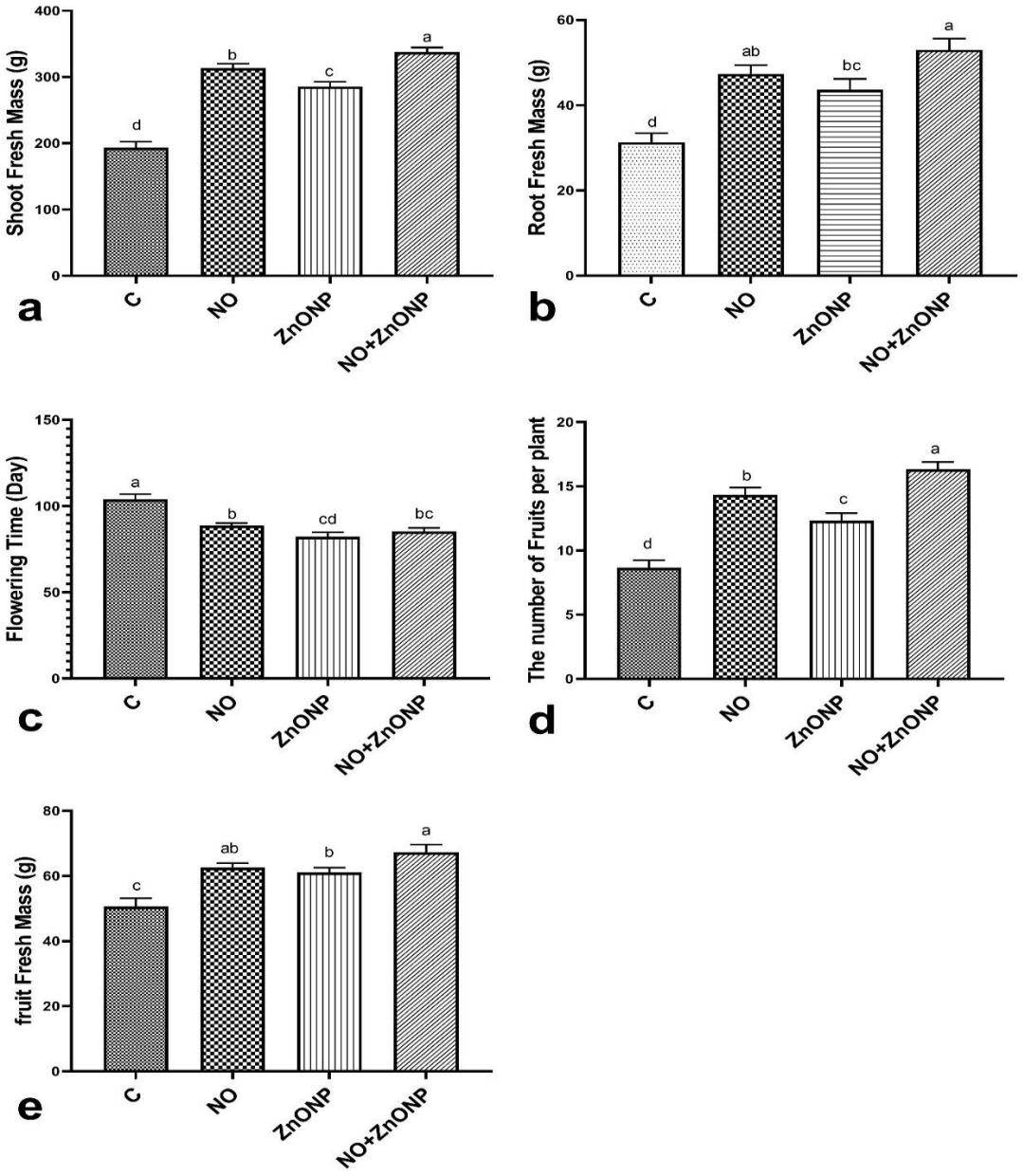

Figure 1. Changes in traits related to growth and development, including shoot fresh weight (a), root fresh weight (b), flowering time (c), number of fruits per plant (d), and fruit fresh weight (e)

شکل ۱. تغییرات در صفات مربوط به رشد و نمو، از جمله وزن تر اندام هوایی (a)، وزن تر ریشه (b)، زمان گلدهی (c)، تعداد میوه در بوته (d) و وزن تر میوه (e)

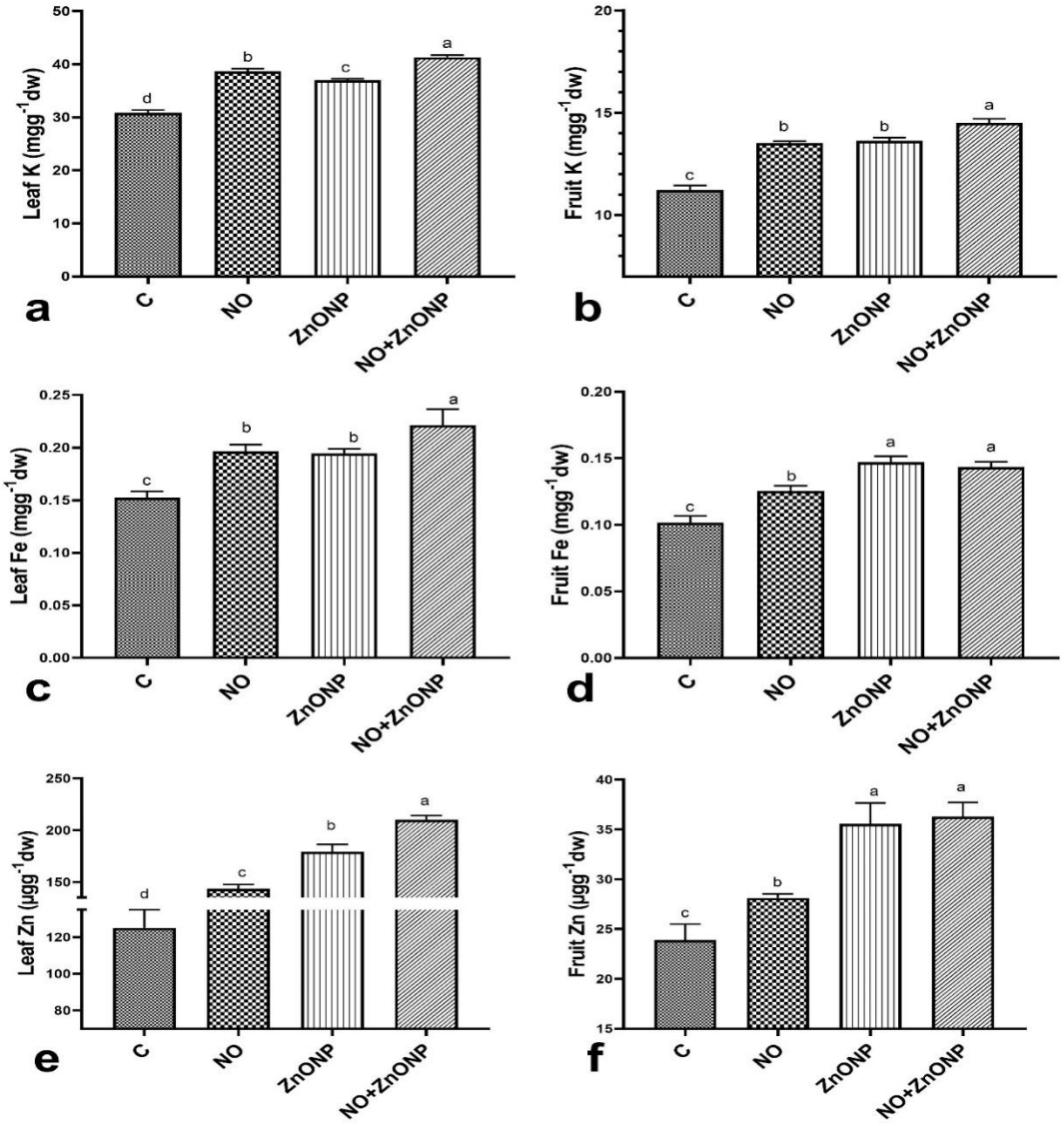

Figure 2. Changes in nutritional traits including leaf potassium (a), fruit potassium (b), leaf iron (c), fruit iron (d), leaf zinc (e), and fruit zinc (f)

شکل ۲. تغییرات در صفات تغذیه ای شامل پتاسیم برگ (a)، پتاسیم میوه (b)، آهن برگ (c)، آهن میوه (d)، روی برگ (e) و روی میوه (f)

بر اساس نتایج این تحقیق، کاربرد ZnONP و یا نیتریک اکسید در غلظت‌های کم به صورت مستمر در هر دو مدل انفرادی و یا ترکیبی منجر به بهبود رشد رویشی، نموزایشی و وضعیت تغذیه شد. نتایج این تحقیق دلالت بر اثرات تقویت کننده نانوزینک اکسید و نیتریک اکسید در بهبود عملکرد گیاه گوجه فرنگی داشت. همسو با نتایج این تحقیق، کاربرد نانوزینک اکسید در غلظت بهینه موجب بهبود رشد در گونه های مختلف گیاهی مانند برنج (Zhang *et al.*, 2021)، بادمجان (Semida *et al.*, 2021)، گندم (Adrees *et al.*, 2021)، ذرت (Azam *et al.*, 2022)، گوجه فرنگی (Ahmed *et al.*, 2023)، عدس (Kolenčík *et al.*, 2022) و لوبیا سبز (Mahdieh *et al.*, 2018) شد. محلول‌پاشی نانوذرات اکسید روی در غلظت 100 mgl^{-1} از نظر پارامترهای رشد، صفات فیزیولوژیکی، تغذیه، ویژگی‌های عملکرد و صفات کیفی

گوجه‌فرنگی بهترین کارایی را داشت (Ahmed *et al.*, 2023). کاربرد ZnONP تاثیر مثبتی برعملکرد، وزن هزار دانه و تعداد غلاف در بوته گیاه عدس داشت، اما تفاوت آماری معنی‌داری در محتوای عناصر غذایی مشاهده نشد (Kolenčík *et al.*, 2022). همچنین، بکارگیری نانوزینک اکسید به عنوان روشی برای ارتقا مقاومت گیاهان در برابر تنش های مختلف از جمله فلزات سنگین (Adrees *et al.*, 2021)، خشکی (Semida *et al.*, 2021) و شوری (Ali *et al.*, 2022) معرفی شده است. همسو با نتایج این تحقیق، بکارگیری نیتریک اکسید موجب ارتقا موثر در رنگیزه‌های فتوسنتزی، رشد، عملکرد و تغذیه در گونه‌های متنوعی از گیاهان مانند نعناع فلفلی (Nazerieh *et al.*, 2018)، پنبه (Kong *et al.*, 2016)، *Vigna angularis* (Ahanger *et al.*, 2020)، بادمجان (Soliman *et al.*, 2019) و برنج (Kushwaha *et al.*, 2019) شده است. نیتریک اکسید خارجی همراه با افزایش محتوای عناصر ضروری مانند K، Ca، N و Fe در بادمجان (Soliman *et al.*, 2019) و *Vigna angularis* (Ahanger *et al.*, 2020) بود که با نتایج ما تطابق دارد. بکارگیری نیتریک اکسید به طور موثری همراه با ارتقا رشد و عملکرد گیاه از طریق مکانیسم‌های مختلفی از جمله تاثیر بر هدایت روزنه‌ای (Balotf *et al.*, 2018; Nazerieh *et al.*, 2018; Abedi *et al.*, 2020)، تغییر رشد ریشه (Sun *et al.*, 2020)، بهبود تغذیه (Soliman *et al.*, 2019; Ahanger *et al.*, 2020)، تحریک متابولیسم نیتروژن (Nazerieh *et al.*, 2018)، بهبود راندمان فتوسنتز (Ahanger *et al.*, 2020) و تغییر بیان ژن‌ها (Abedi *et al.*, 2020; Santisree *et al.*, 2018) است.

تیمارهای نیتریک اکسید و نانو اکسید روی موجب افزایش معنی‌دار میزان کلروفیل a گیاه نسبت به شاهد شد. بالاترین میزان رنگیزه‌های کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئید در گیاهان تیمار شده با نانوزینک اکسید و نیتریک اکسیدبه طور همزمان مشاهده شد (شکل 3a, 3b, 3c). تفاوت بین محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی بین دو گروه نیتریک اکسید و نانوزینک اکسید به تنهایی معنی‌دار از نظر آماری نبود. بالاترین میزان پرولین در تیمارهای ZnONP و NO+ZnONP مشاهده شد (شکل 3d). اثر تیمار نانوزینک اکسید نسبت به نیتریک اکسید در افزایش محتوای پرولین بیشتر بود. تیمارهای تکی و ترکیبی نیتریک اکسید، و نانو اکسید روی سبب افزایش معنی‌دار میزان فنل محلول برگ نسبت به شاهد شدند، اما تفاوت بین این گروه‌ها از نظر آماری معنی‌دار نبود (شکل 3e). در روندی مشابه، افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم پراکسیداز نسبت به شاهد در اثر مکمل‌های اعمال شده ثبت شد (شکل 3f). بیشترین فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در برگ گیاهانی ثبت شد که تحت تیمار ترکیبی نیتریک اکسید و نانوزینک اکسید بود که به مقدار معنی‌داری از سایر گروه‌های تیماری بالاتر بود. فعالیت آنزیم PAL از روندی مشابه فنل محلول تبعیت کرد (شکل 3h). تفاوت بین گروه‌های تیماری NO+ZnONP و ZnONP و نیز دو گروه NO و ZnONP از نظر آماری معنی‌دار نبود (شکل 3h)

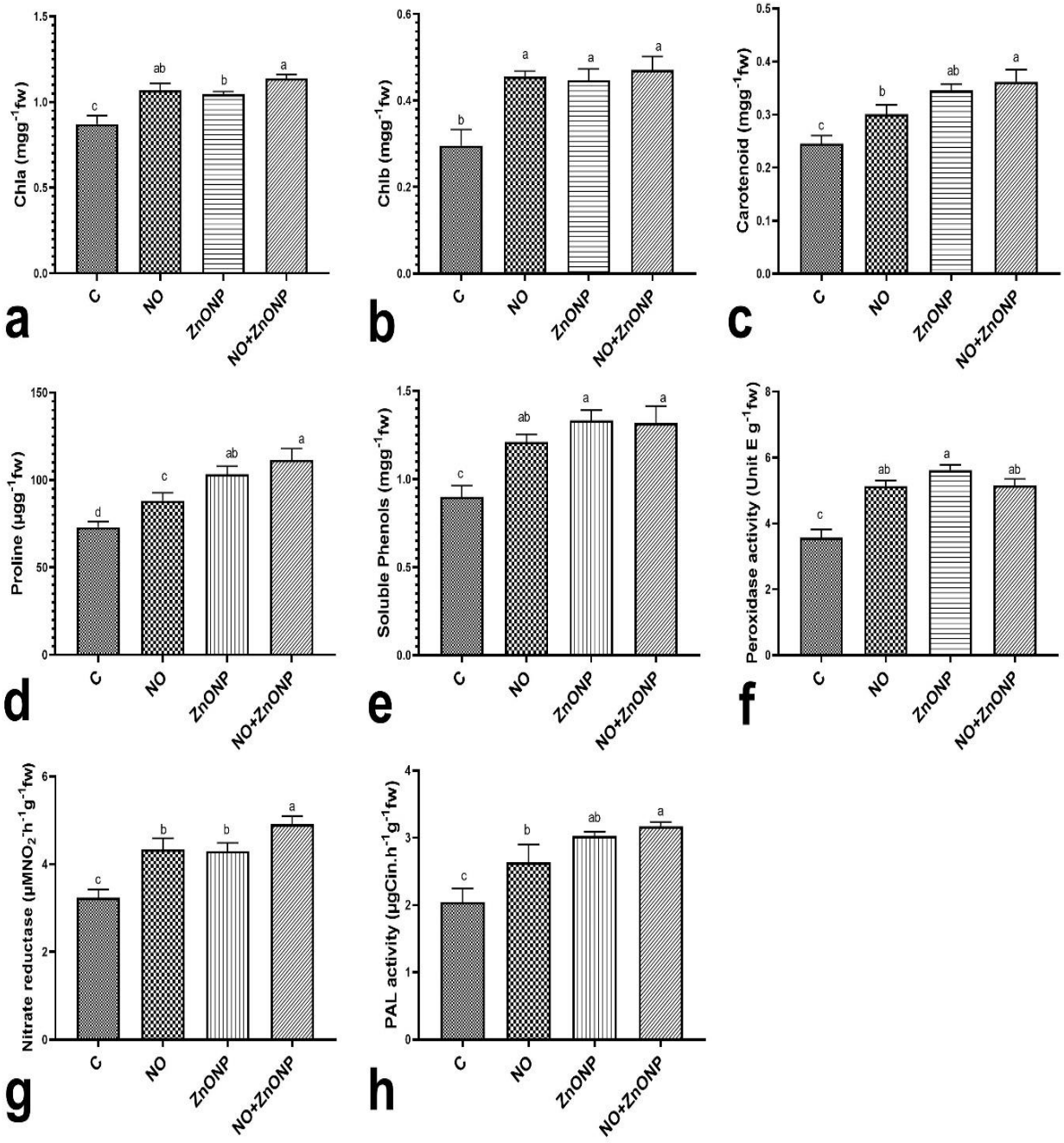

Figure 3. Changes in some biochemical traits including the concentration of Chla (a), Chlb (b), carotenoid (c), leaf proline (d), total soluble phenols (e), peroxidase activity (f), nitrate reductase activity (g), and PAL activity (h)

شکل ۳. تغییرات در برخی از صفات بیوشیمیایی از جمله غلظت کلروفیل a (a) ، کلروفیل b (b)، کاروتنوئید (c)، پرولین برگ (d)، فنل محلول (e)، فعالیت پراکسیداز (f)، فعالیت نیترات ردوکتاز (g) و فعالیت فنیل الانین آمونیا لیاز (h)

بر اساس نتایج تحقیق، کاربرد ZnONP و یا نیتریک اکسید در غلظت‌های کم به صورت مستمر در هر دو مدل انفرادی و یا ترکیبی متابولیسم ازت، فتوسنتز، سیستم آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و متابولیسم ثانویه کمک شایانی کرد. به خوبی مستند شده است که نیتریک اکسید یک مولکول زیستی سیگنالینگ کارآمد برای اصلاح متابولیسم فتوسنتزی است. یکی از مقاصد عمده داخل سلولی نیتریک اکسید، اندام کلروپلاست است به نحویکه نیتریک اکسید می‌تواند دامنه متنوعی از سیگنال‌های پایین دست را کنترل کند (Santisree *et al.*, 2018). تغییرات مشاهده شده در فعالیت نیترات ردوکتاز به عنوان دو شاخص مهم در متابولیسم نیتروژن بیانگر این واقعیت است که سیگنالینگ نیتریک اکسید بر متابولیسم نیتروژن موثر است. منطبق با یافته‌های این تحقیق، بکارگیری نیتریک اکسید در گندم موجب ارتقا عملکرد متابولیسم نیتروژن از طریق تنظیم مثبت بیان ژن‌های مرتبط مانند نیترات ردوکتاز و گلوتامین سنتاز و تحریک فعالیت آنزیم‌های درگیر شد (Balotf *et al.*, 2018). بعلاوه، بکارگیری نیتریک اکسید موجب افزایش غلظت پرولین در نعناع فلفلی (Nazerieh *et al.*, 2018) و بادمجان (Soliman *et al.*, 2019) شد. همچنین نیتریک اکسید به طور موثری در تنظیم تمایز بافتی، فعالیت مریستم، نسخه‌برداری ژنها و متابولیسم فیتوهورمون‌ها نقش دارد (Wany *et al.*, 2018; Plohovska *et al.*, 2019). این مسئله توضیح می‌دهد که چطور بکارگیری نیتریک اکسید شاخص‌هایی مانند تعداد برگ و تولید میوه را ارتقا می دهد. مطابق با نتایج Wang *et al.* (2018)، برهمکنش نزدیکی بین نیتریک اکسید، انواع اکسیژن فعال، تغذیه و جذب نیتروژن و فعالیت مریستم‌های راسی وجود دارد. گزارش شده است که نیتریک اکسید با اثر بر اسکلت سلولی، موازنه فیتوهورمونی و تکثیر سلولی بر حفظ و فعالیت مریستم راسی موثر است (Wany *et al.*, 2018; Plohovska *et al.*, 2019). نتایج دلالت بر تغییرات در نموزایشی و تولید میوه بدنبال اعمال تیمارها بود. NO در ترکیب با هورمون‌ها و H_2S دخیل در فرآیند رسیدن میوه است. اثر مثبت NO بر بلوغ میوه‌های گوشتی با تیمار میوه فلفل شیرین نابالغ با NO نشان داده شده است (González-Gordo *et al.*, 2019).

اثبات شده است که عنصر روی در تنظیم رشد گیاه، متابولیسم اولیه/ثانویه و رونویسی نقش‌های چند منظوره دارد (Sheteiwy *et al et al.*, 2021). نوسانات عنصر روی یک سیگنال مهم است و عملکردهای محوری مانند کوفاکتور در تعداد زیادی از آنزیم‌ها (به ویژه در پروتئین‌های متصل به DNA)، حفظ ثبات ژنتیکی، تنظیم متیلاسیون DNA، رونویسی، ترجمه، متابولیسم هورمون، تمایز سلولی، و تکثیر سلولی (Maret, 2017) دارد. بنابراین، پس از مصرف مکمل عنصر روی، تغییرات در رشد، متابولیسم، رونوشت و پروتئوم مورد انتظار است، هر چند گزارشاتی از سمیت کاربرد نانو زینک اکسید نیز گزارش شده است. مطابق با نتایج، چندین گزارش از مزایای ZnO-NP در بهبود فتوسنتز، تغذیه، رشد، متابولیسم ثانویه، سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی، تجمع زیستی روی، باروری و ایمنی ارائه دادند (Faizan and Faraz, 2018; Abdelaziz *et al.*, 2022; Prakash *et al.*, 2022). با این حال، محققان قویاً هشدار داده‌اند که ZnO-NP در دوزهای بالا برای محصولات زراعی خطرناک است (Sheteiwy v., 2021; Babajani *et al.*, 2019).

اکثر محققان بر این باورند که ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی متفاوت نانوذرات نسبت به مواد غیر نانو به تفاوت‌هایی در عملکرد جذب، برهمکنش‌های بعدی با بیومولکول‌ها، سیگنال‌دهی و پاسخ‌ها کمک می‌کند (Mirakhorli *et al.*, 2022). بنابراین، مطالعات بیشتری برای تایید این فرضیه مورد نیاز است. اخیراً گزارش‌های قانع کننده‌ای بر این موضوع تأکید دارند که ZnO-NP بیان ژن‌ها را تنظیم می‌نماید. این بازآرایی در پروفایل رونویسی ژن‌ها را می‌توان با تغییرات مرتبط با

ZnONP در مولکول‌های سیگنالینگ و هورمون‌ها توضیح داد.

Vafaee *et al.* (2021)، افزایش رونویسی در فاکتورهای رونویسی bZIP، AREB و WRKY1 را به دنبال تیمار گیاهان *Datura Stramonium* با ZnONP گزارش کردند. HSFs، bHLH و EREB، پروتئین‌های تنظیمی اساسی هستند که در متابولیسم / سیگنال‌دهی هورمون‌ها، رشد، متابولیسم و پاسخ‌های تنش نقش دارند (Abedi *et al.*, 2020). کاربرد ZnONP غلظت پتاسیم، آهن و روی را بهبود بخشید. مطابق با نتایج حاصل، ZnONP در غلظت مناسب غلظت مواد مغذی ضروری را در *Datura Stramonium* (Vafaee Moghadam *et al.*, 2021)، *Melissa officinalis* (Babajani *et al.*, 2019) و سورگوم (Dimkpa *et al.*, 2019) را افزایش داد. تغییرات ناشی از ZnONP در بیان ناقلان غشای ZIP، تعادل هورمونی، تمایز سیستم آوندی و رابطه منبع/مخزن مکانیسم‌هایی هستند که توسط آن‌ها ZnONP ممکن است بر هموستاز مواد مغذی و در نتیجه متابولیسم، به ویژه فتوسنتز و جذب نیتروژن تأثیر بگذارد.

تیمار ZnONP اعمال شده با افزایش رنگدانه‌های فتوسنتزی همراه بود که حاکی از بهبود بالقوه در کارایی فتوسنتز و محافظت (نقش حفاظتی) کاروتنوئیدها از طریق چرخه گزانتوفیل (مکانیسم‌های مهم)، در نتیجه بهبود رشد و عملکرد است. ZnONP همچنین فعالیت نیترات ردوکتاز و غلظت پرولین را افزایش داد که نشان دهنده تغییر در متابولیسم اولیه نیتروژن است. مطابق با این نتایج، ZnONP صفات مربوط به فتوسنتز، نیترات ردوکتاز و تجمع پرولین را بهبود بخشید. Adil *et al.*, (2022) گزارش کردند که نانوزینک اکسید روی رنگیزه‌های فتوسنتزی و تغذیه گیاه گندم را بهبود بخشید که با نتایج این تحقیق همسو است.

افزایش مشاهده‌شده در فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدان پراکسیداز و آنزیم PAL همراه با افزایش متابولیت‌های فنلی (**Soroori** *et al.*, 2021)، القای مرتبط با ZnONP را در سیستم آنتی‌اکسیدانی، متابولیسم ثانویه و سیستم دفاعی پیشنهاد می‌کند. تنظیم مثبت در سیستم آنتی‌اکسیدانی و متابولیت‌های ثانویه بدنبال تیمار نانوزینک اکسید مستند شده است و آنرا به عنوان کود مطرح می‌کند (Abdelaziz *et al.*, 2022; Prakash *et al.*, 2022). مطابق با نتایج ما، تیمار ZnONP کارایی سیستم مهار انواع اکسیژن فعال را از طریق تنظیم رونویسی در ژن‌های POD، APX، CAT و SOD در برنج افزایش داد (Sheteiwy *et al.*, 2017).

نتایج این تحقیق بیانگر این موضوع بود که محلول‌پاشی برگی با نیتریک اکسید و زینک اکسید در غلظت مناسب به تعداد دفعات مناسب منجر به ارتقا رشد و عملکرد متابولیسم گیاه و نیز تقویت سیستم دفاعی گیاه می‌شود که به ویژه در مورد گیاهان دارویی و زراعی این امر بسیار اهمیت دارد. این یافته‌ها می‌تواند برای طراحی مطالعات آینده در مورد نانو کودها یا آفت‌کش‌ها مفید باشد. این مطالعه همچنین بر ضرورت ارائه داده‌های بزرگ بیان ژن ها و پروتئین ها در مطالعات آتی تاکید می‌کند.

استفاده از نانوذرات در کشاورزی، چه به عنوان کود و چه به عنوان آفت کش، به دلیل مزایا و خطرات بالقوه آن موضوعی است که در حال تحقیق و بحث است. نانوذرات به دلیل اندازه کوچک و سطح بالای خود می توانند انتقال و جذب مواد مغذی یا آفت کش ها توسط گیاهان را افزایش دهند. مزایای کاربرد نانومواد به عنوان کود و یا آفت کش عبارتند ازتخفیف آلودگی های زیست محیطی ناشی از مصرف آفت کش ها و کودهای شیمیایی و تهیه نانوذرات مهندسی شده برای آزادسازی تدریجی مواد مغذی یا آفت‌کش‌ها؛ از طرف دیگر، کاربرد نانومواد خطرات بالقوه ای نیز دارد. نانوذرات می‌توانند در خاک و یا آب انباشته شوند، بر اکوسیستم‌ها

تأثیر گذاشته و به طور بالقوه وارد زنجیره‌های غذایی شوند و سلامت موجودات زنده از جمله انسان ها را تهدید کند. هنوز چیزهای زیادی برای یادگیری در مورد اثرات بلند مدت قرار گرفتن در معرض نانوذرات در محیط های کشاورزی، هم برای محیط زیست و هم برای سلامت انسان وجود دارد. پاسخ های متنوع گونه‌های مختلف گیاهی به نانوذرات تعمیم نتایج را دشوار می‌کند. بدیهی است تحقیقات بیشتر برای ارزیابی خطرات بالقوه مفید هستند. بنابراین، در حالی که مزایای بالقوه برای کاربرد نانومواد وجود دارد، تصمیم به استفاده از نانوذرات در کشاورزی باید بر اساس ارزیابی‌های جامع خطر و نظارتی باشد تا از پایداری زیست‌محیطی و ایمنی سلامت انسان اطمینان حاصل شود. تهیه دستورالعمل‌های جامع برای استفاده ایمن از نانوذرات در کشاورزی توسط نهادهای نظارتی در آینده مورد انتظار است.

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق بیانگر این موضوع بود که محلول‌پاشی برگی با نیتریک اکسید و زینک اکسید در غلظت کم به تعداد دفعات زیاد ضمن کاهش ریسک ناشی از سمیت احتمالی می‌تواند منجر به ارتقا رشد و عملکرد متابولیسم گیاه و نیز تقویت سیستم دفاعی گیاه شود که به ویژه در مورد گیاهان دارویی و زراعی این امر بسیار اهمیت دارد. این یافته‌ها می‌تواند برای طراحی مطالعات آینده در مورد نانو کودها یا آفت‌کش‌ها مفید باشد. این مطالعه همچنین بر ضرورت ارائه داده های بیان ژن ها و پروتئین ها در مطالعات آتی تاکید می‌کند.

سپاس‌گزاری

نویسندگان این مقاله از مسئولان محترم دانشگاه آزاد واحد گرمسار جهت فراهم نمودن امکانات لازم جهت انجام این پژوهش سپاسگزاری می‌نمایند.

References

Abdelaziz, A.M., Salem, S.S., Khalil, A.M., El-Wakil, D.A., Fouda, H.M. & Hashem, A.H. (2022). Potential of biosynthesized zinc oxide nanoparticles to control Fusarium wilt disease in eggplant (*Solanum melongena*) and promote plant growth. *BioMetals*, 35(3), 601-616.

Abedi, S., Iranbakhsh, A., Oraghi Ardebili, Z. & Ebadi, M. (2020). Nitric oxide and selenium nanoparticles confer changes in growth, metabolism, antioxidant machinery, gene expression, and flowering in chicory (*Cichorium intybus* L.): potential benefits and risk assessment. *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 3136-3148.

Adil, M., Bashir, S., Bashir, S., Aslam, Z., Ahmad, N., Younas, T., Asghar, R.M.A., Alkahtani, J., Dwiningsih, Y. & Elshikh, M.S. (2022). Zinc oxide nanoparticles improved chlorophyll contents, physical parameters, and wheat yield under salt stress. *Frontiers in plant science*, 13, p. 932861.

Adrees, M., Khan, Z.S., Hafeez, M., Rizwan, M., Hussain, K., Asrar, M., Alyemeni, M.N., Wijaya, L. & Ali, S. (2021). Foliar exposure of zinc oxide nanoparticles improved the growth of wheat (*Triticum aestivum* L.) and decreased cadmium concentration in grains under simultaneous Cd and water deficient stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 208, p.111627.

Ahanger, M.A, Aziz, U, Alsahli, A.A, Alyemeni, M.N. & Ahmad, P. (2020). Influence of exogenous salicylic acid and nitric oxide on growth, photosynthesis, and ascorbate-glutathione cycle in salt stressed *Vigna angularis*. *Biomolecules*, 10(1), 42.

Ahmed, R., Uddin, M.K., Quddus, M.A., Samad, M.Y.A., Hossain, M.M. & Haque, A.N.A. (2023). Impact of foliar application of zinc and zinc oxide nanoparticles on growth, yield, nutrient uptake and quality of tomato. *Horticulturae*, 9(2), 162.

Alhverdizadeh, S. & Danaee, E. (2022). Effect of Humic Acid and Vermicompost on Some Vegetative Indices and Proline Content of *Catharanthus roseous* under Low Water Stress. *Environment and Water Engineering*, 9(1), 141-152. doi.org/10.22034/ewe.2022.333951.1745.

Ali, B., Saleem, M.H., Ali, S., Shahid, M., Sagir, M., Tahir, M.B., Qureshi, K.A., Jaremko, M., Selim, S., Hussain, A. & Rizwan, M. (2022). Mitigation of salinity stress in barley genotypes with variable salt tolerance by application of zinc oxide nanoparticles. *Frontiers in Plant Science*, 13, 973782.

Azam, M., Bhatti, H.N., Khan, A., Zafar, L. & Iqbal, M. (2022). Zinc oxide nano-fertilizer application (foliar and soil) effect on the growth, photosynthetic pigments and antioxidant system of maize cultivar. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 42, 102343.

Babajani, A., Iranbakhsh, A.R., Ardebili Z.O. & Eslami, B. (2019). Differential growth, nutrition, physiology and gene expression in Melissa officinalis mediated by zinc oxide and elemental selenium nanoparticles. *Environmental Science and Pollution Research*, 26, 24430–24444. https//doi.org/10.1007/s1135 6-019-05676 –z.

Balotf, S., Islam, S., Kavoosi, G., Kholdebarin, B., Juhasz, A. & Ma, W. (2018). How exogenous nitric oxide regulates nitrogen assimilation in wheat seedlings under different nitrogen sources and levels. *PloS one*, 13(1): p.e0190269.

Bates, L. S., Waldren, R. P. & Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Journal of Plant Soil*, 39, 205–207. DOI: 10.1007/BF00018060.

Beaudoin-Eagan, L.D. & Thorpe, T.A. (1985). Tyrosine and phenylalanine ammonia lyase activities during shoot initiation in tobacco callus cultures. *Plant Physiology*, 78(3), 438-441.

Danaee, E. & Abdossi, V. (2019). Effects of Some Amino Acids and Organic Acids on Enzymatic Activity and Longevity of *Dianthus caryophyllus* cv. Tessino on at Pre-Harvest Stage. *Journal of Ornamental Plants*, 9(2), 93-104.

Danaee, E. & Abdossi, V. (2018). Effect of different concentration and application methods of polyamines (Putrescine, Spermine, Spermidin) on some morphological, physiological and enzymatic characteristics and vase life of *Rosa hybrida* cv. Dolce Vita cut flower. *Journal of Ornamental Plants*, 8(3), 171-182.

Dimkpa, CO., Singh, U., Bindraban, P.S, Elmer, W.H, Gardea-Torresdey, J.L. & White, J.C. (2019). Zinc oxide nanoparticles alleviate drought-induced alterations in sorghum performance, nutrient acquisition and grain fortification. *Science* of the *Total Environment*, 688, 926-934.

Faizan, M., Faraz, A., Yusuf, M., Khan, S.T. & Hayat, S. (2018). Zinc oxide nanoparticle-mediated changes in photosynthetic efficiency and antioxidant system of tomato plants. *Photosynthetica*, 56, 678-86.

González-Gordo, S., Bautista, R., Claros, M.G., Cañas, A., Palma, J.M. & Corpas, F.J. (2019). Nitric oxide-dependent regulation of sweet pepper fruit ripening. *Journal of Experimental Botany*, 70, 4557–4570.

Hussain, A., Shah, F., Ali, F. & Yun, B.W. (2022). Role of nitric oxide in plant senescence. *Frontiers in Plant Science*, 13, 851631.

Kolenčík, M., Ernst, D., Komár, M., Urík, M., Šebesta, M., Ďurišová, Ľ., Bujdoš, M., Černý, I., Chlpík, J., Juriga, M. & Illa, R. (2022). Effects of foliar application of ZnO nanoparticles on lentil production, stress level and nutritional seed quality under field conditions. *Nanomaterials*, 12(3), 310.

Kong, J., Dong, Y., Song, Y., Bai, X., Tian, X., Xu, L., Liu, S. & He, Z. (2016). Role of exogenous nitric oxide in alleviating iron deficiency stress of peanut seedlings (*Arachis hypogaea* L.). *Journal of plant growth regulation*, 35, 31-43.

Khan, Z.S., Rizwan, M., Hafeez, M., Ali, S., Javed, M.R. & Adrees, M. (2019). The accumulation of cadmium in wheat (*Triticum aestivum*) as influenced by zinc oxide nanoparticles and soil moisture conditions. *Environmental Science and Pollution Research*, 26, 19859-19870.

Kushwaha, B.K., Singh, S., Tripathi, D.K., Sharma, S., Prasad, S.M., Chauhan, D.K., Kumar, V. & Singh, V.P. (2019). New adventitious root formation and primary root biomass accumulation are regulated by nitric oxide and reactive oxygen species in rice seedlings under arsenate stress. *Journal of hazardous materials*, 361, 134-140.

Lichtenthaler, H.K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In Methods in enzymology (Vol. 148, 350-382). Academic Press.

Mahdieh, M., Sangi, M.R., Bamdad, F. & Ghanem, A. (2018). Effect of seed and foliar application of nano-zinc oxide, zinc chelate, and zinc sulphate rates on yield and growth of pinto bean (*Phaseolus vulgaris*) cultivars. *Journal of Plant Nutrition*, 41(18), 2401-2412.

Maret, W. (2017). Zinc in cellular regulation: the nature and significance of "zinc signals". *International journal of molecular sciences*, 18(11), 2285.

Mirakhorli, T., Oraghi Ardebili, Z., Ladan-Moghadam, A. & Danaee, E. (2022). Nitric oxide improved growth and yield in soybean (*Glycine max*) by mediating physiological, anatomical, and transcriptional modifications. *Journal of Plant Growth Regulation (JPGR)*, 41, 13311-1343. https://doi.org/10.1007/s00344-021-10389-0.

Nazerieh, H., Ardebili, Z.O. & Iranbakhsh, A.R. (2018). Potential benefits and toxicity of nanoselenium and nitric oxide in peppermint. *Acta Agriculturae Slovenica*, 111(2), 357-368.

Plohovska, S.H., Krasylenko, Y.A. & Yemets, A.I. (2019). Nitric oxide modulates actin filament organization in Arabidopsis thaliana primary root cells at low temperatures. *Cell Biology International*, 43(9), 1020-1030.

Prakash, V., Rai, P., Sharma, N.C., Singh, V.P., Tripathi, D.K., Sharma, S. & Sahi, S. (2022). Application of zinc oxide nanoparticles as fertilizer boosts growth in rice plant and alleviates chromium stress by regulating genes involved in oxidative stress. *Chemosphere*, 303, 134554.

Putter, J. (1974). In: Methods in enzymatic analysis, 2 (Ed Bergmeyer, A) Academic press. New York, P. 685. Raya-González, J., López-Bucio, J.S. & López-Bucio, J. (2019). Nitric oxide and hydrogen peroxide in root organogenesis. *Nitric Oxide and Hydrogen Peroxide Signaling in Higher Plants*, 157-173.

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 Oxide*, 73, 22-38.

Santisree, P., Adimulam, S.S., Sharma, K., Bhatnagar-Mathur, P. & Sharma, K.K. (2019). Insights into the nitric oxide mediated stress tolerance in plants. *Plant Signaling Molecules* (pp. 385-406). Woodhead Publishing.

Semida, W.M., Abdelkhalik, A., Mohamed, G.F., Abd El-Mageed, T.A., Abd El-Mageed, S.A., Rady, M.M. & Ali, E.F. (2021). Foliar application of zinc oxide nanoparticles promotes drought stress tolerance in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Plants*, 10(2), 421.

Sheteiwy, M.S., Dong, Q., An, J., Song, W., Guan, Y., He, F., Huang, Y. & Hu, J. (2017). Regulation of ZnO nanoparticles-induced physiological and molecular changes by seed priming with humic acid in *Oryza sativa* seedlings. *Plant Growth Regulation*, 83, 27-41.

Sheteiwy, M.S., Shaghaleh, H., Hamoud, Y.A., Holford, P., Shao, H., Qi, W., Hashmi, M.Z. & Wu, T. (2021). Zinc oxide nanoparticles: potential effects on soil properties, crop production, food processing, and food quality. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(28), 36942-36966.

Soliman, M., Alhaithloul, H.A., Hakeem, K.R., Alharbi, B.M., El-Esawi, M. & Elkelish, A. (2019). Exogenous nitric oxide mitigates nickel-induced oxidative damage in eggplant by upregulating antioxidants, osmolyte metabolism, and glyoxalase systems. *Plants*, 8(12), 562.

Soroori, S., Danaee, E., Hemmati, Kh. & Ladan Moghadam, A. (2021). The metabolic response and enzymatic activity of *Calendula officinalis* L. to foliar application of spermidine, citric acid and proline under drought stress and in a postharvest condition. *Journal of Agriculture Scince and Technology*, 23 (6), 1339-1353.

Sun, L.R., Yue, C.M. & Hao, F.S. (2020). Update on roles of nitric oxide in regulating stomatal closure. *Plant signaling & behavior*, 14(10), p.e1649569.

Sym, G.J. (1984). Optimisation of the in-vivo assay conditions for nitrate reductase in barley (*Hordeum vulgare* L. cv. Igri). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 35(7), 725-730.

Ullah, S., Ahmad, A., Ri, H., Khan, A.U., Khan, U.A. & Yuan, Q. (2020). Green synthesis of catalytic zinc oxide nano-flowers and their bacterial infection therapy. *Applied Organometallic Chemistry*, 34(1), p.e5298.

Vafaee Moghadam, A., Iranbakhsh, A.R., Saadatmand, S., Ebadi, M. & Ardebili, Z. (2021). New insights into the transcriptional, epigenetic, and physiological responses to zinc oxide nanoparticles in datura stramonium; potential species for phytoremediation. *Journal of Plant Growth Regulation*. https://doi.org/10.1007/s00344-021-10305-6.

Wany, A., Gupta, A.K., Brotman, Y., Pandey, S., Vishwakarma, A.P., Kumari, A., Singh, P., Pathak, P.K., Igamberdiev, A.U. & Gupta, K.J. (2018). Nitric oxide is important for sensing and survival under hypoxia in Arabidopsis. *BioRxiv*, p.462218. https://doi.org/10.1101/462218.

Yan, S., Wu, F., Zhou, S., Yang, J., Tang, X. & Ye, W. (2021). Zinc oxide nanoparticles alleviate the arsenic toxicity and decrease the accumulation of arsenic in rice (*Oryza sativa* L.). *BMC plant biology*, 21, 1-11.

Zhang, H., Wang, R., Chen, Z., Cui, P., Lu, H., Yang, Y. & Zhang, H. (2021). The effect of zinc oxide nanoparticles for enhancing rice (*Oryza sativa* L.) yield and quality. *Agriculture*, 11(12), 1247.