

تغییرات ویژگی‌های مورفوفیزیولوژی و عملکرد اسانس برگ و گل سرخارگل (*Echinacea purpurea* (L.) Moench) با کاربرد برگی سدیم نیتروپروساید (SNP) تحت تنش خشکی

شقایق السادات موسوی^۱، سمانه اسدی صنم^{۲*} و مریم پژمان مهر^۱

۱. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
۲. استادیار، بخش تحقیقات گیاهان دارویی، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۲/۳ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۳/۲۰)

چکیده

تنش خشکی یکی از محدود کننده‌ترین عوامل محیطی در رشد و تولید گیاهان محسوب می‌شود. سدیم نیتروپروساید (SNP) به‌عنوان یک تولیدکننده نیتریک‌اکساید (NO) در کاهش تنش اکسیداتیو ناشی از تنش‌های غیرزیستی نقش دارد. به‌منظور بررسی اثر محلول‌پاشی SNP بر رشد، عملکرد و برخی ویژگی‌های بیوشیمیایی گیاه دارویی سرخارگل در شرایط تنش خشکی، آزمایشی در قالب طرح کرت‌های خردشده در پایه بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در مزرعه تحقیقاتی مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور-کرج در سال‌های زراعی ۹۵-۱۳۹۴ طراحی و اجرا شد. تیمارهای آزمایش شامل دو عامل SNP در چهار سطح (صفر، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکرومولار) و تنش خشکی در سه سطح [۳۰ (شدید)، ۶۰ (متوسط) و ۹۰ (شاهد)] درصد ظرفیت زراعی بود. در مرحله گلدهی کامل گیاه، ارتفاع بوته، تعداد شاخه جانبی، برگ و گل، ماده خشک اندام‌های هوایی گیاه و نیز بازده اسانس برگ و گل اندازه‌گیری شد. همچنین، نمونه‌گیری از برگ‌ها برای اندازه‌گیری محتوای نسبی آب (RWC) و کلروفیل، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و پراکسیداز (POD)، محتوای مالون‌دی‌آلدهید (MDA)، پرولین و فنل کل هم انجام شد. بر اساس نتایج آزمایش، بیشترین مقدار صفات مورفولوژیک اندازه‌گیری شده و وزن خشک شاخساره مربوط به محلول‌پاشی SNP با غلظت ۲۰۰ میکرومولار تحت شرایط عدم تنش خشکی (شاهد) بود. بیشترین مقدار RWC با میانگین ۷۸/۹ درصد در رطوبت ۹۰ درصد ظرفیت زراعی (شاهد) و سطح ۲۰۰ میکرومولار SNP به‌دست آمد. هم‌چنین غلظت‌های بالاتر SNP مصرفی (۲۰۰ و ۴۰۰ میکرومولار) در تنش متوسط (۶۰ درصد ظرفیت زراعی)، توانست با افزایش فعالیت آنزیم‌های SOD و POD و کاهش محتوای MDA موجب تحمل تنش خشکی شود. بیشترین مقدار پرولین (۱۶/۷ میکرومول بر گرم وزن تر) و فنل کل (۱۲۷/۴ میلی‌گرم گالیک‌اسید بر گرم ماده خشک) هم مربوط به غلظت ۴۰۰ میکرومولار SNP بود. در مجموع می‌توان گفت که کاربرد SNP در غلظت‌های بالاتر، تحت شرایط تنش خشکی، ضمن اینکه می‌تواند موجب تعدیل خسارت تنش شود، افزایش ترکیبات مؤثره گیاه را نیز می‌تواند در پی داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، بازده اسانس، تنش اکسیداتیو، محلول‌پاشی، نیتریک‌اکساید.

Changes in morpho-physiological characteristics and the leaf and flower essential oils yield of coneflower [*Echinacea purpurea* (L.) Moench] with sodium nitroprusside (SNP) foliar application under drought stress

Shaghayegh Mousavi¹, Samaneh Asadi-Sanam^{2*} and Maryam Pezhmanmehr¹

1. Former M. Sc. Student, Department of Horticulture Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Assistant Professor, Department of Medicinal Plants, Research Institute of Forests and Rangelands, AREEO, Tehran, Iran
(Received: Apr. 23, 2019 - Accepted: Jun. 10, 2019)

ABSTRACT

Drought stress (water scarcity) is one of the most limiting environmental factors in plant growth and production. Sodium nitroprusside (SNP) as a nitric oxide donor compound (NO) plays an important role in reducing the oxidative stress caused by abiotic stresses. In order to investigate the effect of SNP foliar application on some biochemical characteristics, growth and yield of *Echinacea purpurea* Moench L. under drought conditions, an experiment was conducted in a split plot design in a completely randomized block design with three replications at the Research Institute of Agriculture, Institute of Forest and Rangelands, Karaj, Iran, in 2015-2016. The experimental treatments included SNP factor at four levels (0, 100, 200 and 400 μM) and drought stress factor at three levels [30% field capacity (severe), 60% field capacity (moderate), 90% field capacity (control)]. At full flowering stage, plant height, number of lateral branches, leaf and flower number, dry weight of shoots and percentage and yield of shoot essential oil were measured. Also, leaves sampling was performed to measure relative water content (RWC), chlorophyll content, the activity of superoxide dismutase (SOD) and peroxidase (POD) enzymes, malondialdehyde (MDA), total phenol and proline contents. Results showed that the highest amount of morphological traits and shoot dry weight were related to 200 μM SNP concentration under non drought stress (control) condition. The highest amount of RWC was obtained (97.9%) in 90% moisture treatment (control) and 200 μM of SNP. Also, higher concentrations of SNP (200 and 400 μM) under moderate stress (60% of crop capacity), could increase the plant drought stress tolerance by increasing the SOD and POD enzymes activity as well as reducing MDA content. The highest amount of proline (16.7 $\mu\text{mol/g}$ fr wt) and total phenol (127.7 mg GAE/g dry matter) were also related to 400 μM SNP treatment. In general, SNP foliar application especially at 200 μM concentration under drought stress conditions could modify drought stress damage, and increase active ingredient of the plant.

Keywords: Antioxidant enzymes, essential oil content, foliar application, nitric oxide, oxidative stress.

* Corresponding author E-mail: asadisanam@rifr-ac.ir

مقدمه

سرخارگل (*Echinacea purpurea* L.)، گیاهی معطر، علفی و چندساله از خانواده کاسنی (Asteraceae) است که در ایران رویش طبیعی ندارد. این گونه بومی آمریکای شمالی بوده اما با توجه به اهمیت دارویی و تجاری آن و سازگاری مناسب به شرایط آب و هوایی کشور، کشت و اهلی‌سازی آن رو به گسترش است. نسخه پزشکی به‌جا مانده از بومیان آمریکا، سرخارگل را جزو مهم‌ترین و پرمصرف‌ترین گیاهان دارویی معرفی کرده است؛ به‌طوری که ساکنان قبایل مختلف، از این گیاه برای درمان زخم‌های دهان و لثه، سرفه و سوءهاضمه، سرماخوردگی، دندان درد، سوزاک، بیماری‌های عفونی و به‌عنوان تقویت‌کننده استفاده می‌کردند (Omidbaigi, 2012). فرمولاسیون‌های خوراکی و تزریقی سرخارگل، امروزه به‌عنوان تقویت‌کننده سیستم دفاعی و ایمنی بدن به‌منظور پیشگیری و درمان عفونت‌های مجاری تنفسی، سرماخوردگی و بیماری‌های مزمن ناشی از نقص ایمنی به‌کار می‌رود (Tsai et al., 2012). از جمله اثرات آن بر سیستم ایمنی می‌توان به افزایش تعداد گلبول‌های سفید خون و سلول‌های طحال و نیز افزایش فعالیت تنفسی اشاره کرد (Manayi et al., 2015).

ترکیبات زیستی سازنده اندام‌های مختلف این گیاه شامل آلکامیدها، مشتقات اسیدکافئیک، پلی‌ساکاریدها، پلی‌استیلن‌ها، گلیکوپروتئین‌ها، فلاونوئیدها و اسانس‌ها است (Landy et al., 2011; Barnes et al., 2005) که در صنایع دارویی، غذایی و آرایشی و بهداشتی استفاده می‌شود (Barrett, 2003). افزایش اسانس می‌تواند یکی از اهداف گزینش و اصلاح سرخارگل در کنار دیگر شاخص‌ها مانند بیشترین عملکرد ریشه و شاخساره، قابلیت برداشت مکانیزه، رشد یکنواخت، یکنواختی در رسیدن گل‌ها و بذرها، بالا بودن میزان اسید شیکوریک (ترکیب شاخص از ترکیبات پلی‌فنلی سرخارگل) باشد تا بتوان رقم‌های مناسب را برای کشت و سازگاری این گیاه وارداتی به کشاورزان معرفی کرد (Yavari et al., 2017). مقدار اسانس در مرحله گل‌دهی، در شاخساره کمتر از ۰/۱ درصد و در ریشه‌ها حدود ۰/۲ درصد گزارش شده است

(Percival, 2000). از اجزای اصلی اسانس در سرخارگل می‌توان به جرم‌کرن دی، اسپاتولنول، بتاکاریوفیلین و هومولن اشاره کرد (Thomsen et al., 2012; Mirjalili et al., 2006; Mousavi et al., 2018). ترکیب‌های فنلی با داشتن خاصیت آنتی‌میکروبی، آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی از مهم‌ترین گروه این متابولیت‌های زیستی هستند (Cheynier et al., 2013) که تجمع آنها در گیاهان در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی متعددی مانند خشکی، دمای پایین، اشعه ماورای بنفش، جراحت، کاهش تغذیه و حمله پاتوژن‌ها گزارش شده است (Cheynier et al., 2013; Michalak, 2006).

تنش خشکی یکی از مهم‌ترین بازدارنده‌های تولید گیاهان در بسیاری از مناطق خشک و نیمه‌خشک جهان به‌شمار می‌رود (Reddy et al., 2004). خشکی به‌علت عدم انطباق مقدار و پراکنش آب مورد نیاز در طول دوره رشد گیاه، در کنار محدودیت در فراهمی و جذب عناصر غذایی می‌تواند بر رشد، فنولوژی، مورفولوژی، تولید ماده خشک و متابولیت‌های ثانویه مؤثر باشد (Rad & Rad, 2013; Rad et al., 2014). لذا با مدیریت زراعی مناسب و فرآوری صحیح، می‌توان به افزایش تولید این ترکیبات مهم دست یافت. استفاده از الیستورها به‌عنوان ترکیبات پیام‌رسان کلیدی، یکی از این مدیریت‌هاست که از راه القای پاسخ‌های دفاعی موجب بیوسنتز و انباشت متابولیت‌های ثانویه می‌شوند (Esmailzadeh-Bahabadi & Sharifi, 2013). نیتریک‌اکساید (NO) به‌عنوان یک گونه فعال اکسیداتیو با کارکردهای فیزیولوژیک متنوع در گیاهان یکی از این الیستورهاست.

کاربرد سدیم نیتروپروساید (SNP) به‌عنوان یک ترکیب آزادکننده نیتریک‌اکساید (NO) نقش مهمی در رشد و نمو گیاهی از شروع جوانه‌زنی تا پیری اندام‌ها، از جمله ریخت‌زایی نوری (Besson-Bard et al., 2008)، انتقال پیام، تحریک گسترش و توسعه برگ، جوانه‌زنی بذر، جلوگیری از رشد هیپوکوتیل و رشد میانگره‌ها (Beligni et al., 1997)، القای ریشه‌های جانبی (Tewari et al., 2008)، تأخیر در پیری (Neill et al., 2003)، کاهش سمیت مس

خشک و نیمه‌خشک کشور و تغییر الگوی آب و هوایی در سال‌های اخیر وجود دارد. از طرفی با توجه به اهمیت نقش پاک‌کنندگی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در بهبود تحمل تنش خشکی و نقش NO به‌عنوان پیام‌رسان میانجی‌گر در تنش‌ها و نیز ارزش دارویی و تجاری مواد مؤثره سرخارگل در بازار جهانی (Mrozikiewicz *et al.*, 2010)، آزمایش حاضر با هدف بررسی تأثیر کاربرد برگری NO بر تحمل به خشکی گیاه دارویی سرخارگل با بررسی برخی از ویژگی‌های مورفوفیزیولوژیک و عملکرد اسانس گیاه، طراحی و اجرا شد.

مواد و روش‌ها

این آزمایش به‌منظور بررسی اثر محلول‌پاشی سدیم نیتروپرساید (SNP) به‌عنوان منبع آزاد کننده نیتریک‌اکساید (NO) روی رشد، عملکرد ماده خشک و برخی ویژگی‌های فیتوشیمیایی گیاه دارویی سرخارگل (*Echinacea purpurea* L.) در شرایط خشکی در منطقه کرج به‌صورت طرح کرت‌های خرد شده در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در مزرعه تحقیقاتی مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور کرج در سال زراعی ۹۵-۱۳۹۴، طراحی و اجرا شد. پیش از شروع آزمایش، ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک مورد نظر تعیین و اندازه‌گیری شد (جدول ۱؛ آزمایشگاه خاک مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور). از پارامترهای هواشناسی برای سال اجرای آزمایش می‌توان به متوسط بارندگی منطقه حدود ۲۳۵ میلی‌متر، کمینه دما، ۲۰- درجه سانتی‌گراد و بیشینه دما، ۳۸ درجه سانتی‌گراد اشاره کرد (ایستگاه هواشناسی دانشگاه تهران).

(Tewari *et al.*, 2008)، تعدیل جریان کلسیم خارج سلولی (Wang *et al.*, 2009) و بیش‌تنظیمی (up-regulation) سنتز متابولیت‌های ثانویه در ریشه‌های جانبی گیاهان (Wu *et al.*, 2007a) داشته است (Besson-Bard *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2009). نیتریک‌اکساید به‌عنوان یک پیام‌رسان و ترکیب زیست‌فعال گیاهی در مکانیسم‌های دفاعی گیاه و حیوانات در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی نقش دارد (Domingos *et al.*, 2014). همچنین این ترکیب در غلظت‌های بسیار پایین (میکرومولار تا میلی‌مولار)، اثرات مثبت چشمگیری بر فرآیندهای فیزیولوژیک گیاه دارد؛ بنابراین کاربرد آن به لحاظ اقتصادی مقرون به‌صرفه است.

عملکرد بهینه گیاهان دارویی به برخورداری از شرایط مطلوب آب و هوایی، خاکی و موقعیت جغرافیایی وابسته است (Guerrero-Chavez *et al.*, 2015). با توجه به دامنه‌سازی سرخارگل به شرایط مختلف آب و هوایی و خاکی (Sabra *et al.*, 2012a)، کشت گسترده این گونه دارویی مهم در سراسر جهان به‌ویژه ایران افزایش یافته است. در پژوهش‌هایی که به بررسی رفتار این گیاه دارویی با ارزش در شرایط سخت و تنش‌زای محیطی پرداخته‌اند (Sabra *et al.*, 2012b; Tang *et al.*, 2010)، کاهش عملکرد سرخارگل در شرایط شور (Sabra *et al.*, 2012a; Asadi-Sanam *et al.*, 2014) و تحمل نسبی گیاه به تنش‌های دمای پایین و غرقاب (Asadi-Sanam *et al.*, 2015a,b) و نیز یخ‌زدگی (Asadi-Sanam *et al.*, 2015c) تأیید شده است؛ با این‌وجود، اطلاعات محدودی مبنی بر پاسخ گیاه سرخارگل به تنش خشکی با توجه به شرایط

جدول ۱. برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک مزرعه آزمایش

Table 1. Some physical and chemical properties of experimental field soil

Soil texture	Field capacity (%)	Permanent Wilting Point (%)	Measured characteristics							Saturated soil pH	Sampling depth (centimeter)	
			Apparent density	Clay (%)	Silt (%)	Sand (%)	Absorbable potassium (ppm)	Absorbable phosphorus (ppm)	Total nitrogen (%)			Organic carbon (%)
Clay Silty	23	10	1.49	29	38	34	197.6	10.2	0.08	0.57	7.4	0-15
Clay Silty	23	10	1.49	29	41	31	178.6	8.7	0.08	0.68	7.2	15-30

(RWC) و فنل کل به‌ترتیب از برگ بالغ تازه و خشک اندازه‌گیری شد. از ویژگی‌های مورفولوژیک گیاه، ارتفاع بوته، تعداد برگ، تعداد شاخه جانبی و تعداد گل از چهار بوته اندازه‌گیری و ثبت شدند.

پس از جداسازی و هواخشک شدن اندام‌های گیاهی در محیط خشک و سایه و توزین ماده خشک آن، اسانس‌گیری از برگ و ساقه (مخلوط برگ و ساقه) و گل به‌طور جداگانه به‌روش تقطیر با آب و با دستگاه کلونجر به‌مدت دو ساعت با ۱۰۰ گرم نمونه در سه تکرار صورت گرفت. پس از رطوبت‌زدایی اسانس‌ها، بازده اسانس‌ها نسبت به وزن خشک تعیین گردید. سپس اسانس‌ها به دستگاه گاز کروماتوگراف (GC) مدل HP6890 و دستگاه گاز کروماتوگراف کوپل‌شده با طیف‌سنج جرمی (GC-MS) مدل HP-5973 تزریق شده و طیف‌های جرمی و کروماتوگرام‌های مربوطه به‌دست آمد. سپس با توجه به الگوی خروج آلکان‌های نرمال و شاخص‌های بازداری ترکیبات و در نهایت مقایسه آنها با شاخص‌های مرجع طیف‌های مربوط به هر جسم در الگوهای کتابخانه‌ای تفسیر و ترکیبات عمده تشکیل‌دهنده اسانس شناسایی شدند (Adams, 1995). ماده خشک شاخساره از مجموع ماده خشک برگ، ساقه و گل به صورت «گرم در بوته» و «گرم در متر مربع»، محاسبه شد.

RWC

اندازه‌گیری RWC، از آخرین برگ توسعه‌یافته گیاه با استفاده از رابطه ۲ انجام شد.

$$RWC = \frac{F_w - D_w}{S_w - D_w} \times 100 \quad (2)$$

که در آن F_w : وزن تر برگ بلافاصله بعد از نمونه‌برداری، D_w : وزن خشک برگ بعد از قرار گرفتن در آن، S_w : وزن اشباع برگ بعد از قرار گرفتن در آب مقطر.

کلروفیل برگ

محتوی کلروفیل برگ به‌روش Lichtenthaler (1987) با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل PG (Instruments T80⁺UV/VIS) در طول موج‌های ۶۶۳ و ۶۴۶ نانومتر تعیین و مقدار کلروفیل a ، b بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه شد.

پس از عملیات آماده‌سازی بستر شامل شخم پاییزه، دیسک و تسطیح زمین، ردیف‌های کاشت به حالت پشته طراحی و کرت‌هایی به ابعاد ۳×۲/۵ متر ایجاد شد و برای هر کرت پنج ردیف کاشت به فاصله ۵۰ سانتی‌متر در نظر گرفته شد. نشاهای سرخارگل در مرحله سه تا چهار برگی از گلخانه پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی کرج در نیمه اردیبهشت ماه به زمین اصلی منتقل و در فاصله ۳۰ سانتی‌متر روی ردیف‌ها نشاکاری شدند. تیمارهای آزمایشی شامل دو عامل SNP (Merck company) در چهار سطح صفر، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکرومولار و تنش خشکی در سه سطح، ۳۰ درصد (شدید)، ۶۰ درصد (متوسط) و ۹۰ درصد (شاهد) ظرفیت زراعی بود. اعمال تیمار تنش از مرحله ساقه‌دهی انجام و برای اندازه‌گیری و تعیین زمان آبیاری از دستگاه رطوبت‌سنج (TDR; Time Domain Reflectometry) مدل MCT 50 استفاده شد. از خاک هر تکرار از عمق توسعه ریشه (از سطح خاک تا عمق ۱۵ و ۳۰ سانتی‌متر) دو نمونه مجزا برداشت و پس از اختلاط نمونه‌ها، ظرفیت زراعی (Field Capacity) و پژمردگی دائم (Permanent Wilting Point) محاسبه شد (آزمایشگاه خاکشناسی مؤسسه خاک و آب کشور-کرج). برای محاسبه حجم آب مورد نیاز هر کرت از رابطه ۱ استفاده شد.

$$V = pdA (FC - PWP) / 100 \quad (1)$$

در این رابطه؛ V : حجم آبی که به هر کرت داده می‌شود، p : وزن مخصوص خاک، d : عمق توسعه‌ی مؤثر ریشه، A : مساحت هر کرت، FC : رطوبت خاک در ظرفیت زراعی و PWP : رطوبت خاک در نقطه‌ی پژمردگی دائم می‌باشند. برای کنترل حجم آب ورودی به هر کرت، از کنتور استفاده شد. در طول اعمال تنش خشکی، محلول‌پاشی SNP در غلظت‌های تعیین‌شده در سه مرحله (شروع ساقه‌دهی، ابتدای گلدهی و ۵۰ درصد گلدهی) انجام شد.

در مرحله گلدهی کامل گیاه، برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و پراکسیداز (POD)، محتوای مالون‌دی‌آلدئید (MDA)، پرولین و کلروفیل، نمونه‌گیری از برگ‌های جوان و بالغ گیاه انجام شد. محتوی نسبی آب برگ

برای تجزیه آماری داده‌ها، از نرم‌افزار SAS (نسخه ۹) (SAS Institute, 2002) استفاده شد. مقایسه میانگین تیمارها، با آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) انجام و $P < 0.05$ به‌عنوان سطح معنی‌دار بودن اختلافها در نظر گرفته شد. نمودارها، با نرم‌افزار سیگماپلات (SigmaPlot) نسخه ۱۱ رسم شدند.

نتایج و بحث

ویژگی‌های مورفولوژیک

در این آزمایش، ویژگی ارتفاع بوته تحت تأثیر معنی‌دار برهم‌کنش تنش خشکی \times SNP قرار گرفت (جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیشترین مقدار ارتفاع بوته (۷۷/۷ سانتی‌متر) مربوط به تیمار ۹۰ درصد ظرفیت زراعی (شاهد) و SNP ۲۰۰ میکرومولار بود. کمترین مقدار ارتفاع بوته (۴۲ سانتی‌متر) نیز مربوط به تنش ۳۰ درصد ظرفیت زراعی (خشکی شدید) و SNP صفر (شاهد) بود (جدول ۳). نتایج همچنین نشان داد با افزایش شدت تنش، غلظت‌های SNP مؤثر بوده، به‌طوری‌که در تنش متوسط (۶۰ درصد ظرفیت زراعی)، غلظت ۱۰۰ میکرومولار و در تنش شدید (۳۰ درصد ظرفیت زراعی)، غلظت ۲۰۰ میکرومولار غلظت‌های مناسب و مؤثر بودند (جدول ۳). در ویژگی تعداد برگ و گل در بوته، برهم‌کنش تنش خشکی و SNP در سطح یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۲). با توجه به نتایج مقایسه میانگین، تعداد برگ در تنش ۶۰ درصد ظرفیت زراعی (متوسط) و SNP صفر (شاهد) ۴۸/۹ بوده است که نسبت به تیمار رطوبت ۹۰ درصد ظرفیت زراعی (شاهد) و SNP ۲۰۰ میکرومولار حدود ۵۷ درصد کاهش داشته است (جدول ۳). بیشترین تعداد گل مربوط به سطح تنش ۹۰ درصد ظرفیت زراعی (شاهد) و SNP ۲۰۰ میکرومولار با میانگین ۲۰/۳ بوده است که این تعداد در شاهد کمترین بود و حدود ۶۲ درصد کاهش نشان داد (جدول ۳). برهم‌کنش تنش خشکی و SNP بر تعداد شاخه جانبی در سطح پنج درصد معنی‌دار شد (جدول ۲). بیشترین تعداد شاخه جانبی با میانگین ۱۴/۵، مربوط به تیمار ۹۰ درصد ظرفیت زراعی (شاهد) و SNP ۲۰۰ میکرومولار بوده است و کمترین تعداد شاخه جانبی مربوط به رطوبت ۹۰ درصد ظرفیت زراعی

پرولین

محتوی پرولین با روش Bates *et al.* (1973) در طول موج ۵۲۰ نانومتر با استفاده از منحنی استاندارد پرولین خالص تعیین و برحسب میکرومول بر گرم بافت تازه محاسبه شد.

پراکسیداسیون لیپیدهای غشا

پراکسیداسیون لیپیدهای غشا به روش Heath & Packer (1968) با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. استخراج عصاره با استفاده از تری‌کلرو استیک اسید (TCA) یک درصد انجام گردید. ماده قرمز رنگ مالون‌دی‌آلدهید-تیوباربتوریک‌اسید (MDA-TBA) تولید شده در طول موج ۵۳۲ نانومتر و جذب سایر رنگیزه‌های اختصاصی در طول موج ۶۰۰ نانومتر سنجش و غلظت مالون‌دی‌آلدهید بر حسب نانومول بر گرم بافت تازه بیان شد.

آنزیم SOD

فعالیت آنزیم SOD با استفاده از روش Giannopolitis & Ries (1977) با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۶۰ نانومتر سنجش و فعالیت آنزیمی بر حسب میکرومول بر گرم بافت تازه بیان شد.

آنزیم POD

فعالیت آنزیم POD از روش In *et al.* (2007) در طول موج ۴۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده و فعالیت آنزیمی بر حسب میکرومول بر گرم بافت تازه در دقیقه محاسبه شد.

فنل کل

فنل کل با روش Folin-Ciocalteu در طول موج ۷۶۵ نانومتر به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. استخراج عصاره فنلی با استفاده از ۴/۰ گرم از پودر الک‌شده برگ و ۱۰ میلی‌لیتر محلول متانول:آب (۳۰:۷۰) به روش Thygesen *et al.* (2007) با کمی تغییر انجام شد. در نهایت مقدار فنل کل از روی منحنی استاندارد برحسب میلی‌گرم اکی‌والان اسید گالیک در یک گرم ماده خشک بیان شد (Singleton *et al.*, 1999).

باغی (*Thymus vulgaris*) را کاهش می‌دهد. در واقع وقتی گیاه با خشکی مواجه می‌شود تعداد شاخ و برگ خود را که منابع اصلی تبخیر و تعرق در گیاه هستند، کاهش می‌دهد تا تحمل و مقاومت به تنش را افزایش دهد. دلیل کاهش ارتفاع بوته در شرایط کم‌آبی می‌تواند کاهش فشار تورژسانس سلول‌های در حال رشد و اثر بر طول سلول‌ها باشد. در این شرایط، کاهش تعداد برگ و شاخه جانبی هم احتمالاً یکی از مکانیزم‌های مقاومت به تنش یا حفظ آب می‌باشد.

ماده خشک

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که برهم‌کنش تنش خشکی و SNP بر وزن خشک برگ معنی‌دار بود؛ همچنین اثرهای ساده SNP و تنش خشکی بر این ویژگی در سطح یک درصد تأثیر معنی‌دار نشان دادند (جدول ۴).

(شاهد) و SNP صفر (شاهد) با میانگین ۵/۴ بوده است (جدول ۳).

کمیاب آب سبب کاهش فتوسنتز و تورژسانس سلول و به دنبال آن کاهش رشد و توسعه سلول به‌ویژه در ساقه و برگ می‌شود؛ در واقع، اولین نشانه کاهش رشد سلول، محدود شدن اندازه اندام‌ها مانند کاهش ارتفاع یا اندازه کوچک‌تر برگ‌ها به‌عنوان آشکارترین اثر کم‌آبی روی گیاه می‌باشد (Zahoor et al., 2017). در پژوهشی که توسط Foaadedini et al. (2015) روی تأثیر تنش کم‌آبی بر ویژگی‌های گیاه کاسنی (*Cichorium intybus*) در تاریخ‌های مختلف کاشت انجام گرفت، نتایج حکایت از آن داشت که کم‌آبیاری به‌شدت موجب کاهش ارتفاع، تعداد برگ و شاخه جانبی گردید که با نتایج این آزمایش مطابقت دارد. در پژوهشی دیگر، Babae et al. (2010) بیان کردند که تنش خشکی، ارتفاع بوته و تعداد شاخه جانبی آویشن

جدول ۲. نتایج تجزیه واریانس تأثیر تیمارهای تنش خشکی و SNP بر شاخص‌های مورفولوژیک سرخارگل در مرحله گلدهی کامل
Table 2. ANOVA for the effect of drought stress and SNP treatments on morphological traits of coneflower at full bloom stage

Source of variation	df	Mean squares			
		Plant height	Leaf number	Shoot number	Flower number
Drought stress	2	1400.5**	933.3**	43**	46.6*
Replication × Drought stress	6	16.5 ^{ns}	27.9 ^{ns}	12.1*	5.9 ^{ns}
SNP	3	290.5**	2623.2**	25.7**	100.4**
Drought × SNP	6	157.8**	645.9**	12.3*	45.7**
Error	18	30.8	20.9	4.7	9.7
CV (%)		9.6	5.8	28	24

*, **, Significant at 5% and 1% of probability levels, and Non-significant. *ns: معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و نبود تفاوت معنی‌دار. **ns: سدیم نیتروپروساید.

SNP: Sodium nitroprusside.

جدول ۳. مقایسه میانگین داده‌های مورفولوژیک سرخارگل تحت تیمارهای تنش خشکی و SNP

Table 3. Mean comparisons of morphological traits of coneflower under drought stress and SNP treatments

Fc (%)	SNP (μM)	Measured properties			
		Plant height (centimeter)	Leaf number	Shoot number	Flower number
90	0	59.9±1.01	62.6±0.58	5.4±0.21	7.7±0.73
	100	65.1±0.07	75.9±6.02	7.9±1.36	14.1±1.89
	200	77.7±3.19	113.5±4.11	14.5±3.64	20.3±2.41
	400	73.1±3.31	103.4±2.06	11.2±2.17	16.4±1.21
60	0	46.8±3.71	48.9±1.56	6.1±0.76	7.9±1.41
	100	71.9±2.23	101.1±1.56	7.6±1.50	18.4±3.71
	200	56.3±4.46	79.5±1.65	7.5±1.03	10.2±1.09
	400	51.1±2.03	72.8±1.53	6.1±0.81	9.1±1.24
30	0	42.1±2.52	53.6±2.66	5.6±0.58	7.9±0.10
	100	46.6±2.27	65.7±2.37	5.7±0.57	9.4±0.74
	200	51.9±1.88	93.4±2.45	7.2±0.84	16.3±2.08
	400	49.1±5.37	75.8±0.78	6.5±0.64	10.5±0.43
LSD		9.1	8.03	4.1	5.1

Values are mean of three replicates ± SE.

مقادیر، میانگین سه تکرار ± SE (خطای معیار) است.

FC: Field capacity and SNP: Sodium nitroprusside.

FC: ظرفیت زراعی و SNP: سدیم نیتروپروساید.

جدول ۴. نتایج تجزیه واریانس تأثیر تیمارهای تنش خشکی و SNP بر داده‌های وزن خشک سرخارگل

Table 4. ANOVA for the effect of drought stress and SNP treatments on coneflower dry matter

Source of variation	df	Mean squares					
		Leaf dry matter	Stem dry matter	Flower dry matter	Shoot dry matter	Leaf essential oil yield	Flower essential oil yield
Drought stress	2	643.2**	571.3**	153.9**	3493.4**	0.003**	0.003*
Replication × Drought stress	6	35.1 ^{ns}	8.7 ^{ns}	8.6 ^{ns}	53.3 ^{ns}	0.0002**	0.0009 ^{ns}
SNP	3	193.5**	146**	248.6**	1684.6**	0.011**	0.033**
Drought × SNP	6	70.2**	105.7**	111.3**	820.1**	0.0005**	0.003**
Error	18	35.9	14.4	13.3	87.6	0.00003	0.7000
CV (%)		16.4	20.4	18.3	12.4	4.6	9.6

*, **, Significant at 5% and 1% of probability levels, and Non-significant. ns: معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و نبود تفاوت معنی‌دار. SNP: سدیم نیتروپروساید.

خشکی و SNP بر وزن خشک گل نیز در سطح یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۴). بیشترین وزن خشک گل با میانگین ۳۳/۵ گرم در بوته و ۲۳۴/۳ گرم در متر مربع متعلق به SNP ۱۰۰ میکرومولار و تنش خشکی متوسط و کمترین وزن خشک گل با میانگین ۱۱/۴ گرم در بوته و ۷۸ گرم در متر مربع مربوط به تنش شدید و SNP شاهد بود (جدول ۶).

با توجه به نتایج، برهم‌کنش تنش خشکی و SNP بر وزن خشک شاخساره در سطح یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۴). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بیشترین وزن خشک شاخساره مربوط به سطح تنش ۹۰ درصد ظرفیت زراعی (شاهد) و SNP ۲۰۰ میکرومولار با میانگین ۸۰/۳ گرم در بوته و ۸۵۱/۹ گرم در مترمربع بوده است (جدول ۶). کمترین مقدار آن در شرایط تنش ۳۰ درصد ظرفیت زراعی و SNP شاهد، ۴۵/۳ گرم در بوته و ۳۱۷/۳ گرم در مترمربع به‌دست آمد که حدود ۴۳ درصد کاهش نشان داد (جدول ۶). نتایج همبستگی ساده وزن خشک شاخساره با برخی ویژگی‌های اندازه‌گیری شده (جدول ۹) نشان داد که این صفت با صفات وزن خشک گل ($r=0.187$)، RWC و کلروفیل کل همبستگی مثبت و معنی‌داری دارد.

با توجه به نتایج در تنش خشکی ۳۰ درصد ظرفیت زراعی، کمترین مقدار وزن خشک دیده می‌شود که این نتیجه با نتایج (2006) Pirzad *et al.* در گیاه بابونه آلمانی (*Matricaria chamomilla*) و (2012) Daneshian & Rahmani در گیاه همیشه بهار مطابقت داشت.

بر اساس نتایج مقایسه میانگین، بیشترین مقدار وزن خشک برگ در تیمار رطوبت ۹۰ درصد ظرفیت زراعی (شاهد) ۴۴ گرم در بوته و ۳۰۸/۱ گرم در مترمربع بود که این مقادیر حدود ۳۳ درصد در تیمار ۳۰ درصد ظرفیت زراعی (تنش شدید)، کاهش داشت (جدول ۵). در تیمار SNP هم، بیشترین مقدار وزن خشک برگ مربوط به تیمار ۲۰۰ میکرومولار با میانگین ۴۲/۲ گرم در بوته و ۲۹۵/۶ گرم در مترمربع بود (جدول ۵).

جدول ۵. مقایسه میانگین میزان وزن خشک برگ

سرخارگل در سطوح مختلف تنش خشکی و SNP

Table 5. Mean comparison results of the effect of different levels of drought stress and SNP on coneflower leaf dry matter

	Leaf dry matter (g/plant)	Leaf dry matter (g/m ²)
Fc (%)		
90	44 a	308.1 a
60	36.6 b	256.1 b
30	29.4 b	205.6 b
SNP (μM)		
0	30.9 b	216.2 b
100	37 a	258.9 a
200	42.2 a	295.6 a
400	36 ab	255.7 ab

مقادیر، میانگین سه تکرار است. FC: ظرفیت زراعی و SNP: سدیم نیتروپروساید. Values are mean of three replicates.

FC: Field capacity and SNP: Sodium nitroprusside.

بر اساس نتایج جدول تجزیه واریانس، برهم‌کنش تنش خشکی و SNP بر وزن خشک ساقه در سطح یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۴). بر پایه نتایج مقایسه میانگین، سطح تنش ۹۰ درصد ظرفیت زراعی (شاهد) و SNP ۲۰۰ میکرومولار با میانگین ۳۶ گرم در بوته و ۲۵۲ گرم در متر مربع، بیشترین وزن خشک ساقه را نشان دادند (جدول ۶). برهم‌کنش تنش

جدول ۶. مقایسه میانگین داده‌های وزن خشک گل، ساقه و شاخساره سرخارگل تحت تیمارهای تنش خشکی و SNP

Table 6. Mean comparisons for the results of the effect of drought stress and SNP treatments on flower, stem and shoot dry matter of coneflower

Fc (%)	SNP (μM)	Measured properties					
		Stem dry matter (g/plant)	Stem dry matter (g/m ²)	Flower dry matter (g/plant)	Flower dry matter (g/m ²)	Shoot dry matter (g/plant)	Shoot dry matter (g/m ²)
90	0	17.1±3.60	119.9±25.2	11.4±1.07	79.8±7.48	64.5±3.05	451.3±21.3
	100	22.4±1.13	157±7.9	17±2.32	118.8±16.2	80.3±6.16	562.1±43.1
	200	36±3.70	252±25.9	31.5±4.68	220.5±32.8	121.7±5.32	851.9±37.2
	400	26.6±1.30	186.2±9.1	25.2±2.67	176.6±18.7	96.9±9.90	678.1±69.3
60	0	12.8±2.99	89.8±20.9	14.6±0.42	102±2.92	59.4±8.87	416±62.1
	100	29.2±3.15	204.2±22	33.5±2.28	234.3±16	106.4±4.71	744.8±33
	200	16.9±0.26	118.1±1.86	23.7±0.78	166.1±5.5	77.3±2.46	541.1±17.2
	400	15.4±1.70	107.6±11.9	18.9±1.10	132.5±7.35	68.2±3.66	477.2±25.6
30	0	9.5±0.42	66.5±2.91	11.1±0.29	78±2.03	45.3±1.32	317.3±9.24
	100	11.8±0.62	82.6±4.37	15.3±0.83	107.1±5.83	53.4±1	373.8±7.01
	200	13.5±0.23	94.3±1.63	18.1±1.03	127±7.25	67.4±2.41	471.8±16.8
	400	12.2±0.10	85.4±0.7	19±1.98	133±13.9	61.9±3.73	4333.3±26.1
LSD		6.2	43.1	6.2	43.02	14.8	10.4

Values are mean of three replicates.

مقادیر، میانگین سه تکرار است.

FC: Field capacity and SNP: Sodium nitroprusside.

FC: ظرفیت زراعی و SNP: سدیم نیتروپروساید.

بازده اسانس

جدول تجزیه واریانس مربوط به بازده اسانس برگ، اثر معنی‌دار برهم‌کنش تنش خشکی و SNP در سطح یک درصد را نشان داد (جدول ۴). نتایج نشان داد که با افزایش سطح تنش خشکی و همچنین سطوح SNP تا ۲۰۰ میکرومولار، بازده اسانس برگ افزایش داشت؛ به طوری که بیشترین مقدار بازده اسانس برگ در تنش خشکی ۳۰ درصد ظرفیت زراعی (تنش شدید) و SNP ۲۰۰ میکرومولار دیده شد که نسبت به کمترین مقدار آن، ۱۳۶ درصد افزایش داشته است (شکل ۱). بر اساس نتایج تجزیه واریانس، برهم‌کنش تنش خشکی و SNP بر بازده اسانس گل در سطح پنج درصد معنی‌دار شد (جدول ۴). با افزایش تنش خشکی و سطوح SNP، بازده اسانس گل نیز افزایش نشان داد. بیشترین مقدار بازده اسانس گل در تنش خشکی ۳۰ درصد ظرفیت زراعی (تنش شدید) و SNP ۴۰۰ میکرومولار با میانگین ۰/۴ اندازه‌گیری شد که نسبت به کمترین مقدار آن، ۱۳۶ درصد افزایش داشته است (شکل ۲).

در این پژوهش، اسپاتونول (Spathulenol) با ۶/۸ درصد در بین ۱۱ ترکیب شناسایی شده از اسانس گل و جرماکرن-دی (germacrene D) با ۱۰/۲ درصد در بین ۱۵ ترکیب شناسایی شده از اسانس برگ، بیشترین مقدار را به خود اختصاص دادند. ترکیبات شناسایی شده در

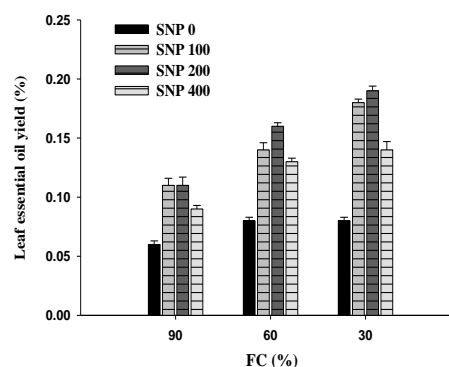
در آزمایش مشابه روی سرخارگل، آبیاری پس از ۲۵، ۵۰ و ۷۵ درصد تخلیه آب قابل‌دسترس خاک مورد بررسی قرار گرفت. در نتایج این مطالعه، دست‌یابی به بیشترین عملکرد اندام هوایی، در آبیاری پس از ۵۰ درصد تخلیه آب قابل‌دسترس گزارش شد (Jalil et al., 2018). در بررسی سطوح مختلف تنش خشکی (۷۵، ۵۰ و ۲۵ درصد ظرفیت زراعی) بر گیاهان اسفرزه (*Plantago psyllium*)، بومادران (*Achillea millefolium*)، مریم‌گلی (*Salvia officinalis*)، همیشه‌بهار و بابونه آلمانی، Lebaschy & Sharifi (2004) گزارش کردند که با تشدید تنش خشکی (۲۵ درصد ظرفیت زراعی)، وزن خشک اندام‌های هوایی در تمام گیاهان مورد مطالعه کاهش یافت. در واقع گیاه در هنگام تنش، سطح برگ و تعداد اندام‌های هوایی خود را کاهش داده و با کاهش تولید مواد فتوسنتزی و انتقال مواد به سمت اندام زایشی، در نهایت موجب کاهش ماده خشک و عملکرد می‌شود. همچنین بر اساس نتایج به‌دست آمده، غلظت SNP مؤثر بر وزن خشک برگ و ساقه در مقایسه با وزن خشک گل متفاوت بود، به طوری که غلظت ۴۰۰ میلی‌مولار، مناسب برای افزایش وزن خشک گل و غلظت ۲۰۰ میکرومولار، مناسب برای افزایش وزن خشک برگ و ساقه مشاهده شد.

در مورد عملکرد بیوشیمیایی گیاهان دارویی در تنش خشکی، گزارش‌های متفاوتی وجود دارد. در بررسی بازده اسانس، در مطالعه‌ای روی آویشن دنیایی (*Thymus daenensis*) مشخص شد که تنش خشکی سبب افزایش بازده اسانس گردید (Bahreininejad et al., 2013). در بررسی اثر تنش خشکی بر زیره سیاه ایرانی (*Bunium persicum*) با اعمال تنش در دو مرحله پس از ساقه‌دهی و گلدهی، بازده اسانس با افزایش تنش خشکی افزایش یافت (Saeidnejad et al., 2013). بررسی Abbaszade et al. (2007) روی گیاه بادرنجیویه (*Melissa officinalis*) نشان داد تنش خشکی شدید موجب کاهش اسانس می‌گردد ولی تنش خشکی ملایم، مقدار اسانس را افزایش می‌دهد هرچند که ممکن است در این شرایط عملکرد برخی از اجزای اسانس (Leicach et al., 2010) کاهش یابد. ترکیب SNP در شرایط تنش هم به‌عنوان عامل پیام‌رسان و هم به‌عنوان تنظیم‌کننده رشد، سبب فعال‌شدن سیستم دفاعی گیاه و تحریک تولید متابولیت‌های ثانویه از جمله روغن‌های اسانسی می‌شود. تأثیر متفاوت جاسمون‌ها به‌عنوان دیگر تنظیم‌کننده‌های رشد بر تعداد و نوع ترکیب‌های ثانویه گیاهان دارویی نیز در گزارش Goyal & Ramawat (2008) آمده است.

ویژگی‌های فیزیولوژی - بیوشیمیایی

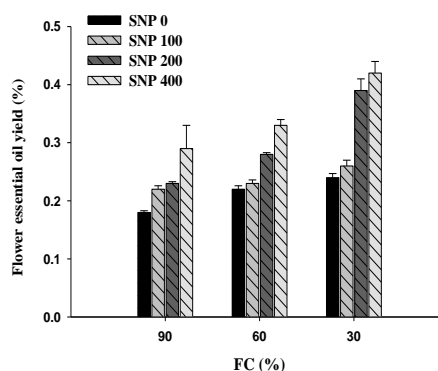
برهم‌کنش SNP و تنش خشکی بر RWC برگ در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۷). بیشترین مقدار RWC با میانگین ۷۸/۹ درصد متعلق به رطوبت ۹۰ درصد ظرفیت زراعی و تیمار SNP ۲۰۰ میکرومولار بود. نسبت به این مقدار، کمترین مقدار آن در تیمار ۳۰ درصد ظرفیت زراعی و عدم استفاده از SNP بود که حدود ۲۶ درصد کاهش داشت (جدول ۸). کاهش رشد و فعالیت ریشه و افزایش مقدار تبخیر و تعرق از جامعه گیاهی از عوامل دخیل در کاهش RWC شناخته شده‌اند (Costa-Franca et al., 2000). کاهش محتوای رطوبت نسبی برگ بر اثر تنش خشکی، دارای همبستگی مثبت و بالایی با محتوای رطوبتی خاک است (Nautiyal et al., 2002). در این

گل‌ها، شامل مونوترپن‌های اکسیژنه (۱/۸ درصد)، سزکویی‌ترین‌های هیدروکربنه (۱۳/۴ درصد) و سزکویی‌ترین‌های اکسیژنه (۹/۴ درصد) بودند. ترکیبات شناسایی‌شده در برگ‌ها، شامل مونوترپن‌های اکسیژنه (۰/۹۶ درصد)، سزکویی‌ترین‌های هیدروکربنه (۳۲/۵ درصد) و سزکویی‌ترین‌های اکسیژنه (۱۹/۳ درصد) بودند.



شکل ۱. برهم‌کنش تنش خشکی و SNP بر بازده اسانس برگ در مرحله گلدهی کامل سرخارگل. مقادیر، میانگین سه تکرار \pm SE (خطای معیار) است؛ مقدار LSD ($P < 0.05$) برای برهم‌کنش تنش خشکی \times SNP: ۰/۰۱۳. SNP: سدیم نیتروپروساید؛ FC: ظرفیت زراعی.

Figure 1. Interaction of drought stress and SNP on Leaf essential oil yield at full bloom stage of coneflower. Values are mean of three replicates \pm SE. LSD value ($P < 0.05$) for interaction of drought stress \times SNP: 0.013. SNP: Sodium nitroprusside and FC: Field capacity.



شکل ۲. برهم‌کنش تنش خشکی و SNP بر بازده اسانس گل در مرحله گلدهی کامل سرخارگل. مقادیر، میانگین سه تکرار \pm SE (خطای معیار) است؛ مقدار LSD ($P < 0.05$) برای برهم‌کنش تنش خشکی \times SNP: ۰/۰۴۵. SNP: سدیم نیتروپروساید؛ FC: ظرفیت زراعی.

Figure 1. Interaction of drought stress and SNP on flower essential oil yield at full bloom stage of coneflower. Values are mean of three replicates \pm SE. LSD value ($P < 0.05$) for interaction of drought stress \times SNP: 0.045. SNP: Sodium nitroprusside and FC: Field capacity.

میلی گرم بر گرم وزن تر مشاهده گردید (شکل ۳ و ۴). خشکی با کاهش سطح برگ، موجب تجمع کلروفیل در سطح کمتر برگ‌ها و بنابراین افزایش غلظت می-شود. Movahedi Dehnavi *et al.* (2004) در گیاه گلرنگ و Bahreininejad *et al.* (2013) در گیاه آویشن دنیایی، کاهش محتوای کلروفیل در تنش خشکی را تأیید کردند. کاهش محتوای کلروفیل a، b و نسبت کلروفیل a به b در گیاه شوید (*Anethum graveolens*) نیز تحت تنش خشکی گزارش شد (Setayesh-Mehr & Ganjeali, 2013). غلظت‌های زیاد SNP، شاخص کلروفیل را افزایش داده است. غلظت ۰/۲ میلی‌مولار SNP در گیاهچه گندم (*Triticum aestivum*) موجب افزایش مقدار کلروفیل در مطالعه Li *et al.* (2010) شد.

پژوهش تنش خشکی موجب کاهش محتوای نسبی آب شد؛ با کاهش آب در خاک، گیاه مقدار آب پیکره خود را از طریق افزایش مواد اسمزی درون بافت‌ها به حداقل می‌رساند تا آب با نیروی بیشتری وارد گیاه شود؛ همین امر سبب کاهش آب درون بافت گیاه در شرایط خشکی نسبت به شرایط بدون تنش می‌گردد. برهم‌کنش SNP و تنش خشکی بر محتوای کلروفیل a، b و کلروفیل کل معنی‌دار نبود؛ در بررسی اثرات ساده، اثر ساده تنش خشکی هم بر محتوای کلروفیل معنی‌دار نبود ولی اثر ساده SNP روی کلروفیل a و کلروفیل کل در سطح یک درصد معنی‌دار شد و بر کلروفیل b معنی‌دار نبود (جدول ۷). بیشترین مقدار کلروفیل a و کلروفیل کل در هنگام استفاده از SNP ۴۰۰ میکرومولار به ترتیب با میانگین ۱/۳۰ و ۳/۳۵

جدول ۷. نتایج تجزیه واریانس تأثیر تیمارهای تنش خشکی و SNP بر ویژگی‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاه سرخارگل

Table 7. ANOVA for the effect of drought stress and SNP treatments on physiological and biochemical traits of coneflower plant

Source of variation	df	Mean squares								
		RWC	Chlorophyll a	Chlorophyll b	Total chlorophyll	SOD	POD	MDA	Proline	Total phenol
Drought stress	2	60.5**	0.088 ^{ns}	0.127 ^{ns}	1.73 ^{ns}	415.9**	1.15**	43.9**	31.1**	2024.2**
Replication × Drought stress	6	0.422 ^{ns}	0.046 ^{ns}	0.031 ^{ns}	0.328*	1.98 ^{ns}	0.003 ^{ns}	0.57 ^{ns}	0.411 ^{ns}	14.3 ^{ns}
SNP	3	425**	0.601**	0.022 ^{ns}	3.37**	750.3**	1.62**	79.3**	347.7**	2823.5**
Drought × SNP	6	2.74**	0.043 ^{ns}	0.009 ^{ns}	0.133 ^{ns}	28.2**	0.02**	0.4 ^{ns}	4.98**	72.5**
Error	18	0.63	0.018	0.029	0.178	2.2	0.004	1.08	0.572	17.3
CV (%)		1.2	13.5	6.5	15.8	1.5	6.8	5.3	10.1	4.3

*, **, ns: معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و نبود تفاوت معنی‌دار.

SNP: سدیم نیتروپروساید، RWC: محتوای نسبی آب، SOD: آنزیم سوپراکسیددیسموتاز، POD: آنزیم پراکسیداز، MDA: مالون‌دی‌آلدهید.

*, **, ns: Significant at 5% and 1% of probability levels, and Non-significant respectively.

SNP: sodium nitroprusside, RWC: Relative Water Content, SOD: Superoxide Dismutase, POD: peroxidase, MDA: Malondialdehyde.

جدول ۸. مقایسه میانگین اثر تیمارهای تنش خشکی و SNP بر ویژگی‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاه سرخارگل

Table 8. Mean comparison of the effect of drought stress and SNP treatments on physiological and biochemical traits of coneflower plant

Fc (%)	SNP (μM)	Measured properties				
		RWC (%)	SOD (μmol/g fr wt)	POD (μmol/g fr wt. min)	Proline (μmol/g fr wt)	Total phenol (mg GAE/g dry matter)
90	0	62.4±0.73	83.4±0.67	0.48±0.05	0.66±0.06	77.4±1.39
	100	66.9±0.28	93.3±0.58	0.73±0.03	2.56±0.04	92.2±0.93
	200	78.9±0.39	98.3±0.65	1.08±0.04	9.87±0.12	117.6±0.88
	400	73.2±0.23	103.5±0.95	1.32±0.04	11.2±0.74	103.1±1.46
60	0	60.7±0.50	92.1±1.04	0.74±0.03	0.98±0.03	91.3±1.19
	100	63.7±0.23	98.8±0.20	1.07±0.02	3.61±0.15	100.3±1.89
	200	75.1±0.23	101.9±1.15	1.31±0.04	10.8±0.57	127.4±0.81
	400	72.9±0.53	108.9±0.89	1.89±0.03	13.1±0.33	114.4±0.63
30	0	58.4±0.62	71.4±1.60	0.24±0.02	1.37±0.10	52.9±5.93
	100	62.4±0.29	89.4±0.25	0.37±0.009	4.07±0.49	84.7±0.76
	200	72.3±0.52	94.4±0.33	0.76±0.06	14.8±0.46	102.8±4.33
	400	70.4±0.32	99.3±0.57	1.17±0.01	16.7±0.81	89.6±0.07
LSD		1.3	2.4	0.10	1.2	6.8

Values are mean of three replicates ± SE.

مقادیر، میانگین سه تکرار ± SE (خطای معیار) است.

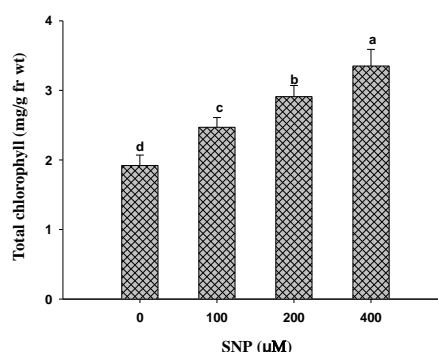
FC: Field capacity and SNP: sodium nitroprusside.

FC: ظرفیت زراعی و SNP: سدیم نیتروپروساید.

برهم‌کنش SNP و تنش خشکی بر فعالیت آنزیم‌های SOD و POD در سطح یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۷). نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بیشترین فعالیت آنزیم‌ها مربوط به تنش ۶۰ درصد ظرفیت زراعی (متوسط) و SNP ۴۰۰ میکرومولار به‌ترتیب با میانگین ۱۰۸/۹ و ۱/۹ میکرومول بر گرم بافت تازه در دقیقه بود. کمترین فعالیت آنزیم‌ها، مربوط به تنش خشکی ۳۰ درصد ظرفیت زراعی (شدید) و تیمار شاهد SNP بود (جدول ۸). در مجموع نتایج نشان داد که با افزایش تنش تا حد متوسط و محلول‌پاشی غلظت بالای SNP، فعالیت آنزیم‌های SOD و POD افزایش پیدا می‌کند. اما با زیاد شدن مقدار تنش و عدم استفاده از SNP آنزیم‌ها فعالیت کمتری نشان دادند (جدول ۸). محلول‌پاشی ترکیب SNP به‌عنوان تنظیم‌کننده رشد با القای تنش کاذب سبب افزایش محتوای پراکسید هیدروژن به‌عنوان یکی از گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) می‌شود. ROSها عوامل زیان‌بخشی هستند که موجب پراکسیداسیون تدریجی ساختارهای لیپیدی، غیرفعال‌سازی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و خسارت اکسیداتیو می‌گردند (Blokina *et al.*, 2003). آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند SOD و POD نقش مهمی در کاهش خسارت ROSها به ساختار لیپیدی غشای گیاهان تحت تنش‌های مختلف غیرزیستی دارند (Hashempour *et al.*, 2014). در شرایط خشکی تا حد ۶۰ درصد ظرفیت زراعی، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان افزایش یافته و محلول‌پاشی SNP در بیشترین غلظت استفاده‌شده با القای تنش کاذب توانست موجب پالایش ROSها و افزایش فعالیت سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی شود. پیرامون این پژوهش و در تنش مشابه، Zheng *et al.* (2009) نیز در پژوهشی تأثیر SNP خارجی در بهبود جوانه‌زنی بذر گندم در تنش شوری شدید (۳۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم) را مورد بررسی قرار دادند. نتایج پژوهش آنها نشان داد که SNP فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان را افزایش داده است.

نتایج تجزیه واریانس این آزمایش تأثیر معنی‌دار اثر ساده SNP (در سطح یک درصد) و اثر ساده تنش خشکی (در سطح یک درصد) بر MDA به‌عنوان محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدی غشا در سرخارگل را نشان

در گزارش Maciejewska & Krupa (2002) افزایش مقدار کلروفیل با تنظیم‌کننده رشد متیل‌جاسمونات گزارش شده است. در واقع SNP مانع فعالیت ACC سنتتاز شده و از تشکیل اتیلن و به‌دنبال آن از کاهش کلروفیل جلوگیری می‌کند (Li *et al.*, 2010). تنظیم‌کننده‌های رشد با فعال کردن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در کلروپلاست، از تخریب کلروفیل و کاهش فتوسنتز جلوگیری کرده و بدین ترتیب موجب بهبود رشد و فعالیت گیاه می‌شوند (Popova *et al.*, 2003).

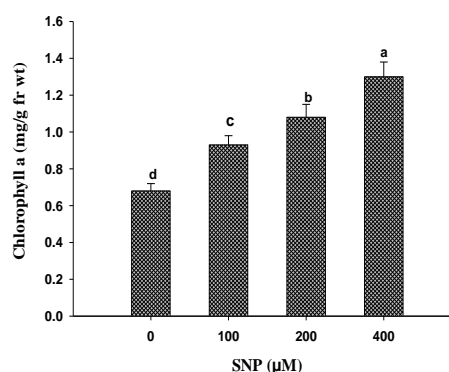


شکل ۳. تأثیر تیمار SNP بر محتوای کلروفیل کل در مرحله گلدهی کامل سرخارگل.

مقادیر، میانگین سه تکرار \pm SE (خطای معیار) است. SNP: سدیم نیتروپروساید.

Figure 3. Effect of SNP treatment on total chlorophyll content at full bloom stage of coneflower.

Values are mean of three replicates \pm SE. SNP: Sodium nitroprusside.



شکل ۴. تأثیر تیمار SNP بر محتوای کلروفیل a در مرحله گلدهی کامل سرخارگل.

مقادیر، میانگین سه تکرار \pm SE (خطای معیار) است. SNP: سدیم نیتروپروساید.

Figure 4. Effect of SNP treatment on chlorophyll a content at full bloom stage of coneflower.

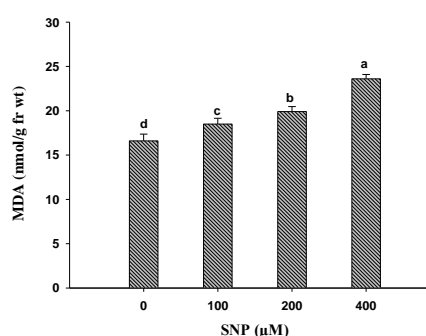
Values are mean of three replicates \pm SE. SNP: Sodium nitroprusside.

برهم‌کنش SNP و تنش خشکی بر محتوای پرولین در سطح یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۷). بیشترین مقدار پرولین با میانگین ۱۶/۷ میکرومول بر گرم وزن تر متعلق به رطوبت ۳۰ درصد ظرفیت زراعی و تیمار SNP ۴۰۰ میکرومولار بود؛ درحالی‌که کمترین مقدار آن در تیمار ۹۰ درصد ظرفیت زراعی با میانگین ۰/۶۶ میکرومول بر گرم وزن تر مشاهده گردید (جدول ۸).

پژوهش‌های بسیاری در گیاهان مختلف مبنی بر افزایش اسید آمینه پرولین و MDA در شرایط خشکی وجود دارد. در سرخارگل برای مقابله با تنش کم‌آبیاری با سطوح ۲۵، ۵۰ و ۷۵ درصد تخلیه آب قابل‌دسترس خاک، محتوای پرولین در برگ افزایش پیدا کرد (Jalil Sheshbahrhe *et al.*, 2018). افزایش MDA با افزایش تنش خشکی در مطالعه Gharibi *et al.* (2012) بر گیاه بومادران بیابانی (*Achillea tenuifoli*) مطابق با نتایج آزمایش مشاهده شد. در این آزمایش، SNP موجب افزایش محتوای MDA شده است که این افزایش می‌تواند احتمالاً به این دلیل باشد که این ترکیب در غلظت‌های بالا به مانند یک رادیکال آزاد عمل کرده و موجب آسیب به لیپیدهای غشا و در نتیجه افزایش محتوای لیپید پراکسیداسیون شده است. با این حال، بر خلاف نتایج این آزمایش و در شرایط تنش مشابه، استفاده از SNP خارجی روی گیاهچه‌های سرخارگل و گندم در بستر شور بررسی شد که SNP توانست پراکسیده شدن لیپیدهای غشا را کاهش داده و سبب تأخیر در تجزیه پروتئین‌ها شود (Asadi-Sanam *et al.*, 2014; Zheng *et al.*, 2009). افزایش تنش خشکی موجب افزایش غلظت پرولین در آویشن دناپی (Bahreinnejad *et al.*, 2013) و بادرنجبویه (Abbaszadeh *et al.*, 2007) شده است. همچنین غلظت ۰/۲ میلی‌مولار SNP در گیاهچه گندم موجب کاهش پرولین تحت تنش خشکی در مطالعه Lei *et al.* (2007) شد.

بر اساس نتایج تجزیه واریانس، برهم‌کنش SNP و تنش خشکی بر محتوای فنل کل در سطح یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۷). نتایج مقایسه میانگین در مورد محتوای فنل کل، بیشترین میزان آن را مربوط به تنش متوسط (۶۰ درصد ظرفیت زراعی) و SNP ۲۰۰

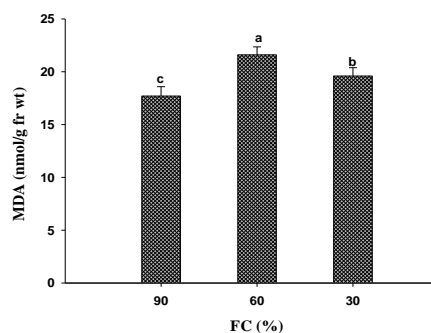
داد (جدول ۷). نتایج نشان داد که بیشترین محتوای MDA (۲۳/۶ نانومول بر گرم بافت تازه) مربوط به تیمار ۴۰۰ میکرومولار SNP بود؛ در حالی‌که کمترین محتوای MDA (۱۶/۶ نانومول بر گرم بافت تازه) مربوط به عدم استفاده از SNP (شاهد) بود (شکل ۵). در تنش خشکی هم، با افزایش تنش تا سطح ۶۰ درصد ظرفیت زراعی، مقدار MDA افزایش یافت و به بیشترین مقدار خود با میانگین ۲۱/۶ نانومول بر گرم بافت تازه رسید (شکل ۶). کمترین مقدار MDA در تیمار ۹۰ درصد ظرفیت زراعی (عدم تنش خشکی) با ۱۸ درصد کاهش نسبت به بیشترین مقدار تنش به‌دست آمد (شکل ۶).



شکل ۵. تأثیر تیمار SNP بر محتوای MDA در مرحله گلدهی کامل سرخارگل.

مقادیر، میانگین سه تکرار \pm SE (خطای معیار) است. SNP: سدیم نیتروپروساید.

Figure 5. Effect of SNP treatment on MDA content at full bloom stage of coneflower. Values are mean of three replicates \pm SE. SNP: Sodium nitroprusside.



شکل ۶. تأثیر تیمار خشکی بر محتوای MDA در مرحله گلدهی کامل سرخارگل.

مقادیر، میانگین سه تکرار \pm SE (خطای معیار) است. FC: ظرفیت زراعی.

Figure 6. Effect of drought stress treatment on MDA content at full bloom stage of coneflower. Values are mean of three replicates \pm SE. SNP: Sodium nitroprusside.

فنل‌ها دارند؛ این ترکیبات انتشار وسیعی در گیاهان دارند و فعالیت بیولوژیک متنوع این ترکیبات از جمله اثر آنتی‌اکسیدانی، آنتی‌میکروبی، ضدالتهابی و محرک سیستم ایمنی (Dai & Mumper, 2010) آنها در بسیاری از گیاهان از جمله سرخارگل (Gray *et al.*, 2003) گزارش شده است (Dai & Mumper, 2010). در این پژوهش، مقدار فنل کل در تنش متوسط و در بالاترین غلظت به کار رفته SNP به بیشترین مقدار خود رسید که این می‌تواند به نقش محافظتی فنل‌ها و دو نقش پیام‌رسان و تنظیم‌کننده رشد SNP در مقابل خسارت‌های اکسیداتیو مربوط باشد. در این راستا، پژوهش‌گران به نقش تنظیم‌کننده‌های رشدی نظیر هورمون‌های سیتوکینین و جیبرلین به‌عنوان پیش‌ماده بعضی آنزیم‌های بیوسنتز فنل‌ها اشاره دارند (Min *et al.*, 2010; Kishore *et al.*, 2009). اغلب تنش‌ها موجب افزایش بیان آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیا لیاز (PAL)، مهم‌ترین آنزیم بیوسنتزکننده این ترکیبات در مسیر شیکمیک اسید و در نتیجه افزایش بیوسنتز ترکیبات فنلی می‌شوند (Cheynier *et al.*, 2013).

نتیجه‌گیری کلی

به‌طور کلی نتایج این پژوهش نشان داد که محلول‌پاشی با ترکیب SNP (تولیدکننده NO در گیاه) به‌عنوان تنظیم‌کننده رشد و پیام‌رسان قوی با اثرات فیزیولوژیک برجسته بر متابولیسم و ساختار گیاهان، می‌تواند در غلظت‌های بالاتر مصرف، سبب بهبود ویژگی‌های ریخت‌شناسی، ماده خشک و ترکیبات فنلی و اسانس سرخارگل در شرایط تنش شود و با پالایش ROSها و افزایش فعالیت سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی، تحمل به خشکی را افزایش دهد. با توجه به مصرف پایین این ترکیب، ارزان بودن و نداشتن تأثیر سوء زیست‌محیطی، می‌توان کاربرد آن را برای رسیدن به عملکرد و ماده مؤثره بیشتر در گیاه سرخارگل پیشنهاد نمود. همچنین می‌توان گفت احتمالاً سطح تنش متوسط به کار رفته در این آزمایش، آستانه تحمل گیاه باشد که گیاه توانسته بیشترین قدرت پاسخ‌گویی، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و تولید پرولین برای حفظ تنظیم اسمزی را داشته باشد. در مجموع، می‌توان گفت که کاربرد SNP

میکرومولار با میانگین ۱۲۷/۴ میلی‌گرم گالیک‌اسید در گرم ماده خشک نشان داد، درحالی‌که کمترین مقدار آن ۵۲/۹ میلی‌گرم گالیک‌اسید در گرم ماده خشک، مربوط به تنش خشکی شدید و سطح صفر SNP (شاهد) بود که نسبت به بیشترین مقدار آن ۵۸ درصد کاهش داشت (جدول ۸). در ویژگی‌های بیوشیمیایی مورد مطالعه در این آزمایش، تنها برای فنل کل، غلظت ۲۰۰ میکرومولار مناسب و مؤثرترین بود درحالی‌که در دو آنزیم اندازه‌گیری شده و محتوای MDA و پرولین برای کاهش خسارت غشا، بالاترین غلظت SNP محلول‌پاشی شده (۴۰۰ میکرومولار) تأثیرگذار بود. افزایش میزان فنل کل در گیاه سرخارگل در مقابله با تنش کم‌آبایی (عدم مصرف، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ درصد ظرفیت زراعی) و تیمار اسیدهیومیک در مطالعه‌ای گزارش شد (Alizade *et al.*, 2017). نتایج همبستگی ساده فنل کل با ویژگی‌های فیزیولوژیک و فیتوشیمیایی اندازه‌گیری شده (جدول ۹) نشان داد که محتوای فنل کل با صفات وزن خشک گل، RWC ($r=0/83$)، فعالیت آنزیم POD (۰/۷۶)، محتوای پرولین و کلروفیل کل همبستگی مثبت و معنی‌داری دارد.

جدول ۹. ضرایب همبستگی (پیرسون) مقدار وزن خشک شاخساره و فنل کل با برخی صفات بیوشیمیایی سرخارگل تحت تیمارهای تنش خشکی و SNP

Table 9. Correlation coefficients (r) between shoot dry matter and total phenol with some of biochemical properties of coneflower plant under drought stress and SNP treatments

Variable	r	
	Shoot dry matter	Total phenol
Flower dry matter	0.87**	0.62**
RWC	0.57**	0.83**
Total chlorophyll	0.55**	0.56**
SOD	0.49 ^{ns}	0.86 ^{ns}
POD	0.41 ^{ns}	0.76**
MDA	0.12 ^{ns}	0.53 ^{ns}
Proline	0.18 ^{ns}	0.56**

**، * و ^{ns} معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و نبود تفاوت معنی‌دار. SNP: سدیم نیتروپروساید، RWC: محتوای نسبی آب، SOD: آنزیم سوپراکسیددیسموتاز، POD: آنزیم پراکسیداز، MDA: مالون‌دی‌آلدهید. *, **, ns: Significant at 5% and 1% of probability levels, and Non-significant respectively. SNP: sodium nitroprusside, RWC: Relative Water Content, SOD: Superoxide Dismutase, POD: peroxidase, MDA: Malondialdehyde.

عوامل محیطی تأثیر به‌سزایی در تغییر محتوای

سیاسگزاری

از حمایت و مساعدت مالی مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور جهت اجرای این پژوهش، تشکر و قدردانی می‌گردد

در غلظت‌های بالاتر تحت تنش خشکی، ضمن این‌که می‌تواند موجب تعدیل نسبی خسارت تنش شود، افزایش ترکیبات مؤثره گیاه را نیز می‌تواند در پی داشته باشد.

REFERENCES

1. AbbasZade, B., Sharifi Ashour-Abadi, A., Lebaschi, M. H., Naderi Haji-Bagher Kandi, M. & Maghdami, F. (2007). Effect of drought stress on proline, soluble sugars, chlorophyll and relative water content of *Melissa officinalis* L. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 23(4), 504-513. (in Farsi)
2. Adams, R. P. (1995). Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. *Allured, Coral Stream, IL*, 456p.
3. Alizade Ahmadabadi, A., Khorasaninejad, S. & Hemmati, Kh. (2017). The effect of limited irrigation stress and humic acid on the some morphological and root phytochemical characteristics of purple coneflower. *Agricultural Crop Management*, 19(1), 1-14. (in Farsi)
4. Asadi Sanam, S., Zavareh, M., Pirdashti, H., Sefidkon, F. & Nematzadeh, Gh. A. (2015a). Evaluation of biochemical and physiological responses of purple coneflower (*Echinacea purpurea* L.) medicinal plant to low temperature stress. *Journal of Plant Process and Function*, 4(12), 11-28. (in Farsi)
5. Asadi Sanam, S., Zavareh, M., Pirdashti, H., Sefidkon, F., Nematzadeh, Gh. A. & Hashempour, A. (2015b). Changes in some biochemical characteristics of purple coneflower (*Echinacea purpurea* L.) Moench medicinal plant in response to planting date and soil flooding duration. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 31(2), 315-331. (in Farsi)
6. Asadi-Sanam, S., Pirdashti, H., Hashempour, A., Zavareh, M., Nematzadeh, G. A. & Yaghubian, Y. (2015c). The physiological and biochemical responses of eastern purple coneflower (*Echinacea purpurea* L.) Moench to freezing stress. *Russian Journal of Plant Physiology*, 62(4), 515-523.
7. Asadi-Sanam, S., Zavareh, M., Pirdashti, H., Mirjalili, M. H. & Hashempour, A. (2014). Effect of exogenous nitric oxide on germination and some of biochemical characteristics of purple coneflower (*Echinacea purpurea* L.) in saline condition. *Iranian Journal of Plant Biology*, 6(20), 55-74. (in Farsi)
8. Babaee, K., Amini Dehaghi, M., Modares Sanavi, S. A. M. & Jabbari, R. (2010). Water deficit effect on morphology, prolin content and thymol percentage of Thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 26 (2), 239-251.
9. Bahreininejad, B., Razmjou, J. & Mirza, M. (2013). Influence of waterstress on morpho-physiological and phytochemical traits in *Thymus daenensis*. *International Journal of Plant Production*, 7(1), 151-166.
10. Barnes, J., Anderson, L. A., Gibbons, S. & Phillipson, J. D. (2005). *Echinacea* species (*Echinacea angustifolia* (DC.) Hell., *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt., *Echinacea purpurea* (L.) Moench): A review of their chemistry, pharmacology and clinical properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 57(8), 929-954.
11. Barrett, B. (2003). Medicinal properties of *Echinacea*: A critical review. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 10, 66-86.
12. Bates, L. S., Waldern, R. P. & Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil*, 39, 205-207.
13. Beligni, M. V., Laxalt, A. & Lamattina, L. (1997). In: The Biology of Nitric Oxide part 6 (S. Moncada, N. Toda, E.A. Higgs, Eds) (Proc. Fifth Int. Meeting on the Biology of Nitric Oxide, Kyoto, Japan) Portland Press, Portland, p. 250.
14. Besson-Bard, A., Courtois, C., Gauthier, A., Dahan, J., Dobrowolska, G., Jeandroz, S., Pugin, A. & Wendehenne, D. (2008). Nitric oxide in plants: Production and cross-talk with Ca²⁺ signalling. *Molecular Plant*, 1, 218-228.
15. Blokhina, O., Virolainen, E. & Fagerstedt, K. V. (2003). Antioxidant, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany*, 91, 179-194.
16. Cheynier, V., Comte, G., Davies, K. M., Lattanzio, V. & Martens, S. (2013). Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiology and Biochemistry: PPB/ Societe Francaise de Physiologie Vegetale*, 72, 1-20.
17. Costa-Franca, M. G., Pham-Thi, A. T., Pimental, C., Pereyra-Rossiello, R. O., Zuily-Fodil, Y. & Laffray, D. (2000). Differences in growth and water relations among *Phaseolus vulgaris* cultivars in response to induced drought stress. *Environmental and Experimental Botany*, 43, 227-237.
18. Dai, J. & Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* (Basel, Switzerland), 15(10), 7313-7352.

19. Daneshian, N. & Rahmani, M. (2012). Effects of application nitrogen and fertilizer manure on physiological characteristics of calendula (*Calendula officinalis* L.) under water deficit stress. *New Finding in Agriculture*, 6(4), 231-240. (in Farsi)
20. Domingos, P., Prado, A. M., Wong, A., Gehring, C. H. & Feijo, J. A. (2014). Nitric Oxide: A multitasked signaling gas in plants. *Molecular Plant*, 506-520.
21. Esmaeilzadeh-Bahabadi, S., Amiri, A. & Sirousmehr, A. (2015). Effect of foliar application of salicylic acid and chitosan on yield of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Journal of Plant Researches (Iranian Journal of Biology)*, 28(4), 712-725. (in Farsi)
22. Esmaeilzadeh-Bahabadi, S. & Sharifi, M. (2013). The increasing of secondary metabolites in plant with use of biological elicitors. *Cell Journal*, 4, 119-128.
23. Foaaedini, M., Seghatoleslami, M. J. & Moosavi, S. Gh. (2015). Effect of water deficit stress on traits of chichory (*Cichorium intybus* L.) in different planting dates. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 31(3), 383-395. (in Farsi)
24. Gharibi, S., Sayed Tabatabaei, B. E., Saeidi, G., Hossein Goli, S. A. & Talebi, M. (2012). Effect of drought stress on some physiological properties and antioxidant activity of *Achillea tenuifolia* Lam. *Herbal Drugs*, 3, 181-190.
25. Giannopolitis, C. & Ries, S. (1977). Superoxide dismutase. I. Occurrence in higher plant. *Plant Physiology*, 59, 309-314.
26. Goyal, S. & Ramawat, K. (2008). Ethrel treatment enhanced isoflavonoids accumulation in cell suspension cultures of *Pueraria tuberosa*, a woody legume. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30(6), 849-853.
27. Gray, D. E., Pallardy, S. G., Garrett, H. E. & Rottinghaus, G. E. (2003). Acute drought stress and plant age effects on alkalamide and phenolic acid content in purple coneflower roots. *Planta Medica*, 69, 50-55.
28. Guerrero-Chavez, G., Scampicchio, M. & Andreotti, C. (2015). Influence of the site altitude on strawberry phenolic composition and quality. *Scientia Horticulturae*, 192, 21-28.
29. Hashempour, A. Ghasemnezhad, M., Fotouhi Ghazvini, R. & Sohani, M.M. (2014). Olive (*Olea europaea* L.) freezing tolerance related to antioxidant enzymes activity during cold acclimation and nonacclimation. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36, 3231-3241.
30. Bahreininejad, B., Razmjou, J. & Mirza, M. (2013). Influence of waterstress on morpho-physiological and phytochemical traits in *Thymus daemensis*. *International Journal of Plant Production*, 7(1), 151-166.
31. Heath, L. R. & Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125, 189-198.
32. In, B. C., Motomura, S., Inamoto, K., Doi, M. & Mori, G. (2007). Multivariate analysis of relation between preharvest environmental factors, postharvest morphological and physiological factors and vase life of cut Asomi Red Roses. *Japanese Society for Horticultural Science*, 76, 66-72.
33. Jalil Sheshbahrhe, M., Movahhedi Dehnavi, M., Bahreininejad, B. & Salehi, A. (2018). Response of yield and physiological characteristics of purple coneflower (*Echinacea purpurea* (L.) Moench) to nitrogen sources at different levels of irrigation. *Journal of Crop Production*, 10(3), 143-156. (in Farsi)
34. Kishore, G., Ranjan, S., Pandey, A. & Gupta, S. (2010). Influence of altitudinal variation on the antioxidant potential of tartar buckwheat of western Himalaya. *Food Science and Biotechnology*, 19, 1355-1363.
35. Landy, N., Ghalamkari, G., Toghyani, M. & Moattar, F. (2011). The effects of *Echinacea purpurea* L. (purple coneflower) as an antibiotic growth promoter substitution on performance, carcass characteristics and humoral immune response in broiler chickens. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(11), 2332-2338.
36. Lebaschy, M. H. & Sharifi Ashoor-abadi, E. (2004). Growth indices of some medicinal plants under different water stresses. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 20(3), 249-261. (in Farsi)
37. Lei, Y., Yin, C., Ren, J. & Li, C. (2007). Effect of osmotic stress and sodium nitroprusside pretreatment on proline metabolism of wheat seedlings. *Biologia Plantarum*, 516, 386-390.
38. Leicach, S. R., Garau, A.M., Guarnaschelli, A. B., Yaber Grass, M. A., Sztarker, N. D. & Dato, A. (2010). Changes in *Eucalyptus camaldulensis* essential oil composition as response to drought preconditioning. *Journal of Plant Interactions*, 5, 205-210.
39. Li, Q., Niu, Y., Yin, H. B., Wang, J., Shao, M. B., Deng, H. B., Chen, D. Z., Ren, X. X. & Li, Y. C. (2010). Protective role of exogenous nitric oxide against oxidative stress induced by salt stress in barley (*Hordeum vulgare*). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 56, 220-225.
40. Li, Th. S. C. (1998). *Echinacea*: Cultivation and medicinal value. *Horticultural Technology*, 8(2), 122-129.
41. Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148, 350-382.

42. Maciejewska, W. & Krupa, Z. (2002). Jasmonic acid and heavy metals in *Arabidopsis* plant a similar physiological response to both stressors. *Plant Physiology*, 159, 509-515.
43. Manayi, A., Vazirian, M. & Saeidnia, S. (2015). *Echinacea purpurea*: Pharmacology, phytochemistry and analysis methods. *Pharmacognosy Reviews*, 9(17), 63-72.
44. Michalak, A. (2006). Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy acids and anthocyanins in protoplasts. *Plant Physiology*, 64, 88-93.
45. Min, H. M., Trick, H. N. & Rajasheka, E. B. (2009). Secondary metabolism and antioxidant are involved in environmental adaptation and stress tolerance in lettuce. *Journal of Plant Physiology*, 166, 180-191.
46. Mirjalili, M. H., Salehi, P., Naghdi Badi, H. A. & Sonboli, A. (2006). Volatile constituents of the flowerheads of three *Echinacea* species cultivated in Iran. *Flavour and Fragrance Journal*, 21, 355-358.
47. Mousavi, Sh., Asadi-Sanam, S. & Pezhmanmehr, M. (2018). Effect of drought stress and nitric oxide (NO) on leaf and flower essential oil constituents of *Echinacea purpurea* (L.) Moench. 15 th National Iranian Crop Science Congress. Sep. 4-6, Karaj, Iran.
48. Movahhedi Dehnavi, M., Modarres Sanavi, A. M., Soroush-Zade, A. & Jalali, M. (2004). Changes of proline, total soluble sugars, chlorophyll (SPAD) content and chlorophyll fluorescence in safflower varieties under drought stress and foliar application of zinc and maganese. *Biaban*, 9, 93-110. (in Farsi)
49. Mrozikiewicz, P. M., Bogacz, A., Karasiewicz, M., Mikolajczak, P. L., Ozarowski, A. S. & Mrozikiewicz, A. B. (2010). The effect of standardized *Echinacea purpurea* extract on rat cytochrome P₄₅₀ expression level. *Phytomedicine*, 17, 830-833.
50. Nautiyal, P. C., Rachaputi, N. R. & Joshi, Y. C. (2002). Moisture-deficit-induced changes in leaf-water content, leaf carbon exchange rate and biomass production in groundnut cultivars differing in specific leaf area. *Field Crop Research*, 74, 67-79.
51. Neill, S., Desikan, R. & Hancock, J. T. (2003). Nitric oxide as a mediator of ABA signalling in stomatal guard cells. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*, Special Issue, 124-132.
52. Omidbaigi, R. (2012). *Production and Processing of Medicinal Plants*, 1. Astan Quds Publication. (in Farsi)
53. Percival, S.S., (2000). Use of *Echinacea* in medicine. *Biochemical Pharmacology*, 60, 155-158.
54. Pirzad, A., Alyari, H., Shakiba, M. R., Zehtab-Salmasi, S. & Mohammadi, A. (2006). Essential oil content and composition of German chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) at different irrigation regimes. *Journal of Agronomy*, 5(3), 451-455. (in Farsi)
55. Popova, L., Ananieva, E., Hristova, V., Christov, K., Georgieva, K., Alexieva, V. & Stoinova, Z. H. (2003). Salicylic acid and methyl jasmonate induced protection on photosynthesis to paraquat oxidative stress. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*, 18, 133-152.
56. Rad, J. S., Alfatemi, S. M., Rad, H. M. S. & Iriti, M. (2014). Free radical scavenging and antioxidant activities of different parts of *Nitraria schoberi* L. *Journal of Biologically Active Products from Nature*, 4(1), 44-51.
57. Rad, M. S. & Rad, J. S. (2013). Effects of abiotic stress conditions on seed germination and seedling growth of medical plant, hyssop (*Hyssopus officinalis* L.). *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 5 (21), 2593-2597.
58. Reddy, A. R., Chiatanya, K. V. & Vivekanandan, M. (2004). Drought induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *Journal of Plant Physiology*, 161, 1189-1202.
59. Sabra, A., Adam, L., Daayf, F. & Renault, S. (2012b). Salinity-induced changes in caffeic acid derivatives, alkamides and ketones in three *Echinacea* species. *Environmental and Experimental Botany*, 77, 234-241.
60. Sabra, A., Daayf, F. & Renault, S. (2012a). Differential physiological and biochemical responses of three *Echinacea* species to salinity stress. *Scientia Horticulturae*, 135, 23-31.
61. Saeidnejad, A. H., Kafi, M., Khazaei, H. R. & Pessarakli, M. (2013). Effects of drought stress on quantitative and qualitative yield and antioxidative activity of *Bunium persicum*. *Turkish Journal Botanic*, 37, 930-939.
62. Samadi, S., Ghasemnezhad, A. & Alizadeh, M. (2014). Investigation on phenylalanine ammonia-lyase activity of artichoke (*Cynara scolymus* L.) affected by methyl jasmonate and salicylic acid in in-vitro conditions. *Journal of Plant Production Research*, 21, 135-148.
63. SAS Institute. SAS/STAT user's Guide, Release G. 12. SAS Institute Cary. North Carolina. USA. (2002).
64. Setayesh-Mehr, Z. & Ganjeali, A. (2013). Effects of drought stress on growth and physiological characteristics of dill (*Anethum graveolens* L.). *Journal of Horticultural Science*, 27(1), 27-35. (in Farsi)

65. Singleton, V. L., Orthofer, R & Lamuela-Raventós, R. S. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin- Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
66. Tang, B., Shang-zhong, X. U., Zou, X. L., Zheng, Y. L. & Qiu, F. Z. (2010). Changes of antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of waterlogging-tolerant and waterlogging-sensitive maize genotypes at seedling stage. *Agricultural Sciences in China*, 9, 651-661.
67. Tewari, R. K., Hahn, E. J. & Paek, K. Y. (2008). Modulation of copper toxicity-induced oxidative damage by nitric oxide supply in the adventitious roots of *Panax ginseng*. *Plant Cell Reports*, 27, 171-181.
68. Thomsen, M.O., Frette, X.C., Christensen, K.B., Christensen, L.P. & Grevsen, K.. (2012). Seasonal variations in the concentrations of lipophilic compounds and phenolic acids in the roots of *Echinacea purpurea* and *Echinacea pallida*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 12131-12141.
69. Thygesen, L., Thulin, J., Mortensen, A., Skibsted, L. H. & Molgaard, P. (2007). Antioxidant activity of cichoric acid and alkaloids from *Echinacea purpurea* alone and in combination. *Food Chemistry*, 101, 74-81.
70. Tsai, Y. L., Chiou, S. Y., Chan, K. C., Sung, J. M. & Lin, S. D. (2012). Caffeic acid derivatives, total phenols, antioxidant and antimutagenic activities of *Echinacea purpurea* flower extracts. *LWT-Food Science and Technology*, 48, 169-176.
71. Wang, Y., Chen, T., Zhang, C., Hao, H., Liu, P., Zheng, M., Baluska F., Samaj, J. & Lin, J. (2009). Nitric oxide modulates the influx of extracellular Ca^{2+} and actin filament organization during cell wall construction in *Pinus bungeana* pollen tubes. *New Phytologist*, 182, 851-862.
72. Wu, C. H., Murthy, H. N., Hahn, E. J., Lee, H. L. & Paek, K. Y. (2007b). Efficient extraction of caffeic acid derivatives from adventitious roots of *Echinacea purpurea*. *Czech Journal of Food Sciences*, 26, 254-258.
73. Wu, C. H., Tewari, R. K., Hahn, E. J. & Paek, K. Y. (2007a). Nitric oxide elicitation induces accumulation of secondary metabolites and antioxidant defence in the adventitious roots of *Echinacea purpurea*. *Journal of Plant Biology*, 50, 636-643.
74. Yavari, A., Shokrpour, M., Tabrizi, L. & Hadian, J. (2017). Analysis of morphological variation and general combining ability in half sib families of *Echinacea purpurea* L. *Iranian Journal of Horticultural Science*, 47(4), 617-630. (in Farsi)
75. Zahoor, R., Dong, H., Abid, M., Zhao, W., Wang, Y. & Zhou, Z. (2017). Potassium fertilizer improves drought stress alleviation potential in cotton by enhancing photosynthesis and carbohydrate metabolism. *Environmental and Experimental Botany*, 137, 73-83.
76. Zheng, C., Jiang, D., Liu, F., Dai, T., Liu, W., Jing, Qi. & Cao, W. (2009). Exogenous nitric oxide improves seed germination in wheat against mitochondrial oxidative damage induced by high salinity. *Environmental and Experimental Botany*, 67, 222-227.