

## اثر نیتریک اکسید بر فیزیولوژی و متابولیت‌های ثانویه گیاه دارویی ریحان (*Ocimum basilicum L.*) در شرایط تنش خشکی

بهروز اسماعیل‌پور<sup>۱\*</sup>، حمیده فاطمی<sup>۲</sup> و معصومه مرادی<sup>۳</sup>

۱- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران، پست الکترونیک: behsmaiel@yahoo.com

۲- دانشجوی دکتری، گروه علوم باغبانی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

۳- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

تاریخ پذیرش: خرداد ۱۳۹۸

تاریخ اصلاح نهایی: اردیبهشت ۱۳۹۸

تاریخ دریافت: دی ۱۳۹۷

### چکیده

تنش خشکی به‌عنوان یکی از مهمترین تنش غیرزیستی نقش زیادی در کاهش عملکرد گیاهان دارویی دارد. به‌منظور بررسی تأثیر نیتریک اکسید بر خصوصیات مورفوفیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاه ریحان (*Ocimum basilicum L.*) توده بومی شهری در شرایط تنش خشکی آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. فاکتورهای مورد آزمایش شامل تنش خشکی (شاهد (آبیاری کامل) و قطع آبیاری در مرحله ابتدای گلدهی و ۵۰٪ گلدهی) و محلول‌پاشی نیتریک اکسید به‌صورت سدیم نیتروپروساید در غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌مولار بودند. در تیمار شاهد نیز گیاهان با آب مقطر اسپری برگی شدند. نتایج نشان داد با افزایش شدت تنش خشکی ارتفاع بوته، وزن خشک گیاه، کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئید و محتوای آب نسبی کاهش معنی‌داری یافت و میزان نشت الکترولیت، محتوای پرولین برگ و درصد اسانس افزایش یافت. محلول‌پاشی با نیتریک اکسید، باعث افزایش رشد گیاه ریحان در شرایط تنش خشکی شد و بیشترین بهبود رشد در اثر محلول‌پاشی غلظت ۲ میلی‌مولار از نیتریک اکسید حاصل گردید. با افزایش تنش خشکی و غلظت نیتریک اکسید مقدار ترکیب‌های اسانس افزایش یافت. عمده‌ترین ترکیب‌های اسانس ریحان در این آزمایش شامل متیل کایوکول، لینالول، ژرانیال، ژرانیول، آلفا-پینن، بتا-پینن و میرسن بودند. به‌طور کلی نتایج این آزمایش نشان داد که محلول‌پاشی نیتریک اکسید در شرایط تنش خشکی با ایجاد تنظیم اسمزی، جلوگیری از تجزیه کلروفیل و حفظ محتوای آب برگ در بهبود رشد گیاه ریحان مؤثر می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: پرولین، کلروفیل، لینالول، متیل کایوکول، نشت الکترولیت.

### مقدمه

معدده، ضد انگل، اشتهاآور، محرک و مؤثر در بهبود بیماری‌های ریوی و سینه مورد استفاده قرار می‌گیرد (Chalchat & Ozcan, 2008). اسانس ریحان خاصیت ضدقارچی و باکتریایی داشته و دفع‌کننده حشرات است و

ریحان (*Ocimum basilicum L.*) گیاهی دارویی یک‌ساله متعلق به تیره نعناعیان (Lamiaceae) است که در طب سنتی به‌عنوان خلط‌آور، ضد نفخ، برای تسکین درد

برگ، وزن خشک و تر ریشه، طول ریشه، تعداد شاخه و محتوای رطوبت نسبی برگ شد (Safi-Khani et al., 2006). آزمایش روی گونه‌های مرزه (*Satureja hortensis* L.) نیز نشان داد که افزایش فواصل آبیاری عملکرد ماده خشک و سرشاخه‌های گلدار، عملکرد اسانس و شاخص سطح برگ را در مقایسه با شاهد به طور معنی‌داری کاهش داد (Nooshkam et al., 2014). تحت تنش شدید خشکی به دلیل مختل شدن جریان آب از آوندهای چوبی با سلول‌های مجاور بزرگ شدن سلول‌ها متوقف شده و این منجر به کاهش رشد گیاه تحت تنش خشکی می‌شود (Hussain et al., 2008). مهمترین عامل دیگری که در گیاهان تحت تنش خشکی باعث کاهش فتوسنتز و رشد می‌شود عدم تعادل بین گونه‌های فعال اکسیژن تولید شده و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان است. گونه‌های فعال اکسیژن در سلول با پروتئین‌ها، لیپیدها و اسیدهای نوکلئیک واکنش می‌دهند و باعث اختلال در عملکرد نرمال سلول‌ها می‌شوند (Farooq et al., 2009).

اخیراً استفاده از مولکول‌های پیام‌رسان مانند نیتریک اکسید در تخفیف اثرهای تنش خشکی و سایر تنش‌های غیر زیستی مؤثر نشان داده است. نیتریک اکسید یک مولکول گازی نسبتاً پایدار کوچک و به‌عنوان یک پیام‌ر زیستی مهم در گیاهان می‌باشد (Misra et al., 2011) و شبکه آندوپلاسمی و آپوپلاست به‌عنوان منبع سنتز درونی نیتریک اکسید گزارش شده‌اند (Frohlich & Durner, 2011). نیتریک اکسید در تنظیم خیلی از فرایندهای فیزیولوژیکی گیاه از قبیل تحریک جوانه‌زنی بذر (Sarath et al., 2006) تا تنظیم فتوسنتز و گلدهی (Tan et al., 2008) وارد عمل می‌شود، اخیراً مشخص شده است که نیتریک اکسید به‌عنوان یک مولکول پیام‌رسان کلیدی در واکنش گیاه به تنش‌های زنده و غیرزنده به‌عنوان واسطه و انتقال پیام در عمل تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی شرکت می‌کند (Xiong et al., 2012). بسیاری از پاسخ‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی نیتریک اکسید، بر اساس توانایی آن در نگهداری تعادل اکسایش و احیای

به‌طور گسترده در صنایع غذایی، عطرسازی، فرآورده‌های دهانی و دندان‌کاری کاربرد دارد (Klimankova et al., 2008). از میان فاکتورهای بازدارنده محیطی مؤثر بر عملکرد گیاهان باغی و دارویی، تنش خشکی یکی از مهمترین عوامل اصلی محدودکننده تولیدات کشاورزی به‌شمار می‌رود، که گیاه را از رسیدن به حداکثر توان محصول‌دهی باز می‌دارد (Hussain et al., 2008). به‌طور کلی تنش خشکی زمانی ایجاد می‌شود که آب موجود در خاک کاهش پیدا کند و شرایط محیطی نیز از طریق تبخیر و تعرق باعث تداوم از دست رفتن آب توسط گیاه گردد (Jaleel et al., 2009). تنش‌های غیر زیستی از جمله تنش خشکی تأثیر کمبود رطوبت بر عملکرد و تغییرات کمی و کیفی مواد مؤثره گیاهان دارویی است که دارای ویژگی‌های خاصی است که باید به‌طور کامل مورد ارزیابی قرار گیرد. تولید مواد مؤثره گیاهان دارویی با هدایت فرایندهای ژنتیکی است ولی به‌طور بارزی تحت تأثیر عوامل محیطی نیز قرار می‌گیرند، به نظر می‌رسد عملکرد و مواد مؤثره گیاهان دارویی واکنش‌های متفاوتی نسبت به تنش خشکی دارند (Ashiri et al., 2010). تنش کم آبی در گیاهان دارویی بر روی رشد و توسعه گیاه تأثیر می‌گذارد و منجر به عدم بهره‌وری محصول می‌شود. به‌عنوان مثال کمبود آب تأثیرات متفاوتی بر اسیدهای چرب، عملکرد اسانس و ترکیب‌های اسانس گیاه مریم‌گلی (*Salvia officinalis* L.) داشت، به‌طوری که در تنش متوسط عملکرد اسانس افزایش پیدا کرد (Bettaieb et al., 2011). تنش آبی سبب افزایش روغن‌های فرار در بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.) (Aliabadi et al., 2009) و همکاران، (۲۰۰۹) و زیره سیاه (*Carum carvi* L.) (Laribi et al., 2009) می‌شود.

به‌طور کلی کمبود آب اثرهای نامطلوبی بر فرایندهای فیزیولوژیکی گیاه همانند فتوسنتز، جذب عناصر غذایی، توسعه سلول، تقسیم سلولی، تجمع و انتقال مواد غذایی دارد (Devnarain et al., 2016). به‌عنوان مثال در گیاه دارویی بادرشبو (*Dracocephalum moldavica* L.) تنش خشکی باعث کاهش ارتفاع گیاه، اندام هوایی، تعداد برگ، کلروفیل

روش وزنی استفاده گردید. ظرفیت مزرعه‌ای (FC) و نقطه پژمردگی دائم (PWP) با استفاده از نمونه‌های دست‌نخورده در ۲۴ ساعت پس از اشباع خاک برای ظرفیت مزرعه‌ای و قرار دادن در دستگاه مکش با ۱۵ اتمسفر فشار منفی برای نقطه پژمردگی دائم محاسبه گردید. مقادیر مربوطه برای خاک در عمق صفر تا ۲۰ سانتی‌متر با توجه به لایه‌بندی خاک و از تفاضل آنها میزان آب قابل استفاده خاک (AW) تعیین شد (De Ridder & Van Keulen, 1995). تنش خشکی به صورت قطع آبیاری در اوایل مرحله گلدهی و قطع آبیاری در مرحله ۵۰٪ گلدهی اعمال گردید. بدین ترتیب که تمام گلدان‌ها تا هشت هفته بعد از کاشت به‌طور کاملاً یکسان و همزمان آبیاری شدند، که در تیمار آبیاری کامل، آبیاری تا آخرین مراحل رشد ادامه یافت. در تیمارهای تنش خشکی نیز اعمال تنش به صورت قطع آبیاری بود، بدین ترتیب که در تنش خشکی ملایم قطع آبیاری در مرحله ۵۰٪ گلدهی و در تیمار تنش خشکی شدید نیز آبیاری گیاهان از ابتدای گلدهی قطع شد. در تیمارهای تنش خشکی قطع آبیاری تا آخر دوره رشد گیاه ادامه یافت. برای تهیه محلول نیتریک اکسید ابتدا آن را در آب مقطر حل نموده و بعد غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌مولار از این ماده تهیه کرده و به صورت محلول‌پاشی برگ‌گی در چهار مرحله و با فواصل زمانی دو هفته در ساعات اولیه روز استفاده و گیاهان شاهد توسط آب مقطر اسپری برگ‌گی شدند. اولین محلول‌پاشی یک هفته قبل از اعمال تنش خشکی انجام شد. در پایان فصل رشد بوته‌ها برداشت شدند و صفاتی از قبیل ارتفاع گیاه و وزن خشک بخش هوایی اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری وزن خشک، بخش هوایی گیاهان به مدت ۷۲ ساعت در آون با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و بعد با ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ گرم توزین شدند.

#### سنجش کلروفیل و کاروتنوئید

برای اندازه‌گیری رنگیزه‌های فتوسنتزی، شامل کلروفیل a و b و کاروتنوئیدها، از برگ‌های تازه استفاده شد. بدین

درون سلولی و تنظیم سمیت انواع اکسیژن فعال است (Hayat et al., 2011).

محدودیت منابع آب در ایران به‌عنوان یک عامل محدودکننده کشت و پرورش گیاهان باغی به‌ویژه گیاهان دارویی می‌باشد. یکی از راهکارهای اساسی در کاهش اثرهای زیانبار تنش خشکی استفاده از موادی همانند نیتریک اکسید می‌باشد که اثرهای این ماده روی ریحان در شرایط تنش خشکی مطالعه نشده است، از این رو در این مطالعه نقش سدیم نیتروپروساید (SNP) به‌عنوان دهنده نیتریک اکسید در بهبود تحمل به خشکی در گیاه ریحان بر پایه برخی تغییرات فیزیولوژیکی و عملکرد کیفی اسانس آن مورد بررسی قرار گرفته است.

#### مواد و روش‌ها

این تحقیق در قالب آزمایش فاکتوریل با طرح پایه کاملاً تصادفی در سه تکرار در سال ۱۳۹۶ به صورت گلدانی در دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه محقق اردبیلی اجرا شد. فاکتورهای آزمایشی شامل تنش خشکی (آبیاری کامل و قطع آبیاری در مرحله شروع گلدهی و ۵۰٪ گلدهی) و محلول‌پاشی غلظت‌های مختلف نیتریک اکسید (۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌مولار) به صورت سدیم نیتروپروساید بودند و گیاهان شاهد توسط آب مقطر اسپری برگ‌گی شدند. برای انجام این آزمایش بذر ریحان بومی شهرری از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه گردید و نیتریک اکسید نیز به صورت سدیم نیترو پروساید ( $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$ ) از شرکت سیگما آلدریچ خریداری گردید. بستر کشت شامل مخلوط دو قسمت خاک و یک قسمت ماسه و یک قسمت کود دامی پوسیده بود که در گلدان‌هایی در اندازه ۳۰×۴۰ و با ارتفاع ۳۵ سانتی‌متر ریخته شد. بافت خاک مورد استفاده در این آزمایش لومی شنی بود، برخی از مشخصات خاک مورد استفاده در این آزمایش در جدول ۱ آمده است. برای اعمال تیمار آبیاری، خاک گلدان در افق ریشه‌های گیاه تا عمق ۲۰ سانتی‌متر مورد بررسی قرار گرفت. برای کنترل آب از

روش Arnon و همکاران (۱۹۴۹) اندازه‌گیری شد. طبق این روش با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل جنوی انگلیس) مقدار جذب نوری محلول‌ها در طول موج ۰.۴۷۰، ۶۴۶/۸ و ۶۶۳/۲ نانومتر قرائت و مقدار کلروفیل a و b، کل و کاروتنوئید براساس روابط زیر محاسبه گردید.

$$\text{Chla} = (0.0127)(A663.2) - (0.00269)(A646.8) \quad \text{رابطه (۱)}$$

$$\text{Chlb} = (0.0229)(A646.8) - (0.00468)(A663.2) \quad \text{رابطه (۲)}$$

$$\text{ChIT} = \text{Chlb} + \text{Chla} \quad \text{رابطه (۳)}$$

$$\text{Car} = (1000A470 - 1.8 \text{ Chla} - 85.02 \text{ Chlb}) / 198 \quad \text{رابطه (۴)}$$

در آب مقطر شناور گردید. پس از گذشت این مدت وزن اشباع برگ اندازه‌گیری گردید (TW). سپس برگ‌ها به مدت ۲۴ ساعت در آون در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و بعد از گذشت این مدت وزن خشک (DW) آنها اندازه گرفته شد (Ritchie & Nguyen, 1990).

$$\text{RWC (\%)} = \frac{\text{FW} - \text{DW}}{\text{TW} - \text{DW}} \quad \text{رابطه (۶)}$$

#### اندازه‌گیری پرولین

برای این منظور مقدار ۰/۵ گرم از جوان‌ترین برگ‌های هر بوته انتخاب گردید و به قطعات کوچکتر از ۵ میلی‌متر تبدیل شد، سپس این قطعات برگی همراه با ۱۰ میلی‌لیتر سولفوسالیسیلیک اسید ۳٪ در یک هاون چینی به مدت سه دقیقه ساییده شد و محلول هموژنیزه شده توسط کاغذ صافی واتمن شماره ۲ صاف گردید. بعد از آن ۲ میلی‌لیتر از محلول صاف شده با ۲ میلی‌لیتر نین‌هیدرین و ۲ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال خالص در یک لوله آزمایش ریخته شده و به مدت یک ساعت در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد بن‌ماری قرار گرفت. به محلول واکنش پس از سرد شدن ۴ میلی‌لیتر تولوئن اضافه گردید و به مدت ۱۵ تا ۲۰ ثانیه مخلوط گردید. پس از تشکیل دو فاز جداگانه، فاز رنگی بالایی با دقت جدا و مقدار جذب در دستگاه اسپکتروفتومتر

منظور ۰/۱ گرم از برگ تازه در داخل هاون چینی با ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰٪ ساییده شده و محلول حاصل به‌طور کامل به لوله‌های سانتریفیوژ منتقل گردید. سپس محلول به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید و مقدار کلروفیل در محلول رویی براساس

در این فرمول‌ها Chla, Chlb, ChIT و Car به ترتیب غلظت کلروفیل a, کلروفیل b, کلروفیل کل و کاروتنوئیدها (شامل کاروتن‌ها و گزانتوفیل‌ها) است.

#### اندازه‌گیری نشت غشاء

برای این منظور از برگ‌های کاملاً توسعه یافته دیسک‌هایی تهیه و سه بار با آب دیونیزه شست‌وشو شد. نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ظرف سر بسته حاوی ۱۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و روی شیکر تکان داده شدند. پس از پایان زمان مورد نظر نمونه‌ها در طول موج ۲۸۰ نانومتر قرائت شد (Lt). سپس نمونه و محلول به مدت ۲۰ دقیقه در فشار ۱۲۱ پاسکال در اتوکلاو قرار داده شد و دوباره در طول موج ۲۸۰ نانومتر قرائت انجام شد (L0). برای محاسبه نشت یونی از فرمول زیر استفاده شد (Redman et al., 1986).

$$\text{رابطه (۵)} \quad \text{درصد نشت مواد محلول} = \frac{\text{Lt}}{\text{L0}} \times 100$$

#### اندازه‌گیری محتوای نسبی آب برگ

برای اندازه‌گیری این صفت ۰/۵ گرم از جوان‌ترین برگ هر گیاه (FW) جدا کرده و بعد نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت

کروماتوگرافی (GC) مدل 9A Shimadzu ساخت کشور ژاپن و گاز کروماتوگرافی متصل به طیف‌سنج جرمی (GC/MS) مدل 3400 Varian، متصل شده به دستگاه طیف‌سنج جرمی Satuorn II، استفاده گردید. ستون موئینه با نام تجاری DB-5 ساخت شرکت J&W به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۲۵۰ میکرومتر که سطح داخلی آن با فاز ساکن از جنس 5% Phenyl و Dimethylsiloxane به ضخامت ۰/۲۵ میکرومتر پوشیده شده بود، مورد استفاده قرار گرفت.

#### تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های حاصل از این آزمایش با نرم‌افزار آماری SAS 9.2 مورد تجزیه و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال ۵٪ انجام شد.

با طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت شد و مقدار پرولین با استفاده از منحنی استاندارد آن بدست آمد ( Bates et al., 1973).

#### استخراج اسانس

برای استخراج اسانس از روش تقطیر با آب و دستگاه کلونجر استفاده شد. برای این منظور حدود ۴۰ گرم از نمونه‌های خرد شده برگ و سرشاخه گل‌دهنده پس از دستیابی به رطوبت حدود ۱۰٪ تا ۱۴٪ در دیگ کلونجر به مدت ۲ ساعت حرارت داده شد. اسانس بدست‌آمده توسط سولفات سدیم خشک شد و به‌دقت توزین گردید و نمونه‌های اسانس برای جلوگیری از نفوذ نور تا زمان آنالیز در جای تاریک و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای شناسایی ترکیب‌های اسانس از دستگاه‌های گاز

جدول ۱- برخی مشخصات فیزیکی و شیمیایی خاک مورد آزمایش

سیلت	شن	رس	Ec (ds/m)	pH	ماده آلی (%)	بافت خاک
۲۰	۶۴	۱۶	۰/۱۶	۸	۰/۹۱	لومی شنی

#### نتایج

مقایسه میانگین اثرهای متقابل تنش خشکی و محلول‌پاشی نیتریک اکسید (جدول ۳) نشان داد که با افزایش شدت تنش خشکی از ارتفاع و وزن خشک بخش هوایی بوته کاسته شده و بیشترین ارتفاع (۶۴/۶۷ سانتی‌متر) و وزن خشک بخش هوایی بوته (۶/۲۲ گرم) در گیاهان در شرایط بدون تنش و محلول‌پاشی شده با غلظت ۲ میلی‌مولار از نیتریک اکسید حاصل شده است و کمترین ارتفاع بوته (۳۵/۷۵ سانتی‌متر) و وزن خشک بخش هوایی بوته (۲/۸۵ گرم) نیز در گیاهان اسپری شده با آب مقطر در تیمار تنش قطع آبیاری در مرحله ابتدای گلدهی بدست آمد.

نتایج حاصل از تجزیه واریانس محلول‌پاشی نیتریک اکسید بر صفات رویشی و فیزیولوژیک ریحان در شرایط تنش خشکی (جدول ۲) نشان داد که اثر تنش خشکی و محلول‌پاشی با نیتریک اکسید بر ارتفاع بوته، وزن خشک بخش هوایی و رنگیزه‌های فتوسنتزی شامل کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل، نشت یونی غشاء، کاروتنوئید برگ، پرولین برگ، محتوای نسبی آب برگ، درصد و عملکرد اسانس ریحان معنی‌دار بود (جدول ۲). اما اثر متقابل تنش خشکی و محلول‌پاشی برای تمام صفات مورد مطالعه بجز کاروتنوئید برگ، محتوای نسبی آب برگ، درصد و عملکرد اسانس معنی‌دار بود.

جدول ۲- تجزیه واریانس تأثیر محلول پاشی نیتریک اکسید بر رشد، فیزیولوژی و درصد اسانس ریحان در شرایط تنش خشکی

میانگین مربعات												
منابع تغییرات	درجه آزادی	ارتفاع بوته	وزن خشک بخش هوایی	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	کاروتنوئید	نشت یونی	محتوای نسبی آب برگ	پرولین	درصد اسانس	عملکرد اسانس
تنش خشکی	۲	۹۱۵/۵***	۱۲/۳۳***	۱۲/۳۳***	۱/۶۲***	۲۱/۷۲***	۰/۴۳***	۶۷/۷۹***	۳۸۷۶/۱۶***	۱/۹۱***	۰/۵۳*	۹/۸۳***
نیتریک اکسید	۳	۷۲/۸***	۱۸/۱۶***	۱۷/۰۶***	۳/۲۱***	۳۶/۷۵***	۴/۱۳***	۴۰۰/۶۵***	۷۶/۴۳*	۰/۴۱***	۰/۴۱***	۱/۴۱***
تنش خشکی × نیتریک اکسید پاشی	۶	۲۹/۱۹***	۰/۲۸*	۰/۱۶***	۰/۰۳***	۰/۵۰***	۰/۰۴ns	۱/۷۷*	۵/۹۴ ns	۰/۰۳***	۰/۳۲ns	۰/۰۶ ns
اشتباه آزمایش	۳۲	۵/۴۵	۰/۱۲	۰/۱۱	۰/۰۱	۰/۱۱	۰/۰۱۵	۰/۷۷	۳/۳۶	۰/۰۵۵	۰/۰۴	۰/۰۸
ضریب تغییرات		۴/۹	۶/۳۵	۶/۳۵	۷/۴	۴/۴۲	۱۰/۶۵	۵/۹۵	۲/۲۰	۸/۳۴	۹/۹۵	۸/۷۱

\*\*\*، \*\* و ns: به ترتیب معنی دار در سطح احتمال ۵٪، ۱٪ و عدم تفاوت معنی دار

جدول ۳- مقایسه میانگین اثر متقابل تنش خشکی و نیتریک اکسید بر صفات فیزیولوژیک ریحان

تنش نشت یونی (%)	پروئین (میکروگرم بر گرم وزن تازه)	کلروفیل کل	کلروفیل b	کلروفیل a	وزن خشک برگ (گرم)	ارتفاع بوته (سانتی متر)	نیتریک اکسید	تنش
۲۱/۹۰ f	۰/۵۲ f	۷/۹۸ cd	۱/۸۷ c	۶/۱۱ de	۴/۹۰ bcd	۵۱ d	N <sub>0</sub>	I <sub>1</sub>
۲۰/۴۴ f	۰/۶۴ e	۹/۵ b	۲/۱۶ b	۷/۳۴ b	۵/۴۶ ab	۵۴/۶۷ c	N <sub>1</sub>	I <sub>1</sub>
۱۸/۸۶ g	۰/۷۱ e	۱۰/۹۴ a	۲/۵۹ a	۸/۳۵ a	۶/۰۲ a	۵۹/۳۳ b	N <sub>2</sub>	I <sub>1</sub>
۱۵/۱۷ h	۰/۸ e	۱۱/۳۸ a	۲/۷۶ a	۸/۶۳ a	۶/۲۲ a	۶۴/۶۷ a	N <sub>3</sub>	I <sub>1</sub>
۲۸/۲۹ de	۰/۹۲ de	۶/۵۸ e	۱/۲۵ de	۵/۳۳ ef	۴/۳۹ bcde	۴۶/۲۵ fg	N <sub>0</sub>	I <sub>2</sub>
۲۵/۲۳ d	۱/۱۸ d	۸/۳ c	۱/۵۷ d	۶/۷۳ ef	۴/۸۵bcd	۴۸ ef	N <sub>1</sub>	I <sub>2</sub>
۲۱/۴۰ e	۱/۳۳ cd	۹/۷۶ b	۱/۹۶ c	۷/۸۰ ab	۵/۳۷ abc	۴۹/۴ de	N <sub>2</sub>	I <sub>2</sub>
۱۹/۷۱ g	۱/۵۴ c	۱۰/۴۱ ab	۲/۳۵ b	۸/۰۶ a	۵/۴۰ abc	۵۰/۴۲ d	N <sub>3</sub>	I <sub>2</sub>
۳۷/۵۲ a	۱/۴۱ c	۵/۴۴ f	۰/۹۹ f	۴/۴۵ fg	۲/۸۵ f	۳۵/۷۵ j	N <sub>0</sub>	I <sub>3</sub>
۳۱/۴۶ b	۲/۲۷ b	۶/۴۶ e	۱/۱۶ e	۵/۳ ef	۳/۱۴ ef	۳۹/۶۵ i	N <sub>1</sub>	I <sub>3</sub>
۲۴/۷۸ d	۲/۷۶ a	۷/۸۲ cd	۱/۳۹ d	۶/۴۳ d	۳/۲۵ ef	۴۴/۵ hi	N <sub>2</sub>	I <sub>3</sub>
۲۵/۷۲ e	۲/۹۷ a	۹/۲ bc	۲/۱۷ b	۷/۰۳ c	۳/۵۸ def	۴۶/۵ fg	N <sub>3</sub>	I <sub>3</sub>

I<sub>1</sub> = آبیاری کامل؛ I<sub>2</sub> = قطع آبیاری بعد از ۵۰٪ گلدهی؛ I<sub>3</sub> = قطع آبیاری در ابتدای گلدهی

N<sub>0</sub> = محلول پاشی با آب مقطر؛ N<sub>1</sub> = محلول پاشی با نیتریک اکسید ۰/۵ میلی مولار؛ N<sub>2</sub> = محلول پاشی با نیتریک اکسید ۱ میلی مولار؛

N<sub>3</sub> = محلول پاشی با نیتریک اکسید ۲ میلی مولار

میانگین‌های با حروف مشابه در هر ستون از لحاظ آماری اختلاف معنی داری با هم ندارند.

برگی شده با آب مقطر در شرایط تنش قطع آبیاری در ابتدای گلدهی حاصل شد (جدول ۳). به طوری که با افزایش شدت تنش خشکی از میزان رنگیزه کاروتنوئید کاسته شده و بیشترین میزان این رنگیزه (۰/۴ میلی گرم بر گرم وزن تازه) در گیاه ریحان پرورش یافته در شرایط آبیاری کامل حاصل شد و کمترین مقدار برای این صفت (۰/۲۴ میلی گرم بر گرم وزن تازه) در گیاهانی حاصل شد که از ابتدای گلدهی آبیاری آنها قطع شده بود (جدول ۴). محلول پاشی با نیتریک اکسید نیز باعث افزایش غلظت کاروتنوئید برگ گیاه ریحان شد. حداکثر مقدار برای این شاخص (۴/۸ میلی گرم بر گرم

با افزایش شدت تنش خشکی از میزان کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل گیاه ریحان کاسته شده و بیشترین میزان کلروفیل a (۸/۶۳ میلی گرم بر گرم وزن تازه)، کلروفیل b (۲/۷۶ میلی گرم بر کیلوگرم وزن تازه) و کلروفیل کل (۱۱/۳۵ میلی گرم بر گرم وزن تازه) در گیاهان محلول پاشی شده با غلظت ۲ میلی مولار از نیتریک اکسید در شرایط آبیاری کامل حاصل شد و کمترین میزان کلروفیل a (۴/۴۵ میلی گرم بر گرم وزن تازه)، کلروفیل b (۰/۹۹ میلی گرم بر کیلوگرم وزن تازه) و کلروفیل کل (۵/۴۴ میلی گرم بر گرم وزن تازه) نیز در گیاهان اسپری

وزن تازه) در تیمار محلول پاشی با غلظت ۱ میلی مولار نیتریک اکسید حاصل شد که با غلظت ۲ میلی مولار از این ماده تفاوت معنی داری نشان نداد و گیاهان اسپری برگی شده با آب مقطر از حداقل میزان (۲/۱ میلی گرم بر گرم وزن تازه) کاروتنوئید را تولید کردند (جدول ۴).

جدول ۴- مقایسه میانگین اثر تنش خشکی و محلول پاشی نیتریک اکسید بر صفات فیزیولوژیک ریحان

تیمار	کاروتنوئید برگ (میلی گرم بر گرم وزن تر)	محتوای نسبی آب برگ (%)	درصد اسانس	عملکرد اسانس (میلی لیتر در گلدان)
آبیاری کامل	۰/۴ a	۹۳ a	۱/۰۳ c	۵/۰۴ a
تنش خشکی	۰/۳۵ b	۷۸ b	۱/۲ b	۵/۲۷ a
قطع آبیاری در ابتدای گلدهی	۰/۲۴ c	۵۸ c	۱/۴ a	۳/۹۹ b
شاهد ( اسپری برگی با آب مقطر)	۲/۱ c	۵۵ d	۱/۰۶ c	۴/۲۸ d
نیتریک اکسید	۳/۲۵ b	۶۵ c	۱/۲۲ b	۵/۴۶ c
۰/۵ میلی مولار	۴/۸ a	۸۷ a	۱/۳۰ b	۶/۳۴ b
۱ میلی مولار	۴/۵ a	۸۵ ab	۱/۴۳ a	۷/۲۴ a

میانگین‌های با حروف مشابه در هر ستون از لحاظ آماری اختلاف معنی داری با هم ندارند.

#### پرولین

سلولی (۳۷/۵۲٪) در گیاهان اسپری برگی شده با آب مقطر در تیمار تنش خشکی شدید یا قطع آبیاری در ابتدای گلدهی مشاهده شد و گیاهان محلول پاشی شده با غلظت ۱ میلی مولار نیتریک اکسید در شرایط آبیاری کامل کمترین میزان نشت یونی (۱۷٪/۱۵) را داشتند (جدول ۴).

#### محتوای نسبی آب برگ

با افزایش شدت تنش خشکی محتوای نسبی آب برگ گیاه ریحان کاهش یافت، به طوری که بیشترین محتوای نسبی آب برگ (۹۳٪) در گیاهان شاهد و کمترین مقدار آن (۵۸٪) در گیاهان تحت تنش قطع آبیاری در ابتدای رشد زایشی تولید شد (جدول ۴). محلول پاشی گیاه ریحان با غلظت ۱ میلی مولار از نیتریک اکسید با ۸۷٪ رطوبت بیشترین و گیاهان اسپری برگی شده با آب مقطر با ۵۵٪ رطوبت کمترین محتوای نسبی آب برگ را داشتند.

مقایسه میانگین اثرهای متقابل تنش خشکی و محلول پاشی با نیتریک اکسید بر میزان پرولین آزاد در برگ ریحان (جدول ۳) نشان داد که با افزایش شدت تنش خشکی میزان پرولین افزایش یافته و بیشترین میزان پرولین (۲/۹۷ میکروگرم بر گرم وزن تازه) در گیاهان محلول پاشی شده با غلظت ۲ میلی مولار از نیتریک اکسید در شرایط قطع آبیاری در ابتدای گلدهی حاصل شد و گیاهان اسپری برگی شده با آب مقطر در شرایط آبیاری کامل کمترین پرولین (۰/۵۲ میکروگرم بر گرم وزن تازه) را داشتند (جدول ۳).

#### نشت یونی

با افزایش شدت تنش خشکی نشت مواد الکترولیتی از غشای سلولی افزایش پیدا کرد و بیشترین میزان نشت از غشای



## درصد اسانس

متیل کائوبیکول بیشترین درصد را در بین اجزای تشکیل دهنده اسانس به خود اختصاص داد و بیشترین مقدار این ترکیب (۵/۵۲٪) در گیاهان پرورش یافته تحت تیمار تنش خشکی قطع آبیاری در ۵۰٪ گلدهی حاصل شد که با غلظت ۲ میلی مولار از نیتریک اکسید محلول پاشی شده بودند و کمترین میزان این ترکیب (۳۸٪) در گیاهان محلول پاشی نشده در شرایط قطع آبیاری در ابتدای مرحله گلدهی حاصل شد. با افزایش میزان تنش خشکی و غلظت نیتریک اکسید میزان ترکیب لینالول و ژرانیال افزایش یافت و بالاترین مقدار آنها (به ترتیب ۲۸٪ و ۱۶٪) و کمترین مقدار این دو ترکیب (به ترتیب ۱۶٪ و ۹/۲٪) در گیاهان محلول پاشی شده با غلظت ۲ میلی مولار از نیتریک اکسید تیمار در شرایط تنش خشکی قطع آبیاری در ابتدای گلدهی و گیاهان محلول پاشی نشده در شرایط آبیاری کامل بدست آمد. بالاترین میزان ژرانیول (۹٪) در تیمار تنش قطع آبیاری در ابتدای گلدهی و محلول پاشی نیتریک اکسید ۱ میلی مولار و بیشترین میزان لیمونن (۵/۵٪) در شرایط آبیاری کامل در گیاهان محلول پاشی شده با غلظت ۰/۵ میلی مولار نیتریک اکسید حاصل شد. حداکثر میزان آلفا-پینن (۳/۳٪) در گیاهان اسپری برگی شده با آب مقطر در شرایط تنش قطع آبیاری در ۵۰٪ گلدهی و بیشترین میزان کامفور (۴/۳٪) در تیمار آبیاری کامل و اسپری برگی شده با آب مقطر بدست آمد.

## بحث

نتایج این پژوهش نشان داد که با افزایش تنش خشکی صفات رویشی گیاه دارویی ریحان کاهش یافت و بیشترین میزان کاهش رشد گیاه در شرایط قطع آبیاری در مرحله ابتدای گلدهی حاصل شد. کاهش شاخص‌های رشد در شرایط تنش خشکی در سایر گیاهان دارویی از قبیل مرزه تابستانه (Esmailpour et al., 2013) (*Satureja hortensis* L.) گل مکزیک (*Agastache foeniculum* L.) (Omidbaigi & Mahmoudi Sourestani, 2010) و ترخون (*Artemisia dracunculus* L.) (Lotfi et al., 2014) نیز گزارش شده

با افزایش شدت تنش خشکی بر درصد اسانس این گیاهان افزوده شده و گیاهان متأثر از تنش خشکی قطع آبیاری در ابتدای گلدهی بیشترین درصد اسانس (۱/۴٪) و گیاهانی که تحت تیمار آبیاری کامل پرورش یافته بودند کمترین (۱/۰۳٪) اسانس را داشتند (جدول ۴). محلول پاشی با نیتریک اکسید نیز باعث افزایش اسانس ریحان شد و گیاهان اسپری شده با آب مقطر کمترین (۱/۰۶٪) و گیاهان محلول پاشی شده با غلظت ۲ میلی مولار نیتریک اکسید بیشترین (۱/۴۳٪) اسانس را داشتند (جدول ۴).

## عملکرد اسانس

نتایج مقایسه میانگین تأثیر تیمارها نشان داد که با افزایش شدت تنش خشکی ابتدا عملکرد اسانس افزایش یافته و بیشترین مقدار عملکرد اسانس (۵/۲۷ میلی لیتر در گلدان) در تنش ملایم یا قطع آبیاری در زمان ۵۰٪ گلدهی حاصل شد که نسبت به تیمار آبیاری کامل حدود ۵٪ افزایش نشان داد (جدول ۴)، سپس در شرایط تنش خشکی شدید یا قطع آبیاری در ابتدای گلدهی حدود ۲۵٪ کاهش یافت. محلول پاشی نیتریک اکسید سبب افزایش عملکرد اسانس شد، به طوری که بیشترین عملکرد اسانس (۷/۲۴ میلی لیتر در گلدان) در اثر محلول پاشی غلظت ۲ میلی مولار نیتریک اکسید بدست آمد و کمترین مقدار (۴/۲۸ میلی لیتر در گلدان) برای این صفت در گیاهان شاهد حاصل شد (جدول ۴).

## اجزای اسانس

در این آزمایش با توجه به نتایج آنالیز طیف‌سنجی جرمی ۵۰ ترکیب از اجزای تشکیل دهنده اسانس ریحان در تیمارهای مختلف شناسایی گردید که ۱۳ ترکیب غالب آن شامل متیل کائوبیکول، لینالول، ژرانیال، ژرانیول، آلفا-پینن، بتا-پینن، میرسن، کامفور، کامفن، کاربوفیلن، کامفن، ترانس کریزانتمال و دی جرماکرن بودند (جدول ۵).

است. در شرایط تنش خشکی به علت کاهش در فشار تورژسانس، یکی از حساس فرایندهای فیزیولوژیک در گیاه، رشد سلولی می‌باشد (Taiz & Zeiger, 2006).

جدول ۵- اثر تنش خشکی و نیتریک اکسید بر اجزای اسانس ریحان

germacrene D	geraniol	caryophyllene	geranial	methyl-chavicol	trans-chrysanthamal	camphore	linalool	limonene	myrcene	B-pinene	camphene	$\alpha$ -pinene	ترکیب تیماری
۱۴۶۹	۱۴۳۱	۱۴۰۵	۱۲۷۴	۱۱۹۲	۱۱۵۲	۱۱۴۳	۱۱۰۰	۱۰۲۵	۹۹۱	۹۸۲	۹۵۴	۹۲۹	شاخص بازداری
۰/۹	۳/۲	۱/۲	۹/۲	۴۲	۳/۲	۴/۳	۱۶	۰/۶	۱/۵	۲/۵	۱/۲	۱/۸	N <sub>0</sub> I <sub>1</sub>
۲/۶	۲/۳	۰/۶	۱۰	۴۵	۰/۷	۱/۷	۱۹	۵/۵	۲/۳	۰/۸	-	۲/۲	N <sub>1</sub> I <sub>1</sub>
۳	۵/۶	۰/۶	۱۱	۴۶	۰/۵	۱/۴	۱۸	۴/۲	۲/۵	۰/۶		۳/۱	N <sub>2</sub> I <sub>1</sub>
۲	۶	۱	۱۲/۵	۴۶	۰/۶	۲/۱	۲۰	۳	۲	۰/۷	-	۳/۱	N <sub>3</sub> I <sub>1</sub>
۱/۵	۴/۳	۰/۷۸	۹/۵	۴۵	۱	۳/۵	۲۲	۲/۲	۰/۸	۱/۱	۰/۸	۳/۳	N <sub>0</sub> I <sub>2</sub>
۱	۴	۱/۱۴	۱۰	۴۸	۱	۲	۲۴	۲	۱/۵	۱/۲	۰/۷	۱/۸	N <sub>1</sub> I <sub>2</sub>
۱/۶	۳	۱/۱۶	۱۱	۵۱	۰/۹	۱/۵	۲۵	۱/۵	-	۰/۸	-	۱/۵	N <sub>2</sub> I <sub>2</sub>
۱/۲	۳	۱/۳	۱۲	۵۲/۵	-	۱/۵	۲۶	۱	-	۰/۶	۰/۵	۱/۸	N <sub>3</sub> I <sub>2</sub>
۲/۵	۸/۲	۱/۰۸	۱۲	۳۸	۳/۲	۲/۲	۲۳	۱/۵	۱/۵	۲/۱	۱/۲	۲	N <sub>0</sub> I <sub>3</sub>
۱	۸/۸	۲/۱۲	۱۴	۴۱	۱/۵	۲/۱	۲۵/۵	۱	-	۱/۱	-	۱/۵	N <sub>1</sub> I <sub>3</sub>
۱/۲	۹	۱/۴	۱۵	۴۱	۱	۱/۵	۲۶	۱	۰/۴	۱	۰/۵	۱/۱	N <sub>2</sub> I <sub>3</sub>
-	۸/۴	۱/۳	۱۶	۴۲	۱	۱/۲	۲۸	۱/۲	۰/۵	-	۰/۵	۱	N <sub>3</sub> I <sub>3</sub>

I<sub>1</sub>= آبیاری کامل؛ I<sub>2</sub> = قطع آبیاری بعد از ۵۰٪ گلدهی؛ I<sub>3</sub>= قطع آبیاری در ابتدای گلدهی

N<sub>0</sub>= محلول پاشی با آب مقطر؛ N<sub>1</sub>= محلول پاشی با نیتریک اکسید ۰/۵ میلی مولار؛ N<sub>2</sub>= محلول پاشی با نیتریک اکسید ۱ میلی مولار؛

N<sub>3</sub>= محلول پاشی با نیتریک اکسید ۲ میلی مولار

نیز به طور محسوس کاهش یافته و ظرفیت فتوسنتزی کل کاهش می‌یابد که با کاهش تولید فرآورده‌های فتوسنتزی در شرایط تنش خشکی، رشد گیاه و در نهایت عملکرد گیاه کاهش می‌یابد (Ashraf & Foolad, 2007). کاربرد نیتریک اکسید در شرایط تنش خشکی روی ریحان توانست اثرهای نامطلوب تنش قطع آبیاری را به صورت معنی داری کاهش داده و اثرهای مثبت این ماده در بهبود

در گیاهان عالی تحت شرایط کمبود شدید آب، از طریق ایجاد وقفه در جریان آب از آوندهای چوبی به محیط اطراف سلول‌های در حال طویل شدن، به دلیل کاهش فشار تورمی می‌تواند مانع طویل شدن سلول گردد. در شرایط تنش خشکی، جذب مواد غذایی موجود در خاک کاهش یافته و رشد و نمو برگ‌ها محدود می‌شود. از این رو در اثر کاهش سطح برگ، جذب نور توسط گیاه

نتایج این تحقیق نشان داد که کاربرد نیتریک اکسید و به‌ویژه غلظت ۲ میلی‌مولار این ماده در شرایط تنش خشکی از کاهش میزان کلروفیل جلوگیری کرد. نتایج این تحقیق با گزارش‌های ارائه شده گوجه‌فرنگی در ایجاد پایداری کلروفیل توسط نیتریک اکسید مطابقت دارد (Nasibi, 2011). همچنین گزارش شده در حضور نیتریک اکسید دسترسی گیاه به آهن بیشتر است و این عامل نیز می‌تواند سبب حفظ محتوای کلروفیل شود (Neill et al., 2003). تأثیر نیتریک اکسید در پایداری کلروفیل در شرایط تنش خشکی مربوط به دفاع آنتی‌اکسیدانی و جلوگیری از تخریب کلروفیل توسط رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شود، زیرا رادیکال‌های آزاد اکسیژن در شرایط تنش باعث خسارت و شکستن رنگرزه‌های فتوسنتزی و پروتئین‌های ساختاری دستگاه فتوسنتزی می‌شوند (Kim & Lee, 2005; Laspina et al., 2005). در این مطالعه محتوای کاروتنوئیدها در گیاهان بیمار شده با نیتریک اکسید بیشتر از عدم کاربرد آن در شرایط تنش بود. کاروتنوئیدها نه فقط الکترونها را جذب و انتقال می‌دهند، بلکه در خنثی‌سازی اکسیژن منفرد، آنیون سوپراکسید و دیگر رادیکال‌های آزاد دخیل بوده و احتمالاً به محافظت از گیاه بر علیه صدمات اکسیداسیون نوری کمک می‌کنند (Yang et al., 2010).

در این پژوهش با افزایش تنش خشکی محتوای نسبی آب برگ به‌شدت کاهش پیدا کرد. از محتوای نسبی آب به منزله شاخصی مناسب از وضعیت آب برگ‌ها یاد می‌شود که کاهش آن سبب تغییر در غشای یاخته‌ای و در نتیجه افزایش نشت الکترولیتی از یاخته‌ها می‌شود (Izadi et al., 2009). تحت شرایط تنش خشکی، روزنه‌ها به‌سرعت بسته شده و در صورت تداوم این شرایط، رشد گیاه متوقف شده و جذب و تحلیل خالص  $CO_2$  کاهش می‌یابد. دلیل این کاهش از یک سو کم‌شدن ذخیره  $CO_2$  سلول‌های مزوفیل برگ و از سوی دیگر، کاهش فعالیت آنزیم ریبولوز بی‌فسفات کربوکسیلاز در برگ‌ها تحت تنش است (Bertamini et al., 2006). کاربرد نیتریک اکسید در این آزمایش سبب بهبود

رشد در شرایط تنش شدید به میزان قابل توجهی بیشتر از آبیاری کامل بود. اثرهای سدیم نیتروپروکساید بر افزایش تحمل به خشکی در ماریتیغال (*Silybium marianum*(L)) (Zangani et al., 2017) و چمن چچم چندساله (*Lolium perenne* L.) (Mohammadi et al., 2017) نیز گزارش شده است. مطالعات نشان می‌دهد که برخی اثرهای محافظتی نیتریک اکسید برای گیاهان تحت تنش خشکی از طریق دفاع آنتی‌اکسیدانی علیه تنش‌های اکسیداتیو (Farooq et al., 2009)، تحریک بستن روزنه‌ها و کاهش تعرق و هدایت روزنه‌ای (Neill et al., 2008) و افزایش فعالیت آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز (Tan et al., 2008) می‌باشد. همچنین نیتریک اکسید با تغییر خاصیت کشسانی دیواره سلولی و افزایش سیالیّت غشاها منجر به بهبود رشد گیاه می‌شود (Tian & Lei, 2006).

نتایج این تحقیق نشان داد که در شرایط محدودیت میزان رنگرزه‌های فتوسنتزی از جمله کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل کاهش یافت. کاهش محتوای کلروفیل یک پدیده عمومی مشاهده شده تحت تنش خشکی در بسیاری از گیاهان می‌باشد (Mishra & Singh, 2010; Din et al., 2011; Keshavarz Afshar et al., 2016). تنش خشکی در گیاهان باعث پیری زودرس برگ، شکسته شدن کلروپلاست‌ها، تخریب غشای تیلاکوئید کلروپلاست و اکسیداسیون نوری کلروفیل می‌گردد. گونه‌های اکسیژن واکنشگر با تخریب کمپلکس پروتئینی رنگدانه‌های a و b و همچنین افزایش فعالیت آنزیم کلروفیل‌از سبب ایجاد تنش اکسیداتیو لیبیدها و پروتئین‌های کلروپلاست می‌شوند. کاهش میزان کلروفیل برگ در اثر تنش خشکی، باعث کاهش کارایی فتوسنتز می‌شود (Izadi et al., 2009; Kim & Lee, 2005). از سوی دیگر تنش خشکی منجر به افزایش غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد مانند اسید آبسزیک و اتیلن می‌شود که تحریک‌کننده آنزیم کلروفیل‌از هستند که این آنزیم نیز موجب تجزیه کلروفیل می‌شود (Orabi et al., 2010).

سدیم نیتروپروساید روی چمن چچم چندساله در شرایط تنش خشکی تولید پرولین را در گیاهان تیمار شده نسبت به گیاهان تیمار نشده به طور معنی داری افزایش داد (Mohammadi *et al.*, 2017). پیرولین ۵- کربوکسیلات سنتتاز (P5CS) آنزیم کلیدی در بیوسنتز پرولین است که فعالیت آن با تیمار سدیم نیترو پروساید افزایش می یابد (Tian & Lei, 2006). مطالعات نشان می دهد که نیتریک اکسید برخی اثرهای محافظتی مرتبط با دفاع آنتی اکسیدانی را برای گیاهان تحت تنش خشکی ایجاد می کند (Farooq *et al.*, 2009). زیرا رادیکال های آزاد اکسیژن اصلی ترین عاملی هستند که در شرایط تنش باعث خسارت و شکستن رنگیزه های فتوسنتزی و پروتئین های ساختاری دستگاه فتوسنتزی می شوند (Kim & Lee, 2005). محلول پاشی این ترکیب نفوذپذیری غشاء، نشت الکترولیت ها و همچنین میزان H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> موجود در برگ را کاهش داده است (Neill *et al.*, 2008).

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که با افزایش تنش خشکی میزان درصد اسانس افزایش و عملکرد اسانس کاهش یافت. تنش خشکی باعث افزایش ترکیب های غالب در اسانس ریحان شامل متیل کایوکول، لینالول و ژرانیال شد و بیشترین مقدار آنها در گیاهان در شرایط قطع آبیاری در ابتدای گلدهی حاصل شد. اثر تنش خشکی در افزایش متابولیت های ثانویه در ریحان، مرزه (Khalid, 2006)، آویشن (*Thymus vulgaris* L.) (Bahreininejad *et al.*, 2014)، همیشه بهار (*Calendula officinalis* L.) (Taherkhani *et al.*, 2011) و ماریتیغال (*Silybum marianum* L.) (Vazque, 2010) گزارش شده است. در گیاهان دارویی یکی از کاربردهای مؤثر القای خشکی، افزایش کیفیت در گیاهان یا افزایش مواد مؤثره می باشد (Selmar & Kleinwächter, 2013). البته اگرچه محتوای متابولیت های ثانویه در برخی از گیاهان دارویی ممکن است تحت تنش خشکی افزایش نشان دهد، اما عملکرد ماده مؤثره تولیدی در شرایط تنش کاهش می یابد که این می تواند ناشی از کاهش معنی دار رشد در اثر تنش خشکی باشد.

محتوای نسبی رطوبت برگ ریحان گردید که این یافته ها با نتایج سایر تحقیقات نیز سازگاری دارد. کاربرد غلظت ۱۵۰ میکرومولار سدیم نیتروپروساید نیز روی گیاه گوجه فرنگی موجب افزایش محتوای نسبی آب برگ گردید (Nasibi & Kalantari, 2009). همچنین کاربرد ۱۰۰ میکرومولار سدیم نیتروپروساید سبب بهبود محتوای نسبی آب برگ در برنج و جو شد (Gan *et al.*, 2015؛ Farooq *et al.*, 2009). کاربرد نیتریک اکسید در شرایط تنش خشکی با حفظ محتوای نسبی رطوبت برگ و کاهش رادیکال های آزاد سایر باعث بهبود رشد و عملکرد در گیاهان می شود (Tian & Lei, 2006). این ماده در شرایط تنش بستن روزنه ها را القاء کرده (Neill *et al.*, 2008)، در نتیجه تعرق و هدایت روزنه ای را کاهش می دهد (Farooq *et al.*, 2009) که این امر در حفظ محتوای آب برگ مؤثر می باشد.

نتایج این پژوهش نشان داد که تنش خشکی موجب افزایش میزان سنتز پرولین در گیاه ریحان گردید. گیاهان در مواجهه با تنش اسمزی ناشی از خشکی، طی فرایند تنظیم اسمزی اسمولیت های سازگاری مانند پرولین را انباشت می کنند که این فرایند سبب برقراری تورژسانس سلولی می گردد. پرولین به عنوان یک اسید آمینه چند منظوره در پاسخ به تنش غیرزیستی اثرهای حفاظتی بر ماکرومولکول های موجود در سلول هایی دارد که آب خود را از دست داده اند (Farooq *et al.*, 2009). حتی افزایش ۳ تا ۳۰۰ برابری غلظت پرولین در گونه های مختلف و در پاسخ به سطوح متفاوت تنش اسمزی گزارش گردیده است (Mahajan & Tuteja, 2005). تجمع پرولین در اثر تنش خشکی در نتیجه سنتز پرولین در بافت های مختلف، ممانعت از اکسیداسیون پرولین و جلوگیری از شرکت پرولین در ساخت پروتئین ها می باشد. پرولین بر حلالیت پروتئین های مختلف اثر می گذارد و مانع تجزیه آنها می گردد (Farooq *et al.*, 2009). همچنین محلول پاشی با نیتریک اکسید با افزایش میزان پرولین در گیاهان تحت شرایط تنش خشکی باعث ایجاد مقاومت شد. کاربرد ۴۰۰ و ۶۰۰ میکرومولار

- Ashiri, F., Khoskhai, M., Saharkhiz, M., Firouzi, O. and Javidnia, K., 2010. Effects of water deficit stress on morphological characteristics, chlorophyll and proline contents and antioxidant activity of garden thyme (*Thymus vulgaris* L.). Iranian Journal of Horticultural Science and Technology, 11: 163-174.
- Ashraf, M. and Foolad, M.R., 2007. Roles of glycine, betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. Environmental and Experimental Botany, 59: 206-216.
- Bahreininejad, B., Razmjoo, J. and Mirza, M., 2014. Effect of water stress on productivity and essential oil content and composition of *Thymus carmanicus*. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 17(5): 717-725.
- Bannayan, M., Nadjafi, F., Azizi, M., Tabrizi, L. and Rastgoo, M., 2008. Yield and seed quality of *Plantago ovata* and *Nigella sativa* under different irrigation treatments. Industrial Crops and Products, 27: 11-16.
- Bates, L.S., Waldern, R.P. and Teare, I.D., 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant and Soil, 39(1): 205-207.
- Bertamini, M., Zulini, L., Muthuchelian, K. and Nedunchezian, N., 2006. Effects of water deficit on photosynthetic and other physiological responses in grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Riesling) plants. Photosynthetica, 44: 151-154.
- Bettaieb, I., Knioua, S., Hamrouni, I., Limam, F. and Marzouk, B., 2011. Water deficit impact on fatty acid and essential oil composition and antioxidant activities of Cumin (*Cuminum cyminum* L.) aerial parts. Journal of Agriculture and Food, 59: 328-334.
- Chalchat, J.C. and Ozcan, M.M., 2008. Comparative essential oil composition of flowers, leaves and stems of basil (*Ocimum basilicum* L.) used as herb. Food Chemistry, 110: 501-503.
- De Ridder, N. and Van Keulen, H., 1995. Estimating biomass through transfer functions based on a simulation model results: a case study for Sahel. Agricultural Water Management, 28: 57-71.
- Devnarain, N., Crampton, B.G., Chikwamba, R., Becker, J.V.W. and O'Kennedy, M.M., 2016. Physiological responses of selected African sorghum landraces to progressive water stress and re-watering. South African Journal of Botany, 103: 61-69.
- Din, J., Khan, S.U., Ali, I. and Gurmani, A.R., 2011. Physiology and agronomic response of canola varieties to drought stress. Journal of Animal and Plant Science, 21: 78-82.
- Esmailpour, B., Hadian, J. and Jalilvand, P., 2013. Effects of drought stress and mycorrhiza on morpho-

شاید بتوان درصد بالای اسانس برای برخی ترکیب‌های غالب در ریحان را با کاهش سطح برگ و متعاقب آن افزایش تراکم غده‌های ترشح‌کننده اسانس توجیه کرد (Bannayan *et al.*, 2008). فرضیه موازنه رشد بیان می‌دارد که هر کمبودی که رشد را بیش از فتوسنتز محدود کند تولید و تجمع متابولیت‌های ثانویه را افزایش می‌دهد. در برخی از گیاهان دارویی، تنش خشکی درصد تولیدات ثانویه را افزایش می‌دهد، زیرا در اثر تنش، به دلیل کاهش رشد، تثبیت کربن در طی فتوسنتز صرف تولید متابولیت‌های ثانویه شده و افزایش این مواد سبب جلوگیری از اکسیداسیون درون سلول‌ها می‌گردد (Selmar & Kleinwächter, 2013) که نتایج تحقیقات انجام شده در مورد گیاهان مختلف دارویی نیز مؤید این مطلب است که با اعمال تنش خشکی و کاهش آب آبیاری درصد اسانس افزایش می‌یابد (Abreu & Mazzafera, 2005).

کاربرد نیتریک اکسید با کاهش گونه‌های اکسیژن واکنشگر و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، سرعت فتوسنتز را افزایش و با کاهش بسته شدن روزنه‌ها کارایی مصرف آب را بالا برده، در نتیجه مواد فتوسنتزی سیمیلات بیشتری را صرف تولید متابولیت‌های ثانویه می‌کند (Hendawy *et al.*, 2013)؛ که این امر موجب افزایش عملکرد اسانس در این گیاه در شرایط تنش خشکی شده است.

### منابع مورد استفاده

- Abreu, I.N. and Mazzafera P., 2005. Effect of water and temperature stress on the content of active constituents of *Hypericum brasiliense* Choisy. Plant Physiology and Biochemistry, 43: 241-248.
- Aliabadi Farahani, H., Valadabadi, S.A., Daneshian, J. and Khalvati, M.A., 2009. Evaluation changing of essential oil of balm (*Melissa officinalis* L.) under water deficit stress conditions. Journal of Medical Plant Research. 3: 329-333.
- Arnon, D.I., 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts, polyphenoloxidases in *Beta vulgaris*. Plant Physiology, 24: 1-15.

- photosystem II after photooxidative treatment of rice leaves. *Plant Science*, 168: 1115-1125.
- Klimankova, E., Holadova, K., Hajslova, J., Cajka, T., Poustka, J. and Koudela, M., 2008. Aroma profiles of five basil (*Ocimum basilicum* L.) cultivars grown under conventional and organic conditions. *Food Chemistry*, 107: 464-472.
  - Laribi, B., Bettaieb, I., Kouki, K., Sahli, A., Mougou, A. and Marzouk, B., 2009. Water deficit effects on caraway (*Carum carvi* L.) growth, essential oil and fatty acid composition. *Industrial crop products*, 30: 372-379.
  - Laspina, N.V., Groppa, M.D., Tomaro, M.L. and Benavides, M.P., 2005. Nitric oxide protects sunflower leaves against Cd-induced oxidative stress. *Plant Science*, 169: 323-330.
  - Lotfi, M., Abbaszadeh, B. and Mirza, M., 2014. The effect of drought stress on morphology, proline content and soluble carbohydrates of tarragon (*Artemisia dracunculus* L.). *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 30: 19-29.
  - Mahajan, S. and Tuteja, N., 2005. Cold, salinity and drought stress: an overview. *Archive Biochemistry and Biophysic*, 444: 139-158.
  - Mishra, A.K. and Singh, V.P., 2010. A review of drought concepts. *Journal of Hydrology*, 391(1): 202-216.
  - Misra, A.N., Misra, M. and Singh, R., 2011. Nitric oxide ameliorates stress responses in plants. *Plant Soil and Environment*, 57(3): 95-100.
  - Mohammadi, R., Arghavani, M., Mortazavi, S.N. and Aelaei, M., 2017. The effect of sodium nitroprusside on drought tolerance of perennial ryegrass in germination and early seedling growth stage. *Agricultural Crop Management*, 19: 335-346.
  - Nasibi, F. and Kalantari, K.M., 2009. Influence of nitric oxide in protection of tomato seedling against oxidative stress induced by osmotic stress. *Acta Physiologica Plantarum*, 31:1037-1044.
  - Nasibi, F., 2011. Effect of different concentrations of sodium nitroprusside (SNP) pretreatment on oxidative damages induced by drought stress in tomato plant. *Iranian Journal of Plant Biology*, 3(9): 63-74.
  - Neill, S., Barros, R., Bright, J., Desikan, R., Hancock, J., Harrison, J., Morris, P., Rieeiro, D. and Wilson, I., 2008. Nitric oxide, stomatal closure and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany*, 59: 165-176.
  - Neill, S., Desikan, R. and Hancock, J., 2003. Nitric oxide signalling in plants. *New Phytologists*, 159: 11-35.
  - Nooshkam, A., Majnoun Hoseini, N., Hadian, J., Jahansooz, M. and Khavazi, K., 2014. The effects of physiological and yield of summer savory (*Satureja hortensis* L.). *Journal of Agroecology*, 5: 169-177.
  - Farooq, M., Basra, S.M.A., Wahid, A. and Rehman, H., 2009. Exogenously applied nitric oxide enhances the drought tolerance in fine grain aromatic rice. *Journal of Agronomy & Crop Science*, 195: 254-261.
  - Frohlich, A. and Durner, J., 2011. The hunt for plant nitric oxide synthase (NOS): is one really needed? *Plant Science*, 181: 401-404.
  - Gan, L., Wu, X. and Zhong, Y., 2015. Exogenously applied nitric oxide enhances the drought tolerance in hullless barley. *Plant Production Science*, 18: 52-56.
  - Hayat, S., Yadav, S., Wani, A., Irfan, M., and Ahmad, A., 2011. Nitric Oxide Effects on Photosynthetic Rate, Growth and Antioxidant Activity in Tomato. *International journal of vegetable science*, 17: 333-348.
  - Hendawy, S.F., Hussein, M.S., Youssef, A.A. and EL-Mergawi, R.A., 2013. Response of *Silybum marianum* plant to irrigation intervals combined with fertilization. *Nusant Ara Bioscience*, 5: 22-29.
  - Hussain, M., Malik, M.A., Farooq, M., Ashraf, M.Y. and Cheema, M.A., 2008. Improving drought tolerance by exogenous application of glycinebetaine and salicylic acid in sunflower. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 194: 193-199.
  - Izadi, Z., Asnaashari, M. and Ahmadvand, G., 2009. Influence of drought tension on yield, proline contents, soluble sugars, chlorophyll, relative water contents and essential oil in peppermint (*Mentha piperita* L.). *Iranian Journal of Horticultural Science*, 10: 223-234.
  - Jaleel, C.A., Manivannan, P. and Wahid, A., 2009. Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. *International journal of Agriculture and Biology*, 11: 100-105.
  - Keshavarz Afshar, R., Hashemi, M., DaCosta, M., Spargo, J. and Sadeghpour, A., 2016. Biochar application and drought stress effect on physiological characteristics of *Silybum marianum*. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 47: 743-752.
  - Khalid, K.A., 2006. Influence of water stress on growth, essential oil and chemical composition of herbs (*Ocimum* sp.). *International Agrophysics*, 20: 289-296.
  - Kim, J.H. and Lee, C.H., 2005. In vivo deleterious effects specific to reactive oxygen species on

- Taherkhani, T., Rahmani, N., Moradi, A. and Zandi, P., 2011. Assessment of nitrogen levels on flower yield of *Calendula* grown under different waterdeficit stress using drought tolerant indices. *Journal of American Science*, 7(10): 591-598.
- Taiz, L. and Zeiger, E., 2006. *Plant Physiology*. 4th Ed., Sinauer Associates Inc. Publishers, Massachusetts, 580p.
- Tan, J., Zhao, H., Hong, J., Han, Y. and Zhao, W., 2008. Effects of exogenous nitric oxide on photosynthesis, antioxidant capacity and proline accumulation in wheat seedlings subjected to osmotic stress. *World Journal of Agricultural Sciences*, 4: 307-313.
- Tian, X. and Lei, Y., 2006. Nitric oxide treatment alleviates drought stress in wheat seedlings. *Biologia Plantarum*, 50: 775-778.
- Vazque, Z., 2010. Essential oil content and composition of *Silybum marianum* at different irrigation regimes. *Journal of Agronomy*, 10: 969-1002.
- Xiong, J., Zhang, L., Fu, G., Yang, Y., Zhu, C. and Tao, L., 2012. Drought-induced proline accumulation isuninvolved with increased nitric oxide, which alleviates drought stress by decreasing transpiration in rice. *Journal of Plant Research*, 125: 155-164.
- Yang, W., Sun, Y., Chen, S., Jlang, J., Chen, F., Fang, W. and Liu, Z., 2010. The effect of exogenously applied nitric oxide on photosynthesis and antioxidant activity in heat stressed chrysanthemum. *Biologia Plantarum*, 54: 1-4.
- Zangani, E., Zehtab Salmasi, S., Andalibi, B. and Zamani, A.A., 2017. Enhancement of drought stress tolerance in two genotypes of milk thistle (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.) byexogenous application of sodium nitroprusside. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 33: 636-648.
- irrigated and rainfed conditions on vegetative and essential oil yield of two medicinal species, *Satureja khuzistanica* Jamzad and *S. rechingeri* Jamzad in North of Khuzestan. *Electronic Journal of Crop Production*, 7: 61-75.
- Omidbaigi, O. and Mahmoudi Sourestani, M., 2010. Effect of drought stress on some morphological traits, amount and yield essential oil of Mexican flower (*Agastache foeniculum*). *Iranian Journal of Horticulture*, 41: 153-161.
- Orabi, S.A., Salman, S.R. and Shalaby, M.A., 2010. Increasing resistance to oxidative damage in cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants by exogenous application of salicylic acid and paclobutrazol. *Journal of agricultural science*, 6: 252-259.
- Redman, R., Haraldson, J.M. and Gusta, L., 1986. Leakage of UV-absorbing substances as a measure of salt injury in leaf tissue of woody spicies. *Physiologica Plantarum*, 67: 87-91.
- Ritchie, S. and Nguyen, H., 1990. Leaf water content and gas exchange parameters of two wheat genotype differing in drought resistance. *Crop science*, 30: 105-111.
- Safi-Khani, F., Heidari Sharif Abad, H., Siadat, S.A., Sharifi, Ashorabadi, E., Seyednejad, S.M. and Abaszadeh, B., 2006., Drought effects on yield and morphological traits of *Dracocephalum moldavica* L. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 36: 183-190.
- Sarath, G., Bethke, P.C., Jones, J., Baird, L.M., Hou, G. and Mitchell, R.B., 2006. Nitric oxide accelerates seed germination in warm-season grasses. *Planta*, 223(6): 1154-1164.
- Selmar, D. and Kleinwächter, M., 2013. Influencing the product quality by deliberately applying drought stress during the cultivation of medicinal plants. *Industrial Crops and Products*, 42: 558-566.

## Effects of nitric oxide on some morphophysiological and biochemical properties of basil (*Ocimum basilicum* L.) under drought stress conditions

B. Esmailpour<sup>1\*</sup>, H. Fatemi<sup>2</sup> and M. Moradi<sup>3</sup>

1\*- Corresponding author, Department of Horticultural Sciences, Mohaghegh Ardabili University, Ardabil, Iran  
E-mail: behsmaiel@yahoo.com

2- Ph.D. student, Department of Horticultural Sciences, Mohaghegh Ardabili University, Ardabil, Iran

3-M.Sc. student, Department of Horticultural Sciences, Mohaghegh Ardabili University, Ardabil, Iran

Received: January 2019

Revised: May 2019

Accepted: May 2019

### Abstract

Drought stress, as one of the most important abiotic stresses, plays an important role in decreasing the yield of medicinal plants. In order to investigate the effect of nitric oxide on morphophysiological and biochemical characteristics of basil (*Ocimum basilicum* L.), the native population "Shahre-ray", a factorial experiment was conducted in a completely randomized design under drought stress conditions with three replications in the research greenhouse of Mohaghegh Ardabili University in 2017. Experimental factors included drought stress at three levels of complete irrigation (drip irrigation at three-day intervals throughout the growing season) and complete stop of irrigation at early flowering stage (60 days after planting at 10-12 leaf stage) and 50% flowering (75 days after planting at 14-15 leaf stage) and nitric oxide spray with sodium nitroprusside at four concentration levels of zero (leaf spray with distilled water), 0.5, 1, and 2 mM. The foliar application was carried out from the eight-leaf stage of the plant, with intervals of two weeks to four times. Results showed that stopping irrigation at both mentioned growth stages significantly reduced plant height, plant dry weight, chlorophylls *a* and *b*, total chlorophyll, carotenoid, and relative water content, and significantly increased electrolyte leakage rate, leaf proline content, and essential oil percentage. Foliar application of 2 mM nitric oxide significantly increased plant growth under irrigation interruption, especially at 50% flowering. Increasing the concentration of nitric oxide produced the highest essential oil percentage (1.4%) at the early flowering stage under irrigation interruption conditions and significantly increased the content of essential oil components including methyl chavicol, linalool, geraniol, geraniol,  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene, and myrcene. In general, the results showed that foliar application of nitric oxide at 50% flowering stage under irrigation interruption improved the growth of basil and increased the percentage and components of essential oil via osmotic adjustment, preventing chlorophyll degradation and maintenance of leaf water content.

**Keywords:** Proline, chlorophyll, linalool, methyl-chavicol, electrolyte leakage.