The best time to measure the content of phenol , amino acids and photosynthetic pigments in response to foliar spraying of some chemical elicitors in lemongrass (*Cymbopogon citratus*)

Pages 53-67

L. Barahmandzadeh[1*], A.R. Abdali Mashhadi[2] and A. Poushdar[3]

1, 2 & 3) Department of Plant Production Engineering and Genetics, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.

*Corresponding author **: phd.l.berahmand@asnrukh.ac.ir**

Received date: 2024.10.01 **Accepted date: 2025.01.08**

Abstract

Lemon grass is one of the plants with essential oil of high economic value and many medicinal properties. This plant has phenolic and polyphenolic compounds, especially citral. To investigate the response of lemongrass to phenolic and amino acid chemical elicitors, a factorial experiment was conducted in the form of a completely randomized design with three replications in the research farm of the Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan in 2021. The first factor includes different concentrations of chemical elicitors (salicylic acid in concentrations of 0, 50, 100, 200, and 400 µM and tryptophan amino acid in concentrations of 0, 50, 100, 200, and 400 mg/l) and the second factor includes the day of the sample. Harvesting was (2, 4, 6, and 8 days after spraying). The interaction effect of treatment was significant on all parameters except chlorophyll a, and six days after foliar spraying were the best time for sampling and measuring chlorophyll a. To measure total chlorophyll, chlorophyll b, and carotenoids in low concentrations of salicylic acid application, the best time was on the eighth day, but with high concentrations of salicylic acid and tryptophan amino acid, the fourth day was at the best time. The phenolic compounds of the whole plant were only affected by the concentration of 100 µM salicylic acid on the second day and 100 and 400 mg/L tryptophan on the eighth day. The highest amount of total phenol was observed at the most prolonged time interval after the application of tryptophan. The amino acid assay of the whole leaf also showed that the higher the concentration of the elicitors, the better the sampling, and the amino acid assay should be done in a longer time interval.

Keywords: biostimulants, Essential oil, Phenolic compounds, Salicylic acid, Tryptophan.

بهترین زمان سنجش محتوای فنل، اسیدهای آمینه و رنگیزه‌های فتوسنتزی در واکنش به محلول‌پاشی برخی از الیسیتورهای شیمیایی در علف‌لیمو (*Cymbopogon citratus*)

شماره صفحات
۵۳-۶۷

لیدا برهمندزاده[1*]، علیرضا ابدالی مشهدی[2] و عادل پشت‌دار[3]

۱، ۲ و ۳) گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران.

*. نویسنده مسئول: **phd.l.berahmand@asnrukh.ac.ir:**

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۷/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۰/۱۹

چکیده

علف‌لیمو از گیاهان دارای اسانس با ارزش اقتصادی بالا و خواص دارویی متعدد است. این گیاه دارای ترکیبات فنولی و پلی فنولی به‌ویژه سیترال است. برای بررسی پاسخ علف‌لیمو به الیسیتورهای شیمیایی فنولی و اسید آمینه‌ای، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار در مزرعه پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان در سال زراعی ۱۴۰۱- ۱۴۰۰ اجرا شد. عامل نخست آزمایش شامل غلظت‌های مختلف الیسیتورهای شیمیایی (اسید سالیسیلیک در غلظت‌های ۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکرومولار و اسید آمینه تریپتوفان در غلظت‌های ۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر) و عامل دوم آزمایش شامل روز نمونه‌برداری (۲، ۴، ۶ و ۸ روز پس از محلول‌پاشی) بود. بر اساس نتایج اثر متقابل تیمار بر تمام پارامترها به استثنای کلروفیل a معنی‌دار شد و شش روز پس از محلول‌پاشی بهترین زمان جهت نمونه‌برداری و سنجش کلروفیل a بود. برای سنجش کلروفیل کل، کلروفیل b و کاروتنوئیدها در غلظت‌های پایین کاربرد اسید سالیسیلیک بهترین زمان در روز هشتم بود اما غلظت‌های بالای کاربرد اسید سالیسیلیک و اسید آمینه تریپتوفان، روز چهارم بهترین زمان بود. ترکیبات فنولی کل گیاه تنها تحت تاثیر غلظت ۱۰۰ میکرومولار اسید سالیسیلیک در روز دوم و ۱۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر تریپتوفان در روز هشتم قرار گرفت. بیشترین میزان فنول کل در بیشترین فاصله زمانی از زمان کاربرد تریپتوفان مشاهده شد. سنجش اسید آمینه کل برگ نیز نشان داد که هرچه غلظت الیسیتورها بیشتر شود، نمونه‌برداری و سنجش اسید آمینه بهتر است در فاصله زمانی بیشتری صورت گیرد. به‌عنوان نتیجه‌گیری نهایی می‌توان بیان کرد روز مناسب سنجش پارامترهای مورد ارزیابی پس از محلول‌پاشی بستگی به ماهیت الیسیتور و غلظت آن دارد و از روند ثابتی پیروی نمی‌کند.

واژه‌های کلیدی: اسید سالیسیلیک، اسانس، تحریک‌کننده‌های زیستی، ترکیبات فنولی، تریپتوفان.

مقدمه

گیاهان دارویی، گیاه یا بخشی از یک گیاه است که به دلیل داشتن ویژگی‌های دارویی، عطری یا ادویه‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرند (Mirjalili, 2021). اثرات گیاهان دارویی از قدیم الایام شناخته و در طب سنتی برای درمان بیماری‌ها مورد استفاده قرار گرفته و ترکیبات و مواد فعال موجود در آنها شناسایی شده است (Talebi *et al*., 2022). یکی از گیاهان دارویی که دارای ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی می‌باشد، علف‌لیمواست. علف‌لیمو (*Cymbopogon citratus* DC. Stapf) گیاهی چندساله و متعلق به خانواده گندمیان و بومی جنوب شرق آسیا (کشورهای سریلانکا و هند) می‌باشد (Mirzaei *et al*., 2020). علف‌لیمو به‌صورت توده‌های متراکم رشد می‌کند. ارتفاع آن تا ۱/۸ متر و قطر تاج پوشش آن به حدود ۱/۲ متر می‌رسد. این گیاه دارای ساقه‌ای بلند و برگ‌های خشن، باریک و دراز که در صورت شکسته شدن بوی خوبی از آن‌ها متصاعد می‌شود. معمولاً تمام قسمت‌های علف‌لیمو (ریشه، ساقه و برگ) مورد استفاده قرار می‌گیرد (Alizadeh *et al*., 2023). علف‌لیمو یکی از گراس‌های معطر با ترکیبات پلی‌فنولی ارزشمند است که کاربردهای بسیاری در صنایع دارویی، آرایشی و بهداشتی دارد. از این‌رو عواملی که موجب افزایش مجموع ترکیبات این گیاه گردد، همواره مورد توجه پژوهشگران و تولیدکنندگان بوده است (Sani Khani *et al*., 2021). یکی از مهم‌ترین راهکارها برای افزایش و بهبود میزان متابولیت‌های دارویی در گیاهان استفاده از محرک‌های زیستی است؛ که از منابع طبیعی و زیستی منشاء می‌گیرند و در مقادیر کم می‌توانند رشد و نمو گیاه را بهبود بخشند. این ترکیبات کارایی عناصر غذایی و یا ویژگی‌های ساختاری و عملکردی خاک را بهبود داده و بدین ترتیب رشد گیاه را افزایش می‌دهند (Hakimi *et al*., 2019). اسیدهای آمینه یکی از محرک‌های زیستی معروف هستند که اثرات متعددی از جمله، افزایش عملکرد کیفی و کمی گیاه، کاهش قابل ملاحظه صدمات ناشی از تنش‌های غیرزیستی، تاثیر مستقیم یا غیرمستقیم بر فعالیت‌های فیزیولوژیکی گیاهان و همچنین انجام فعالیت‌های متابولیسمی، ساختاری و مبادلاتی دارند (Aminifard *et al*., 2020). وضعیت نیتروژن گیاه و به‌خصوص مخزن‌های اسیدآمینه ارتباط نزدیکی با فعالیت فتوسنتزی آن دارد. نقش ویژه‌ای توسط تریپتوفان ایفا می‌شود که پیش ماده اکسین است؛ هورمونی که مسئول میزان طویل شدن ساقه و ریشه، افزایش جوانه‌های برگ و فعالیت آنزیم‌ها می‌باشد (Saremi *et al*., 2021). از دیگر ترکیبات محرک گیاهان، اسید سالیسیلیک (SA) است؛ که به‌عنوان تنظیم‌کننده فرآیندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مانند تجمع رنگدانه، فتوسنتز، فعالیت آنزیمی، جذب مواد مغذی عمل می‌کند و باعث افزایش تجمع متابولیت‌های ثانویه در گیاهان می‌شود (Ali and atrakchii, 2022). مطالعات متعدد نشان داده است که کاربرد اسید سالیسیلیک باعث افزایش محتوای رنگدانه‌های فتوسنتزی و ایجاد مقاومت در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی، در گیاه می‌شود (Sajed gollojeh *et al*., 2020). از این رو، بررسی کاربرد برخی از الیسیتورها که احتمال دارد بتوانند بر سنتز تعدادی از متابولیت‌ها مؤثر باشند موضوعی جذاب است. در این راستا، برای بررسی بهترین تأثیر غلظت‌های اسید سالیسیلیک و اسید آمینه بر روند تغییر برخی از خصوصیات بیوشیمیایی علف‌لیمو این تحقیق طراحی گردید.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در سال زراعی ۱۴۰۱- ۱۴۰۰ در مزرعه پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان واقع در ۳۶ کیلومتری شمال شرقی شهرستان اهواز با عرض جغرافیایی ۳۱ درجه و ۳۶ دقیقه، طول جغرافیایی ۴۸ درجه و ۵۳ دقیقه و ۲۲ متر ارتفاع از سطح دریا اجرا شد. محل اجرای آزمایش از نظر اقلیمی جزء مناطق خشک و نیمه خشک محسوب می‌شود. آزمایش به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل غلظت‌های مختلف الیسیتورهای شیمیایی (اسید سالیسیلیک در غلظت‌های ۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکرومول و اسید آمینه تریپتوفان در غلظت‌های (۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر) و روز نمونه‌برداری (۲، ۴، ۶ و ۸ روز پس از محلول‌پاشی) بود. قبل از انجام عملیات خاک‌ورزی در زمین محل اجرای آزمایش عملیات ماخار (آبیاری قبل از کاشت) با هدف تحریک جوانه‌زنی بذر علف‌های هرز مدفون شده در خاک و سبز شدن به منظور کنترل مطلوب‌تر آن‌ها و تامین رطوبت مناسب جهت انجام عملیات شخم صورت گرفت. بعد از آبیاری و رسیدن رطوبت به حد ظرفیت مزرعه (گاوروشدن)، زمین توسط گاوآهن برگردان‌دار شخم و بعد از زدن دو دیسک عمودبرهم و خرد شدن کلوخه‌ها، کرت‌بندی انجام شد. هر کرت شامل شش خط به طول سه فاصله بین کرت‌ها نیم متر در نظر گرفته شد. فاصله خطوط کشت از یکدیگر ۶۰ سانتی‌متر و فاصله بین بوته‌ها روی خط کشت ۴۰ سانتی‌متر بود. کاشت در اول اسفند ۱۴۰۰ انجام گرفت. کشت گیاه به‌صورت نشاکاری با استفاده از نشاء علف‌لیمو ارسالی از شرکت زرگیاه اجرا گردید. اسید آمینه و اسید سالیسیلیک مورد استفاده در این آزمایش از شرکت مرک آلمان تهیه و استفاده شد. تهیه هر غلظت در آزمایشگاه گیاهان دارویی گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی صورت گرفت. جهت اعمال تیمارها در مرحله پوشش کامل سایه انداز (۸۰ روز بعد از کشت گیاه)، از هر غلظت در هنگام غروب محلول پاشی با استفاده از سمپاش دستی و به میزان یک لیتر در هر مترمربع صورت گرفت. در خطوط شاهد از آب مقطر جهت محلول پاشی استفاده گردید. محلول‌پاشی در یک مرحله و نمونه‌برداری در چهار مرحله (۲، ۴، ۶ و ۸ روز پس از محلول‌پاشی) بلافاصله پس از اعمال محلول‌پاشی غلظت‌ها و هر روز از سه بوته مشخص در هر کرت صورت گرفت. نمونه‌ها شامل نمونه‌های برگی از برگ‌های بالغ بود. جهت اندازه‌گیری میزان کلروفیل، نمونه‌های برگی پس از روی یخ گذاری به آزمایشگاه منتقل و بر اساس روش معرفی شده توسط Arnon (1949) کلروفیل گیاه با استون استخراج و میزان جذب نور توسط عصاره استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Spekol 2000 شرکت Analytic Jena) در طول موج ۶۶۳ و ۶۴۵ نانومتر تعیین گردید. بدین صورت که از برگ‌های هر تیمار ۱ گرم جدا و درون هاون چینی توسط ۱۰ میلی لیتر استون ۸۰ درصد له شده، سپس در فالکون‌های ۱۰ میلی‌لیتر قرار گرفتند. پس از ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ در دور ۶۰۰۰، روشناور جدا شده و پس از قرائت توسط دستگاه اسپکتروفتومتر غلظت کلروفیل از طریق رابطه‌های ۱ تا ۴ به‌دست آمد.

رابطه ۱: $A_{\text{کلروفیل}} = [۱۲/۷ (\text{جذب در} ۶۶۳nm) - ۲/۶۹ (\text{جذب در} ۶۴۵nm)] \times v / (۱۰۰۰ \times w)$

رابطه ۲: کلروفیل b= [۲۲/۹ (جذب در۶۴۵nm) – ۴/۶۹ (جذب در۶۶۳nm)] v / (۱۰۰۰×w)

رابطه ۳: کلروفیل کل= [۲۰/۲ (جذب در۶۴۵nm) + ۸/۰۲ (جذب در۶۶۳nm)] v / (۱۰۰۰×w)

رابطه۴: کاروتنوئیدها= (۱۰۰۰ A۱-۴۷۰/۸ Cla - ۸۵/۰۲ Clb)/۱۹۸

در این روابط v حجم نمونه استخراج شده و w وزن تر نمونه است (Ashraf, 1994). میزان فنول کل براساس روش رنگ‌سنجی فولین-سیوکالتیو اندازه‌گیری شد. برای عصاره‌گیری ۱ گرم وزن خشک اندام در ۱۰ میلی لیتر اتانول خالص ۹۶٪ عصاره‌گیری گردید. به ۰/۲ میلی‌لیتر از عصاره گیاهی یا محلول‌های استاندارد (اسید گالیک) ۱/۸ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۲ میلی‌لیتر معرف فولین- سیوکالتیو رقیق (۱:۱۰ v/v) اضافه شد. بعد از ۵ دقیقه، با افزودن ۳ میلی‌لیتر از محلول ۷/۵ ٪ کربنات سدیم، حجم محلول واکنش با آب مقطر به ۵ میلی‌لیتر رسانیده و بعد از ۹۰ دقیقه نگهداری در دمای آزمایشگاه، جذب آن‌ها در طول موج ۷۵۰ نانومتر تعیین گردید. مقدار فنول کل نیز از روی منحنی استاندارد بر حسب میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشک محاسبه شد (Maizura *et al*., 2011). برای اسید آمینه کل مقدار ۱ گرم بافت خشک شده برگ با ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ ٪ در هاون چینی له شد و سپس عصاره در میکروتیوب ریخته و به‌مدت ۱۰ دقیقه و با سرعت ۳۰۰۰ دور در ثانیه سانتریفیوژ گردید. به ۱۰۰ میکرولیتر عصاره ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر و ۲ میلی‌لیتر محلول ناین هیدرین اضافه شد. میکروتیوب‌ها در بن ماری قرار گرفت و ۲ میلی‌لیتر الکل ۵ ٪ به آن‌ها اضافه گردید. محلول خنک شد و جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۷۵ نانومتر قرائت شد. برای تهیه محلول استاندارد از گلایسین و اسید استیک استفاده و میزان اسید آمینه آزاد کل براساس میلی‌گرم در گرم وزن خشک بافت محاسبه گردید (Ravindranth, 1981).

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس نشان داد الیسیتورها در روزهای مختلف اثر متفاوتی بر خصوصیات فیزیولوژیک علف‌لیمو به استثنای کلروفیل a دارند (جدول ۱). همچنین اثر اصلی الیسیتورها بر کلروفیل a، b، کاروتنوئیدها و فنول کل برگ علف‌لیمو تاثیر بسیار معنی‌داری داشتند ($P < ۰/۰۱$). اثر روز پس از محلول‌پاشی نیز بر کلیه پارامترهای فیزیولوژیک ذکر شده اثر معنی‌داری نشان داد (جدول ۱).

کلروفیل a

بر اساس نتایج تجزیه واریانس تنها اثر روز نمونه‌برداری بر میزان کلروفیل a معنی‌دار بود ($P < ۰/۰۱$). مقایسه میانگین میزان کلروفیل a نشان داد، بیشترین میزان تغییر در روز ششم پس از محلول‌پاشی (۷۷ درصد) و پس از آن روز چهارم و روز هشتم به ترتیب با ۷۲ و ۵۴ درصد نسبت به تغییرات میزان کلروفیل در روز دوم پس از محلول‌پاشی مشهود بود. بنابراین می‌توان بیان کرد که شش روز پس از محلول‌پاشی با الیسیتورهای مورد استفاده در این آزمایش میزان کلروفیل a در بالاترین میزان خود قرار گرفت (شکل ۱).

جدول ۱- تجزیه واریانس خصوصیات فیزیولوژیک علف‌لیمو در پاسخ به کاربرد الیسیتورهای شیمیایی در روزهای مختلف نمونه‌برداری

Table 1- Analysis of variance of physiological characteristics of Lemongrass in response to the application of chemical Elicitors on different sampling days

منبع تغییر Source of variation	درجه آزادی Degree Freedom	مجموع مربعات Means of square					
		کلروفیل a Chlorophyll a	کلروفیل b Chlorophyll b	کلروفیل‌کل Total Chlorophyll	کاروتنوئیدها Carotenoid	فنول کل Total phenol	اسید آمینه Amino acid
الیسیتور Elicitor	8	4.26 ns	0.17**	5.62 ns	0.69**	10.8**	19.7 ns
روز نمونه‌برداری Sampling day	3	34.2**	0.85**	38.8**	4.52**	1.52*	178**
الیسیتور × روز نمونه‌برداری Elicitor× Sampling day	24	13.4 ns	0.73**	25.6**	2.28**	24.7**	98.1**
خطا Error	72	31.1	0.33	32.4	2.12	14.2	103
ضریب تغییرات (٪) C.V(%)	-	23.6	14.3	20.7	15.0	4.27	4.33

ns ، * و ** به ترتیب عدم معنی‌داری و معنی‌داری در سطح احتمال خطای ۵ و ۱ درصد

ns, *, and **: non-significant, significant at 5 and 1% probability levels, respectively

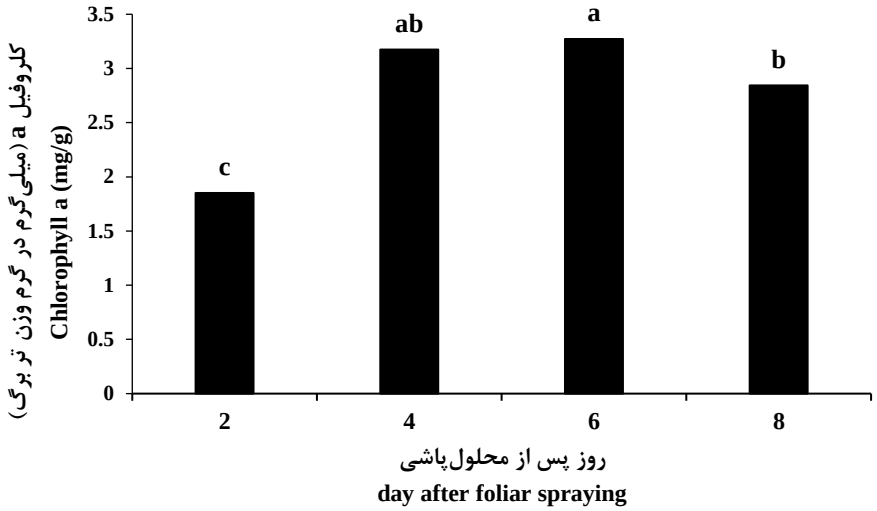
جدول ۲- برش‌دهی اثر متقابل پارامترهای فیزیولوژیک برگ علف‌لیمو در روزهای مختلف در هر سطح الیسیتور

Table 2- Intersectional effect of physiological parameters of Lemongrass leaves on different days at each Elicitor level

الیسیتور Eliciter	درجه آزادی Degree Freedom	مجموع مربعات Means of square				
		کلروفیل b Chlorophyll b	کلروفیل کل Total Chlorophyll	کاروتنوئیدها Carotenoid	فنول کل Total phenol	اسید آمینه Amino acid
عدم کاربرد 0	3	0.032 ns	4.65*	0.48**	0.35 ns	9.76 ns
۵۰ میکرومولار اسید سالیسیلیک 50 µmol Salicylic acid	3	0.075**	1.58 *	0.24*	0.74 ns	67.7**
۵۰ میلی‌گرم در لیتر تریپتوفان 50 mg/L Tryptophan	3	0.11**	4.79*	0.39**	0.11 ns	25.1**
۱۰۰ میکرومولار اسید سالیسیلیک 100 µmol Salicylic acid	3	0.22**	1.62 ns	0.44**	14.6**	14.7*
۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر تریپتوفان 100 mg/L Tryptophan	3	0.31**	17.4**	1.77**	3.2**	12.1*
۲۰۰ میکرومولار اسید سالیسیلیک 200 µmol Salicylic acid	3	0.24**	12.3**	1.237**	0.29 ns	44.8**
۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر تریپتوفان 200 mg/L Tryptophan	3	0.24**	10.66**	1.236**	0.40 ns	15.3*
۴۰۰ میکرومولار اسید سالیسیلیک 400 µmol Salicylic acid	3	0.032 ns	1.96 ns	0.01 ns	0.80 ns	53.4**
۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر تریپتوفان 400 mg/L Tryptophan	3	0.32**	9.35**	0.99**	5.70**	33.0**

ns ، * و ** به ترتیب عدم معنی‌داری و معنی‌داری در سطح احتمال خطای ۵ و ۱ درصد

ns, *, and **: non-significant, significant at 5 and 1% probability levels, respectively

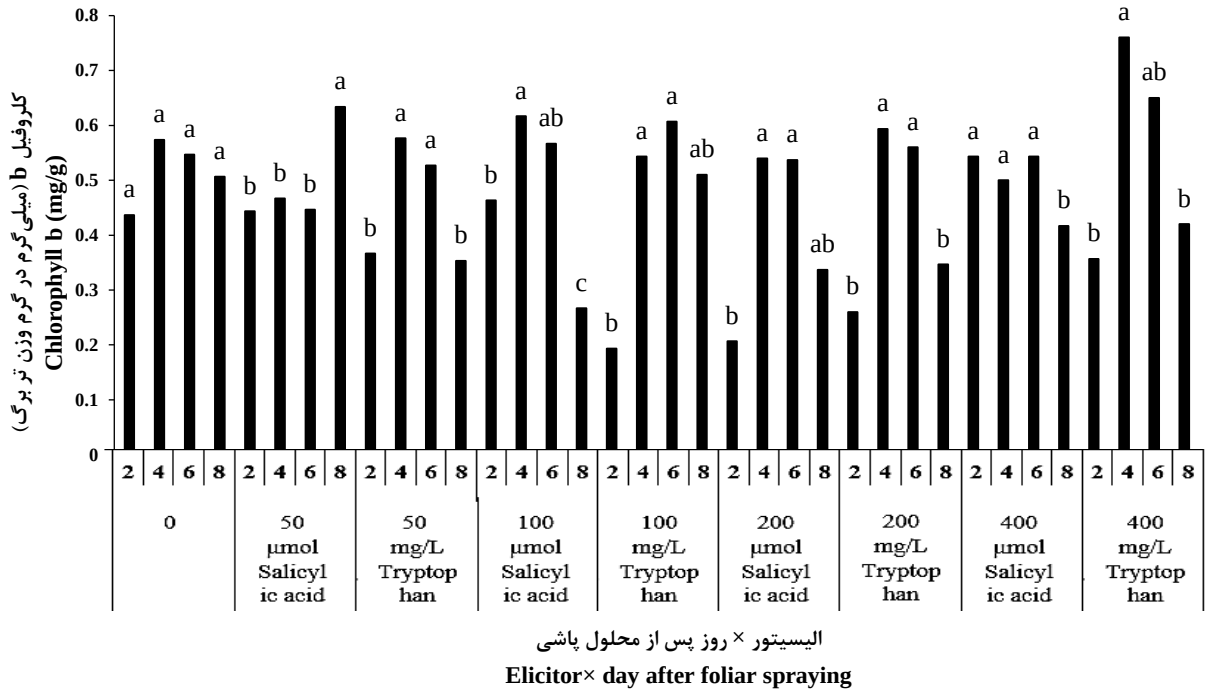


شکل ۱- تغییرات میزان کلروفیل a در روزها ی مختلف نمونه‌برداری پس از محلول‌پاشی با الیسیتورها

Figure 1- changes in Chlorophyll a levels on different sampling days after spraying with Elicitors

کلروفیل b

نتایج آنالیز واریانس نشان داد که کاربرد الیسیتورها در روزهای مختلف متفاوت بود (جدول ۱). با برش‌دهی اثر متقابل تیمارهای آزمایش (جدول ۲) مشخص شد که در شرایط عدم کاربرد الیسیتورها، میزان کلروفیلb در روزهای مختلف اندازه‌گیری تغییر معنی‌داری نداشت. اما با کاربرد الیسیتورها، روز نمونه‌برداری تاثیر معنی‌داری بر میزان کلروفیلb سنجش شده نشان داد. در خصوص کاربرد غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک مشخص شد در غلظت ۵۰ میکرومولار ۸ روز و در غلظت‌های بیشتر پس از شش روز فاصله از محلول‌پاشی بیشترین مقدار کلروفیلb سنجش شد (شکل ۲). در خصوص استفاده از اسید آمینه تریپتوفان مشخص شد که در اغلب غلظت‌ها، بهترین زمان نمونه‌برداری برای سنجش میزان کلروفیلb، چهار روز پس از محلول‌پاشی است. کلروفیل‌ها مهم‌ترین رنگدانه‌های جذب‌کننده نور در غشاهای تیلاکوئیدی هستند. میزان کلروفیل درگیاهان یکی از فاکتورهای موثر بر رشد گیاه و از مهم‌ترین شاخص‌های نشاندهنده فشارهای محیطی می‌باشد (Fahmideh *et al.*, 2020). در گزارشی در شرایط بدون تنش، کاربرد اسید سالیسیلیک باعث افزایش جزیی در میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی گردید اما اختلاف مشاهده شده معنی‌دار نبود، به‌طوری که تیمارهایی که کمترین میزان کلروفیل را داشتند، کمترین میزان عملکرد را نیز دارا بودند. اسید سالیسیلیک به‌عنوان یک پیام‌رسان منجر به بیان ژن‌های مسئول محافظت از گیاهان در برابر تنش‌های محیطی می‌گردد، از طرفی اسید سالیسیلیک با جلوگیری از فعالیت آنزیم‌های کلروفیل اکسیداز مانع تجزیه کلروفیل شده و از این طریق سبب افزایش در فتوسنتز می‌شود (Heidari *et al.*, 2019). به نظر می‌رسد افزایش کلروفیل در غلظت کم اسید سالیسیلیک می‌تواند به همین دلیل باشد.



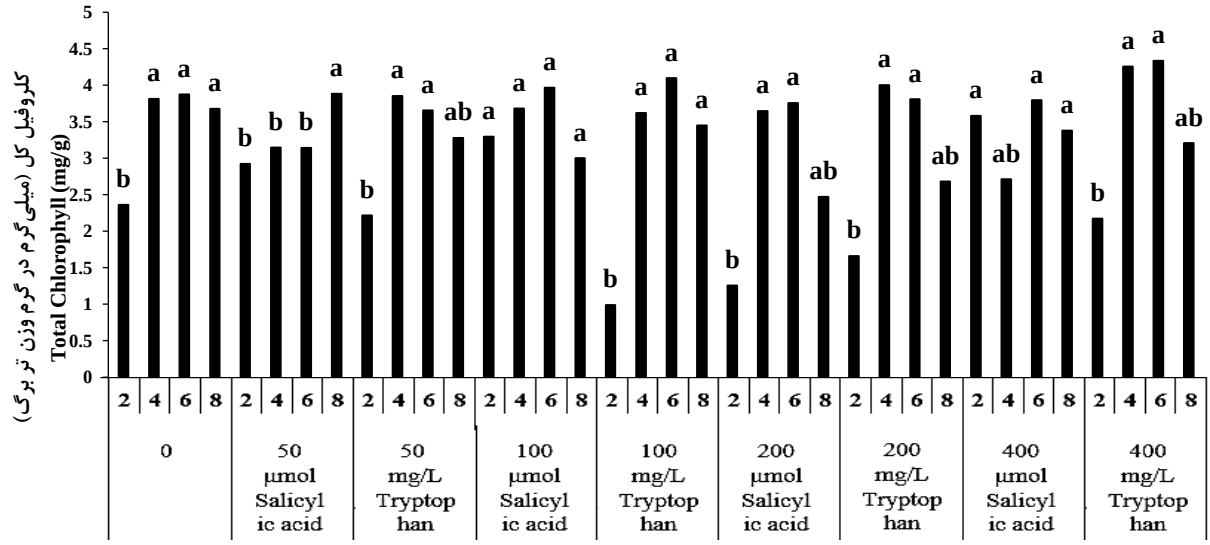
شکل ۲- تغییرات میزان کلروفیل b در روزهای مختلف نمونه‌برداری در غلظت‌های مختلف الیسیتورها

Figure 2- changes in Chlorophyll b levels on different sampling days at different concentrations of Elicitor

کلروفیل کل

نتایج این آزمایش نشان داد اثر متقابل الیسیتورها در روزهای نمونه‌برداری بر کلروفیل کل در سطح احتمال خطای ۱ درصد معنی‌دار شد (جدول ۱). با برش‌دهی اثر متقابل تیمارها مشخص شد که هر غلظت الیسیتور در روز مشخصی موجب افزایش میزان کلروفیل کل سنجش شده گردیده است و اندازه‌گیری میزان این پارامتر به نظر می‌رسد زودتر و یا دیرتر از زمان مناسب بوده است. بر اساس نتایج، در زمان عدم کاربرد الیسیتورها، تا دو روز پس از نمونه‌برداری میزان کلروفیل کل علف‌لیمو تغییر معنی‌داری نداشت. اما از روز چهارم تا هشتم میزان کلروفیل کل در بالاترین میزان بود (شکل ۳). با کاربرد غلظت‌های پایین الیسیتور اسید سالیسیلیک، در فاصله زمانی بیشتری از محلول‌پاشی مانند روز هشتم بیشترین میزان کلروفیل مشهود بود در حالی‌که با افزایش غلظت اسید سالیسیلیک، فاصله زمانی به چهار روز و شش روز کاهش یافته و اغلب شش روز پس از محلول‌پاشی بالاترین میزان کلروفیل کل سنجش شد. کاربرد غلظت‌های مختلف اسید آمینه تریپتوفان نیز نشان داد که در چهار و شش روز پس از محلول‌پاشی نسبت به روز دوم و هشتم بالاترین میزان کلروفیل کل اندازه‌گیری شد (شکل ۳). اسیدهای آمینه به‌عنوان بلوک‌های ساختمانی نیتروژن‌داری هستند که در سنتز پروتئین‌ها شرکت می‌کنند و موجب تحریک رشد سلول‌ها می‌شوند. نقش بافری آن‌ها به‌دلیل گروه‌های بازی و اسیدی آن‌ها در حفظ pH بهینه سلول نقش مهمی دارند. تریپتوفان نیز

به‌عنوان پیش ماده تولید اکسین مسئول افزایش سرعت رشد سلول‌ها است و منجر به افزایش توسعه برگ از طریق افزایش میزان کلروفیل‌ها و در نهایت فتوسنتز گیاه می‌شود و این امر کمیت و کیفیت محصول را ارتقا می‌بخشد (Sani Khani *et al*., 2021).



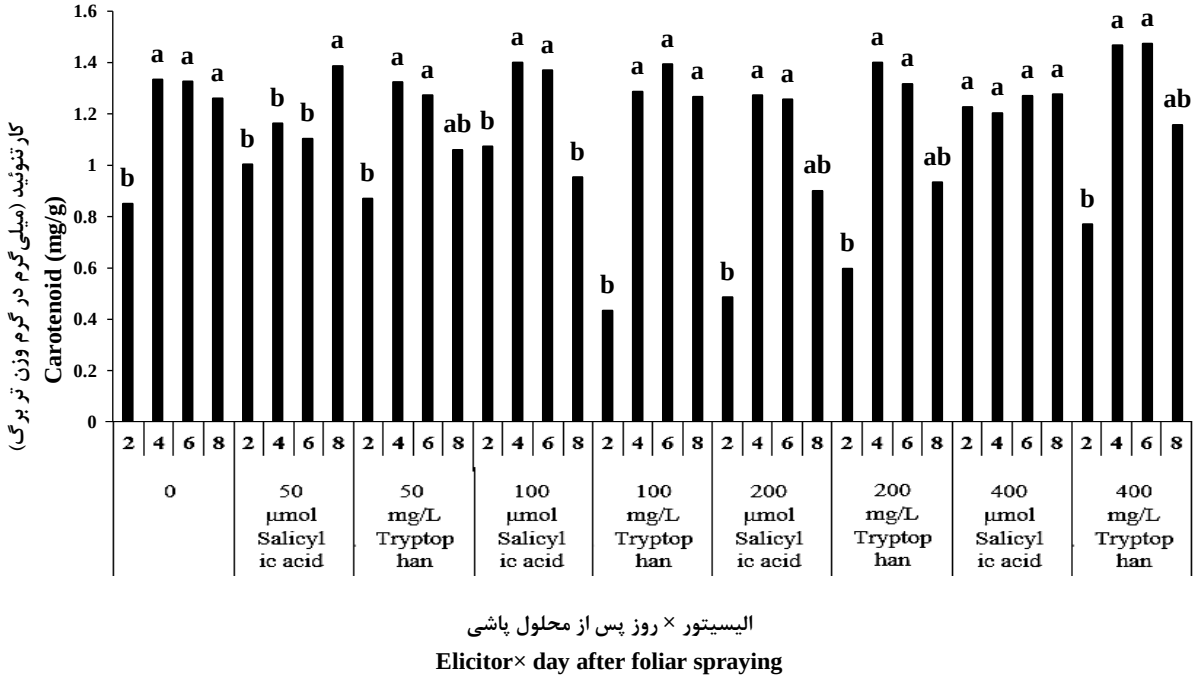
شکل ۳- تغییرات میزان کلروفیل کل در روزهای مختلف نمونه‌برداری در غلظت‌های مختلف الیسیتورها

Figure 3- changes in Total Chlorophyll content on different sampling days at different concentrations of Elicitors

کارتنوئید کل

اثر متقابل الیسیتورها در روز نمونه‌برداری پس از محلول‌پاشی بر میزان رنگدانه کارتنوئیدی بسیار معنی‌دار بود (جدول ۱). با برش‌دهی اثر متقابل مشخص شد که همانند میزان کلروفیل کل، بهترین زمان سنجش کاروتنوئیدها در زمان کاربرد الیسیتور اسید سالیسیلیک در غلظت ۵۰ میکرومولار در روز هشتم پس از محلول‌پاشی و در غلظت‌های بالاتر چهار و شش روز پس از محلول‌پاشی است (شکل ۳). در مورد الیسیتور اسید آمینه نیز چهار روز پس از محلول‌پاشی بهترین زمان اندازه‌گیری میزان کاروتنوئیدهای گیاه است (شکل ۴). اگرچه سنجش میزان این رنگدانه در روز ششم تفاوت آماری معنی‌داری با میزان آن در روز چهار در هیچ کدام از غلظت‌های اسید آمینه تریپتوفان نشان نداد. پژوهشگران گزارش کردند که محلول‌پاشی ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر تریپتوفان و فنیل آلانین می‌تواند موجب افزایش قابل توجه رنگدانه های فتوسنتزی در گیاه ایبریس (*Iberis amara* L.) شود (Sani Khani *et al*., 2021). اسیدهای آمینه در گیاهان به‌دلیل نقش مهارکنندگی از ساخت آنزیم‌های ضروری در سنتز اتیلن، به تولید رنگیزه‌های درون سلول نقش موثری دارند. از طرفی به دلیل مهار آنزیم پراکسیداز مانع از تخریب رنگدانه‌های سلول‌های گیاهی می‌شوند. در واقع اسیدهای آمینه از این طریق با کاهش فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک، غشای تیلاکوئیدی

را تحت تاثیر قرار داده و مانع تخریب رنگدانه‌های گیاهی توسط گونه‌های فعال اکسیژن می‌گردد (Saremi *et al*., 2021). به نظر می‌رسد نقش اسیدهای آمینه در ارتقاء عملکرد کمی و کیفی و بهبود پارامترهای فیزیولوژیک گیاه ناشی از تاثیر آن در مبارزه آنتی‌اکسیدانی و نیز حفظ تعادل یونی و در نهایت افزایش دسترسی به نیتروژن با توجه به ماهیت اسیدهای آمینه دانست (Siahmansour *et al*., 2020).



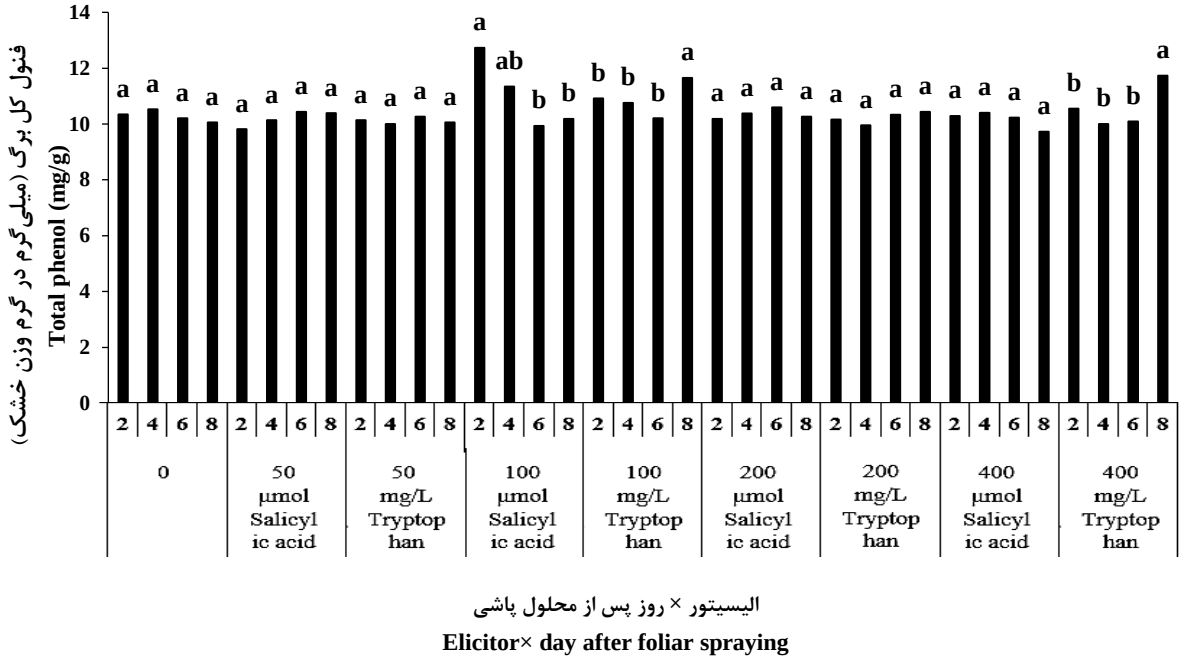
شکل ۴- تغییرات میزان کارتنوئید در روزهای مختلف نمونه‌برداری در غلظت‌های مختلف الیسیتورها

Figure 4- changes in Carotenoid levels on different sampling days at different concentrations of Elicitors

فنل کل برگ

علف‌لیمو یکی از گراس‌های معطر با ترکیبات پلی فنولی ارزشمندی همچون سیترال است که کاربردهای بسیاری در صنایع دارویی، آرایشی و بهداشتی دارد. از این رو عواملی که موجب افزایش مجموع ترکیبات فنولی این گیاه گردد، همواره مورد توجه پژوهشگران و تولیدکنندگان بوده است. ترکیبات فنولی گسترش وسیعی در گیاهان دارند و فرآیندهای بیولوژیکی بیشماری همچون سنتز انواع آنتی‌اکسیدان‌ها را کنترل می‌کنند (Sani Khani *et al*., 2021). نتایج آزمایش نشان داد با توجه به معنی‌دار شدن اثر متقابل تیمارهای آزمایش، کاربرد الیسیتورها تنها در دو غلظت الیسیتورها تاثیر بسیار معنی‌داری بر میزان فنل تام برگ داشت (جدول ۱). با توجه به نتایج جدول برش‌دهی، اسید سالیسیلیک به‌عنوان یک ترکیب فنولی با غلظت ۱۰۰ میکرومولار در روز دوم و الیسیتور تریپتوفان با غلظت‌های ۱۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر در روز هشتم اثر معنی‌داری در افزایش میزان فنل کل گیاه دارویی علف‌لیمو داشت (شکل ۵). اثر مثبت اسید سالیسیلیک بر میزان فنل گیاه سرخارگل (*Echinacea purpurea*

L.) مشخص شد (Darvizheh *et al*., 2019). تریپتوفان نیز در نقش پیش ماده طیف گسترده‌ای از متابولیت‌های ثانویه نظیر ترکیبات فنولی، آلکالوئیدی، فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها و تعداد زیادی از ترکیبات موثره در سلول‌های گیاهی، همواره مورد استفاده کشاورزان و محققان قرار گرفته است (Saremi *et al*., 2021).



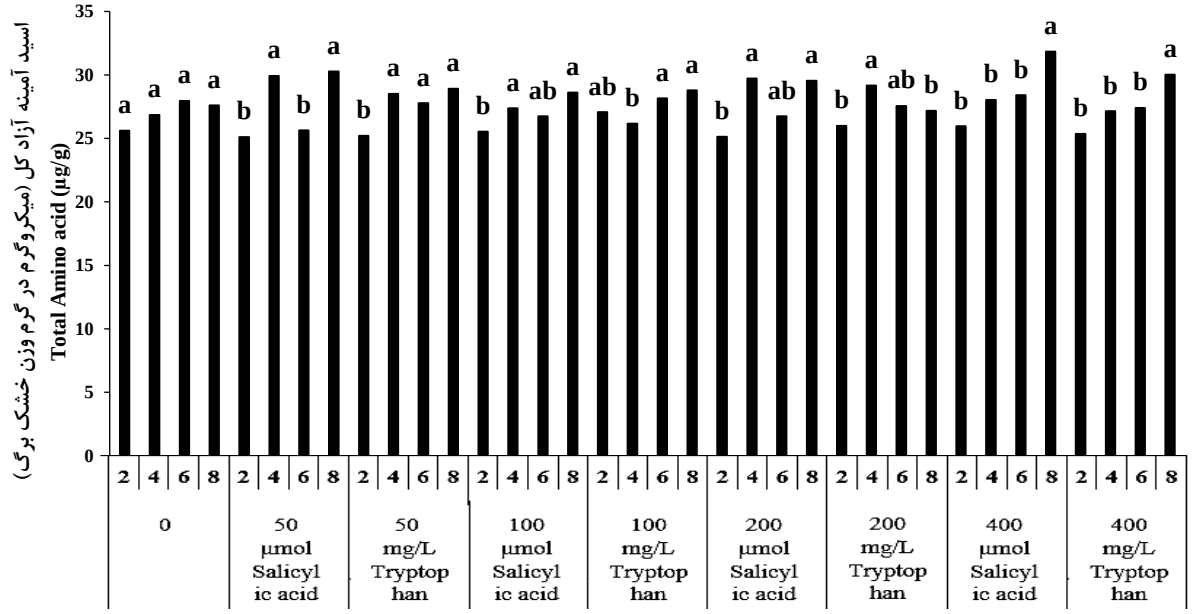
شکل ۵- تغییرات میزان فنول کل در روزهای مختلف نمونه‌برداری در غلظت‌های مختلف الیسیتورها

Figure 5- changes in Total phenol levels on different sampling days at different concentrations of Elicitors

اسید آمینه کل

بر اساس نتایج تجزیه واریانس و برش‌دهی اثر متقابل تیمارها (جدول ۱) اثر متقابل تیمارها در شرایط معنی‌دار بود که در صورت عدم کاربرد الیسیتورها، اختلاف آماری در میزان اسید آمینه کل برگ در روزهای مختلف مشاهده نشد. اما با محلول‌پاشی ۵۰ میکرومولار اسید سالیسیلیک و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر اسید آمینه تریپتوفان، در روز چهارم و هشتم بالاترین میزان اسید آمینه سنجش شد. با افزایش غلظت هر دو الیسیتور به ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار اسید سالیسیلیک و ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر تریپتوفان، مشخص شد که بهترین روز برای سنجش میزان اسید آمینه کل برگ گیاه در روز چهارم پس از محلول‌پاشی بود که نسبت به سایر روزها اختلاف آماری معنی‌داری داشتند (شکل ۶). اما با افزایش غلظت هر دو الیسیتور اسید سالیسیلیک و تریپتوفان به ترتیب به ۴۰۰ میکرومولار و ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر، بهترین نتیجه در اندازه‌گیری میزان اسید آمینه کل را هشت روز پس از محلول‌پاشی می‌توان مشاهده کرد. اسیدهای آمینه نقش موثری در تولید ترکیبات آلی مانند اسیدهای آمینه،

پروتئین‌ها، آنزیم‌ها، پورین‌ها، آمین‌ها، پیریمیدین‌ها، آلکالوئیدها و ویتامین‌ها دارند (Saremi *et al*., 2021). محلول‌پاشی اسیدهای آمینه می‌تواند با ممانعت از فعالیت گونه‌های فعال اکسیژن و رادیکال‌های آزاد، موجب افزایش اسیدهای آلی و اسیدهای امینه درون سلول‌ها گردد (Danaee and Abdossi, 2019). همچنین در گزارشی روی گیاه دارویی هندوانه ابوجهل (*Citrullus colocynthis* .L) محلول‌پاشی اسید آمینه تریپتوفان تأثیر معنی‌داری بر عمده صفات مورفولوژیکی و فیزیولوژیک و تولید این محصول داشته است (Sani Khani *et al*., 2021).



شکل ۶- تغییرات میزان اسید آمینه کل در روزهای مختلف نمونه‌برداری در غلظت‌های مختلف الیسیتورها

Figure 6- changes in Total Amino acid levels on different sampling days at different concentrations of Elicitors

نتیجه‌گیری

نتایج آین آزمایش نشان داد که بهترین زمان برای نمونه‌برداری و اندازه‌گیری این قبیل پارامترهای فیزیولوژیک بسته به نوع الیسیتور و غلظت مورد استفاده در محلول‌پاشی متفاوت است. به‌طوری که زمانی که الیسیتور مورد استفاده اسید سالیسیلیک باشد، در غلظت‌های پایین آن مانند ۵۰ میلی‌مولار، زمان بیشتری برای انجام فرآیندهای فیزیولوژیک درون سلول‌های برگی نیاز بوده و در روز هشتم بهترین نتایج از نظر میزان رنگدانه‌ها مشاهده شد، اما با افزایش میزان غلظت این الیسیتور به ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکرومولار، روز چهارم و ششم پس از محلول‌پاشی زمان مناسب‌تری برای نمونه‌برداری و سنجش رنگدانه‌های برگ گیاه است. در خصوص کاربرد الیسیتور اسید آمینه تریپتوفان نتایج نشان داد که بهترین زمان نمونه‌برداری فارغ از غلظت الیسیتور

چهار و شش روز پس از محلول‌پاشی است. نتایج آزمایش همچنین نشان داد که میزان ترکیبات فنولی کل گیاه تحت تاثیر الیسیتورها در روزهای مختلف متفاوت بود. به‌طوری که تنها غلظت ۱۰۰ میکرومولار اسید سالیسیلیک و دو غلظت ۱۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر تریپتوفان در فاصله زمانی بیشتری از زمان محلول‌پاشی بر محتوی فنول کل گیاه اثر معنی‌داری نشان داد. این امر می‌تواند به این دلیل باشد که مدت زمان بیشتری جهت انجام فرآیندهای فیزیولوژیک منتج به سنتز و تجمع ترکیبات ثانوی فنولی در برگ باشد. اگرچه غلظت ۱۰۰ میکرومولار اسید سالیسیلیک در دومین روز پس از محلول‌پاشی اختلاف آماری بیشتری در میزان ترکیبات فنولی برگ نسبت روزهای دیگر داشت که می‌توان دلیل آن را ماهیت فنولی اسید سالیسیلیک دانست. در نهایت با اندازه‌گیری میزان اسید آمینه کل گیاه مشخص شد که هرچه غلظت الیسیتورها بیشتر شد، در فواصل زمانی بیشتری از محلول‌پاشی، مقادیر بالاتری از اسیدهای آمینه در گیاه تولید و در نهایت سنجش شد.

سپاسگزاری:

از دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان که در قالب طرح پژوهشی این امکان را فراهم کردند، قدردانی می‌شود.

منابع

Alizadeh, P., Sodaizadeh, H., Mosleh Arani, A., & Hakimzadeh, M. A. (2023). The effect of cultivation system on the morphological, physiological and biochemical characteristics of lemon grass (*Cymbopogon citratus*). *Journal of Arid Biome*, 13(1): 1-19. (In Persian). Doi:10.29252/ARIDBIOM.2023.20304.1938.

Ali, W.N., & Atrakchii, A. O. Al. (2022). Effect of Gibberellic, Salicylic Acids, and NPK Fertilizers on growth and chemical constituents of Rosemary plants (*Rosmarinus officinalis* L.). *Journal of Pharmaceutical Negative Results*, 1842-1850. Doi:10.47750/pnr.2022.13.S03. 281.

Arnon, DI. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Poly phenoloxidase in beta vulgaris. *Plant physiolojy,* 24: 1-15. Doi.org/10.1104%2Fpp.24.1.1.

Ashraf, M. (1994). Breeding for salinity tolerance in plants. Crit. Rev. *Plant Sci*, 13: 17-42. Doi.org/10.1007/978-3-642-30553-5_7.

Danaee, E., & Abdossi, V. (2019). Phytochemical and morphophysiological responses in basil (*Ocimum basilicum* L.) plant to application of polyamines. *Journal of Medicinal Plants*, 69 (18): 125-133. http://dorl.net/dor/20.1001.1.2717204.2019.18.69.15.6.

Darvizheh, H., darvizheh, M., & Abbaszadeh, B. (2019). Effects of Foliar Application of Salicylic Acid and Spermine on the Growth and Root Morphological Characteristics of Purple Coneflower (*Echinacea purpurea* L.) Under Drought Stress. *Plant Process and Function*, 8 (30): 225-242. (In Persian). URL: http://jispp.iut.ac.ir/article-1-936-fa.html.

Fahmideh, L., Ghaderi, A. A., Mazaraie, A., & Rajabi, A. (2020). The effect of salicylic acid on some morphological characteristics, photosynthetic pigments and antioxidant system activity of basil (*Ocimum basilicum* L.) under arsenic toxicity. *Environmental Stresses in Crop Sciences*, 13(1): 297-312. (In Persian). Doi: 10.22077/escs.2019.1841.1435.

Hakimi, L., Naiebzadeh, M., & Khaligi, A. (2019). Investigating the effect of glycine betaine and humi-forthi on morpho-physiological and biochemical properties Pelargonium graveolens under water stress. *Journal of Plant Production Research*, 26(3): 37-56. Doi.10.22069/jopp.2019.14987.2342.

Heidari, H., Alizadeh, Y., & Fazeli, A. (2019). Effects of seed priming and foliar application of salicylic acid on some of physiological characteristic and yield on mung bean (*Vigna radiata* L.) under drought stress condition. *Journal of Plant Production Research*, 26(2): 127-141. (In Persian). Doi: 10.22069/jopp.2019.14863.2327.

Maizura, M., Aminah, A., & Wan Aida, W. M. (2011). Total phenolic content and antioxidant activity of kesum (*Polygonum minus*), ginger (*Zingiber officinale*) and turmeric (*Curcuma longa*) extract. *International Food Research Journal*, 18(2): 529-534. https://www.researchgate.net/publication/28479146.

Masroor, M., Khan, A., Aftab, T., Naeem, M., & Hashmi, N. (2010). Salicylic acid-induced physiological and biochemical changes in lemongrass varieties under water stress. *Journal of Plant Interactions*, 5(4): 293-303. Doi.org/10.1080/17429145.2010.508566.

Mirjalili, S. A. (2021). Efficacy and safety in producing and using medicinal plants and herbal drugs. *Medical History Journal*, 12 (45): 1-15. (In Persian). https://Doi.org/10.22037/mhj.v12i45.29956.

Mirzaei, M., Ladan Moghadam, A., Hakimi, L., & Danaee, E. (2020). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) improve plant growth, antioxidant capacity, and essential oil properties of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) under water stress. *Iranian Journal of Plant Physiology*, 10: 3155-3166. Doi: 10.30495/IJPP.2020.672574.

Ravindranth, M. H. (1981). Manual Research Method for Crustacean Biochemistry and Physiology. *Special Publication*, 172p. http://eprints.cmfri.org.in/id/eprint/8186.

Siahmansour, S., Ehtesham-Nia, A., & Rezaeinejad, A. (2020). Effect of salicylic acid foliar application on Morphophysiological and biochemical traits of Goldenberry (*Physalis peruviana* L.) under salinity stress condition. *Journal of Plant Production Research*, 27(1):165-178. Doi.org/10.22069/jopp.2020.16087.2448.

Sani Khani, M., Akbari, A., & Khairi, A. (2021). The effect of phenylalanine and tryptophan on morphological and physiological traits of Abu Jahl watermelon (*Citrullus colocynthis* L.). *Journal of Plant Process and Function*, 35(9): 317-327. (In Persian). DOI: 20.1001.1.23222727.1399.9.35.5.6.

Sajed gollojeh, K., khomari, S., shekhzadeh, P., sabaghnia, N., & mohebodini, M. (2020). The effect of foliar spray of nano silicone and salicylic acid on physiological traits and seed yield of spring rapeseed at water limitation conditions. *Journal of Crop Production,* 12(4): 137-156. (In Persian). Doi: 10.22069/ejcp.2020.16396.2221.

Saremi, S., Gholipoor, M., Abbasdokht, H., Naghdi Badi, H., Mehrafarin, A., & Asghari, Hr. (2021). Phytochemical response of *physalis alkekengi* L. to foliar application of amino acids Eco-phytochemical *Journal of Medicinal Plants*, (2): 39-52. (In Persian). Doi.org/10.30495/ejmp.2021.694469.

Talebi, E., Jahromi, M. H., Nezhad, M. K., & Fard, E. R. H. (2022). Herbal plants as an appropriate stimulus with prophylactic potential in livestock: A review. *Safe Future & Agricultural Research Journal (SFAR Journal)*, 1(1): 11-19. Doi.10.22034/sfar.2022.158473.