نشریه علمی ـ پژوهشی اکوفیزیولوژی گیاهان زراعی، جلد دوازدهم، شماره ۲(۴۶)، تابستان ۱۳۹۷، صفحه ۳۱۶-۳۰۳

اثر سالیسیلیک اسید بر صفات مورفو- فیزیولوژیک به‌لیمو (*Lippia citriodora*) در شرایط مزرعه‌ای و درون‌شیشه‌ای

حسن نورافکن[1*]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۹ تاریخ بازنگری: ۱۳۹۶/۲/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۶/۷

چکیده

سالیسیلیک اسید یک ترکیب فنلی طبیعی و شبه‌هورمون بوده و غلظت‌های مختلف و مدت زمان تأثیرگذاری آن، کنش و واکنش‌های متعددی را در گیاه سبب می‌شود. در این راستا، دو آزمایش جداگانه به منظور بررسی اثر سالیسیلیک اسید بر صفات مورفو - فیزیولوژیک گیاه زینتی – دارویی به‌لیمو در شرایط درون شیشه‌ای و مزرعه‌ای در شهرستان میانه انجام شد. در شرایط کشت بافت، پنج غلظت صفر، ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید به محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) اضافه و اثر آنها بر شاخص‌های رشدی به‌لیمو مورد ارزیابی قرار گرفت. اثر سالیسیلیک اسید در شرایط کشت درون شیشه‌ای اختلاف آماری معنی‌داری در تمام صفات به جز در تعداد گره بلندترین ساقه، ارتفاع بوته و سیترال تولیدی نشان داد. همزمان با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید، تعداد برگ‌های کلروزه (زرد) ریزنمونه‌های به‌لیمو افزایش و درصد گیاهان سبز سالم و تعداد شاخه جانبی کاهش یافتند ولی در غلظت‌های کم، طول بلندترین شاخه، تعداد برگ و شاخص کلروفیل برگ افزایش یافت. همچنین، نقش مثبت سالیسیلیک اسید در افزایش وزن تر شاخساره ریزنمونه‌های کشت بافتی مشاهده شد. در شرایط مزرعه‌ای، اثر شش تیمار بدون محلول‌پاشی، محلول‌پاشی با آب مقطر و سالسیسلیک اسید در غلظت‌های ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۰ میکرومولار بر صفات مورفو-فیزیولوژیک به‌لیمو مورد ارزیابی قرار گرفت. اثر سالیسیلیک اسید اختلاف آماری معنی‌داری بین تیمارها در پهنای (عرض) برگ، تعداد گل‌آذین، وزن تر گل‌آذین، وزن تر برگ و طول بزرگ‌ترین گل‌آذین نشان داد. اثر منفی مصرف سالیسیلیک اسید در پهنای برگ، تعداد و وزن تر گل‌آذین دیده شد و برعکس، وزن تر برگ و طول گل‌آذین به‌خصوص در غلظت کم سالیسیلیک اسید افزایش پیدا کرد. بنابراین، استفاده از غلظت‌های کم سالیسیلیک اسید به خاطر داشتن اثر مثبت بر رشد اندام‌های مصرفی به لیمو در شرایط مزرعه‌ای و کشت بافتی قابل توصیه می‌باشد.

واژگان کلیدی: الیسیتور، برون شیشه‌ای، کشت بافت، محرک غیرزیستی، محلول‌پاشی.

۱- گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، واحد میانه، دانشگاه آزاد اسلامی، میانه، ایران.

* نگارنده‌ی مسئول hassannourafcan@gmail.com

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

گیاه به‌لیمو (*Lippia citriodora* H.B.K.) از تیره شاه‌پسند (Verbenaceae) بوده (Nourafcan and Ansari, 2017) و به عنوان یک گیاه دارویی، معطر و زینتی کشت می‌شود. این گیاه به‌علت داشتن خواص دارویی، زیبایی، عطر و طعم مطبوع آن کشت می‌شود. این گیاه بومی آمریکای جنوبی، شیلی، پرو و آرژانتین است. لیمونن، سیترال، ژرانیول، سزکوئی‌ترپن‌ها، وربنون، آلدهیدها و کتون‌ها از متابولیت‌های ثانویه این گیاه می‌باشد. مونوترپن‌های اکسیژنه، مهم‌ترین گروه ترکیبات فرار به‌لیمو بوده و ۶۰ درصد آن را سیترال تشکیل می‌دهد (Zargari, 1997؛ Ghaemi *et al*., 2006؛ Moaveni, 2009؛ Oladzad *et al*., 2012؛ Severin *et al*., 2006). اسانس به‌لیمو یکی از گران‌ترین و نایاب‌ترین اسانس‌ها در بازار به شمار می‌رود (Nourafcan *et al*., 2014). سیترال یک آلدئید مونوترپن ($C_{10}H_{16}O$) بوده و دارای دو ایزومر Z (نرال یا سیترال b) و E (ژرانیال یا سیترال a) می‌باشد (Tran-Thi *et al*., 2006). قسمت مورد استفاده به‌لیمو برگ‌های آن است. برگ‌ها و اندام رویشی به‌لیمو دارای خاصیت تب‌بر، مسکن، ضدنفخ و کمک کننده به هضم غذا می‌باشد. چای به‌لیمو فوق‌العاده آرام‌بخش و تسکین دهنده اعصاب است (Nourafcan *et al*., 2014؛ Nourafcan and Ansari, 2017).

کشت بافت گیاهی روش مؤثری است که می‌تواند جهت تکثیر غیرجنسی گیاه به صورت انبوه و عاری از آلودگی مورد استفاده قرار گیرد (Taheri Azizabadi *et al*., 2016). استفاده از فن‌آوری کشت بافت بزرگ‌ترین کاربرد بیوتکنولوژی محسوب می‌شود و مهم‌ترین مزیت این تکنولوژی برای گیاهان دارویی، ارائه یک منبع گیاهی مطمئن است که می‌تواند برای کشت بافت گیاه مورد نظر در مقیاس وسیع جهت استخراج ماده مؤثره از آن در سطح انبوه استفاده شود (Pashmforosh and Ahmadabadi, 2017). ازدیاد به‌لیمو از راه بذر به‌دلیل وجود پدیده دگرگشنی و تفرق ژنتیکی صفات در نتاج، مورد توجه نیست. افزایش این گیاه با قلمه یا خوابانیدن شاخه‌ها صورت می‌گیرد ولی شمار محدودی گیاه تولید می‌شود. با استفاده از کشت درون شیشه‌ای می‌توان نسبت به تولید انبوه و بدون آلودگی به‌لیمو اقدام کرد (Nourafcan and Ansari, 2017). استفاده از محرک‌ها، افزودن پیش‌سازها، بهینه‌سازی محیط کشت، کشت ریشه‌های مویین و مهندسی ژنتیک از جمله روش‌های مختلف افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت بافت گیاهی می‌باشند (Raoa and Ravishankar, 2002). محرک‌ها علامت‌هایی تولید می‌کنند که باعث تحریک تشکیل متابولیت‌های ثانویه می‌شوند. تحریک موجب سنتز یا افزایش سنتز متابولیت‌های ثانویه به‌وسیله گیاه به منظور بقاء، مقاومت و رقابت می‌شود (Rahimi Ashtiani *et al*., 2009). این محرک‌ها در شرایط طبیعی نیز بر گیاه اثر گذاشته و سبب تولید متابولیت خاصی می‌شوند (Mousavi *et al*., 2017).

محرک‌ها را می‌توان به محرک‌های فیزیکی یا شیمیایی با منشاء زیستی و غیرزیستی و یا درونی و بیرونی دسته‌بندی کرد که که می‌توانند پاسخ‌هایی را در گیاه القاء کرده و باعث تولید و تجمع متابولیت‌های ثانویه مشابه و جدید در سلول‌ها شوند (Raei *et al*., 2017). از جمله محرک‌های غیر زیستی می‌توان به جاسمونیک اسید و سالیسیلیک اسید اشاره کرد

Archive of SID

www.SID.ir

(Esmaeilzadeh Bahabadi and Sharifi, 2013). سالیسیلیک اسید یک ترکیب فنلی و شبه هورمونی است و نقش آن به عنوان یک مولکول علامتی در پاسخ‌های گیاهان به عوامل محیطی نشان داده شده است. تأثیر سالیسیلیک اسید بستگی زیادی به گونه، شرایط کاربرد و غلظت مصرف دارد (Habibi *et al*., 2015). این ماده بیان ژن‌های مرتبط با بیوسنتز و تولید تعداد زیادی از متابولیت‌های ثانویه گیاه را القاء کرده (Zangeneh *et al*., 2010) و باعث افزایش شاخص‌های رشد، ماده خشک و میزان اسانس گیاهان می‌شود (Gharib, 2006). کاربرد سالیسیلیک اسید فعالیت متابولیسم اولیه را در کالوس‌های داتوره تحریک کرده ولی بر تولید آتروپین اثری نداشت (Zangeneh *et al*., 2010). محلول‌پاشی سالیسیلیک اسید روی گیاه بابونه کبیر (*Tanacetum parthenium* L.) بر خصوصیات مورفولوژیک گیاه اثر گذاشته و میزان اسانس آن را افزایش داد (Najafiyan *et al*., 2009). گزارش‌هایی از اثر سالیسیلیک اسید بر افزایش عملکرد برخی گیاهان مانند سویا، لوبیا چشم‌بلبلی، ریحان و مرزنجوش و نخودفرنگی منتشر شده است (Nourafcan, 2014b). تیمار بذرهای فلفل با سالیسیلیک اسید و اسید سولفوسالیسیلیک در غلظت ۰/۱ میلی‌مولار نسبت به غلظت‌های ۱ و ۰/۰۱ میلی‌مولار بیشترین تأثیر را در افزایش تعداد برگ، ارتفاع دانهال، وزن تر و خشک گیاه داشت (Yadegari and Shakerian, 2014).

هدف از این آزمایش مطالعه اثر سالیسیلیک اسید در شرایط مزرعه‌ای و درون شیشه‌ای بر صفات مورفو - فیزیولوژیکی گیاه دارویی به‌لیمو و معرفی غلظت‌های مناسب مورد استفاده سالیسیلیک اسید بود.

مواد و روش‌ها

دو آزمایش جداگانه به‌منظور بررسی اثر سالیسیلیک اسید بر صفات مورفو - فیزیولوژیک به‌لیمو در شرایط درون شیشه‌ای و مزرعه‌ای بر پایه طرح بلوک کامل تصادفی در مزرعه تحقیقات گیاهان دارویی و آزمایشگاه کشت بافت دانشگاه آزاد اسلامی واحد میانه انجام شد. در شرایط مزرعه‌ای، محلول‌پاشی با اسید سالیسیلیک در چهار غلظت (۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۰ میکرومولار)، در کنار محلول‌پاشی با آب مقطر و بدون محلول‌پاشی انجام و در شرایط کشت بافت، پنج غلظت صفر (شاهد)، ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید به محیط کشت MS حاوی یک گرم بر لیتر زغال فعال (Oladzad *et al*., 2012) اضافه شد. نهال‌های پایه کشت بافتی از پژوهشکده گیاهان دارویی البرز تهیه و در مزرعه با فواصل ۰/۵ در ۱ متر کشت شدند. یک ماه پس از کاشت و اطمینان از استقرار نهال، هر تیمار شامل سه تکرار و هر تکرار شامل پنج گیاه بود. محلول‌پاشی در چهار نوبت و به فواصل هفت روزه اعمال شد. یک هفته پس از آخرین محلول‌پاشی، داده‌برداری و اندازه‌گیری صفاتی مانند ارتفاع گیاه، طول و عرض برگ، محتوای کلروفیل برگ با استفاده از دستگاه کلروفیل‌سنج (مدل SPAD 502, Minolta, Japan)، طول میانگره، تعداد گره و گل آذین، طول بزرگ‌ترین گل‌آذین، وزن تر برگ و گل‌آذین انجام گرفت.

در شرایط کشت بافت، پس از نگهداری تعدادی از گیاهان تهیه شده در شرایط گلخانه‌ای و حصول رشد مطلوب برای گیاهچه‌های مورد نظر، از جوانه‌های جانبی و سر شاخه‌ها به عنوان ریزنمونه جهت کشت درون شیشه‌ای استفاده شد. به این منظور، قطعه‌هایی از ساقه شامل برگ و

Archive of SID

www.SID.ir

جوانه جانبی در اندازه‌های پنج سانتی‌متری بریده شدند. پس از حذف برگ‌ها به گونه‌ای که آسیبی به جوانه‌های جانبی وارد نشود، ضدعفونی سطحی برای از بین بردن آلودگی‌های قارچی و باکتریایی با استفاده از الکل اتانول ۷۰ درصد و هیپوکلریت سدیم انجام شد. کلیه مراحل ضدعفونی و کشت در زیر هود لامینارایرفلو که از پیش با تابش نور UV و سپس با اتانول ضدعفونی شده بود، صورت گرفت. ریزنمونه‌ها به صورت تک گره در اندازه‌های حدود ۱/۵ سانتی‌متر برش داده و در زیر هود لامینارایرفلو درون شیشه‌های مخصوص کشت بافت، کاشته و در اتاقک رشد با دمای ۲±۲۳ درجه سلسیوس و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. هر تیمار شامل سه تکرار و هر تکرار شامل پنج واحد آزمایشی (بطری شیشه‌ای) بوده و در هر بطری شیشه‌ای سه عدد ریزنمونه بود. پس از دو ماه، تعداد شاخساره، طول بلندترین شاخساره، تعداد گره در بلندترین شاخساره، تعداد برگ، درصد بوته سالم، محتوای سبزینه (کلروفیل) برگ با استفاده از دستگاه کلروفیل‌سنج (مدل SPAD 502, Minolta, Japan)، وزن تر شاخساره، تعداد برگ کلروزه (زرد شده)، ارتفاع بـوته و سیترال ریزنمونه‌ها اندازه‌گیری شدند. به خاطر کم بودن ماده خشک اولیه، استخراج اسانس و اندازه‌گیری میزان سیترال از نمونه‌های کشت بافتی از حلال آلی (الکل اتیلیک مطلق) استفاده شد و با دستگاه اسپکتروفتومتر میزان جذب نور قرائت شد (Mohebalipour, 2011).

داده‌های حاصل از آزمایش‌های کشت بافتی و مزرعه‌ای با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS نسخه ۹/۱ تجزیه و مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن در سطح احتمال پنج درصد صورت گرفت.

نتایج و بحث

الف- کشت بافت

جدول تجزیه واریانس اثر سالیسیلیک اسید بر داده‌های مربوط به صفات مورد ارزیابی در شرایط کشت بافت نشان داد که بین تیمارها به جز در صفات تعداد گره بلندترین ساقه، ارتفاع بوته و سیترال در سطح احتمال یک درصد اختلاف آماری معنی‌داری وجود دارد (جدول ۱).

درصد گیاهان سالم: مقایسه میانگین‌ها (جدول ۲) نشان داد با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید، تعداد گیاهان سالم کاهش یافته و در غلظت ۲۰ میکرومولار کمترین درصد گیاهچه‌های سالم (۶۶ درصد) دیده شد.

تعداد شاخه: مقایسه میانگین‌ها (جدول ۲) نشان داد در بین تمام تیمارها، فقط بالاترین غلظت سالیسیلیک اسید (۲۰ میکرومولار) تفاوت آماری معنی‌داری با بقیه داشته و کمترین تعداد ساقه در آن تیمار مشاهده شد. مصرف سالیسیلیک اسید تعداد شاخساره جانبی نعناع فلفلی را افزایش داد (Nourafcan, 2014a) و با نتایج درون شیشه‌ای این پژوهش هماهنگ نیست. باید در نظر داشت که گزارش‌هایی دال بر تأثیر منفی سالیسیلیک اسید بر رشد گیاهان وجود دارد. در نتیجه همانند اثر سایر تنظیم کننده‌های رشد گیاه که بستگی زیادی به گونه و نیز تعادل هورمونی آن گونه دارد (Habibi *et al*., 2015) در این پژوهش نیز، باعث افزایش رشد نشد.

طول بلندترین شاخه: مقایسه میانگین‌ها (جدول ۲) نشان داد اگرچه با افزایش سالیسیلیک اسید، طول بلندترین شاخه افزایش می‌یابد و در تیمار ۵ میکرومولار به بالاترین میزان (۵۵/۵ میلی‌متر) می‌رسد ولی در بالاترین غلظت سالیسیلیک اسید کوتاه‌ترین طول شاخه دیده

Archive of SID

www.SID.ir

می‌شود. بسته به غلظت، گونه گیاهی، دوره‌ی رشدی و شرایط محیطی، سالیسیلیک اسید اثرات متفاوتی روی فرآیندهای مختلف فیزیولوژیکی نظیر شروع برخی فرآیندها و ممانعت برخی دیگر دارد (Shekari *et al*., 2010). سالیسیلیک اسید طویل شدن و تقسیم سلولی را به همراه مواد دیگری از جمله اکسین تنظیم می‌نماید (Eskandari Zanjani *et al*., 2013). در پژوهشی، رشد ریشه، اندام هوایی و ارتفاع گیاه سورگوم تحت تأثیر سالیسیلیک اسید افزایش قابل ملاحظه‌ای نشان داد (Kheirkhah *et al*., 2016). محلول‌پاشی شاخ و برگ مرزه، ریحان و مرزنگوش با سالیسیلیک اسید سبب افزایش ارتفاع گیاه، وزن تر و خشک، تعداد برگ و شاخه جانبی گردید (Nourafcan and Mahboubi, 2017).

تعداد برگ: مقایسه میانگین‌ها (جدول ۲) نشان داد مصرف سالیسیلیک اسید تا ۵ میکرومولار باعث افزایش تعداد برگ در ریزنمونه‌ها شد ولی با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید به ۱۰ و ۲۰ میکرومولار به شدت از تعداد برگ کاسته می‌شود. استفاده از سالیسیلیک اسید به صورت محلول‌پاشی برگی در خیار و ذرت، تعداد برگ را افزایش داد (Nourafcan and Mahboubi, 2017).

شاخص کلروفیل برگ: مقایسه میانگین‌ها (جدول ۲) نشان داد اگرچه با افزایش سالیسیلیک اسید شاخص کلروفیل برگ افزایش می‌یابد ولی در بالاترین غلظت سالیسیلیک اسید مقدار کلروفیل کاهش یافته و با شاهد در یک سطح آماری قرار می‌گیرد. کلروفیل‌ها، مولکول‌های ضروری هستند که مسئول دریافت انرژی خورشیدی در سیستم‌های فتوسنتزی هستند (Shekari *et al*., 2010). سالیسیلیک اسید تأثیر خود را بر فتوسنتز از طریق تأثیر بر فاکتورهای روزنه‌ای، رنگیزه‌ها و ساختار کلروپلاست و آنزیم‌های دخیل در مراحل فتوسنتز اعمال می‌کند. در گندم نیز سالیسیلیک اسید در غلظت‌های کم مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی را افزایش داد ولی غلظت‌های بالاتر میزان رنگیزه‌ها را کاهش داد. همچنین در پژوهش دیگری، محلول‌پاشی سالیسیلیک اسید، محتوای کلروفیل برگ گیاه کلزا را افزایش داد (Pasandi Pour *et al*., 2013). این یافته‌ها با نتایج این پژوهش هماهنگی دارد.

وزن تر شاخساره: مقایسه میانگین‌ها (جدول ۲) نشان داد محلول‌پاشی سالیسیلیک اسید وزن تر شاخساره را افزایش داد. با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید، ویژگی‌های رویشی مانند سطح برگ، وزن تر و خشک ذرت افزایش می‌یابد (Tohidi and Falahi, 2016). این اثر مثبت سالیسیلیک اسید را می‌توان به افزایش میزان فتوسنتز، تولید ماده خشک و نیز جذب بیشتر مواد معدنی توسط گیاه نسبت داد (Eshghi *et al*., 2017). کاربرد سالیسیلیک اسید وزن خشک اندام هوایی گندم و ذرت را افزایش داده است ولی سازوکار مشخصی برای آن ارایه نشده است (Eskandari Zanjani *et al*., 2013).

تعداد برگ کلروزه (زرد شده): مقایسه میانگین‌ها (جدول ۲) نشان داد با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید، تعداد برگ کلروزه ریزنمونه‌ها افزایش یافته و اثر منفی سالیسیلیک اسید در زردی برگ ریزنمونه‌ها مشخص است.

ب- مزرعه

جدول تجزیه واریانس اثر سالیسیلیک اسید بر داده‌های مربوط به صفات مورد ارزیابی در شرایط مزرعه نشان داد که بین تیمارها در عرض

Archive of SID

www.SID.ir

برگ، تعداد گل‌آذین، وزن گل‌آذین، طول بزرگترین گل‌آذین و وزن تر برگ اختلاف آماری معنی‌داری وجود دارد (جدول ۳).

عرض برگ: مقایسه میانگین (جدول ۴) نشان داد افزایش سالیسیلیک اسید اثر منفی بر عرض برگ داشت و کمترین غلظت سالیسیلیک اسید و محلول‌پاشی با آب مقطر عرض برگ بیشتری در مقایسه با غلظت‌های بالای سالیسیلیک اسید نشان داد و کمترین عرض برگ در تیمار ۱۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید مشاهده شد.

تعداد گل‌آذین: مقایسه میانگین (جدول ۴) نشان داد تیمار شاهد (بدون محلول‌پاشی) در مقایسه با محلول‌پاشی آب مقطر و سالیسیلیک اسید تعداد گل‌آذین بیشتری داشت و تیمارهای محلول‌پاشی از گلدهی به‌لیمو کاسته است. سالیسیلیک اسید در تنظیم فرآیندهای فیزیولوژیک در گیاهان نظیر رشد، فتوسنتز، متابولیسم نیترات، تولید اتیلن، تولید گرما و گلدهی و غیره نقش دارد (Eshghi *et al*., 2017). افزایش غلظت محلول‌پاشی سالیسیلیک اسید روی ذرت، موجب افزایش ویژگی‌های رویشی مانند سطح برگ، وزن تر و وزن خشک می‌شود و علت این افزایش، انتقال مواد فتوسنتزی از منبع به مقصد بیان شده است. اثرهای تحریکی سالیسیلیک اسید بر رشد می‌تواند به دلایل دیگری مانند افزایش میزان تقسیم در مناطق مریستمی و رشد سلولی و هورمون‌های گیاهی باشد که موجب افزایش رشد می‌شود (Tohidi and Falahi, 2016).

طول گل آذین: مقایسه میانگین (جدول ۴) نشان داد افزایش غلظت سالیسیلیک اسید باعث کاهش طول گل آذین حتی در مقایسه با شاهد شد و محلول‌پاشی با آب مقطر و کمترین غلظت سالیسیلیک اسید توانست طول گل‌آذین را افزایش دهد. اثرهای تحریکی سالیسیلیک اسید بر رشد می‌تواند به دلایلی مانند افزایش میزان تقسیم در مناطق مریستمی، و رشد سلولی و هورمون‌های گیاهی باشد که موجب افزایش رشد می‌شود (Tohidi and Falahi, 2016).

وزن تر برگ: مقایسه میانگین (جدول ۴) نشان داد نقش مثبت سالیسیلیک اسید در افزایش وزن تر برگ مشخص است ولی همزمان با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید از وزن تر برگ کاسته می‌شود. سالیسیلیک اسید با ایجاد شرایط مناسب از طریق افزایش محتوای آب نسبی، سرعت فتوسنتز، هدایت روزنه‌ای و محتوای کلروفیل برگ می‌تواند باعث افزایش عملکرد گیاه شود (Shekari *et al*., 2010). از طرفی، سالیسیلیک اسید باعث افزایش برخی مواد تنظیم کننده رشد گیاهی مانند اکسین و سیتوکینین شده و باعث بهبود رشد و افزایش فتوسنتز شده و در نتیجه روی عملکرد و اجزای عملکرد اثر می‌گذارد (Tohidi and Falahi, 2016). افزایش شاخص‌های رشدی ریحان و مرزنجوش با محلول‌پاشی سالیسیلیک اسید به اثبات رسیده است (Gharib, 2006).

وزن تر گل آذین: مقایسه میانگین (جدول ۴) نشان داد تمام تیمارهای محلول‌پاشی در مقایسه با شاهد، وزن تر گل‌آذین را کاهش دادند و اثر منفی سالیسیلیک اسید در وزن تر گل‌آذین مشهود بود.

نتیجه‌گیری کلی

اثر مثبت کاربرد سالیسیلیک اسید بر شاخص‌های رشدی به‌لیمو مانند طول و تعداد شاخساره و برگ، وزن تر شاخساره و برگ و اثر منفی بر اندام‌های زایشی گیاه مانند تعداد و وزن

Archive of SID

www.SID.ir

تر گل‌آذین از یک سو و اثر بهتر مصرف غلظت‌های پایین سالیسیلیک اسید در افزایش برگ و رشد اندام‌های مورد مصرف این گیاه در شرایط مزرعه‌ای و کشت بافتی، استفاده از غلظت‌های کم سالیسیلیک اسید به خاطر داشتن اثرات مثبت بر صفات مرتبط با برگ به‌لیمو قابل توصیه می‌باشد.

جدول ۱- جدول تجزیه واریانس اثر سالیسیلیک اسید بر شاخص‌های رشد ریزنمونه‌های به‌لیمو

Table 1- Variance analysis of salicylic acid on growth indices of lemon verbena explants

منبع تغییرات S.O.V.	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean of squares				
		درصد گیاهان سالم Normal plantlet percentage	تعداد شاخه جانبی Lateral shoots number	طول بلندترین شاخه Longest shoot length	تعداد گره در بلندترین شاخه Node number of longest shoot	تعداد برگ Leaf number
بلوک Block	2	9.6 ns	1.98*	8.5 ns	71 ns	4.9 ns
سالیسیلیک اسید SA	4	650**	2.2*	838**	47 ns	214**
خطا Error	8	9.6	0.33	24	64	3.7
ضریب تغییرات(%) C.V.		3.4	12.95	13.3	113.7	6.17

* و **: معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱٪ و ns : غیر معنی دار

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

ادامه جدول ۱

Table 1- Continued

منبع تغییرات S.O.V.	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean of squares				
		شاخص کلروفیل Chlorophyll content	وزن تر شاخساره Shoot fresh weight	ارتفاع بوته Plantlet height	تعداد برگ کلروزه Chlorotic leaf number	سیترال Citral
بلوک Block	2	0.82 ns	649*	34 ns	2.9 ns	0.0001 ns
سالیسیلیک اسید SA	4	40.2*	4413**	264 ns	108**	0.01 ns
خطا Error	8	8.8	107	149	2.3	0.02
ضریب تغییرات(%) C.V.		12.2	5.6	22.7	13.5	0.9

* و **: معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱٪ و ns : غیر معنی دار

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

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲- اثر سالیسیلیک اسید بر شاخص‌های رشد ریزنمونه‌های به‌لیمو

Table 2- Effect of salicylic acid on the growth indices of lemon verbena explants

سالیسیلیک اسید SA (µM)	گیاه سالم Normal plantlet (%)	تعداد شاخه جانبی Lateral shoots number	طول بلندترین شاخه Longest shoot length (mm)	تعداد برگ leaf number	شاخص کلروفیل Chlorophyll content (SPAD unit)	وزن تر شاخساره Shoot fresh weight (mg)	تعداد برگ کلروزه Chlorotic leaf number
0	100 a	5 a	27 b	33 b	22 b	124 c	5.6 c
2.5	100 a	5 a	32.9 b	36.7 a	21.8 b	207 a	8.2 c
5	100 a	4.9 a	55.5 a	38 a	30 a	213 a	8.2 c
10	92 b	4.2 a	52.2 a	31 b	26 ab	167 b	13.8 b
20	66 c	3 b	16 c	17 c	21.8 b	207 a	20.5 a

میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون در سطح احتمال ۵٪ با آزمون دانکن دارای اختلاف معنی‌دار نیستند

Means within a column followed by the same letter do not differ significantly significantly at P<0.05.

جدول۳- تجزیه واریانس اثر سالیسیلیک اسید بر شاخص‌های رشدی به لیمو در مزرعه

Table 3- Variance analysis of salicylic acid on growth indices of lemon verbena in the field

منبع تغییرات S.O.V.	درجه آزادی D.F.	میانگین مربعات Mean of squares				
		ارتفاع گیاه Plant height	طول برگ Leaf length	عرض برگ Leaf width	شاخص کلروفیل Chlorophyll content	طول میانگره Internode length
بلوک Block	3	298 ns	42.8 ns	3.79 ns	8.81 ns	7.15 ns
سالیسیلیک اسید SA	5	153 ns	79.96 ns	9.64*	5.31 ns	90.1 ns
خطا Error	15	186	53.1	2.53	3.89	38.1
ضریب تغییرات(%) C.V.		12.9	7.15	6.26	5.74	16.5

* و **: معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱٪ و ns : غیر معنی دار

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

ادامه جدول۳

Table 3- Continued

منبع تغییرات S.O.V.	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean of squares					
		تعداد گل آذین Inflorescence number	تعداد گره Node number	شاخص سطح برگ Leaf area index	طول گل آذین Inflorescence length	وزن تر برگ Leaf fresh weight	وزن تر گل آذین Inflorescence fresh weight
بلوک Block	3	9.4**	4 ns	20420156**	12.6*	168**	78.7 ns
سالیسیلیک اسید SA	5	3.7*	1.27 ns	1162205 ns	58.3**	3871**	8202**
خطا Error	15	1.11	1.67	987040	3.4	17.12	162.3
ضریب تغییرات(%) C.V.		13.75	13.36	17.74	9.47	8.28	13.15

* و **: معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱٪ و ns : غیر معنی دار

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

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۴- اثر سالیسیلیک اسید بر صفات اندازه گیری شده در مزرعه

Table 4- Effect of salicylic acid on growth indices of lemon verbena in the field

تیمار Treatment	عرض برگ Leaf width (mm)	تعداد گل آذین Inflorescence number	طول گل آذین Inflorescence length (cm)	وزن تر برگ leaf fresh weight (g)	وزن تر گل آذین Inflorescence fresh weight (g)
شاهد (بدون محلول‌پاشی) Control (no spray)	25.38 ab	8.75 a	19.63 c	9.75 d	172.8 a
آب مقطر Distilled water	27 a	6.75 b	23.5 a	13 d	125.15 b
سالیسیلیک اسید ۲/۵ میکرومولار SA 2.5 µM	27.25 a	7 b	22.75 ab	84.5 a	89.6 c
سالیسیلیک اسید ۵ میکرومولار SA 5 µM	25.38 ab	8.75 a	18.75 c	63.75 bc	80.6 cd
سالیسیلیک اسید ۱۰ میکرومولار SA 10 µM	23.38 b	6.75 b	20 bc	59 c	48.98 e
سالیسیلیک اسید ۲۰ میکرومولار SA 20 µM	24 b	8 ab	12.75 d	69.75 b	64.11 de

میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون در سطح احتمال ۵٪ با آزمون دانکن دارای اختلاف معنی‌دار نیستند

Means within a column followed by the same letter do not differ significantly at P<0.05.

Archive of SID

www.SID.ir

References منابع مورد استفاده

- Eshghi, S., S. Moharami, and B. Jamali. 2017. Effect of salicylic acid on growth, yield and fruit quality of strawberry cv. 'Paros' under salinity conditions. *Journal of Science and Technology of Greenhouse Culture*. 7(4): 163-174. (In Persian).
- Eskandari Zanjani, K., A.H. Shirani Rad, A. Moradi Agdam, and T. Taherkhani. 2013. Effect of salicylic acid application under salinity conditions on physiologic and morphologic characteristics of Artemisia (*Artemisia annua* L.). *Journal of Crop Ecophysiology*. 6(4): 415-428. (In Persian).
- Esmaeilzadeh Bahabadi, S., and M. Sharifi. 2013. Increasing the production of plant secondary metabolites using biotic elicitors. *Journal of Cell and Tissue*. 4(2): 119-128. (In Persian).
- Ghaemi, E., D. Khorshidi, A. Moradi, A. Seifi, M. Mazendrani, and M. Bazouri. 2006. The effect of ethanol extract of lemon verbena on the skin infection due to *Staphylococcus aureus* in an animal model. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*. 22(3): 242-249. (In Persian).
- Gharib, F.A.L. 2006. Effect of salicylic acid on the growth, metabolic activities and oil content of basil and marjoram. *International Journal of Agricultural and Biology*. 8(4):458-492.
- Habibi, G., Z. Sadeghipour, and R. Hajiboland. 2015. Effect of salicylic acid on tobacco (*Nicotiana rustica*) plant under drought conditions. *Iranian Journal of Plant Biology*. 7(25): 17-28. (In Persian).
- Kheirkhah, M., M. Farazi, A. Dadkhah, and A. Khoshnood. 2016. Application of glycine, tufool and salicylic acid in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) under drought conditions. *Journal of Crop Ecophysiology*. 10(1): 167-182. (In Persian).
- Moaveni, P. 2009. Medicinal plants. Islamic Azad University-Qods Branch Publication. 398 pp. (In Persian).
- Mohebalipour, N. 2011. Effect of growth regulators on the amount of citral of *Melissa officinalis* L. ecotypes in *in vitro* culture conditions and their genetic analysis using ISSR markers. Ph.D. Thesis. University of Tabriz. 166 pp.
- Mousavi, H., N. Mahdi Nezhad, B. Fakheri, M. Majdi, and F. Heidari. 2017. Effects of some nanoparticles on expression of germacrene A synthase (TpGAS) and parthenolide synthase (TpPTS) genes in *Tanacetum parthenium* L. under water deficit stress. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 33(2): 314-324. (In Persian).
- Najafiyan, S., M. Negahban, A. Tarakemeh, and S.M. Ghasemiyan. 2009. Effect of salicylic acid on some morphological and physiological characteristics of chamomile. 6th Iranian Horticultural Science Congress. Rasht. Iran. 1117-1119.
- Nourafcan, H. 2014a. Effect of salicylic acid on salinity stress tolerance improvement of peppermint (*Mentha piperita* L.) in greenhouse conditions. *Agroecology Journal* (*Modern Science of Sustainable Agriculture Journal*). 10(2(2)): 85-95. (In Persian).

Archive of SID

www.SID.ir

- Nourafcan, H. 2014b. Elicitors, precursors and culture medium components effects on some growth characteristics, citral percentage and antimicrobial activity of essential oil of lemon verbena (*Lippia citriodora* H.B.K.) *in vitro* and greenhouse conditions. Ph.D. Thesis. Islamic Azad University - Science and Research Branch, Tehran. 172 pp.
- Nourafcan, H., and A. Mahboubi. 2017. The effect of salicylic acid foliar spraying on morphophysiological characteristics of *Common mallow* and *Moldavian balm*. *Agroecology Journal*. 13(3): 25-33. (In Persian).
- Nourafcan, H., and F. Ansari. 2017. The effect of MS and B_5 media on growth indices of lemon verbena in *in vitro* condition. *Iranian Journal of Horticultural Science*. 48(1): 249-252. (In Persian).
- Nourafcan, H., F. Sefidkon, A. Mousavi, M. Sharifi, and A. Khalighi. 2014. Effects of different medium on morphophysiological traits of *Lippia citriodora* H.B.K. during in vitro culture condition. *Journal of Herbal Drugs*. 5(3): 143-150. (In Persian).
- Oladzad, A., A. Qaderi, H. Naghdi Badi, and A. Zare. 2012. Rapid micropropagation of lemon verbena (*Lippia citriodora* L.) using in vitro culture. *Journal of Medicinal Plants*. 2(42):145-153. (In Persian).
- Pasandi Pour, A., H. Farahbakhsh, M. Saffari, and B. Karamat. 2013. The effect of salicylic acid on some physiological reactions of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) under salinity stress. *Journal of Crop Ecophysiology*. 7(2): 215-228. (In Persian).
- Pashmforosh, N. and M. Ahmadabadi. 2017. In vitro regeneration of red nightshade from different explants and evaluation of gene transfer using a biolistic gun. *Genetic Engineering and Biosafety Journal*. 5(2): 167-177. (In Persian).
- Raei, M., M. Esna Ashari, and M. Khodayari. 2017. Abiotic Elicitors and Medicinal Plants Biotechnology. *Journal of Cell and Tissue*. 7(4): 333-343. (In Persian).
- Rahimi Ashtiani, S., T. Hasanloo, and M.R. Bihamta. 2009. Using yeast extract as an approach to increase flavonolignans content in cell suspension culture of milk thistle plant via elicitation mechanism. *Journal of Medicinal Plants*. 4 (32):108-119. (In Persian).
- Raoa, S.R., and G.A. Ravishankar. 2002. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*. 20(2): 101-153.
- Severin, C., D. Bruzzese, O. Di Sapio, M. Gattuso, and S. Gattuso. 2006. Evaluation of in vitro behavior of *Aloysia citriodora* Palau: histological and chemical study. *Molecular Medicinal Chemistry*. 11: 19-20.
- Shekari, F., A. Pakmehr, M. Rastgoo, M. Vazayefi, and M.J. Goreishi Nasab. 2010. Effect of salicylic acid seed priming on some physiological traits of cowpea (*Vigna unguiculata* l.) under water deficit at podding stage. *Journal of Crop Ecophysiology*. 4(13): 13-30. (In Persian).
- Taheri Azizabadi, H., N.A. Bagheri, and N.A. Babaeian Jelodar. 2016. The optimization of callus induction and regeneration in medicinal Lemon Verbena

Archive of SID

www.SID.ir

(*Lippia citriodora*) plant. *Journal of Plant Process and Function*. 5(17): 53-62. (In Persian).

- Tohidi, M., and R. Falahi. 2016. Evaluation of yield and yield components of maize by foliar application of salicylic acid. *Journal of Crop Ecophysiology*. 10(3): 645-656. (In Persian).
- Tran-Thi, N.T., H. Casabianca, M. Florence, and G. Loustalot. 2006. Authenticity control of essential oils containing citronellal and citral by chiral and stable-isotope gas-chromatographic analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 386: 2141–2152.
- Yadegari, M., and A. Shakerian. 2014. The effect salicylic acid and jasmonic acid foliar applications on essence and essential oil of salvia (*Salvia officinalis* L.). *Journal of Applied Science and Agriculture*. 9(4): 1578-1584.
- Zangeneh, V., G. Asghari, and A. Ehsanpour. 2010. Influence of salicylic acid on atropine production in *Datura metel* L. callus cultures. *Pharmaceutical Sciences*. 16(1): 29-36.
- Zargari, A. 1997. Medicinal plants. Tehran University Publication. 969 pp. (In Persian).

Archive of SID

www.SID.ir

Effect of Salicylic Acid on Morpho-physiological Characteristics of Lemon verbena (*Lippia citriodora*) in *In Vitro* and Field Conditions

Hassan Nourafcan [1]*

Received: December 2017 , Revised: 14 May 2018, Accepted: 29 August 2018

Abstract

Salicylic acid (SA) is a natural phenolic and a hormone like compound, and its different concentrations and treatment duration cause many actions and reactions in plants. Thus, two experiments were conducted to evaluate the effect of salicylic acid on morphological and physiological characteristics of lemon verbena as an ornamental and medicinal plant in *in vitro* and field conditions at Miyaneh, Iran. In tissue culture conditions, five concentrations of SA including 0, 2.5, 5, 10 and 20 µM were added to MS culture medium and their effects on lemon verbena growth indices were evaluated. Increasing SA concentrations caused increment in chlorotic leaf number but decrement in normal plantlet percentage and lateral shoots number in lemon verbena explants. However, in low concentrations of SA, longest shoot length, leaf number and chlorophyll content were increased. Although all concentrations of SA improved shoot fresh weight in lemon verbena explants. Under field condition, the effect of salicylic acid at 2.5, 5, 10 and 20 µM concentrations, non spray and spray with distilled water, were evaluated on morphological and physiological traits of lemon verbena. Salicylic acid affected significantly leaf width, inflorescence number, fresh inflorescence and leaf weights and the longest inflorescence length. The negative effect of SA application on leaf width and number and fresh weight of inflorescence was observed. But leaf fresh weight and inflorescence length improved especially in low SA concentrations. Therefore, application of low SA concentrations, because of their enhancing potential effect on vegetative growth of lemon verbena both in field and tissue culture conditions can be recommended.

Key words: abiotic elicitor, elicitors, *in vivo*, spraying, tissue culture.

1- Horticultural Sciences Department, Faculty of Agriculture, Miyaneh Branch, Islamic Azad University, Miyaneh, Iran.
* *Corresponding Author: hassannourafcan@gmail.com*

Archive of SID

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir