بررسی تغییرات محتوای اسانس، میزان E- سیترال و خصوصیات مورفوفیزیولوژیکی به‌لیمو در پاسخ به القای ترکیبات فعال‌زیستی و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی

مهسا رودبارکی[1]، علی مهرآفرین[2]، فرحناز خلیقی سیگارودی[2]، حسنعلی نقدی‌بادی[2]*

۱-دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گیاهان دارویی، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
۲-مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی، کرج، ایران
* آدرس مکاتبه: کرج، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی، صندوق‌پستی: ۳۶۹-۳۱۳۷۵
تلفن: ۳۴۷۶۴۰۱۰ (۰۲۶)، نمابر ۳۴۷۶۴۰۲۱ (۰۲۶)
پست الکترونیک: Naghdibadi@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۰/۲۳ **تاریخ تصویب:** ۹۶/۱/۲۹

چکیده

مقدمه: به‌لیمو با نام علمی ***Lippia citriodora* H.B.K.** گیاهی دارویی و معطر از خانواده شاه‌پسند **Verbenaceae** است.

هدف: شناخت تغییرات محتوای اسانس و میزان E- سیترال (ژرانیال) گیاه دارویی به‌لیمو در پاسخ به القای تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و ترکیبات فعال‌زیستی بود.

روش بررسی: این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح آماری بلوک‌های کامل تصادفی با ۳ تکرار به اجرا در آمد. فاکتور اول در چهار سطح تیماری شامل تیمار شاهد (بدون القای تنظیم‌کننده رشدی گیاه)، تیمار القای محلول ۵۰ پی.پی.ام اسیدجیبرلیک و ۵۰ پی.پی.ام اسید ایندول بوتیریک، تیمار القای محلول ۵۰ پی.پی.ام اسیدجیبرلیک و ۱۰۰ پی.پی.ام اسید ایندول بوتیریک و تیمار القای محلول ۱۰۰ پی.پی.ام اسیدجیبرلیک و ۵۰ پی.پی.ام اسید ایندول بوتیریک و فاکتور دوم شامل القای محرک‌زیستی کیتوزان با دو سطح غلظت صفر و ۴۰۰ پی.پی.ام و فاکتور سوم شامل القای محرک‌زیستی متانول **(MeOH)** با دو سطح غلظت صفر و ۵ درصد حجمی بود.

نتایج: نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که اثرات سه‌گانه محلول‌پاشی هورمون، متانول و کیتوزان روی ارتفاع بوته، تعداد ساقه فرعی، طول برگ در سطح آماری پنج درصد و روی بقیه خصوصیات مورد اندازه‌گیری در سطح آماری یک درصد معنی‌دار شدند. بیشترین میزان محتوای اسانس در تیمار ۴۰۰ پی.پی.ام کیتوزان و ۵ درصد حجمی متانول مشاهده شد. بیشترین تعداد برگ و میزان E- سیترال در ۴۰۰ پی.پی.ام کیتوزان و بیشترین وزن تر و خشک ساقه و ریشه، وزن خشک برگ در تیمار حاوی ۵۰ پی.پی.ام اسید جیبرلیک و ۱۰۰ پی.پی.ام اسید ایندول بوتیریک حاصل شد.

نتیجه‌گیری: به طور کلی اثرات متقابل تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، متانول و کیتوزان روی محتوای اسانس، میزان E- سیترال و خصوصیات مورفوفیزیولوژیکی به‌لیمو معنی‌دار و مثبت بوده است.

گل‌واژگان: به‌لیمو، اسانس، اسید جیبرلیک، اسید ایندول بوتیریک، کیتوزان، متانول

مقدمه

رویکرد روزافزون به استفاده از گیاهان دارویی وفرآورده‌های به دست آمده از آن نقش این گیاهان را در چرخه اقتصادی جهانی پررنگ‌تر کرده، به طوری که مصرف رو به افزایش آنها تنها به کشورهای در حال توسعه محدود نبوده بلکه در کشورهای پیشرفته نیز توسعه فراوانی یافته‌اند [۱]. صرف‌نظر از ارزش اقتصادی، گیاهان دارویی قابل تطابق با روش‌های کشت ارگانیک هستند که تمایل تولیدکننده‌ها و مصرف‌کننده‌ها را به همراه دارد [۲]. در تولید گیاهان دارویی، علاوه بر شرایط آب و هوایی و عوامل خاک، نوع عناصر غذایی از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشند، زیرا عناصر غذایی با تأثیری که بر رشد رویشی و زایشی گیاهان دارند، نسبت اندام‌های زایشی به رویشی را تغییر داده و از این طریق بر کیفیت و کمیت اسانس محصول مؤثر می‌باشند [۱].

جنس *Lippia* دارای بیش از ۲۰۰ گونه است که در این بین *Lippia citriodora* دارای اهمیت ویژه‌ای می‌باشد. به‌لیمو با نام علمی *Lippia citriodora* H.B.K درختچه‌ای است خزان‌پذیر از خانواده شاه‌پسند Verbenaceae که ارتفاع آن به ۳ تا ۵ متر می‌رسد [۳]. برگ‌های این گیاه به صورت کشیده و به رنگ سبز کم‌رنگ به صورت دسته‌های سه‌تایی به روی ساقه قرار می‌گیرند. گل‌های به‌لیمو کوچک و سفید رنگ می‌باشند. گیاه در قسمت پایین و نزدیک سطح خاک کاملاً خشبی می‌باشد. به‌لیمو گیاهی است بومی کشورهای آمریکای جنوبی (شیلی و پرو) که به طور وسیع در باغ‌های کشورهای اروپایی کشت می‌شود [۴]. این گیاه امروزه در شمال کشور ایران کشت می‌شود و کشت و کار آن به منظور استفاده از خواص دارویی آن می‌باشد [۵]. برگ‌ها و اندام‌های رویشی این گیاه دارای خاصیت تب بر، مسکن، ضدنفخ، کمک‌کننده به هضم غذا، آرامش‌بخش بوده و در درمان سرماخوردگی و سردرد استفاده می‌شود. چای به‌لیمو فوق‌العاده آرامبخش و تسکین‌دهنده اعصاب است [۶]. اسانس این گیاه دارای خواص ضدمیکربی علیه میکروفلور دندان است [۷]. این گیاه دارای اثرات ضدتب و مهار اثر تحریک‌کنندگی هیستامین می‌باشد [۸].

برگ به‌لیمو علاوه بر اسانس، حاوی آلکالویید، فلاونویید، موسیلاژ، تانن و اسیدهای فنلی می‌باشد [۹] و ترکیبات عمده اسانس این گیاه، ۸، ۱ – سینئول، ژرانیال و نرال است [۱۰]. با وجود دارا بودن این ترکیبات، مهم‌ترین ماده مؤثره موجود در گیاه، اسانس آن می‌باشد که به نظر می‌رسد فرمولاسیون GA_3، IBA، کیتوزان و متانول به صورت محلول‌پاشی هم روی خصوصیات مورفوفیزیولوژیکی و هم فیتوشیمیایی تأثیرگذار است.

کاربرد تجاری جیبرلین‌ها و معمولاً GA_3 در تحریک رشد میوه‌ها، تحریک فرآیند تولید مالت در جو، در صنایع آبجوسازی و افزایش عملکرد قند در نیشکر می‌باشد. همچنین جیبرلین انتقال از دوره جوانی به بلوغ را تنظیم می‌کند و از آن در میوه‌بندی انگور استفاده شده است [۱۱]. IBA یکی از انواع اکسین‌های مصنوعی است، که نسبت به انواع طبیعی به نور مقاوم‌تر می‌باشد. IBA غالبیت انتهایی را تنظیم می‌کند، باعث تحریک و شکل‌گیری ریشه‌های نا به جا می‌شود، از ریزش برگ‌ها جلوگیری کرده و القای تمایز آوندی می‌نماید [۱۲]. کیتوزان مشتقی از گلوکان با واحدهای تکرارشونده کیتین است، که به وفور در اسکلت بندپایان مثل خرچنگ و میگو یافت می‌شود، مادهای بی‌رنگ و بی‌بو است که فعالیت‌های ضدمیکروبی کیتوزان ابتدا توسط Muzzarli و همکاران در سال ۱۹۹۰ مورد بررسی قرار گرفت و مستند گردید [۱۳]. متانول باعث افزایش سرعت تثبیت CO_2 شده و ظرفیت تولید را بالا می‌برد [۱۵، ۱۴].

بنابراین با توجه به مطالب یاد شده به نظر می‌رسد القای فرمولاسیون این ترکیبات باعث تغییرات فیتوشیمیایی و مورفوفیزیولوژیکی در گیاه به‌لیمو شود. هدف از انجام این تحقیق، بررسی تغییرات مورفوفیزیولوژیکی و محتوای اسانس و میزان E–سیترال گیاه دارویی به‌لیمو در پاسخ به القای ترکیبات فعال زیستی و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و شیمیایی

در این تحقیق، نشای گیاه دارویی به‌لیمو از مزرعه تحقیقاتی پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی تهیه شد و

تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی GA_3 و IBA از کمپانی Duchefa و محرک‌های زیستی متانول ساخت کارخانه Merck آلمان و کیتوزان ساخت شرکت Sigma بوده‌اند.

القای تیمار تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و ترکیبات فعال زیستی

در این تحقیق اثر القای تیمار ترکیبات فعال‌زیستی (Bioactive compounds) شامل فرمولاسیون تنظیم‌کننده‌های زیستی (Bioregulators) با کاربرد اسید جیبرلیک (GA_3) و اسید ایندول بوتیریک (IBA) و همچنین محرک‌های زیستی (Biostimulants) با کاربرد کیتوزان و متانول بر تغییرات مورفوفیزیولوژیکی و درصد اسانس گیاه دارویی به‌لیمو (*Lippia citriodora* H.B.K) به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه‌ای بلوک‌های کامل تصادفی (RCBD) با ۱۶ تیمار و ۳ تکرار به صورت گلدانی اجرا شد. فاکتورهای آزمایش عبارت بودند از: فاکتور اول شامل القای فرمولاسیون تنظیم کننده‌های رشدی گیاه از اسید جیبرلیک (GA_3) و اسید ایندول بوتیریک (IBA) با چهار سطح فرمولاسیون الف) تیمار شاهد (بدون القای تنظیم‌کننده رشدی گیاه) ب) القای محلول ۵۰ پی.پی.ام اسید جیبرلیک (GA_3) و ۵۰ پی.پی.ام اسید ایندول ۳ بوتیریک (IBA) ج) القای محلول ۵۰ پی.پی.ام اسید جیبرلیک (GA_3) و ۱۰۰ پی.پی.ام اسید ایندول ۳ بوتیریک (IBA) د) القای محلول ۱۰۰ پی.پی.ام اسید جیبرلیک (GA_3) و ۵۰ پی.پی.ام اسید ایندول ۳ بوتیریک (IBA) بود. فاکتور دوم شامل القای فاکتور محرک زیستی کیتوزان (CH) با دو سطح غلظت صفر و ۴۰۰ پی.پی.ام و فاکتور سوم شامل القای محرک زیستی متانول (MeoH) با دو سطح غلظت صفر و ۵ درصد حجمی (جدول شماره ۱) بود. محلول‌پاشی در ۴ مرحله رشدی و با فواصل معین ۱۵ روز از هم انجام گرفت. محلول‌پاشی در ساعات اولیه صبح و زمانی که ورزش باد حداقل بود، انجام شد.

برداشت نمونه گیاه و اندازه‌گیری خصوصیات مورفوفیزیولوژیکی

برداشت گیاه در اواخر آبان ۱۳۹۴ انجام شد و نمونه‌های گیاهی در سایه خشک شدند. همچنین خصوصیات مورفوفیزیولوژیکی مربوط به گیاهان مورد آزمایش اندازه‌گیری و ثبت شدند. اندازه‌گیری‌ها با استفاده از کولیس دیجیتال، خط‌کش میلی‌متری و ترازوی آزمایشگاهی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ انجام شد. صفات مورفوفیزیولوژیکی اندازه‌گیری شده، شامل ارتفاع گیاه، قطر ساقه اصلی در محل طوقه، تعداد ساقه فرعی بوته، طول برگ، عرض برگ، تعداد برگ بوته، وزن تر ساقه بوته، وزن خشک ساقه بوته، وزن تر برگ، وزن خشک برگ، وزن تر اندام هوایی، وزن خشک اندام هوایی، وزن تر ریشه و وزن خشک ریشه بودند.

جدول شماره ۱- کدهای اختصاری فرمولاسیون تیمارهای تنظیم‌کننده‌های رشدی و محرک‌های زیستی مورد آزمایش

نام تیمار	اسید جیبرلیک (ppm)	اسید ایندول بوتیریک (ppm)	متانول (% V/V)	کیتوزان (ppm)
T_1	۰	۰	۰	۰
T_2	۰	۰	۵	۰
T_3	۰	۰	۰	۴۰۰
T_4	۰	۰	۵	۴۰۰
T_5	۵۰	۵۰	۰	۰
T_6	۵۰	۵۰	۵	۰
T_7	۵۰	۵۰	۰	۴۰۰
T_8	۵۰	۵۰	۵	۴۰۰
T_9	۵۰	۱۰۰	۰	۰
T_{10}	۵۰	۱۰۰	۵	۰
T_{11}	۵۰	۱۰۰	۰	۴۰۰
T_{12}	۵۰	۱۰۰	۵	۴۰۰
T_{13}	۱۰۰	۵۰	۰	۰
T_{14}	۱۰۰	۵۰	۵	۰
T_{15}	۱۰۰	۵۰	۰	۴۰۰
T_{16}	۱۰۰	۵۰	۵	۴۰۰

اندازه‌گیری خصوصیات فیتوشیمیایی

اسانس‌گیری و تعیین ترکیب اصلی اسانس

جهت استخراج اسانس، از روش تقطیر با آب و دستگاه کلونجر استفاده شد. به این ترتیب که مقدار ۱۰۰ گرم از برگ خشک به‌لیمو به دقت توزین و توسط آسیاب مقداری خرد شد. گیاه خرد شده در بالن دو لیتری ریخته شد و سپس آب مقطر تا دو سوم حجم کل بالن اضافه شد، سپس دستگاه کلونجر بر روی بالن قرار داده و هیتر الکتریکی روشن شد. از لحظه شروع به جوش آمدن آب درون بالن، اسانس‌گیری به مدت ۳ ساعت انجام و سپس درصد حجمی- وزنی اسانس تعیین شد.

اسانس موردنظر پس از آماده‌سازی به دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی (GC/MS) جهت تعیین ترکیب اصلی اسانس تزریق شد. شناسایی ترکیب اصلی اسانس با کمک پیشنهاد اولیه نرم‌افزار دستگاه GC/MS و کتابخانه Wiely و نیز مقایسه اندیس بازداری این ترکیب با شاخص بازداری گزارش شده در کتاب Adams انجام پذیرفت. به منظور تعیین درصد ترکیب اصلی اسانس، از دستگاه کروماتوگرافی گازی (GC) استفاده شد [۱۷-۱۶].

مشخصات دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی

دستگاه از نوع Agilent 6890 با ستون به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه ۰/۲۵ میکرومتر از نوع HP-5 MS بود. برنامه دمایی ستون به این نحو تنظیم شد که دمای ابتدایی آون ۵۰ درجه سانتی‌گراد و توقف در این دما به مدت ۵ دقیقه، گرادیان حرارتی ۳ درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه، افزایش دما تا ۲۴۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۵ درجه در هر دقیقه، افزایش دما تا ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد و سه دقیقه توقف در این دما. دمای اتاقک تزریق ۲۹۰ درجه سانتی‌گراد و از گاز هلیوم به عنوان گاز حامل با سرعت جریان (فلو) ۰/۸ میلی‌لیتر در دقیقه استفاده شد. طیف‌سنج جرمی مورد استفاده مدل Agilent 5973 با ولتاژ یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت، روش یونیزاسیون EI و دمای منبع یونیزاسیون ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد بود.

مشخصات دستگاه کروماتوگرافی گازی

دستگاه استفاده شده از نوع Younglin Acm600 با ستون به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه ۰/۲۵ میکرومتر و برنامه دمایی ستون به این نحو تنظیم شد: دمای ابتدایی آون ۵۰ درجه سانتی‌گراد و توقف در این دما به مدت ۵ دقیقه، گرادیان حرارتی ۳ درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه، افزایش دما تا ۲۴۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۵ درجه در هر دقیقه، افزایش دما تا ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد و سه دقیقه توقف در این دما. دمای اتاقک تزریق ۲۹۰ درجه سانتی‌گراد و از گاز هلیوم به عنوان گاز حامل با سرعت جریان (فلو) ۰/۸ میلی‌لیتر در دقیقه استفاده شد. دتکتور مورد استفاده FID بود.

آنالیز آماری

به منظور بررسی تأثیر تیمارهای اعمال شده بر روی گیاه دارویی به‌لیمو، تجزیه واریانس و مقایسه میانگین پارامترهای مورد سنجش در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در ۳ تکرار بر اساس آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار محافظت شده (LSD) در سطوح آماری ۵ درصد توسط نرم‌افزار آماری SPSS (ver. 20) مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که اثرات سه‌گانه محلول‌پاشی هورمون، متانول و کیتوزان روی ارتفاع بوته، تعداد ساقه فرعی و طول برگ در سطح آماری پنج درصد و روی بقیه صفات مورد اندازه‌گیری در سطح آماری یک درصد معنی‌دار شدند (جدول شماره ۲). بیشترین میزان (درصد) اسانس، ارتفاع بوته، ساقه فرعی، وزن تر برگ و وزن تر اندام هوایی، به ترتیب به میزان ۱/۰۲ درصد، ۷۱/۲۸ سانتی‌متر، ۳/۷۰ عدد، ۲۰/۷۷ گرم و ۷۲/۸۶ گرم در تیمار ۴۰۰ پی.پی.ام کیتوزان و ۵ درصد حجمی متانول مشاهده شد (شکل شماره ۱ و جدول شماره ۳). بیشترین میزان E- سیترال و تعداد برگ مربوط به تیمار ۴۰۰ پی.پی.ام کیتوزان به ترتیب با میزان ۳۲/۹۹

درصد و ۳۵۸/۳ عدد برگ بود (شکل شماره ۲ و جدول شماره ۳). ماکزیمم قطر ساقه در تیمار ۵۰ پی.پی.ام GA_3، ۱۰۰ پی.پی.ام IBA و ۵ درصد حجمی متانول با میزان عددی ۱/۳ سانتی‌متر مشاهده شد (جدول شماره ۳). حداکثر وزن تر و خشک ساقه و ریشه، و وزن خشک برگ به ترتیب با مقادیر ۴۹/۱۸، ۲۴/۱۶ ، ۳۰/۵۴ ، ۱۰/۷۰ و ۵/۸۷ گرم در تیمار ۵۰ پی.پی.ام GA_3 و ۱۰۰ پی.پی.ام IBA حاصل شد (جدول شماره ۳).

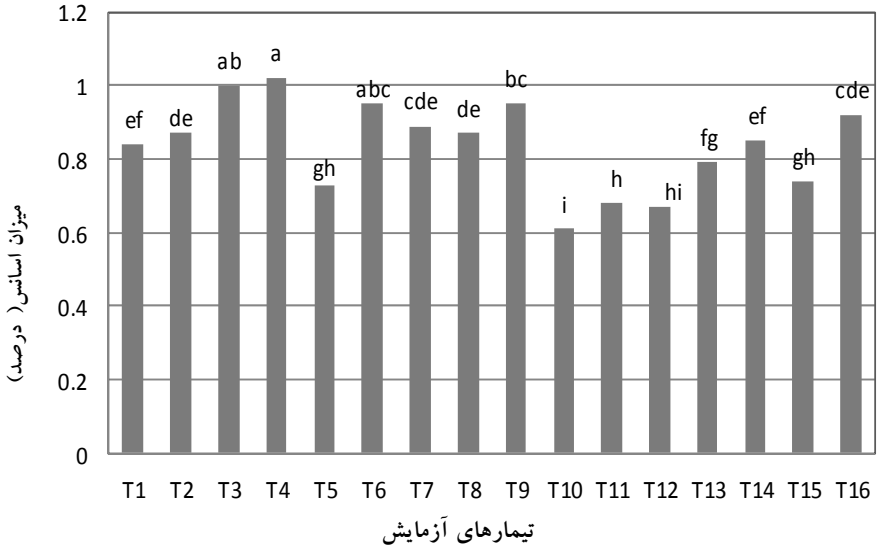
جدول شماره ۲- تجزیه واریانس اثرات محلول‌پاشی بر خصوصیات مورد ارزیابی به‌لیمو

منابع تغییرات (s.o.v)	درجه آزادی	ارتفاع گیاه	تعداد ساقه فرعی	وزن خشک برگ	وزن تر برگ	تعداد برگ بوته	طول برگ	عرض برگ	قطر ساقه
		میانگین مربعات							
بلوک	۲	۳۷/۵۲ ns	۰/۰۱۸ ns	۰/۱۵ ns	۰/۳۵ ns	۲۰۲/۰۸ ns	۰/۶۶ ns	۰/۰۱۴ ns	۰/۰۰۳۵ ns
هورمون	۳	۵۹۵/۷۰**	۱/۶۶۲**	۱/۷۵**	۳۶/۳۲**	۶۷۳۷/۷۴**	۱۰/۶۵**	۰/۲۲۴**	۰/۱۸۹۶**
کیتوزان	۱	۳۸/۰۶ns	۰/۴۰۲ns	۰/۱۸ ns	۲۴/۸۵**	۱۹۸۹/۱۹ ns	۱۱/۳۰**	۱/۰۸۶**	۰/۰۰۰۸ ns
متانول	۱	۰/۰۱ns	۰/۰۱۱ns	۴/۷۸**	۱۱۰/۲۳**	۹۳/۵۲ ns	۰/۱۸ ns	۰/۰۰۷ ns	۰/۰۰۰۶ ns
هورمون × کیتوزان	۳	۱۹۳/۷۲**	۰/۱۸۸ns	۱۱/۶۲**	۱۰۹/۶۸**	۱۲۱۱۴/۲۴**	۶/۱۶**	۰/۲۸۱**	۰/۰۳۰۱ ns
هورمون × متانول	۳	۱۰۱/۹۸**	۰/۵۷۴**	۵/۴۲**	۴۵/۸۵**	۱۰۲۹۲/۹۱**	۲/۲۱**	۰/۲۲۴**	۰/۰۲۲۶ns
متانول × کیتوزان	۱	۲۰۶/۰۱**	۰/۷۷۸*	۵/۲۷*	۳۲/۶۰*	۸۷۷۵/۰۲*	۱/۸۹*	۰/۰۲۳ ns	۰/۰۰۷۷ ns
هورمون × کیتوزان × متانول	۳	۳۰/۱۱*	۰/۳۵۲*	۱/۵۵**	۱۱/۷۹**	۱۰۱۲۲/۸۵**	۰/۸۶*	۰/۴۸۰**	۰/۰۱۸۷ ns
خطای آزمایش	۳۰	۹/۶۶	۰/۱۱۹	۰/۱۱	۰/۷۷	۷۴۸/۵۹	۰/۲۴	۰/۰۲۸	۰/۰۱۳۴
ضریب تغییرات (CV)		۶/۰۷	۱۴/۹۳	۱۰/۸۲	۱۰/۱۱	۱۱/۸۰	۸/۵۴	۹/۷۷	۱۰/۳۸

ادامه جدول شماره ۲-

منابع تغییرات (s.o.v)	درجه آزادی	وزن خشک ساقه	وزن تر ساقه	وزن تر اندام هوایی	وزن خشک اندام هوایی	وزن تر ریشه	وزن خشک ریشه	درصد اسانس	E- سیترال
		میانگین مربعات							
بلوک	۲	۱/۴۰ ns	۱۵/۳۲ ns	۰/۸۰ ns	۵/۰۱ ns	۰/۱۷ ns	۰/۲۲ ns	۰/۰۷**	۰/۲۵ ns
هورمون	۳	۲۹/۱۸**	۲۳۳/۲۸**	۳۱۵/۴۶**	۵۲/۸۶**	۳۲/۶۱**	۸/۶۸**	۰/۰۹**	۶۸/۷۵**
کیتوزان	۱	۶/۳۵ ns	۱۹/۴۲ ns	۴۰۷/۲۳**	۷۰/۰۴**	۳/۱۶ ns	۰/۰۵ ns	۰/۰۱ *	۱/۵۳ ns
متانول	۱	۰/۳۶ ns	۷۷/۶۵ *	۶۵۸/۶۷**	۲۳۷/۸۱**	۳۹/۸۶**	۷/۶۳**	۰/۰۰۴ ns	۲/۴۶ ns
هورمون × کیتوزان	۳	۲۶۶/۷۶**	۹۴۲/۹۵**	۱۵۲۰/۳۷**	۳۳۱/۸۰**	۱۰۳/۰۳**	۱۵/۴۲**	۰/۰۳**	۱۱/۴۵**
هورمون × متانول	۳	۱۱۹/۷۵**	۲۵۶/۲۲**	۱۲۰۰/۳۸**	۴۵۴/۸۵**	۱۴۳/۳۸**	۲۳/۵۶**	۰/۰۵**	۴۲/۰۶**
متانول × کیتوزان	۱	۳۶۱/۰۰ *	۸۴۲/۱۱ *	۲۲۲۲/۳۸ *	۷۲۱/۲۲ *	۱۹۵/۱۳ *	۴۰/۶۶ *	۰/۰۱ ns	۰/۲۸ ns
هورمون × کیتوزان × متانول	۳	۶۶/۸۱**	۲۹۴/۸۰**	۶۲۷/۴۷**	۱۲۰/۴۶**	۵۶/۳۴**	۱۰/۹۱**	۰/۰۴**	۳۰/۸۷**
خطای آزمایش	۳۰	۲/۲۸	۱۱/۹۱	۱۹/۳۶	۷/۰۸	۲/۲۶	۰/۲۸	۰/۰۰۲	۱/۹۳
ضریب تغییرات (CV)		۱۲/۲۹	۱۲/۶۱	۱۲/۳۷	۱۶/۱۵	۱۲/۹۲	۹/۴۰	۴/۹۳	۵/۰۵

**، * و ns به ترتیب معنی‌دار در سطح آماری ۱ و ۵ درصد و غیرمعنی‌دار می‌باشد.



شکل شماره ۱- مقایسه میانگین اثر تیمارهای مختلف آزمایشی بر میزان اسانس گیاه به‌لیمو، میانگین‌های دارای حداقل یک حروف مشترک در هر ستون مطابق آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌دار ندارند.

جدول شماره ۳- مقایسه میانگین اثر تیمارهای مختلف بر خصوصیات مورفوفیزیولوژیکی مورد ارزیابی به‌لیمو

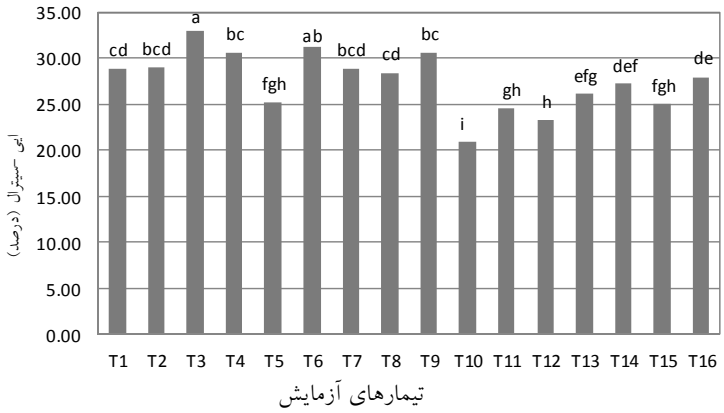
صفات / تیمار	ارتفاع بوته (سانتی‌متر)	قطر ساقه (سانتی‌متر)	تعداد ساقه فرعی (عدد)	وزن خشک برگ (گرم)	وزن تر برگ (گرم)	تعداد برگ (عدد)	وزن خشک ریشه (گرم)
T1	۵۷/۳۴ b	۰/۸۷۷ f	۳/۷۰ a	۱/۷۰ f	۴/۷۴ g	۱۸۳/۳ h	۳/۳۶h
T2	۵۷/۶۴ b	۱/۰۴۳ cdef	۲/۴۳ b	۳/۰۷ cd	۷/۹۷ e	۲۵۸/۳ cd	۴/۱۴gh
T3	۶۰/۰۸ b	۱/۱۷۰ def	۲/۵۳ b	۳/۴۴ bc	۱۱/۱۲ bc	۳۵۸/۳ a	۲/۱۷i
T4	۷۱/۲۸ a	۰/۹۸۷ def	۲/۵۷ b	۵/۷۰ a	۲۰/۷۷ a	۲۵۹/۷ cd	۷/۹۴c
T5	۴۹/۴۸ c	۱/۰۵۰ cdef	۲/۴۷ b	۲/۱۷ ef	۵/۱۴ g	۱۹۰/۰ gh	۴/۵۷g
T6	۴۸/۰۶ c	۱/۰۳۷ cdef	۲/۴۵ b	۳/۰۵ cd	۷/۳۸ ef	۳۲۵/۳ ab	۶/۱۴ef
T7	۴۸/۵۰ c	۰/۹۴۳ ef	۲/۲۸ bc	۳/۰۳ cd	۷/۵۴ ef	۱۹۲/۳ fgh	۷/۱۶cd
T8	۴۸/۴۷ c	۰/۹۵۷ ef	۲/۱۷ bc	۳/۸۸ b	۹/۵۰ d	۱۲۰/۰ efgh	۶/۷۳de
T9	۵۹/۴۵ b	۱/۱۳۰ abcdef	۱/۷۲ c	۵/۸۷ a	۱۲/۴۰ b	۲۴۷/۳ cde	۱۰/۷۰a
T10	۴۹/۱۴	۱/۳۰۰ a	۲/۱۴ bc	۲/۹۰ cd	۶/۷۹ ef	۱۸۹/۷ gh	۴/۶۱g
T11	۴۵/۷۵	۱/۲۰۳ abc	۱/۷۵ c	۱/۷۰ f	۴/۷۶ g	۲۳۶/۰ defg	۴/۳۸g
T12	۴۰/۵۵ de	۱/۲۸۰ ab	۲/۱۵ bc	۲/۰۸ ef	۶/۱۷ fg	۱۶۴/۰ h	۴/۳۷g
T13	۵۰/۳۲ c	۱/۲۶۳ ab	۲/۲۸ bc	۲/۲۸ e	۶/۹۰ ef	۲۴۳/۳ de	۶/۰۲ef
T14	۴۵/۳۱ cd	۱/۲۶۳ ab	۲/۰۰ bc	۲/۸۷ d	۱۲/۵۷ b	۲۱۰/۰ efgh	۵/۵۹f
T15	۳۸/۵۶ e	۱/۲۶۷ ab	۱/۸۵ c	۱/۶۸ f	۴/۷۴ g	۲۳۷/۰ def	۳/۸۴gh
T16	۴۹/۳۱ c	۱/۰۹۳ bcde	۲/۴۳ b	۳/۳۷ bcd	۱۰/۶۳ cd	۲۹۳/۰ bc	۹/۰۷b

میانگین‌های دارای حداقل یک حروف مشترک در هر ستون مطابق آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌دار ندارند.

ادامه جدول شماره ۳-

صفات / تیمار	طول برگ (سانتی‌متر)	عرض برگ (سانتی‌متر)	وزن خشک ساقه (گرم)	وزن تر ساقه (گرم)	وزن تر اندام هوایی (گرم)	وزن خشک اندام هوایی (گرم)	وزن تر ریشه (گرم)
T1	۲/۴۶^{h}	۱/۲۲^{f}	۶/۰۶^{i}	۱۴/۹۳^{fg}	۲۱/۶۸^{g}	۸/۸۶^{hij}	۶/۹۵^{fg}
T2	۳/۵۹^{g}	۱/۵۱^{de}	۶/۹۴^{hi}	۱۹/۸۸^{ef}	۳۱/۸۶^{de}	۱۲/۴۰^{fghi}	۹/۲۹^{def}
T3	۵/۱۶^{ef}	۱/۷۰ ^{cde}	۹/۸۲^{fg}	۲۲/۹۸^{de}	۳۸/۴۷^{cd}	۱۳/۲۹^{efgh}	۵/۴۰^{g}
T4	۵/۹۰^{cde}	۱/۶۷^{cde}	۱۷/۳۱^{c}	۳۴/۳۰^{c}	۲۷/۸۶^{a}	۱۳/۴۱^{b}	۱۶/۸۳^{bc}
T5	۵/۴۹^{def}	۱/۷۷^{cd}	۱۱/۶۰^{def}	۲۰/۶۱^{ef}	۲۴/۱۹^{fg}	۱۱/۸۲^{fghij}	۹/۶۸^{de}
T6	۴/۸۶^{f}	۱/۵۲^{de}	۱۲/۸۷^{de}	۲۷/۵۹^{d}	۳۶/۶۸^{cde}	۱۴/۷۱^{cdef}	۱۴/۶۵^{c}
T7	۶/۳۵^{bc}	۱/۶۱^{cde}	۱۳/۰۷^{de}	۴۰/۲۳^{b}	۴۱/۶۲^{c}	۱۶/۹۲^{cde}	۱۴/۳۵^{c}
T8	۷/۷۶^{a}	۲/۰۷^{b}	۱۴/۱۱^{d}	۴۱/۳۲^{b}	۴۱/۵۲^{c}	۱۷/۸۸^{cd}	۱۵/۴۵^{c}
T9	۷/۱۵^{ab}	۱/۷۳^{cd}	۳۰/۵۴^{a}	۴۹/۱۸^{a}	۶۳/۸۰^{b}	۳۳/۴۹^{ab}	۲۴/۱۶^{a}
T10	۵/۴۴^{ef}	۱/۶۵^{cde}	۱۱/۰۹^{ef}	۲۲/۹۵^{de}	۱۸/۸۰^{gh}	۸/۴۷^{ij}	۷/۴۶^{efg}
T11	۶/۲۸^{cd}	۱/۵۳^{de}	۵/۷۳^{i}	۱۰/۵۵^{g}	۱۴/۲۰^{h}	۷/۴۷^{j}	۶/۴۸^{g}
T12	۵/۸۲^{cde}	۱/۸۲^{bc}	۷/۰۹^{hi}	۱۴/۹۰^{fg}	۱۸/۲۹^{gh}	۹/۲۴^{ghij}	۶/۶۵^{g}
T13	۶/۲۶^{cd}	۱/۴۴^{ef}	۱۲/۸۵^{de}	۳۳/۸۴^{c}	۳۳/۳۹^{de}	۱۳/۵۱^{defg}	۱۱/۱۶^{d}
T14	۶/۳۸^{bc}	۱/۵۶^{cde}	۹/۱۹^{fgh}	۲۴/۸۱^{de}	۳۰/۹۲^{ef}	۱۸/۸۹^{c}	۱۱/۷۰^{d}
T15	۵/۸۸^{cde}	۲/۷۰^{a}	۷/۸۸^{ghi}	۱۶/۴۰^{f}	۱۷/۶۴^{gh}	۸/۶۵^{ij}	۷/۵۲^{efg}
T16	۶/۲۶ ^{cd}	۱/۷۲^{cde}	۲۰/۳۱^{b}	۴۳/۳۱^{b}	۶۳/۳۲^{b}	۳۶/۶۱^{a}	۱۸/۲۵^{b}

میانگین‌های دارای حداقل یک حروف مشترک در هر ستون مطابق آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌دار ندارند.



شکل شماره ۲- مقایسه میانگین اثر تیمارهای مختلف آزمایشی بر میزان E-سیترال گیاه به‌لیمو

میانگین‌های دارای حداقل یک حروف مشترک در هر ستون مطابق آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌دار ندارند.

بحث

این تحقیق نشان داد بیشترین میزان اسانس در گیاه به‌لیمو با کاربرد ترکیبات فعال زیستی کیتوزان و متانول حاصل شد. درصد E- سیترال در تیماری که فقط دارای کیتوزان بود، بالاترین مقدار بود. الکل‌ها با افزایش فعالیت فتوسنتزی گیاه، افزایش تولید سیتوکینین و تحریک رشد گیاه، افزایش فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز و کاهش تنفس نوری، می‌توانند بر رشد گیاهان و محتوای فیتوشیمیایی گیاهان تأثیر داشته باشد [۱۸].

مهم‌ترین نقش پیشنهاد شده برای متانول در گیاهان سه کربنه، بازداشتن تنفس نوری است که احتمالاً ناشی از افزایش غلظت CO_2 داخل برگ‌ها می‌باشد، زیرا غلظت CO_2 در داخل برگ‌ها باعث می‌شود که ریبولوز-۱، ۵- بیس فسفات به جای ترکیب شدن با O_2، با CO_2 واکنش دهد و عمل کربوکسیلاسیون اتفاق افتد. از این روی افزایش زیست‌توده گیاهان سه کربنه تیمار شده با متانول ناشی از استفاده آنها از متانول به عنوان یک منبع مستقیم کربنی برای بیوسنتز سرین و نیز کاهش هدر رفتن کربن از طریق تنفس نوری می‌باشد [۱۹].

از طرف دیگر مشخص شده است که محلول‌پاشی متانول بر روی گیاهان، بیان برخی از ژن‌هایی که در تنظیم فتوسنتز نقش دارند، را تنظیم می‌نماید و بسته به زمان، افزایش ثابتی در مقدار عوامل تنظیم‌کننده متابولیسم اسیدهای آمینه و سنتز پروتئین‌ها نظیر ترانس آمینازها و اندوپپتیدازها مشاهده می‌شود. به طور کلی محلول‌پاشی با الکل‌هایی نظیر متانول [۲۰] و وجود ترکیباتی مثل ساکارز در محیط کشت به عنوان یک منبع کربنی و محرک زیستی می‌تواند باعث افزایش فرآورده‌های ثانویه، رشد و عملکرد گیاه شود [۲۱] که کاربرد چنین موادی می‌تواند تا حدودی سبب افزایش در تولید و عملکرد گیاه دارویی به‌لیمو شود. در سال ۲۰۰۲ گزارش شده است، کاربرد محلول‌پاشی برگی کیتوزان و کیتین بر روی ذرت و سویا سبب تحریک فعالیت‌های فیزیولوژیکی در آنها می‌شود [۲۲]. ایجاد تغییر در پارامترهای رویشی و فیزیولوژیکی منجر به تغییرات پارامترهای فیتوشیمیایی می‌شود، پس به همین دلیل ممکن است کیتوزان باعث افزایش میزان E - سیترال شده باشد. در تحقیقی دیگر، اثر غلظت‌های مختلف کیتوزان بر میوه‌های خیار و فلفل قرمز بررسی شد و نتایج نشان داد که با افزایش غلظت کیتوزان از ۱ به ۵ درصد، مقدار تنفس میوه کاهش یافته و بیشترین تأثیر را در حفظ کیفیت میوه داشته است [۲۳].

بهبود صفات رشدی گیاه به‌لیمو در نتیجه کاربرد اسید جیبرلیک، اسید ایندول بوتیریک، متانول و کیتوزان ممکن است به دلیل افزایش تقسیم سلولی و طویل شدن آنها و تأثیر بر آسیمیلاسیون CO_2 در گیاه و افزایش شدت فتوسنتز باشد. اسید جیبرلیک به عنوان تنظیم‌کننده رشد گیاهی با افزایش تقسیم سلولی و توسعه جوانه‌های انتهایی و جانبی باعث افزایش جذب مواد غذایی می‌شود. زیرا در تقسیم سلولی، نیاز بیشتری به مواد غذایی وجود دارد و با بیشتر کردن جذب مواد باعث افزایش ارتفاع، تعداد برگ، سطح برگ وتعداد شاخه می‌شود [۲۴]. در محلول‌پاشی الکل‌ها بر روی نخود (*Cicer arietinum* L.) مشاهده شد که تیمار ۶۰ درصد حجمی متانول، بیشترین تأثیر را بر روی ارتفاع و وزن صد دانه داشته است، که با نتایج این مطالعه مطابقت داشته‌است [۲۵]. همچنین در تحقیقی دیگر که بر روی تأثیر متانول بر روی عملکرد گیاه سویا (*Glycin max*) صورت گرفت، نتایج نشان داد که اعمال تیمار متانول ۲۸ درصد حجمی باعث افزایش ارتفاع گیاه شده است [۲۶]. با انجام آزمایش بر روی گیاه لوبیای چشم‌بلبلی (*Vigna unguiculata*) مشاهده شد که اعمال تیمار متانول ۳۰ درصد حجمی باعث افزایش ارتفاع گیاه شد [۲۷]. در تحقیق حاضر نیز بر روی به‌لیمو، متانول ۵ درصد حجمی به همراه کیتوزان ۴۰۰ پی.پی.ام باعث افزایش ارتفاع بوته شده است.

محققان گزارش کردند که محلول‌پاشی گیاه نخودفرنگی (*Pisum sativum*) با محلول IBA باعث افزایش معنی‌دار عوامل رشدی از جمله ارتفاع بوته، تعداد برگ، وزن تر و خشک گیاه، پیگمان‌های فتوسنتزی، پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها و عملکرد این گیاه شده و این افزایش عملکرد در غلظت ۱۰۰ پی‌پی‌ام بیشتر بوده‌است [۲۸]. در مورد گیاه به‌لیمو، بیشترین قطر ساقه در تیمار ۵۰ پی.پی.ام اسید جیبرلیک، ۱۰۰ پی.پی.ام. اسید ایندول بوتیریک و ۵ درصد حجمی متانول با میزان ۳/۱ سانتی‌متر مشاهده شد. بیشترین تعداد ساقه فرعی در تیمار شاهد که حاوی آب مقطر بود، مشاهده شد و کمترین آن مربوط به تیمار حاوی ۵۰ پی.پی.ام اسید جیبرلیک و ۱۰۰ پی.پی.ام اسید ایندول بوتیریک بود. با این که هورمون‌ها رشد

و فعالیت‌های فیزیولوژیکی را افزایش می‌دهند، باعث کاهش تعداد ساقه‌های فرعی به‌لیمو شدند. از آنجایی که رشد و نمو ریشه تحت تأثیر هورمون‌ها است و رشد طولی ریشه اصلی و رویش ریشه‌های فرعی بوسیله اکسین سرچشمه گرفته شده از بخش هوایی گیاه تحریک می‌شود، با تأمین یا القای این هورمون، رشد و توسعه ریشه در گیاه بویژه رشد ریشه‌های فرعی تحریک شده‌است [۲۹]. در آزمایش حاضر بر روی به‌لیمو، غلظت‌های مختلف اسید جیبرلیک و اسید ایندول بوتیریک توانستند به مقدار زیادی فاکتورهای طول برگ، عرض برگ، وزن خشک برگ، وزن تر و خشک ساقه و ریشه و وزن خشک اندام هوایی را افزایش دهند که تا حدود زیادی نتایج آزمایش‌های گذشته را تأیید می‌کنند.

کاربرد متانول بر روی قسمت‌های هوایی به عنوان یک بازدارنده‌ی تنفس نوری عمل می‌نماید و سبب افزایش عملکرد می‌شود. همچنین متانول با تأثیر در به تعویق انداختن پیری برگ‌ها، سبب فعالیت فتوسنتزی بیشتر آنها می‌شود و عملکرد را بهبود می‌بخشد. متانول در مقایسه با مولکول CO_2 کوچکتر است و می‌تواند به‌راحتی توسط گیاهان سه کربنه برای افزایش عملکرد ماده خشک و به عنوان منبع کربن درون گیاه مورد استفاده قرار گیرد [۳۰]. همچنین در سطح برگ گیاهان، باکتری‌های همزیست به نام باکتری‌های متیلوتروفیک زندگی می‌کنند که با استفاده از متانول تولیدی در گیاهان هورمون سیتوکینین و اکسین را برای افزایش رشد در اختیار آنها قرار می‌دهند [۳۲، ۳۱]. در این تحقیق وزن تر برگ و وزن تر اندام هوایی با کاربرد متانول و کیتوزان بالا رفته است که با نتایج به دست آمده از آزمایش‌های ذکر شده مطابقت دارد.

نتیجه‌گیری

به طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد اثرات سه‌گانه تیمارهای مورد آزمایش (هورمون، متانول و کیتوزان) بر درصد اسانس گیاه، میزان E –سیترال و صفات مورفوفیزیولوژیکی معنی‌دار و مثبت بوده است. بیشترین درصد اسانس در تیمار مصرف هم‌زمان متانول و کیتوزان و بیشترین میزان E–سیترال و تعداد برگ در تیماری که فقط حاوی کیتوزان بود، حاصل شد. اکثر خصوصیات مورفوفیزیولوژیکی با کابرد اسید جیبرلیک و اسید ایندول بوتیریک به طور معنی‌داری افزایش یافتند.

منابع

1. Moradi R, Rezvani Moghaddam P, NasiriMahallati M and Lakzian A. The effect of application of organic and biological fertilizers on yield, yield components and essential oil of *Foeniculum vulgare* (Fennel). *Iranian Journal of Field Crops Res*. 2009; 7 (2): 625 - 635.

2. Mirjalili MH. World economic situation aromatic plants. *Journal of Zeitoun* 2003; 157: 26 -29.

3. Mozafarian VA. A Dictionary of Iranian plant names. 6nd ed. Farhang-e Moaser. Iran, Tehran. 2010, 740 p.

4. Zargari A. Medicinal Plants. 7th ed. Volume III. University of Tehran Press. Iran. 2010, pp: 739-742.

5. Amin GH. Popular Medicinal Plants of Iran. Press I, Tehran University of Medical Sciences, Tehran. 2005, pp: 38- 162.

6. Valentao P, Fernandes E, Carvalho F, Andrade PB, Seabra RM and de Lourdes Basto M. Studies on the antioxidant activity of (*Lippia citriodora*) infusion: scavenging effect on superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorousacid. *Biol. Pharm Bull*. 2002; 25 (10): 1324-1327.

7. Torrent Martia M.T. Some pharmacognostic and pharmacodynamic aspects of (*Lippia citriodora*). *Revista Brasileira de Farmacognosia* 1976; 14: 39-55.

8. Nakamura T, Okuyama E, Tsukada A, Yamazaki M, Satake M, Nishibe S, Deyama T, Moriya A, Maruno M and Nishimura H. Acteside as the analgesic principle of cedron (*Lippia triphylla*), a Peruvian medicinal plant. *Chem. Pharmaceut. Bull*. 1997; 45 (3): 499-504.

9. Skaltsa, H. and Shammas, G., Flavonoids from *Lippia citriodora.* Georg Thieme Verlag Stuttgart, *Planta Med.* 1988; 54 (5): 465.

10. Gomes P.C.S., Oliveira H.R.C., Vicente A.M.S. and Ferreira M.F. Production, transformation and essential oils composition of leaves and stems of Lemon Verbena [*Aloysiatriphylla* (L'Herit.) Britton] grown in Portugal. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais* 2006; 8: 130-135

11. Taiz L and Zeiger E. Plant physiology and development. 6nd ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc., Publishers, Oxford University Press. 2015, pp: 295-304.

12. Khajehpour G, Jam'eizadeh V, Khajehpour N. Effect of different concentrations of IBA (Indulebutyric acid) hormone and cutting season on the rooting of the cuttings of olive (*Olea Europaea* Var Manzanilla). *Int. J. Adv. Biol. Biom. Res*. 2014; 2 (12): 2920-2924.

13. Kamil JYVA, Jeon YJ and Shahidi F. Antioxidative activity of chitosans of different viscosity in cooked comminuted flesh of herring. *Food Chem*. 2002; 79: 69 - 77.

14. Downie A, Miyazaki S, Bohnert H, John P, Coleman J, Parry M and Haslam R. Expression profiling of the response of *Arabidopsis thaliana* to methanol stimulation. *Phytochem*. 2004; 65 (16): 2305-2316.

15. Ramberg H.A., Bradley J.S.C., Olson, J.N. Nishio J.S.C., Markwell J and Osterman J.C. The Role of Methanol in Promoting Plant Growth: An Update. *Rev. Plant Biochem. Biotechnol*. 2002; 1: 113 - 126.

16. Adams RP. Identification of essential oil components by gas chromatography / massspectrometry. 4th ed. Allured Publishing Corporation Carol Stream, IL. USA. 2007, pp: 804.

17. McLafferty FW and Stauffer DB. The Wiley / Nbs registry of mass spectral data. *J. Am. Soc*. 1989; 2: 432 - 7.

18. Holland MA. Occam's razor applied to hormonology. Are cytokinins produced by plants? *Plant Physiol*. 1997; 115: 865-868.

19. McGiffen M and Manthey J.A. The role of methanol in promoting plant growth: a current evaluation. *Horticultural Sci.* 1996; 31: 1092 - 6.

20. Mehrabi S, Mehrafarin A, Naghdi Badi H. Clarifying the role of methanol and amino acids application on savory (*Satureja hortensis* L.). *Annals of Biological Res.* 2013; 4 (4): 190-195.

21. Sayed-Tabatabaei BE., and Omidi M. Plant cell and tissue culture. 3th Ed.: University of Tehran Press. 2012, pp: 289-303.

22. Khan W.M., Printhivaj B and Smiyh D.L. Effect of foliar application of chitin oligosaccharides on photosynthesis of maize and soybean. *Photosynthetica* 2002; 40: 621-624.

23. Chien P, Sheu F and Lin HR. Coating citrus (*Murcott tangor*) fruit with low molecular weight chitosan increases postharvest quality and shelf life. *Food Chem*.

2007; 100 (3): 1160 -1164.

24. Shah SH, Ahmad I and Samiullah. Effect of gibberellic acid spray on growth, nutrient uptake and yield attributes during various growth stage of black cumin (*Nigella sativa* L.). *Asian J. Plant Sci*. 2006; 5 (5): 881-884.

25. Taherabadi Sh, Parsa M and Nezami A. Foliar application of methanol and irrigation amonges on chiickpea yields and yield components. *Journal of Soil and Water Agricultural Science and Technol.* 2012; 26 (1): 226 - 235.

26. Mireakhorry M, Paknezhad F, Moradi F, Ardakani M, Zahedi H, and Nazeri P. Effect of drought stress and methanol on yield and yield components of soybean max (L17), *American Journal of Biochemistry and Biotechnol.* 2009; 5: 162-169.

27. Jafari M, and Sarmadian F. Soil principal and classification. Tehran University Press, 2nd ed. University Press. Iran. 2004, 650 p.

28. Amal M, Shraiy E, and Hegazi A.M. Effect of acetylsalicylic acid, indole-3-butyric acid and gibberellic acid on plant growth and yield of pea (*Pisum sativum.*). *J. Basic Appl. Sci*. 2009; 3 (4): 3514 - 3523.

29. Marshner H. Mineral Nutrition of Higher Plants. 2nd ed. Academic press. London. 1995, 889 p.

30. Ramirez I, Dorta F, Espinoza V, Jimenez E, Mercado A, and Pena-Cortes H. Effects of foliar and root applications of methanol on the growth of arabidopsis, tobacco and tomato plants. *J. Plant Growth Regul*. 2006; 25: 30 - 44.

31. Safarzadeh Vishkaei M. Effects of methanol on growth and yield of peanut (*Arachis hypogaea* L.). Ph.D. thesis. Sciences and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. 2007, 232 pp.

32. Lee H.S., Madhaiyan M., Kim C.W., Choi S.J., Chung K.Y., and Sa T.M. Physiological enhancement of early growth of rice seedling (*Oryza sativa* L.) by production of phytohormone of N2-fixing methylotrophic isolated. *Bio. Fertil. Soils* 2006; 42: 402 - 408.

Investigation of Essential Oil and Citral Content, and Morpho-physiological Changes of *Lippia citriodora* in Response to Induction of Bioactive Compounds and Plant Growth Regulators

Roodbaraky M (M.Sc.)[1], Mehrafarin A (Ph.D.)[2], Khalighi-Sigaroodi F (Ph.D.)[2], Naghdi Badi H (Ph.D.)[2]*

1- Department of Horticulture, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2- Medicinal Plants Research Center, Institute of Medicinal Plants, ACECR, Karaj, Iran
*Corresponding author: Medicinal Plants Research Center, Institute of Medicinal Plants, ACECR, P.O.Box: 31375/1369, Karaj, Iran
Tel: +98-26-34764010-18, Fax: +98-26-34764021
E-mail: Naghdibadi@yahoo.com

Abstract

Background: ***Lippia citriodora* H.B.K is an important medicinal and aromatic plant from the Verbenaceae family.**

Objective: The aim of this study was to investigation of essential oil percentage, *E*-citral (geranial) content and morphophysiological changes of *Lippia citriodora* in response to induction of bioactive compounds and plant growth regulators.

Methods: This study has been conducted on the base of factorial experiment in randomized complete block design (RCBD) with 3 replications. The first factor included the application of bioregulators at four levels that were distilled water, 50 ppm gibberellic acid (GA_3) + 50 ppm IBA, 50 ppm GA_3 + 100 ppm IBA and 100 ppm GA_3 + 50 ppm IBA. The second factor was chitosan inductions at two levels: distilled water and 400 ppm chitosan. The third factor was methanol induction at two levels: distilled water and 5% v/v methanol.

Results: The measured traits were significantly affected ($P \leq 0.01$) by the interaction of bioregulators, methanol and chitosan except for plant height, number of branches, leave length that were significantly affected at 0.05 level. The highest content of essential oil achieved by 400 ppm chitosan and 5% V/V methanol. The highest amount of leaves number and *E*-citral content were observed at 400 ppm chitosan. The maximum value of root and stem fresh and dry weight and leaf dry weight were obtained at 50 ppm GA_3 + 100 ppm IBA.

Conclusion: Generally, the interaction of foliar application of plant growth regulators, methanol and chitosan could be positively effect on essential oil, *E*-citral (geranial) content and morpho-physiological traits.

Keywords: ***Lippia citriodora*, Essential oil, Gibberellic acid, Indole-3-butyric acid, Chitosan, Methanol**