مقاله پژوهشی، صفحات ۳۶۵-۳۸۱
DOI:10.22034/jpr.2025.8587.3397

بررسی بیان نسبی ژن‌های مرتبط با مسیر سنتز سیترال و فراورده‌ی نهایی مسیر تحت تأثیر کاربرد کود نیتروژن و اسید سالیسیلیک در گیاه علف‌لیمو (*Cymbopogon citratus* DC. Stapf)

لیدا برهمندزاده[۱]، علیرضا ابدالی مشهدی[۱]، عبدالمهدی بخشنده[۱]، امین لطفی جلال آبادی[۱]، علیرضا شافعی‌نیا[۱]، نرگس سلطانی[۲*]

[۱].گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، خوزستان، ایران.

[۲].گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، لرستان، ایران.

تاریخ دریافت:۱۴۰۳/۱۱/۰۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۲/۳۰

چکیده

به‌منظور بررسی بیان نسبی ژن‌های موجود در مسیر تولید اسانس علف‌لیمو در شرایط تغذیه نیتروژن و محلول‌پاشی اسید سالیسیلیک، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل بر پایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی با دو سطح نیتروژن (عدم کاربرد و کاربرد ۱۰۰ کیلوگرم در هکتار) از منبع اوره و سه سطح اسید سالیسیلیک (شاهد، ۱۰میکرومولار و ۱۰۰میکرومولار) با سه تکرار در مزرعه پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان در سال ۱۴۰۱-۱۴۰۰ اجرا گردید. نتایج نشان داد که اسید سالیسیلیک بر همه صفات به‌جز عملکرد اسانس اثر معنی‌دار داشت و بیش‌ترین عملکرد اسانس (۴۸/۹ گرم بر مترمربع) با کاربرد ۱۰۰ کیلوگرم کود نیتروژن در هکتار به‌دست آمد. برهمکنش اسید سالیسیلیک و کود نیتروژن در صفات فنول، فلاونوئید کل و عملکرد اسانس معنی‌دار شد. همچنین محلول‌پاشی اسید سالیسیلیک صرف نظر از تفاوت در تیمار زمانی، افزایش بیان نسبی برای ژن *Aldh* را به‌عنوان ژن پایانی مسیر سنتز اسانس در مقایسه با تیمار شاهد به دنبال داشت که با نتیجه‌ی حاصل از کروماتوگرافی هم‌سو بود. درصد سیترال (مجموع نرال و ژرانیال) در اثر محلول‌پاشی هر دو غلظت ۱۰ میکرومولار اسید سالیسیلیک (به ترتیب ۲۷/۱ و ۴۵/۲ درصد) و ۱۰۰ میکرومولار اسید سالیسیلیک (به ترتیب ۱۴/۸۹ و ۲۱/۳۴ درصد) به مراتب بیش‌از درصد این دو ماده در تیمار شاهد (به ترتیب ۴/۹۶ و ۷/۸۳ درصد) به‌دست آمد.

واژه های کلیدی: محرک، تغذیه گیاه، علف سیترونلا، گیاه دارویی

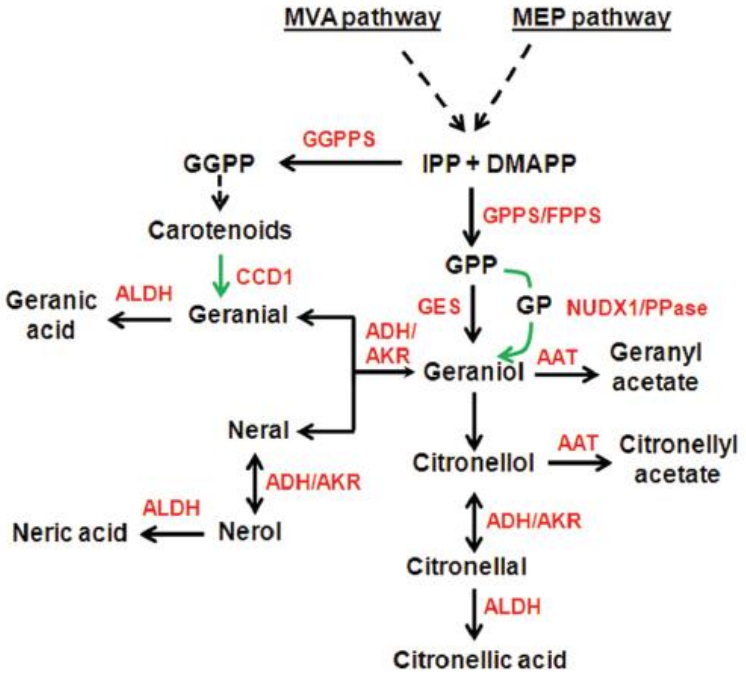
* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: nargesoltani29@gmail.com

مقدمه

استفاده از گیاهان دارویی در بسیاری از کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه بستر مناسبی را برای حفاظت از سلامت ایجاد می‌کند [12]. علف‌لیمو (*Cymbopogon Citratus*) گیاهی دارویی، متعلق به خانواده گرامینه و بومی هند است که در حال حاضر به‌طور گسترده در کشورهای گرمسیری و نیمه گرمسیری قاره آسیا، آفریقا و آمریکا کشت می‌شود

مقاله پژوهشی، صفحات ۳۶۵-۳۸۱
DOI:10.22034/jpr.2025.8587.3397

[13]. اسانس علف‌لیمو دارای رنگ شیری، طعمی تند و بویی شبیه به لیمو است [32]. این اسانس حاوی مواد مختلفی مانند ترپن‌ها، الکل‌ها، استرها و ترکیبات فنلی است که خواص ضد باکتری، ضد سرطان و ضد قارچ را سبب می‌شوند [19]. اسانس علف‌لیمو در مسیر بیوسنتزی حاصل از تلفیق دو مسیر MEP و مووالونات سنتز می‌شود و آنزیم GPPS/ FPPS (PP1) از جمله‌ی اولین آنزیم‌های فعال در مسیر تولید اسانس، به‌شمار می‌رود (شکل ۱)، در واقع فعالیت این آنزیم آغازکننده‌ی فعال شدن مسیر آبشاری تولید اسانس در علف‌لیمو می‌باشد، در توضیح این مسیر باید به این نکته اشاره کرد که آنزیم Aldehyde dehydrogenases (ALDH) آخرین آنزیم مرتبط با تولید اسانس‌های مد نظر بوده و فعالیت آن، فراورده‌هایی چون ژرانیک اسید[1]، نریک اسید[2] و سیترونلیک اسید[3] را به وجود می‌آورد [21].



شکل ۱- مسیر بیوسنتز اسانس در جنس *Cymbopogon* [20].

این مسیر بیوسنتزی نیز همچون سایر مسیرهای آبشاری متأثر از محرک‌ها، تنش‌های زنده و غیرزنده می‌باشد، بر اساس مطالعات مشخص شده‌است که استفاده از محرک‌ها می‌تواند بر ویژگی‌های مورفولوژیک و شاخص‌های کمی و کیفی گیاهان اثر گذاشته و در بیش‌تر موارد منجر به بهبود ویژگی‌های رشدی گیاه و عملکرد آن در شرایط طبیعی و حتی تنش شود [3, 9, 14, 15-16]. از جمله‌ی این محرک‌ها، اسید سالیسیلیک است که به گروه متنوع فنول‌های گیاهی تعلق دارد و بر جذب عناصر معدنی، تنظیم فرآیندهای فیزیولوژیک مانند پایداری غشاء، بسته شدن روزنه‌ها، جذب عناصر، سنتز کلروفیل و پروتئین‌ها، تعرق و فتوسنتز، بازدارندگی سنتز اتیلن، بهبود رشد و عملکرد گیاهان اثر دارد [25]. بعلاوه استفاده از آن بر سیستم دفاعی گیاه و متابولیت‌های ثانویه‌ی آن نیز تأثیرگذار است برای مثال، محلول‌پاشی اسید سالیسیلیک در دو غلظت ۱۰ و ۱۰۰ میکرومولار منجر به افزایش بیان نسبی ژن‌های مسیر تولید

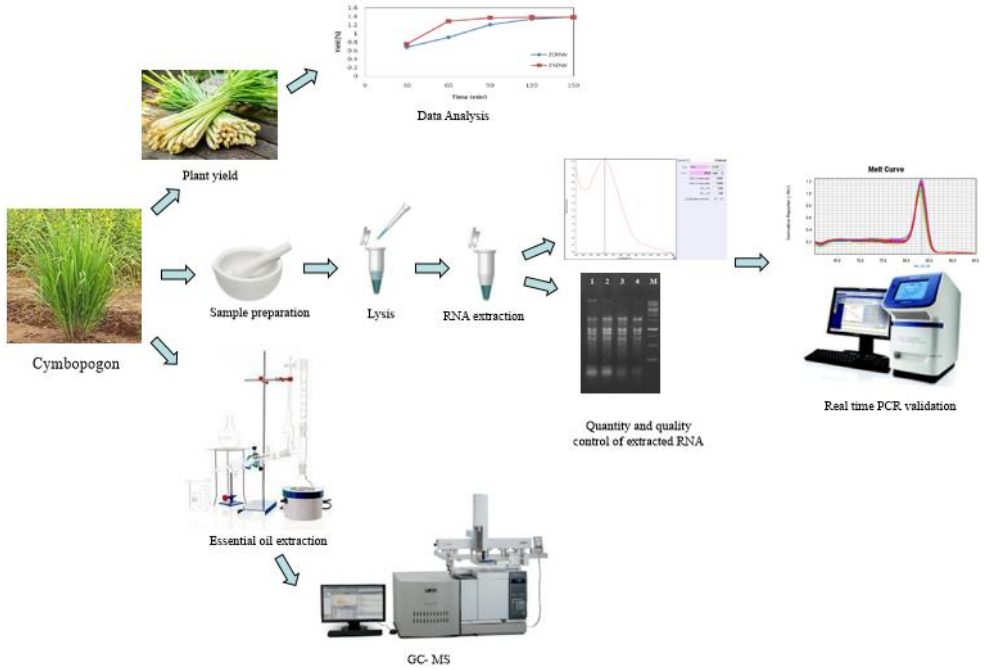
[1]. Geranic acid
[2] .Neric acid
[3]. Citronellic acid

مقاله پژوهشی، صفحات ۳۶۵-۳۸۱
DOI:10.22034/jpr.2025.8587.3397

آلکالوئیدهای دارویی گیاه پروانش، در هر دو غلظت محلول‌پاشی شد [31]، در این مسیر نیز همانند سایر مسیرهای آبشاری انتظار بر تغییر در ساخت فرآورده پایانی در اثر تغییرات بیان ژن‌های موجود در مسیر بود و اندازه‌گیری محصول نهایی (آلکالوئیدهای وین‌بلاستین و وین‌کریستین) با روش کروماتوگرافی مایع (HPLC) این مطلب را تأیید نمود [30]. علاوه بر محرک‌ها، کاربرد صحیح و مناسب عناصر و مواد غذایی در طول مراحل کاشت، داشت و برداشت گیاهان دارویی، نه تنها نقش عمده‌ای در افزایش عملکرد دارد، بلکه در کمیت و کیفیت مواد مؤثره آن‌ها نیز مؤثر است [34]. نیتروژن از نخستین عناصری است که گیاهان در مناطق خشک و نیمه‌خشک با کمبود آن مواجه هستند [27]. به همین دلیل واکنش بیشتر گیاهان نسبت به مصرف نیتروژن، در مقایسه با سایر عناصر غذایی بیش‌تر است [22]. گزارش‌ها نشان می‌دهد که کاربرد کودهای شیمیایی به‌ویژه نیتروژن سبب بهبود عناصر غذایی در خاک و افزایش جذب آن‌ها طی مراحل مختلف شده که در نهایت منجر به افزایش عملکرد می‌شود [9]. در مرزه کوهستانی مشخص گردید که کاربرد کود نیتروژن تا سطح ۱۰۰ کیلوگرم در هکتار موجب افزایش درصد اسانس و میزان فنول کامل شده است [7]. نتایج مطالعه برهمندزاده و همکاران [1] نشان داد که افزایش مصرف نیتروژن باعث بالا رفتن ماده خشک کل، درصد و عملکرد اسانس در علف‌لیمو می‌شود. مطالعات کودی در منطقه خوزستان برای اغلب گیاهان و به‌ویژه علف‌لیمو به‌دلیل کم بودن میزان ماده آلی و نیتروژن موجود در خاک آن، بسیار ضروری است. سطح کودی ۱۰۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار، باعث تولید عملکردی قابل قبول در اغلب گیاهان شده است [28, 5, 3, 7-1]. در این مطالعه اثر استفاده از کود نیتروژن و غلظت‌های اسید سالیسیلیک بر ویژگی‌های کمی و کیفی عملکرد و بیان نسبی ژن‌های *Gpps/ Fpps* (*Pp1*) و *Aldh* در مسیر تولید اسانس در گیاه علف‌لیمو در خوزستان مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روشها

نمایی شماتیک از مراحل مختلف اجرای پژوهش در شکل ۲ نشان داده شده است.



شکل ۲- نمای شماتیک از مراحل مختلف اجرای آزمایش.

مقاله پژوهشی، صفحات ۳۶۵-۳۸۱
DOI:10.22034/jpr.2025.8587.3397

کشت و اجرای تیمار

این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار انجام شد. فاکتورهای آزمایش شامل دو سطح کود نیتروژن (عدم کاربرد و کاربرد ۱۰۰ کیلوگرم در هکتار) از منبع اوره [6, 7]و محلول‌پاشی اسید سالیسیلیک در سطوح شاهد (آب مقطر)، ۱۰ و ۱۰۰ میکرومولار [16] بود. برای تیمار کودی، ۲۰ درصد کود پس از استقرار گیاه و مابقی آن جهت کاهش تلفات آبشویی، در چهار مرحله به همراه آب آبیاری و با توجه به درصد نیتروژن موجود در خاک اعمال گردید. برای محلول‌پاشی اسید سالیسیلیک، غلظت‌های مورد نظر با حل‌کردن مقادیر محاسبه‌شده اسید سالیسیلیک (مارک مرک آلمان) در آب مقطر تهیه گردید. محلول‌پاشی اسید سالیسیلیک نیز در زمانی که گیاهان در زمان اوج مرحله رویشی (۷۰ درصد سطح سبز در هر واحد آزمایشی) بودند، در دو نوبت به فاصله هر ۱۵ روز انجام شد. عملیات آماده‌سازی زمین شامل شخم عمیق و یک دیسک عمود بر آن برای خردکردن کلوخه‌ها و سپس عملیات تسطیح بود. کشت گیاه به‌صورت نشاکاری با استفاده از نشاء علف‌لیمو ارسالی از شرکت زرگیاه اجرا گردید. کشت پاجوش‌های علف‌لیمو در تاریخ ۲۰ اسفندماه ۱۳۹۹ انجام گرفت. هر کرت شامل ۶ خط به طول ۳ متر و عرض ۳ متر بوده و فاصله بین کرت‌ها نیم‌متر در نظر گرفته شد. فاصله خطوط کشت از یکدیگر ۶۰ سانتی‌متر و فاصله بین بوته‌ها روی خطوط کشت ۴۰ سانتی‌متر در نظر گرفته شد. اولین آبیاری نیز بلافاصله پس از کاشت و آبیاری‌های بعدی با توجه به نیاز گیاه در کل فصل رشد انجام شد. از آنجا که گیاه چندساله است، اندازه‌گیری‌ها در سال دوم از همان مزرعه سال اول صورت گرفت.

جدول ۱- توالی و دمای اتصال آغازگرها.

ارزیابی تغییرات بیان نسبی ژن‌های *Gpps/Fpps* (*Pp1*) و *Aldh* موجود در مسیر تولید اسانس علف‌لیمو

نمونه‌برداری و استخراج RNA از بافت برگ

برای بررسی تغییرات بیان نسبی در اثر محلول‌پاشی اسید سالیسیلیک در دو غلظت ۱۰ و ۱۰۰ میکرومولار در تیمار کودی ۱۰۰ کیلوگرم نیتروژن، پس از محلول‌پاشی، نمونه‌برداری از برگ گیاه علف‌لیمو در تیمارهای زمانی ۰، ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶ و ۷ روز صورت گرفت و استخراج RNA از ۱۰۰ میلی‌گرم بافت برگ پودر شده‌ی گیاه علف‌لیمو با استفاده از کیت "ستونی استخراج RNA از بافت گیاه" (شرکت آناسل[4]- Cat. No.: RE001) بر اساس دستورکار همراه کیت انجام پذیرفت. از تیمار آنزیمی DNase I (شرکت سیناکلون[5]- DNase I, RNase- free, Cat. No.: MO5401) در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر به منظور حذف ژنوم احتمالی استخراج شده استفاده شد و تعیین کمیت و کیفیت RNA استخراجی با دستگاه نانودراپ و الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ صورت گرفت. در ادامه ساخت cDNA با استفاده از کیت سنتز رشته‌ی اول cDNA (شرکت آناسل- Lot n: CS0025) و آغازگر الیگوdT[6] موجود در آن، برای غلظت ۵۰۰ نانوگرم از هر نمونه‌ی RNA در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر بر اساس دستورکار شرکت سازنده، انجام و در فریزر ۲۰°C- درجه‌ی سانتی‌گراد نگه‌داری شد.

واکنش Real time- PCR

از آغازگرهای طراحی شده در پژوهش منا و همکاران [21] برای انجام واکنش‌های Real time- PCR استفاده شد (جدول ۱).

[4]. AnaCell
[5]. SinaClon
[6]. Oligo dT

مقاله پژوهشی، صفحات ۳۶۵-۳۸۱
DOI:10.22034/jpr.2025.8587.3397

نام آغازگر	توالی آغازگر	تکثیر	طول (bp)	اتصال	دمای (°C)
Actin	F: GACTACGACCAGGAGATGGAGACT R: ATGACCTGTCCATCAGGAAGCT		۱۰۰		۵۸
Aldh1	F: TTGCTGTGCTGGGTCTCGTA R: GGCCTTCTCCACGAACTCATC		۱۰۰		۵۸
Pp1 or *Gpps/Fpps*	F: CATCAAGCAGGACACCAAGAAG R: CCATGTTTGAGGAAGTAACCCATA		۱۰۹		۵۸

تأیید صحت ساخت cDNA، یافتن دمای اتصال بهینه، غلظت مناسب اجزا در واکنش و بررسی تکثیر اختصاصی آغازگرها با استفاده از واکنش PCR (مرحله واسرشته‌سازی اولیه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای $^{\circ}C$ ۹۵، ۳۵ سیکل شامل واسرشته‌سازی ($^{\circ}C$ ۹۵)، اتصال ($^{\circ}C$ ۵۴-۶۰) و گسترش $^{\circ}C$ ۷۲ هر یک به مدت ۲۰ ثانیه و مرحله گسترش نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای $^{\circ}C$ ۷۲) و الکتروفورز محصول این واکنش صورت گرفت. پس از تعیین شرایط دمایی، زمانی و غلظتی برای هر واکنش، ارزیابی بیان نسبی ژن به کمک واکنش Real time- PCR و با استفاده از کیت سایبرگرین High ROX (شرکت آمپلی‌کون[۷]- Cat. No. A325402) و دستگاه Step One Plus (شرکت ABI) در ۳ تکرار بیولوژیک (۳ بوته برای هر تیمار) و ۲ تکرار تکنیکی (به کاربردن cDNA هر نمونه‌ی تیماری در دو مرتبه) با شرایط دمایی قبل و انتخاب دمای اتصال $^{\circ}C$ ۵۸، انجام شد.

آنالیز داده‌های حاصل از واکنش Real time-PCR

در محاسبه‌ی عدد بیان نسبی هر ژن از روش اختلاف در چرخه‌ی آستانه یا ΔΔCT و نرم‌افزار REST© استفاده شد [18, 22]. در طی این آنالیز ابتدا نرمال‌سازی با استفاده از ژن مرجع اکتین صورت گرفت و سپس عدد بیان نسبی ژن ($^{-\Delta\Delta CT}$۲) محاسبه گردید.

ارزیابی عملکرد و کیفیت اسانس

برای بررسی عملکرد وزن خشک، نمونه‌ها به مدت ۷۲ ساعت در دمای $^{\circ}C$ ۷۰ در آون قرار داده شدند، همچنین برای انجام اسانس‌گیری پس از خشکاندن گیاهان برداشت شده در سایه، مقدار ۳۰ گرم نمونه به روش تقطیر با آب، با استفاده از دستگاه کلونجر به‌مدت

[7]. Ampliqon

مقاله پژوهشی، صفحات ۳۶۵-۳۸۱
DOI:10.22034/jpr.2025.8587.3397

سه ساعت جوشانده شد و در نهایت بازده اسانس براساس وزن خشک نمونه محاسبه گردید.

درصد اسانس × ماده خشک برگ (گرم در متر مربع) = عملکرد اسانس (گرم بر متر مربع)

ارزیابی کیفیت اسانس به روش کروماتوگرافی گازی

اسانس‌ها با استفاده از سولفات سدیم خشک آب‌گیری گردید و با روش تجزیه دستگاهی با دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف نگار جرمی آنالیز گردید. شناسایی و تجزیه ترکیب‌های اسانس با بررسی طیف‌های جرمی حاصل از دستگاه گاز کروماتوگراف متصل به طیف‌سنج جرمی (GC/MS) مدل Agilent (MS 5875 C ,GC7890) و مقایسه این پارامترها با ترکیب‌های استاندارد صورت گرفت. مشخصات دستگاه عبارت است از ستون HP-5MS به طول ۳۰ متر و قطر ۰/۲۵ میلی‌متر. مد یونیزاسیون EI و انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت. برنامه حرارتی آون ۵ دقیقه در ۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد، سپس ۵۰ تا ۲۴۰ درجه سانتی‌گراد با شیب ۳ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه و ۲۴۰ تا ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد با شیب ۱۵ درجه سانتی‌گراد بود. همچنین دمای محل تزریق ۲۹۰ درجه سانتی‌گراد و سرعت حرکت گاز هلیوم ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه تنظیم شد. شناسایی طیف‌ها با مقایسه مؤلفه‌ها با ترکیب های استاندارد با استفاده از زمان بازداری ترکیب‌ها و مقایسه آن با اندیس بازداری (KI) و اطلاعات موجود در منابع معتبر علمی [10] صورت گرفت.

اندازه‌گیری میزان فنول کل

جهت اندازه‌گیری میزان فنول کل به روش پورمراد و همکاران [26] از معرف فولین سیو کالتو (مرک) استفاده گردید. پنج میلی‌لیتر از معرف فولین سیوکالتو با چهار میلی‌لیتر از محلول Na2CO3 یک مولار مخلوط گردید. سپس نیم میلی‌لیتر از محلول هر عصاره گیاهی یا اسیدگالیک به مخلوط اضافه شد. مخلوط‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شدند. پس از این مدت میزان جذب نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل Lambda 45-UV/Visible در طول موج ۷۶۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. نمونه‌ها در سه تکرار بررسی شدند و منحنی استاندارد توسط غلظت‌های صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰ (میلی‌گرم بر لیتر) از محلول اسیدگالیک تهیه گردید. مقدار فنول کل در گیاهان دارویی به‌صورت معادل میلی‌گرم اسیدگالیک (GAE) بر گرم وزن خشک محاسبه شد.

اندازه‌گیری میزان فلاونوئید کل

مقادیر فلاونوئیدها در نمونه عصاره‌های گیاهی به روش پورمراد و همکاران [26] جلالی و همکاران [2] اندازه-گیری شدند. ابتدا ۰/۱ میلی‌لیتر کلرید آلومینیوم ۱۰ درصد را با ۰/۱ میلی‌لیتر استات پتاسیم یک مولار مخلوط کرده و سپس به آن‌ها ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر دو بار تقطیر اضافه شد. در مرحله بعد نیم میلی لیتر از محلول هر عصاره که با ۱/۵ میلی لیتر اتانول مخلوط گردیده بود، به مخلوط کلرید آلومینیوم، استات پتاسیم و آب اضافه گردید. مخلوط نهایی حاصل برای هر عصاره (با حجم پنج میلی لیتر) برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. سپس جذب مخلوط واکنش در طول موج ۴۱۵ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر مدل Lambda 45-UV/Visible اندازه‌گیری شد. مقدار فلاونوئید کل به‌صورت معادل میلی‌گرم کوئرستین بر گرم وزن خشک محاسبه و بیان شد. ارزیابی برای هر کدام از عصاره‌ها در سه تکرار انجام پذیرفت.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی

ارزیابی میزان مهار رادیکال آزاد (DPPH): diphenyl-1-picrylhydrazyl ابتدا ۲/۵ mL از محلول متانولی نمونه مورد نظر در یک لوله‌ی آزمایش ریخته شد. سپس به آن یک میلی‌لیتر محلول متانولی

مقاله پژوهشی، صفحات ۳۶۵-۳۸۱
DOI:10.22034/jpr.2025.8587.3397

DPPH اضافه شد. محتویات هر لوله با ورتکس کاملاً مخلوط شد و پس از گذشت ۳۰ دقیقه، در دمای اتاق و در تاریکی، جذب آن‌ها در طول موج ۵۱۸ nm با استفاده از اسپکتروفتومتر UV/Vis در برابر بلانک حاوی متانول خوانده شد. در این روش از ویتامین C و BHT به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. با توجه به مکانیسم ذکر شده هرچه قدرت آنتی‌اکسیدان نمونه بیشتر باشد رنگ محلول حاصل زردتر است. درصد مهار رادیکال DPPH با استفاده از معادله $I(\%) = 100\times (A_0 - As)/ A_0$ محاسبه گردید که A_0 جذب کنترل (حاوی همه اجزا واکنشگر بدون نمونه) و As جذب نمونه بود. سپس نتایج بصورت IC50 (مقداری از آنتی‌اکسیدان که لازم است تا غلظت DPPH به 50 درصد مقدار اولیه برسد) بیان گردید [33].

جهت انجام تجزیه آماری داده‌ها، آزمون نرمال بودن داده‌ها قبل از آنالیز انجام و سپس تجزیه واریانس صورت گرفت. میانگین‌های به‌دست آمده با آزمون LSD در سطح احتمال خطای پنج درصد مورد مقایسه قرارگرفتند و محاسبات آماری با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۴ انجام شد.

نتایج

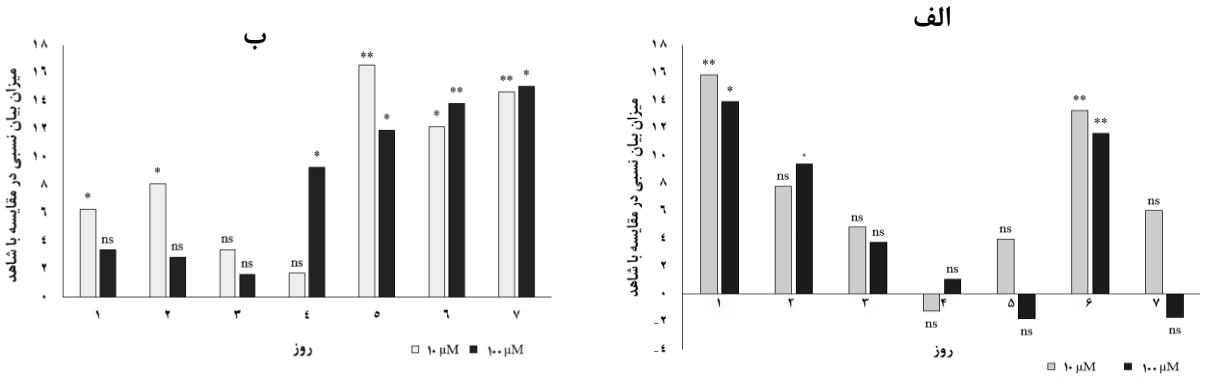
ارزیابی تغییرات بیان نسبی ژن‌های *Gpps/ Fpps* (*Pp1*) و *Aldh* موجود در مسیر تولید اسانس علف‌لیمو

در مطالعه حاضر تغییرات بیان نسبی دو ژن از ژن‌های مسیر بیوسنتزی اسانس علف‌لیمو شامل *Gpps/ Fpps* یا Pp_1 به‌عنوان ژن آغازین مسیر و *Aldehyde dehydrogenases* (*Aldh*) به‌عنوان ژن فعال در مراحل پایانی مسیر، در اثر محلول‌پاشی اسید سالیسیلیک در دو غلظت ۱۰ و ۱۰۰ میکرومولار در طی زمان و در شرایط استفاده از ۱۰۰ کیلوگرم در هکتار نیتروژن، با نرمال‌سازی ژن اکتین مورد ارزیابی قرار گرفت.

بررسی تغییر بیان نسبی ژن (*Gpps/ Fpps* (Pp_1) در اثر محلول‌پاشی هر دو غلظت ۱۰ و ۱۰۰ میکرومولار اسیدسالیسیلیک در سه روز ابتدای پس از محلول‌پاشی، افزایش بیان را نسبت به تیمار شاهد نشان داد و بیش‌ترین عدد بیان به میزان ۱۵/۸ و ۱۳/۹در روز اول به‌ترتیب در تیمارهای غلظتی ۱۰ و ۱۰۰ میکرومولار محلول‌پاشی اسیدسالیسیلیک حاصل شد، هرچند افزایش مشاهده شده در طول زمان روند کاهشی داشت و کم‌ترین میزان بیان در هر دو تیمار در روز چهارم پس از محلول‌پاشی صورت گرفت (شکل ۳- الف). کاهش بیان نسبی مشاهده شده برای هر دو غلظت در روزهای چهارم و پنجم با افزایش بیان در روز ششم جایگزین شد. در بررسی تغییرت بیان نسبی ژن *Gpps/ Fpps* (Pp_1) صرف نظر از نوع تغییرات کاهشی یا افزایشی، میزان تغییر در غلظت ۱۰۰ میکرومولار بیش‌تر از غلظت ۱۰ میکرومولار بود.

محلول‌پاشی بافت برگی گیاه علف‌لیمو در هر دو غلظت مورد آزمایش (۱۰ و ۱۰۰ میکرومولار اسید سالیسیلیک) افزایش بیان ژن *Aldh* را در همه‌ی تیمارهای زمانی نشان داد (شکل ۳- ب). بیش‌ترین عدد بیان در روز پنجم تیمار غلظتی ۱۰ میکرومولار به میزان ۱۶/۵ و بیش‌ترین میزان بیان در تیمار غلظتی ۱۰۰ میکرومولار در روز هفتم با عدد بیان ۱۵/۰۶ حاصل شد.

مقاله پژوهشی، صفحات ۳۶۵-۳۸۱
DOI:10.22034/jpr.2025.8587.3397



شکل ۳- نمودار مربوط به تغییرات بیان نسبی ژن‌های الف) ***Gpps/ Fpps*** و ب) ***Aldh*** در دو غلظت ۱۰ و ۱۰۰ میکرومولار محلول‌پاشی اسیدسالیسیلیک در طول زمان. **، * و ***ns*** به ترتیب معنی‌داری در سطح اطمینان آماری ۹۹٪، ۹۵٪ و غیرمعنی‌دار.

ارزیابی عملکرد و کیفیت اسانس علف‌لیمو

نتایج مقایسه میانگین تیمارها (جدول ۲) نشان داد که بیش‌ترین میزان وزن خشک کل با کاربرد توأم ۱۰۰ میکرومولار اسید سالیسیلیک و ۱۰۰ کیلوگرم در هکتار کود نیتروژن (۱۶۵۱ گرم بر متر مربع) و کم‌ترین میزان وزن خشک کل (۳۷۱ گرم بر متر مربع) با عدم کاربرد اسید سالیسیلیک و عدم کاربرد کود نیتروژن به‌دست آمد (جدول ۲) که ۳۴۵ درصد با بالاترین میزان وزن خشک تفاوت داشت. بالاترین عملکرد اسانس در تیمار ۱۰ میکرومولار اسید سالیسیلیک و ۱۵۰ کیلوگرم کود نیتروژن (۶۵/۶ گرم در مترمربع) و کم‌ترین مقدار آن با اختلاف ۲۶۰ درصد با عدم کاربرد اسید سالیسیلیک و عدم کاربرد کود نیتروژن (۱۸/۲ گرم در مترمربع) مشاهده شد (جدول۲). برهمکنش اسید سالیسیلیک و کود نیتروژن بر درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی معنی‌دار نشد اما اثر اصلی کود نیتروژن و اسید سالیسیلیک معنی‌دار گردید (جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین سطوح اسید سالیسیلیک (جدول ۴) و کود نیتروژن (جدول ۵) به‌ترتیب نشان داد که بالاترین درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی مربوط به کاربرد ۱۰۰ کیلوگرم کود نیتروژن در هکتار و تیمار۱۰۰ میکرومولار اسید سالیسیلیک بود. بالاترین مقدار فنول کل (۲۲/۶ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم برگ خشک) از بکارگیری تیمار۱۰۰ میکرومولار اسید سالیسیلیک و ۱۰۰ کیلوگرم کود نیتروژن به‌دست آمد و کم‌ترین مقدار فنول کل (۱۴/۴ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم برگ خشک) نیز با تیمار شاهد اسید سالیسیلیک اختلاف معنی‌داری نداشت و با کاربرد ۱۰ میکرومولار اسید سالیسیلیک و ۱۰۰ کیلوگرم کود نیتروژن مشاهده شد (جدول۳). بیشترین مقدار فلاونوئید کل (۹/۱۲ میلی‌گرم کوئرستین در گرم وزن خشک) نیز در تیمار۱۰۰ میکرومولار اسید سالیسیلیک و عدم کاربرد کود نیتروژن به‌دست آمد و کم‌ترین آن (۵/۶۴ میلی‌گرم کوئرستین در گرم وزن خشک) با عدم کاربرد میکرومولار اسید سالیسیلیک و ۱۰۰ کیلوگرم کود نیتروژن مشاهده گردید (جدول۳).

مقاله پژوهشی، صفحات ۳۶۵-۳۸۱
DOI:10.22034/jpr.2025.8587.3397

جدول ۲- تجزیه واریانس تاثیر اسید سالیسیلیک و نیتروژن بر صفات علف‌لیمو

Table 2. ANOVA of salicylic acid and nitrogen effects on lemongrass traits

S.O.V.	df	M.S. Total dry weight	Essential oil yield	Antioxidant activity percentage	Total phenol	Total flavonoids
Replication	2	7942^{ns}	9.95^{ns}	40.6^{ns}	8.48^{ns}	0.008^{ns}
Salicylic acid (S)	2	84186^{ns}	81.6**	43.8*	36.9**	2.45**
Nitrogen (N)	1	**4638804	**2822	*61.8	*20.5	**16.6
S × N	2	30044^{ns}	**92	17.5^{ns}	*18.5	*0.45
Experimental error	10	41870	9.06	11.3	2.76	0.08
C.V. (%)		21.9	9.60	3.86	8.73	3.92

^{ns}, *, and **: non-significant, significant at 5 and 1% probability levels, respectively.

^{ns}، * و ** به ترتیب، عدم معنی‌داری، معنی‌داری دار در سطوح ۵ و ۱ درصد

جدول۳- مقایسه میانگین اثر متقابل اسید سالیسیلیک × نیتروژن بر صفات علف‌لیمو

Table 3. Means comparison of salicylic acid × nitrogen interaction on lemongrass traits

Salicylic acid (mmol)	Nitrogen (kg.ha^{-1})	Essential oil yield (g.m^{2})	Total phenol (mg gallic acid.g^{-1} DW)	Total flavonoids (mg quercetin.g^{-1} DW)
0	0	18.2^{c}	20.4^{ab}	7.56^{b}
	100	48.9^{a}	16.8^{cd}	5.64^{d}
10	0	19.04^{c}	19.1^{bc}	7.83^{b}
	100	35.1^{b}	14.4^{d}	6.46^{c}
100	0	19.1^{c}	20.7^{ab}	9.12^{a}
	100	47.4^{a}	22.6^{a}	6.64^{c}

In each column, means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).

در هر ستون، وجود حروف مشابه به منزله عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است (آزمون دانکن).

مقاله پژوهشی، صفحات ۳۶۵-۳۸۱
DOI:10.22034/jpr.2025.8587.3397

جدول۴- مقایسه میانگین اثر اصلی اسید سالیسیلیک بر صفات علف‌لیمو

Table 4- Comparison of average interaction of salicylic acid and nitrogen fertilizer on lemongrass traits

Salicylic acid (mmol)	Antioxidant activity percentage
0	84.5[b]
10	86.9[ab]
100	89.9[a]

In each column, means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level

در هر ستون، وجود حروف مشابه به منزله عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است (آزمون دانکن).

جدول ۵- مقایسه میانگین اثر اصلی کود نیتروژن بر صفات علف‌لیمو

Table 4- Comparison of average interaction of salicylic acid and nitrogen fertilizer on lemongrass traits

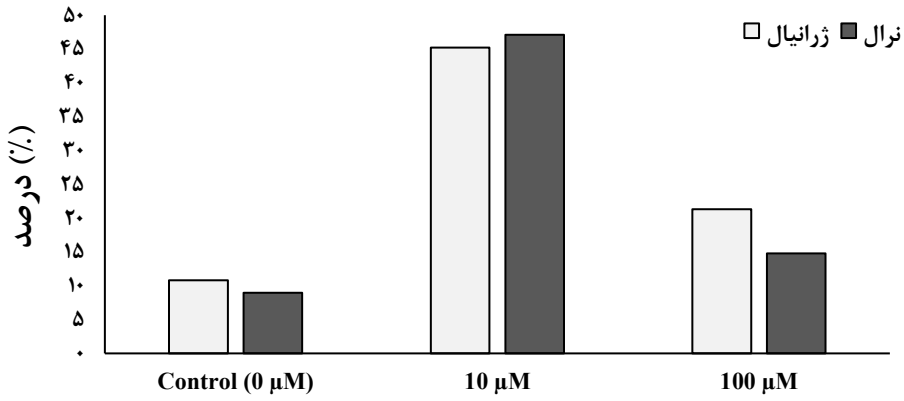
Nitrogen (kg/h)	Total dry weight	Antioxidant activity percentage
0	425.70[b]	85.2[b]
100	1441[a]	88.9[a]

In each column, means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level

در هر ستون، وجود حروف مشابه به منزله عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است (آزمون دانکن).

بر اساس نتایج حاصل از آنالیز کروماتوگرافی گازی طیف‌سنجی جرمی، میزان ژرانیال در تیمار شاهد (عدم محلول‌پاشی) و تیمارهای ۱۰ و ۱۰۰ میکرومولار محلول‌پاشی برگی اسید سالیسیلیک به‌ترتیب ۱۰/۸۳، ۴۵/۲ و ۲۱/۳ درصد و میزان نرال در تیمار شاهد (عدم محلول‌پاشی) و تیمارهای ۱۰ و ۱۰۰ میکرومولار محلول‌پاشی برگی اسید سالیسیلیک به‌ترتیب۸/۹۶، ۲۷/۱ و ۱۴/۸ درصد گزارش شد (شکل ۴).

مقاله پژوهشی، صفحات ۳۶۵-۳۸۱
DOI:10.22034/jpr.2025.8587.3397



شکل ۴- نمودار مربوط به **GC- MS** ماده‌ی سیترال (نرال و ژرانیال) در سه غلظت ۰، ۱۰ و ۱۰۰ میکرومولار محلول‌پاشی اسیدسالیسیلیک در روز هفتم پس از محلول‌پاشی.

بحث و نتیجه گیری

بر اساس گزارش‌های موجود [7 -3 ,5 ,28] استفاده از سطح کودی ۱۰۰ کیلوگرم در هکتار نیتروژن بیش‌ترین عملکرد را نسبت به سایر سطوح تیمار نیتروژن، به خود اختصاص داد که با گزارش برهمندزاده و همکاران [1] در گیاه علف‌لیمو مشابهت داشت. علاوه بر تأمین نیاز کودی گیاه، کاربرد محرک‌ها در راستای رسیدن به عملکرد کمی و کیفی بیش‌تر همواره مد توجه بوده است و محلول‌پاشی با اسید سالیسیلیک در دوزهای مناسب از جمله‌ی این موارد است، بر اساس برخی گزارش‌ها، محلول‌پاشی اسید سالیسیلیک در غلظت‌های پایین موجب افزایش متابولیت‌های گیاهی و کمک به تعدیل اثرات تنش‌های زیستی و غیرزیستی می‌گردد [16 -23 ,10]. سالیسیلیک که یک ترکیب فنلی گیاهی محسوب می‌گردد به‌طور طبیعی در درون بافت گیاهی نیز وجود دارد و کاربرد خارجی آن با اثر بر سنتز هورمون‌هایی مانند آبسیزیک، جیبرلین، متیل جاسمونات و اتیلن و همچنین با القای پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی و افزایش جذب مواد مغذی، بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیک و رشد گیاهان را تنظیم می‌کند که نتیجه‌ی آن سازگاری گیاه نسبت به تنش‌های است [17, 11, 14-15].

اسانس علف‌لیمو در مسیر بیوسنتزی حاصل از تلفیق دو مسیر MEP و مووالونات سنتز می‌شود و آنزیم GPPS/ FPPS (PP1) از جمله‌ی اولین آنزیم‌های فعال در مسیر است و فعالیت این آنزیم آغازکننده‌ی فعال شدن مسیر آبشاری تولید اسانس در علف‌لیمو، در توضیح این مسیر باید به این نکته اشاره کرد که آنزیم Aldehyde dehydrogenases (ALDH) آخرین آنزیم مرتبط با تولید اسانس‌های مد نظر بوده و فعالیت آن فراورده‌هایی چون ژرانیک‌اسید[8]، نریک‌اسید[9] و سیترونلیک‌اسید[10] را به وجود می‌آورد [21]. این مسیر بیوسنتزی نیز همچون سایر مسیرهای آبشاری متأثر از محرک‌ها، محرک‌ها، تنش‌های زنده و

[8]. Geranic acid
[9] .Neric acid
[10]. Citronellic acid

مقاله پژوهشی، صفحات ۳۶۵-۳۸۱
DOI:10.22034/jpr.2025.8587.3397

غیرزنده و ... می‌باشد و اسید سالیسیلیک از جمله تنظیم‌کننده‌های درونی سلول با نقش پیام‌رسانی است که کاربرد آن تغییرات بیان ژن‌ها و فعالیت آنزیم‌های این مسیر را سبب می‌گردد. درمسیر ساخت اسانس گیاه علف‌لیمو با فعالیت آنزیم‌های سنتز شده توسط ژن *Gpps/ Fpps* (*Pp1*) تولید ژرانیول[11] صورت می‌گیرد [21]. تغییر بیان نسبی ژن *Gpps/ Fpps* (*Pp1*) در اثر محلول‌پاشی هر دو غلظت ۱۰ و ۱۰۰ میکرومولار اسیدسالیسیلیک در سه روز ابتدای پس از محلول‌پاشی افزایش بیان را نسبت به تیمار شاهد نشان داد و سپس روند کاهشی نشان داد، در روز ششم با افزایش مجدد مواجه گردید (شکل ۳- الف) که به نظر می‌رسد روند کاهشی در پی گرفته شده و سپس افزایش بیان، ناشی از پاسخ فیدبک منفی سلول به افزایش بیان ژن *Gpps/ Fpps* (*Pp1*) در روزهای ابتدایی پس از محلول‌پاشی و کم‌تر شدن نیاز سلول به بیان شدن این ژن باشد که افزایش بیان نسبی اتفاق افتاده در روز ششم این حدس را قوت می‌بخشد چرا که پس از روند کاهشی سه روزه‌ی بیان این ژن، به یکباره در ششم با افزایش بیان مواجه گردید. ژن *Gpps/ Fpps* (*Pp1*) در مسیر ترپنوئیدی تولید متابولیت‌های ثانویه‌ی گیاهی نقش کلیدی دارند و معمولا در مطالعات مولکولی مربوط به بررسی الگوی بیان ژن‌های این مسیر، تغییرات بیان آن‌ها نیز مورد ارزیابی قرار می‌گیرد [31 -30 ,29]، در بررسی تأثیر محلول‌پاشی ۱۰۰ میکرومولار اسید سالیسیلیک در گیاه پروانش، بیان نسبی ژن *Gpps/ Fpps* (*Pp1*) و سایر ژن‌های موجود در مسیر مورد مطالعه در تیمار زمانی ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمار، افزایش نشان داد که در نهایت منجر به افزایش در مقدار فراوده‌ی پایانی مسیر شد [30]. در بررسی تغییرت بیان نسبی این ژن صرف نظر از نوع تغییرات کاهشی یا افزایشی، میزان تغییر در غلظت ۱۰۰ میکرومولار بیش‌تر از غلظت ۱۰ میکرومولار بود که توجه به این نکته در انتخاب غلظت مناسب توصیه شده‌ی مطالعه فعلی، حائز اهمیت می‌باشد از این‌رو در توضیح تغییرات بیان نسبی ژن پایانی *Aldh*، این نکته نیز مد نظر قرار گرفت. در مسیر تولید اسانس گیاه علف‌لیمو در اثر فعالیت چندین آنزیم در نهایت سه فراورده‌ی پایانی مسیر که شامل ژرانیک‌اسید، نریک‌اسید و سیترونلیک‌اسید هستند با فعالیت آنزیم Aldehyde dehydrogenases (ALDH) ساخته می‌شوند [21]. محلول‌پاشی بافت برگی گیاه علف‌لیمو در هر دو غلظت مورد آزمایش (۱۰ و ۱۰۰ میکرومولار اسید سالیسیلیک) افزایش بیان ژن *Aldh* را در همه‌ی تیمارهای زمانی نشان داد (شکل ۳- ب). با وجود اهمیت بسیار در تغییرات الگوی بیانی همه‌ی ژن‌های موجود در مسیر تولید اسانس، داشتن تأثیر مثبت بر بیان ژن پایانی مسیر از اهمیت دوچندان برخوردار است و همان‌گونه که در نتایج قابل مشاهده است کاربرد محلول‌پاشی اسید سالیسیلیک در هر دو غلظت افزایش بیان ژن *Aldh* را درپی داشت و تنها نکته‌ی حائز اهمیت تعیین زمان برداشت محصول پس از اعمال تیمار و انتخاب مناسب‌ترین غلظت برای محلول‌پاشی است، شاید اگر تنها اطلاعات در دسترس اطلاعات بیان نسبی ژن‌های مسیر مورد مطالعه و به‌ویژه ژن *Aldh* بود، تیمار غلظتی ۱۰ میکرومولار برای محلول‌پاشی و برداشت نمونه در روز پنجم پس از اعمال تیمار توصیه می‌شد و یا برداشت محصول در روز هفتم پس از محلول‌پاشی برای هر دو غلظت، اما توجه به میزان محصول حاصل از رونویسی و فراورده‌ای نهایی که در اثر فرایندهای ترجمه و پس از ترجمه تولید می‌شوند در کنار اطلاعات حاصل از بیان نسبی ژن‌های مسیر، تعیین کننده‌ی غلظت و زمان صحیح نمونه‌برداری است. ماده‌ی سیترال موجود در اسانس علف‌لیمو از ترکیب دو ماده‌ی نرال و ژرانیال به‌دست می‌آید از این‌رو میزان درصد این دو ماده از اهمیت

[11]. Geraniol

مقاله پژوهشی، صفحات ۳۶۵-۳۸۱
DOI:10.22034/jpr.2025.8587.3397

بسیاری برخوردار است، بر اساس نتایج حاصل از آنالیز کروماتوگرافی گازی طیف‌سنجی جرمی، میزان ژرانیال در تیمار ۱۰ و ۱۰۰ میکرومولار محلول‌پاشی برگی اسید سالیسیلیک به‌ترتیب ۴۵/۲ و ۲۱/۳ درصد و میزان نرال در تیمار ۱۰ و ۱۰۰ میکرومولار محلول‌پاشی برگی اسید سالیسیلیک به‌ترتیب ۲۷/۱ و ۱۴/۸ درصد گزارش شد. در نتایجی مشابه با نتایج حاصل از مطالعه‌ی ما بر تأثیر مثبت کاربرد محلول‌پاشی اسیدسالیسیلیک در افزایش مقدار و کیفیت متابولیت ثانویه‌ی هدف هر مطالعه، تأیید شده است و عنوان شده که مرحله‌ی رشدی گیاه و نیز غلظت اسیدسالیسیلیک مورد استفاده بر کارایی مثبت استفاده از این محرک تأثیرگذار است، از این‌رو یافتن و کاربرد غلظت مناسب اسیدسالیسیلیک، بهترین زمان محلول‌پاشی و برداشت محصول همواره مد نظر قرار گرفته است [16, 18, 30- 31]. به عنوان مثال سلطانی و همکاران [31] با بررسی تأثیر دو غلظت ۱۰ و ۱۰۰ میکرومولار اسید سالیسیلیک بیان داشتند که با وجود تأثیر مثبت محلول‌پاشی هر دو غلظت در ابتدای فاز گلدهی، در افزایش بیان نسبی ژن‌های مسیر و فراورده‌های پایانی اما غلظت ۱۰۰ میکرومولار اسید سالیسیلیک منجر به افزایش بیش‌تر بیان ژن‌های مسیر گردید [31]. همچنین ارزیابی مقدار دو فراورده‌ی پایانی بیش‌ترین مقدار را در روزهای سوم و هفتم پس از اعمال تیمار نشان داد [30] که بسته به هدف، می‌توان برداشت محصول را در روز سوم یا هفتم انجام داد.

نتیجه گیری

بر اساس نتایج به‌دست آمده در این پژوهش، باتوجه به نتایج کروماتوگرافی و نیز بیشتر بودن دو برابری سیترال (مجموع ژرانیال و نرال) در تیمار کودی ۱۰۰ کیلوگرم در هکتار نیتروژن و ۱۰ میکرومولار اسید سالیسیلیک، بهترین ترکیب تیماری قابل توصیه برای دست‌یابی به بالاترین عملکرد کمی و کیفی، استفاده از تیمار ۱۰۰ کیلوگرم در هکتار نیتروژن و غلظت ۱۰ میکرومولار اسید سالیسیلیک و برداشت محصول در روز هفتم است.

سپاسگزاری

از اساتید و کارشناسان محترم دانشکده کشاورزی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان و کادر آزمایشگاه مرکزی دانشگاه که در تأمین امکانات و راهنمایی‌های لازم در انجام این پژوهش همکاری نموده‌اند، تشکر و قدردانی می‌شود.

فهرست منابع

۱. برهمندزاده، ل.، ابدالی مشهدی، علیرضا.، بخشنده، ع.، شافعی نیا.، لطفی جلال آبادی، ا. و سلطانی، ن. ۱۴۰۳. بررسی اثر کود نیتروژن و اسید سالیسیلیک بر ویژگی‌های کمی و کیفی و میزان رونوشت برخی ژن‌های مسیر بیوسنتز سیترال در علف‌لیمو (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf). رساله دکتری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان.

۲. جلالی، محمد.، اصغری، غلامرضا.، عابدی، داریوش. و رضایی، زینب. ۱۳۸۶. بررسی اثر ضد میکروبی چند عصاره مختلف میوه گیاه *Pycnocycla spinosa*. مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران. ۵۹: ۸۵ -۷۶.

۳. جمالی‌دوست، منصور.، صالحی، امین.، فرجی، هوشنگ.، بلوچی، حمیدرضا. و رستم‌پور، پروین. ۱۴۰۳. پاسخ فیزیولوژیک، عملکردی و جذب عناصر گیاه دارویی زنیان (*Carum copticum* L.) به تنش خشکی در شرایط

مقاله پژوهشی، صفحات ۳۶۵-۳۸۱
DOI:10.22034/jpr.2025.8587.3397

تغذیع با کودهای آلی و زیستی. پژوهش‌های گیاهی (زیست‌شناسی ایران). ۳۷(۳): ۲۹۱-۲۷۵.

۴. جوادی، حامد.، رضوانی مقدم، پرویز.، راشد محصل، محمدحسن. و ثقه الاسلامی، محمد جواد. ۱۳۹۷. اثر سطوح مختلف نیتروژن و کود سبز بر عملکرد و کارآیی مصرف نیتروژن در گیاه دارویی خرفه. به‌زراعی کشاورزی. ۲۰(۲): ۴۶۵-۴۵۳.

۵. حیدری، راضیه.، موحدی دهنوی، محسن.، یدوی، علیرضا. و خوشرو، علیرضا. ۱۳۹۹. برهمکنش نیتروژن و تراکم بر عملکرد، محتوای عناصر و کارآیی مصرف نیتروژن کتان روغنی (*Linum usitatisimum* L.). علوم گیاهان زراعی ایران. ۵۱(۲): ۱۷۰-۱۵۹.

۶. حکم علی‌پور، سعید. ۱۳۹۶. ارزیابی تاثیر باکتری‌های محرک رشد گیاهی و کود نیتروژن بر عملکرد و برخی صفات زراعی و فیزیولوژیک گیاه دارویی نعناع فلفلی (*Mentha piperita* L.). اکوفیزیولوژی گیاهی. ۹(۲۸): ۱۴۴-۱۳۳.

۷. مهربانی، میترا.، مهدوی میمند، زهرا.، خاندانی‌زاده، بهشته. و حسن آبادی، نوید. ۱۳۹۳. تاثیر مقادیر مختلف کود نیتروژن و زمان برداشت بر کمیت و کیفیت اسانس و میزان فنل کل در گیاه دارویی *Satureja hortensis* L. در استان کرمان. فصلنامه اکوفیتوشیمی گیاهان دارویی. ۲(۴): ۱۱-۱.

۸. مصلحی، نرگس.، نیک‌نژاد، یوسف.، فلاح آملی، هرمز. و خیری، نوراله. ۱۳۹۵. اثر کاربرد تلفیقی کودهای شیمیایی، آلی و زیستی بر برخی صفات مرفوفیزیولوژیک برنج (*Oryza sativa* L.) رقم طارم هاشمی. مجله فیزیولوژی گیاهان زراعی. ۸: ۱۰۳-۸۷.

۹. یوسفی، ف.، ابدالی مشهدی، ع.، لطفی جلال‌آبادی، ا.، شافعی‌نیا، ع.، جلیلی، س. و سلطانی، ن. ۱۴۰۴. اثر محلول‌پاشی اسیدآمینه تریپتوفان و تنش خشکی بر تغییر الگوی بیان نسبی برخی ژن‌های موجود در مسیر ایندول-آلکالوئیدی TIAs و آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی در برگ گیاه پروانش (*Catharanthus roseus*). مجله پژوهشهای گیاهی (مجله زیست شناسی ایران) (علمی). https://doi.org/10.22034/jpr.2025.8.573.3391.

10. Adams, R.P., 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography /quadrupole mass spectroscopy. Allured, Carol Stream, 745p.

11. Bideshki A. Arvin M (2010). Effect of salicylic acid (SA) and drought stress on growth, bulb yield and allicin content of garlic (*Allium sativum*) in field. Plant Ecophysiology 2:73-81.

12. Farzana MUZN. Tharique I. Al-sultana A (2014). A review of ethnomedicine, phytochemical and pharmacological activities of Acacia nilotica wild. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. 3(1): 84-90.

13. Ganjewala D. Luthra R (2010). Nat. Prod. Commun. 5 (1): 72 -163.

14. Idrees M. Naeem M. Aftab T. Khan MMA (2013). Salicylic acid restrains nickel toxicity, improves antioxidant defence system and enhances the production of anticancer alkaloids in

مقاله پژوهشی، صفحات ۳۶۵-۳۸۱
DOI:10.22034/jpr.2025.8587.3397

Catharanthus roseus (L.). Journal of hazardous materials. 252:367-374.

15. Idrees M. Naeem M. Aftab T. Khan MMA. Moinuddin f (2011). Salicylic acid mitigates salinity stress by improving antioxidant defence system and enhances vincristine and vinblastine alkaloids production in periwinkle [*Catharanthus roseus* (L.) G. Don]. Acta Physiologiae Plantarum. 33:987-999.
16. Kaur J. Singh A. Pathak T. Kumar K (2017). Role of PGRs in anticancer alkaloids (vincristine and vinblastine) production. Catharanthus Roseus. Current Research and Future Prospects. 309-319.
17. Kaydan D. Yagmur M. Okut N (2007). Effects of salicylic acid on the growth and some physiological characters in salt stressed wheat (*Triticum aestivum* L.). Tarim Bilimleri Dergisi. 13:114-119.
18. Khandan-Mirkohi A. Khalili Halbi M. Salami SA. Lesani H (2017). Improving effects of mild cold stress and salicylic acid on growth and physiology of periwinkle (*Catharanthus roseus* Don.). International Journal of Horticultural Science and Technology. 4: 67-78.
19. Kumoro AC. Wardhani DH. Retnowati DS. Haryani K (2021). A brief review on the characteristics, extraction and potential industrial applications of citronella grass (*Cymbopogon nardus*) and lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oils. International Conference on Chemical and Material Engineering. 1053 012118.
20. Livak KJ. Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2− ΔΔCT method. methods. 25:402-408.
21. Meena S. Kumar SR. Venkata Rao D. Dwivedi V. Shilpashree H. Rastogi S. Shasany AK. Nagegowda DA (2016). De novo sequencing and analysis of lemongrass transcriptome provide first insights into the essential oil biosynthesis of aromatic grasses. Frontiers in plant science. 7:1129.
22. Malakouti MJ (2004). Fertilizer Use by Crops in Iran. Report Prepared for FAO. Soil and Water Research Institute, Tehran, Iran..
23. Pandey SS. Singh S. Babu CV. Shanker K. Srivastava N. Shukla AK. Kalra A (2016). Fungal endophytes of Catharanthus roseus enhance vindoline content by modulating structural and regulatory genes related to terpenoid indole alkaloid biosynthesis. Scientific reports. 6:26583.
24. Pfaffl MW. Horgan GW. Dempfle L (2002). Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. Nucleic acids research. 30:e36-e36.
25. Padash A. Ghanbari A. Asgharipour MR (2016). Effect of salicylic acid on concentration of nutrients, protein and antioxidant

مقاله پژوهشی، صفحات ۳۶۵-۳۸۱
DOI:10.22034/jpr.2025.8587.3397

enzymes of basil under lead stress. Iranian Journal of Plant Biology. 8(27): 17-32.

26. Pourmorad F. Hosseinimehr SJ. Shahabimajd N (2006). Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. African Journal of Biotechnology. 5(11):1142-1145.
27. Raun WR. Johnson GV (1999). Improving nitrogen use efficiency for cereal production. Agronomy Journal. 91: 357-363.
28. Saini MK. Kaur S. Kandoria A. Singh M (2018). Effect of date of planting, nitrogen application and planting geometries on growth, herbage yield and essential yield of lemon grass (*Cymbopogan flexuosus* Stapf.) under sub-mountaineous region of Punjab. Journal of Crop and Weed. 14:106-112.
29. Soltani Howyzeh M. Sadat Noori SA. Shariati J V. Amiripour M (2018). Comparative transcriptome analysis to identify putative genes involved in thymol biosynthesis pathway in medicinal plant Trachyspermum ammi L. Scientific reports. 8:13405.
30. Soltani N. Firouzabadi FN. Shafeinia A. Shirali M. Sadr AS (2022). De Novo transcriptome assembly and differential expression analysis of catharanthus roseus in response to salicylic acid. Scientific Reports. 12:17803.
31. Soltani N. Nazarian-Firouzabadi F. Shafeinia A. Sadr AS. Shirali M (2020). The expression of Terpenoid Indole Alkaloid (TIAs) pathway genes in Catharanthus roseus in response to salicylic acid treatment. Molecular Biology Reports. 47:7009-7016.
32. Skaria BP. Joy PP. Mathew G. Mathew S. Joseph A (2012). Lemongrass. In K.V. Peter (Ed.), Handbook of Herbs and Spices vol. 2, ed K V Peter (Cambridge: Woodhead Publ. Ltd). pp. 70 - 348.
33. Suhanya P. Bin Azizi J. Ramanathan S. Ismail S. Sasidharan S. Said MI. Mansor SM (2009). Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of aqueous, methanolic and alkaloid extracts from Mitragyna speciosa (Rubiaceae family) leaves. Molecules. 14(10): 3964-74.
34. Zeinali H. Hosseini H. Shirzadi MH (2014). Effects of nitrogen fertilizer and harvest time on agronomy, essential oil and menthol of Mentha piperita L. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants. 30(3): 486-495.

مقاله پژوهشی، صفحات ۳۶۵-۳۸۱

DOI:10.22034/jpr.2025.8587.3397

Study of the gene expression related to the citral synthesis pathway and its final product under the influence of nitrogen fertilizer and salicylic acid application in lemongrass (*Cymbopogon citratus* DC. Stapf)

L. Barahmandzadeh[1], A.R. Abdali Mashhadi[1], A.M. Bakhshandeh[1], A. Lotfi Jalal Abadi[1], A.R. Shafeinia[1] and N. Soltani [2*]

[1.]Department of Production Engineering and Plant Genetics, Faculty of Agriculture, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Khuzestan, Iran.

[2.]Department of Production Engineering and Plant Genetics, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Lorestan University, Khorramabad, Lorestan, Iran.

***Corresponding Author Email:** nargesoltani29@gmail.com

Abstract

In order to investigate the relative expression of genes in the lemongrass essential oil production pathway under nitrogen nutrition and salicylic acid foliar application conditions, a factorial experiment based on a randomized complete block design with two levels of nitrogen (no application and application of 100 kg/ha) from urea source and three levels of salicylic acid (control, 10 µM, and 100 µM) with three replications was conducted at the research farm of the Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan in 2022. The results showed that salicylic acid had a significant effect on all traits except essential oil yield, and the highest essential oil yield (48.9 g/m2) was obtained with the application of 100 kg of nitrogen fertilizer per hectare. The interaction of salicylic acid and nitrogen fertilizer was significant in phenolic, total flavonoid and essential oil yield traits. Also, salicylic acid foliar spraying, regardless of the difference in time treatment, resulted in an increase in relative expression of the *Aldh* gene, as the final gene of the essential oil synthesis pathway, compared to the control treatment, which was consistent with the results obtained from chromatography. The percentage of citral (sum of neral and geranial) obtained by foliar spraying of both concentrations of 10 micro molar salicylic acid (27.1 and 45.2 percent, respectively) and 100 µM salicylic acid (14.89 and 21.34 percent, respectively) was much higher than the percentage of these two substances in the control treatment (4.96 and 7.83 percent, respectively).

Key words: Citronella grass, elicitor, plant nutrition, medicinal plant.