فصلنامه علمی زیست‌شناسی کاربردی دانشگاه الزهرا(س)
دوره ۳۵، شماره ۱، پیاپی ۷۱، بهار ۱۴۰۱، ص۱۵۳-۱۳۱
نوع مقاله: مقاله پژوهشی

The Quarterly Scientific Journal of Applied Biology
Vol.35, No.1, Sering.71, Spring 2022, p. 131-153
Article type: Research paper

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۵/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۶/۱۳

وب سایت نشریه: https://jab.alzahra.ac.ir

doi 22051/JAB.2021.34309.1398

اثر عصاره های آبی و الکلی گیاه گزنه دوپایه بر رشد و برخی ویژگی‌های بیوشیمیایی گیاه گوجه فرنگی در شرایط گلخانه‌ای

الهه ریاضی،[۱] فرشاد رخشنده رو [۲]*، وحید عبدوسی [۳]

چکیده

مقدمه: در این بررسی اثر عصاره های آبی و الکلی گیاه گزنه دو پایه ایران (Urtica dioica L.) بر رشد و برخی ویژگی های بیوشیمیایی گیاه گوجه فرنگی، رقم Super chef، در شرایط گلخانهای مورد بررسی قرار گرفت. **مواد و روش ها:** برای این منظور از بافت های خشک شده ساقه و برگ گزنه، عصاره های آبی و الکلی تهیه و به صورت مستقیم به ریزوسفر خاک گلدان ها تزریق و در زمان های معین پس از تیمار، برخی شاخص های بیوشیمیایی و رشدی گیاهچه های گوجه ارزیابی شد. همچنین با استفاده از آزمون RT-sq-PCR میزان بیان نسبی ژن کدکننده پذیرنده سیتوکینین SlHK4-Cytokinin inducer در نمونهها در زمان ۱۴روز بعد از تیمار ارزیابی گردید. **نتایج و بحث:** نتایج نشان داد که عصاره های آبی و الکلی گزنه توانستهاند در غلظت ppm500 با اختلاف معنی داری موجب افزایش میزان سرعت نسبی رشد، مقدار کلروفیل های a و b، فنل کل و فعالیت اختصاصی آنزیم های پراکسیداز (POX) و پلی فنل اکسیداز (PPO) و همچنین افزایش نسبی میزان بیان ژن SlHK4-Cytokinin inducer در مقایسه با گیاهان شاهد شوند. نتایج حاصل از این پژوهش میتواند به عنوان روشی کاربردی برای بهبود رشد گیاه گوجه فرنگی در شرایط گلخانه مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی: آنزیم پراکسیداز، آنزیم پلی فنل اکسیداز، بیان ژن، فنل، گیاه گزنه

---

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه باغبانی، دانشکده علوم کشاورزی و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران
۲. دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده علوم کشاورزی و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران. (* نویسنده مسئول: rakhshandehroo_fa@srbiau.ac.ir)
۳. استادیار گروه باغبانی، دانشکده علوم کشاورزی و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران.

مقدمه

گیاه گوجه فرنگی با نام علمی *Solanum lycopersicum* L.، گیاهی از خانواده بادنجانیان (*Solanaceae*) و از گروه سبزی و صیفی‌جات است که به‌دلیل سرشار بودن از ویتامین‌های A،K،C،B، کلسیم، فسفر و آهن نقش بسزایی در تغذیه انسان ها دارد. ارقام زراعی گوجه فرنگی، دیپلوئید (2*n*=24) و خود گرده افشان بوده و به صورت گیاه علفی چند ساله رشد می‌نماید و معمولا به عنوان یک محصول یک ساله کشت می‌گردد (Gerszberg *et al*., 2015). در ایران حدود ۸۰درصد از گوجه فرنگی به صورت مزرعه‌ای و بقیه به صورت گلخانه‌ای تولید می شود. در چند سال اخیر افزایش چشمگیری در تولید گلخانه‌ای گوجه فرنگی به چشم می خورد. طبق آمار سازمان خواربار جهانی (FAO) سطح زیر کشت گوجه فرنگی در ایران بالغ بر ۱۴۰/۰۰۰ هکتار با متوسط عملکرد ۳۵۷۱۴ کیلو در هکتار و با تولید تقریبی ۵۰۰/۰۰۰ تن است (FAO, 2012). امروزه بدلیل ویژگی‌های درمانی که نتیجه حضور ترکیبات الکیل‌دار غیر اشباع کارتنوئیدی مانند لیکوپن در آن است، مصرف گوجه فرنگی بسیار مورد توجه قرار گرفته است (Di Cesare *et al*., 2012). از طرفی هورمون‌های رشدی تجارتی مورد استفاده معمول در بخش صنعت، از لحاظ اقتصادی گران قیمت هستند و به‌راحتی در اختیار تولید کننده ها قرار نمی گیرد. بنابراین استفاده از ترکیبات ارگانیک، در صورت افزایش عملکرد رشد گیاه، می تواند با هزینه کمتر و تاثیر بیشتر نسبت به نمونه‌های تجارتی شیمیایی موجود مورد استفاده قرار گیرد. در سال‌های اخیر توجه تولید کنندگان بیشتر به استفاده از ترکیبات گیاهی و ارگانیک (Organic farming) به جای ترکیبات شیمیایی جهت تسریع رشد گیاهان زراعی در تولید محصول معطوف شده است. ترکیبات ارگانیک علاوه بر اثرات مطلوب قابل توجهی که در تولید محصول دارند، برای زیست بوم نیز خطرناک نبوده و پس از تاثیر خود در گیاه هدف در طبیعت پوسیده شده و بعد از مدتی از بین می روند. چنین ترکیباتی با حفظ سلامت گیاهان موجب افزایش توان زیستی آن ها شده و سیستم‌های مقاومتی خاص و مسیرهای ژنتیکی و بیوشیمیایی ویژه‌ای را در آن ها فعال می‌سازند که موجب افزایش توان رشدی و عملکرد زیستی در گیاهان در سطوح مختلف می‌شوند.(Godlewska *et al*., 2021) .

گیاه گزنه از جمله گیاهان بومی ایران با ۶۰ جنس و بیش از ۷۰۰ گونه است. گزنه دو پایه (*Urtica dioica*) گیاهی است علفی و در نقاط مرطوب و سایه دار به حالت خودرو می روید (Bisht *et al*., 2012). در نوار شمالی‌ایران، این گونه در نواحی جلگه‌ای، کنار رودخانه‌ها و جاده‌ها به‌صورت خودرو می‌روید (ابراهیم قوچی، ۱۳۹۸). گزنه دو پایه ایران از جمله گیاهان دارویی است که دارای خواص درمانی بوده و صدها سال است که در طب سنتی در قسمت‌های مختلف جهان جهت معالجه بیماری هایی همچون اگزما، ناراحتی‌های دستگاه گوارش و دردهای مفاصل و نیز کم خونی از عصاره آن استفاده می‌شود (Cowan, 1999). نتایج پژوهش‌های پیشین نشان داده است که عصاره گیاه گزنه دو پایه دارای خاصیت ضد باکتریایی است و به میزان چند برابر بیشتر از باکتری‌کش‌های شیمیایی از توان کنترل باکتری‌های گرم منفی و مثبت برخوردار است (Krope *et al*., 2012; Otles & Yalcin, 2012). از این گیاه داروئی سال هاست که برای درمان بیماری‌های پوستی، گوارشی و درمان درد و کم خونی در سرتاسر جهان به خصوص کشورهای آسیایی استفاده می‌شود (Habibi-Lahigi *et al*., 2011). عصاره‌های آبی و الکلی گزنه از توان کنترل باکتری‌های مختلف آلوده کننده انسان و گیاه برخوردار است (Korpe *et al*., 2012; Murthy *et al*., 2014).

عصاره آبی گزنه غنی از ویتامین‌ها، کربوهیدرات‌ها، اسیدهای آمینه و عناصر معدنی همچون فسفات، نیتروژن، آهن و منیزیم است (Filipovic *et al*., 2011; Rivera *et al*., 2012). ریشه، ساقه، برگ و گل‌های آن دارای رنگ سبز تیره هستند. اندام‌های

هوایی این گیاه سرشار از ویتامین‌های A، C و K است. به‌طوری که در ۱ کیلوگرم از بافت سبز برگ آن حدود ۱۳۰ میلی گرم ویتامین C وجود دارد. همچنین حاوی ۱۸درصد پروتئین و تا ۱۷درصد آلبومین است. در بافت خشک این گیاه انواع اسیدهای آلی مانند: فرمیک اسید، بوتریک اسید، سوکسینیک اسید، کافئیک اسید، کلروژنیک اسید، مالیک اسید، کوماریک اسید، لینولئیک اسید و پالمیتیک اسید وجود دارد. همچنین منبع غنی از آلبومین، آلکالوئیدها، آگلوتنین، استیل کولین، هیستامین، لیگنان، ترپن، سروتنین، گزانتوفیل و کوئرسیتین است (Otles & Yalcin, 2012; Kregiel *et al*., 2018). پژوهش‌های گذشته مشخص ساخت عصاره های آبی و الکلی برگ گزنه دوپایه حاوی مقادیر زیادی از ترکیبات فنلی شامل Fumaric acid و Quercetin است (Otles & Yalcin, 2012). ترکیبات مذکور از جمله فلاونوئیدهای گیاهی هستند که دارای اثرات آنتی اکسیدانی فراوانی بوده و به عنوان مکمل‌های عذایی در پزشکی از آنها استفاده می‌شود (David *et al*., 2016).

نتایج پژوهش های گذشته نشان داد کاربرد عصاره آبی گزنه می‌تواند منجر به افزایش مولفه های رشدی شامل طول گیاهچه، طول‌ریشه چه، وزن خشک ریشه چه نسبت وزن ریشه چه به ساقه چه و میانگین زمان جوانه زنی در ارقام مختلف گندم شود (عقیقی شاهوردی و همکاران، ۱۳۹۴). اثر مثبت عصاره‌آبی گزنه در رشد جو و سیب زمینی نیز به اثبات رسیده است (Garmendia *et al*., 2018) در پژوهشی که به‌تازگی انجام پذیرفت از عصاره آبی گیاه گزنه دو پایه به عنوان کود زیستی مایع به دو صورت مه افشانی روی برگ‌ها و تزریق در خاک در زراعت لوبیا استفاده شد (Maricic *et al*., 2021). مولفه‌های رشدی همچون ارتفاع و قطر ساقه، سطح برگ و همچنین عملکرد تولید در گیاه‌های لوبیای تیمار شده با عصاره آبی گزنه در مقایسه با لوبیاهای تیمار نشده تا ۱۴ روز پس از تیمار افزایش یافت (Maricic *et al*., 2021). همچنین مشخص شده است که عصاره آبی گیاه گزنه دو پایه ایران موجب بهتر شدن عملکرد رشدی قلمه‌های گل سرخ در محیط کشت می شود و از این طریق آلودگی‌های ویروسی در این گیاه مهار می شود (Rakhshandehroo *et al*., 2009; Safamehr *et al*., 2012). بیش از دو دهه است که در کشورهای اروپایی از جمله اسپانیا استفاده از عصاره آبی گیاهان مختلف از جمله گزنه دوپایه به عنوان یک کود زیستی در زراعت‌های گلخانه ای استفاده می‌شود (Garmendia *et al*., 2018). گیاه گوجه فرنگی به عنوان پرکاربردترین گیاه مدل برای تحقیقات زیست شناسی میوه و بررسی رشد و نمو گیاهان محسوب می‌شود (Gerszberg *et al*., 2015). تا کنون تحقیقی در مورد اثر عصاره گیاه گزنه در بهبود عملکرد رشدی گیاه گوجه فرنگی انجام نشده است. در این بررسی کوشش به عمل آمد تا تاثیر عصاره‌های آبی و الکلی گیاه گزنه دو پایه (*Urtica dioica* L.) بر روی برخی شاخص‌های رشدی و توان زیستی گیاه گوجه فرنگی مورد بررسی قرار گیرد. همچنین تاثیر عصاره گیاه گزنه بر تولید سیتوکینین از طریق ارزیابی میزان حضور نسخه های ژن پروتئین تنظیمی متاثر شونده از این تنظیم کننده رشد گیاهی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

کشت گیاه گوجه فرنگی و تیمار با عصاره گزنه

برای این مطالعه، گیاه گزنه دوپایه کوهی (*U. dioica*) در طول فصل رشد رویشی در فصل بهار (اواخر اردیبهشت تا اوایل خرداد ماه) از رویشگاه طبیعی آن واقع در ارتفاعات ۱۸۰۰ متری از سطح دریا در روستای جواهرده شهرستان رامسر، استان مازندران جمع آوری گردید. بخش هوایی گیاه (برگ و ساقه) در دمای آزمایشگاه (۲۵ درجه سانتیگراد) و در تاریکی به مدت ۱۰

روز کاملا خشک و سپس توسط دستگاه خردکن با یکدیگر کاملا ترکیب شد. تهیه عصاره‌های آبی و الکلی مطابق دستورالعمل موجود انجام شد (Leser & Treutter, 2005). برای این منظور ۱۰ گرم از بافت‌های خشک شده گزنه به ترتیب در ۲۰۰ میلی لیتر آب مقطر و الکل اتانل ۷۰ درصد در دستگاه soxhlet برای مدت ۱۲ ساعت قرار داده شدند و آموده بدست آمده برای حذف حلال در دستگاه rotary evaporator (Heidolph, Heizbad Hei-VAP, Germany) در فشار کم و دمای ۶۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد. عصاره حاصل از کاغذ فیلتر با قطر منفذ ۰/۴۵ میکرون عبور داده و تا زمان استفاده در فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتیگراد در شیشه‌های تاریک نگهداری شد.

برای این تحقیق از گوجه فرنگی رقم Super chef استفاده شد. کاشت، نگهداری و تیمار گیاهچه‌ها در شرایط استاندارد گلخانه‌ای شامل درجه حرارت ۲۵±۲ درجه سانتیگراد، رطوبت نسبی ۷۰ درصد و دوران متناوب نوری (۱۶ ساعت) و تاریکی(۸ ساعت) انجام شد. گیاهچه‌های گوجه فرنگی در گلدان های ۱۰۰ گرمی شامل خاک زراعی و ماسه شسته شده به نسبت ۱:۲ کاشته و سپس در مرحله ۴ تا ۶ برگی با غلظت‌های ppm ۵۰۰، ۳۰۰ و ۱۰۰ (در حجم نهائی گلدان) از عصاره‌های آبی و الکلی گیاه گزنه به صورت مجزا تیمار شدند. عصاره‌ها به صورت مستقیم به ریزوسفر خاک گلدان ها تزریق شدند و در زمان های ۳، ۶، ۹ و ۱۴ روز پس از تیمار، برخی شاخص‌های بیوشیمیایی مرتبط با رشد و متابولیسم گیاهچه های گوجه فرنگی در مقایسه با گلدان شاهد، که تنها با آب تیمار شده بود، مقایسه شدند. این آزمون در۳ تکرار و هر تکرار شامل ۵ گلدان انجام شد. در کنار عصاره‌ها از غلظت های ppm ۵۰۰، ۳۰۰ و ۱۰۰ (در حجم نهائی گلدان) ماده اسیدسالیسیلیک (Sigma-Aldrich) جهت تیمار گیاهچه‌های گوجه فرنگی به عنوان القاکننده موثر رشد گیاه جهت مقایسه تاثیر مثبت عصاره‌ها در رشد و مولفه‌های بیوشیمیایی استفاده شد.

محاسبه سرعت نسبی رشد

جهت بررسی اثر غلظت‌های مختلف از عصاره‌های آبی و الکلی گزنه دو پایه در افزایش رشدگیاهچه‌های گوجه فرنگی (۳، ۶، ۹ و ۱۲ روز پس از تیمار) سرعت نسبی رشد RGR (Relative growth rate) با استفاده از رابطه زیر و مطابق روشGardner و همکاران (۱۹۸۵) محاسبه و بر اساس $mg.mg^{-1}d^{-1}$ بیان شد. $\ln RGR\ (Relative\ Growth\ Rate) = (\ln W_2 - \ln W_1)/(t_2 - t_1)$: لگاریتم طبیعی وزن خشک (Natural logarithm of dry matter variations) ، W_1= وزن خشک برگ بر حسب میلی‌گرم (mg) در روز ۳ و W_2= وزن خشک برگ بر حسب میلی‌گرم (mg) در روز ۱۴ ، t= زمان مشخص بر حسب روز. گیاهان تیمارشده با غلظت‌های مختلف از عصاره های آبی و الکلی گزنه در زمان های ۳، ۶، ۹ و۱۴ روز بعد از تیمار و در تکرار های متفاوت انتخاب و پس از گرفتن آب سطحی، به مدت ۷۲ ساعت در آون ۶۵ درجه سانتیگراد خشک شدند و میزان ماده‌ی خشک آنها محاسبه شد.

تعیین مقدار کلروفیل

برای تعیین مقدار کلروفیل، مقدار ۰/۵ گرم برگ گوجه فرنگی با استفاده از نیتروژن مایع خرد و سپس میزان ml ۲۰ میلی‌لیتر استن ۸۰ درصد به نمونه اضافه و به خوبی همگن شد. سپس مخلوط واکنش در دستگاه سانتریفیوژ با سرعت۶۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. جذب نوری روشناور حاصل توسط دستگاه اسپکتروفتومتر

(Shimadzu, UV Mini 1240, Japan) در طول موج های ۶۶۳ نانومتر برای کلروفیل a و ۶۴۵ نانومتر برای کلروفیل b قرائت شد. در نهایت با استفاده از فرمول های زیر مقدار کلروفیل های a و b بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر نمونه به‌دست آمد. در فرمول، V= حجم حلال مورد استفاده برای استخراج (محلول فوقانی حاصل از سانتریفیوژ)، A= جذب نوری نمونه در طول موج های ۶۶۳، ۶۴۵ و ۴۷۰ نانومتر و W= وزن تر نمونه بر حسب میلی‌گرم است (Lichtenthaler & Buschmann, 2001)

Chlorophyll a = (12.3 * A663 - 0.86 * A645) V/100W
Chlorophyll b = (19.3 * A645 - 3.6 * A663) V/100W

تعیین مقدار فنل کل

برای بررسی مقدار فنل کل در بافت برگ گیاهچه‌های گوجه فرنگی تیمار شده با هر یک از عصاره‌های آبی و الکلی گزنه از روش Duarte و همکاران (۲۰۰۸) به شرح ذیل استفاده شد: ابتدا ۰/۱ گرم برگ گوجه فرنگی در ۱ میلی‌لیتر متانول ۸۰درصد به خوبی خرد و برای ۱۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد تکان داده شد. سپس ۱ میلی‌لیتر از عصاره متانولی فوق به ۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل و ۲۵۰ میکرولیتر معرف فولین (Folin Ciocalteu) ۱ نرمال اضافه شد و مخلوط واکنش در دمای۳۰ درجه سانتیگراد برای ۳ تا ۵ دقیقه نگهداری و سپس جذب نوری محلول آبی رنگ حاصل در طول موج ۷۶۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (Shimadzu, UV Mini 1240, Japan) خوانده شد. از گالیک اسید برای رسم منحنی استاندارد استفاده و مقدار فنل کل معادل میزان گالیک اسید بر حسب میلی‌گرم در گرم وزن تر برگ بیان شد.

سنجش فعالیت اختصاصی آنزیم های پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز

جهت سنجش فعالیت اختصاصی آنزیم پلی فنل اکسیداز از روش Rakhshandehroo و همکاران (۲۰۱۲) استفاده شد. برای این منظور میزان ۰/۱ گرم از بافت برگ‌های فوقانی نمونه های گوجه فرنگی در حضور ازت مایع در درون هاون به خوبی خرد و سپس در بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی‌مولار با pH= ۶ به خوبی حل گردید. ترکیب حاصله به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شد و میزان ۰/۵ میلی‌لیتر از روشناور حاصل به عنوان محلول حاوی آنزیم استفاده شد. همچنین ۱ میلی‌لیتر از ماده Quaiacol با غلظت ۰/۰۱ مولار حل شده در بافر فسفات سدیم تامپونی ۵۰ میلی‌مولار با pH= ۶/۵ به عنوان سوبسترا مورد استفاده قرار گرفت. برای سنجش فعالیت اختصاصی آنزیم پراکسیداز میزان ۰/۵ میلی‌لیتر آنزیم استخراج شده با ۷۸۰ میکرولیتر سوبسترا و ۱۰۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۳ درصد ترکیب و منحنی تغییرات جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (Shimadzu, UV Mini 1240, Japan) در مدت ۶۰ ثانیه در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد قرائت شد. در نهایت فعالیت اختصاصی آنزیم پراکسیداز بر حسب تغییرات جذب در دقیقه به ازای هر میکروگرم پروتئین کل بافت گزارش شد.

جهت سنجش فعالیت اختصاصی آنزیم پلی فنل اکسیداز از روش Chandrashekaraiah و همکاران (۲۰۰۹) استفاده شد. برای این منظور میزان ۰/۱ گرم از بافت برگ نمونه های گوجه فرنگی در حضور ازت مایع در درون هاون به خوبی خرد و سپس در بافر فسفات سدیم ۰/۱ مولار با pH= ۶/۸ به خوبی حل گردید. ترکیب حاصله به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ و از ۰/۵ میلی‌لیتر روشناور حاصل به عنوان محلول حاوی آنزیم استفاده شد. از ۱ میلی‌لیتر

ماده Catechol با غلظت ۰/۰۱ مولار در بافر فسفات سدیم تامپونی ۰/۱ مولار با pH= ۶/۸ به عنوان سوبسترا استفاده شد. میزان جذب حاصل از فعالیت آنزیم در طول موج ۴۲۰ نانومتر و در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد از ۴۰ تا ۶۰ ثانیه بعد از اضافه شدن ۱ میلی‌لیتر آب اکسیژنه ۱درصد توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه گیری شد. در نهایت فعالیت اختصاصی آنزیم پلی فنل اکسیداز بر حسب تغییرات جذب واکنش آنزیمی در دقیقه در میکروگرم پروتئین کل بافت گزارش شد.

به منظور سنجش غلظت پروتئین‌های محلول کل، میزان ۰/۱گرم برگ گوجه فرنگی در هاون چینی ریخته شده و همزمان ازت مایع اضافه شده و در حین خرد کردن برگ، ۲۰ میلی‌گرم ماده پلی‌وینیل پیرولیدون (PVP) و ۱/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم با pH=۷ حاوی ۰/۲ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر متابی سولفیت سدیم به آن اضافه شد. ترکیب حاصله به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شد. برای اندازه گیری غلظت پروتئین، ۳۰ میکرولیتر روشناور استخراج شده را به همراه ۷۲۰ میکرولیتر محلول برادفورد مخلوط نموده و پس از ۵ دقیقه، میزان جذب نوری در طول موج ۵۹۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (Shimadzu, UV Mini 1240, Japan) خوانده شد. غلظت پروتئین در نمونه ها با استفاده از منحنی استاندارد پروتئین آلبومین سرم گوساله گاوی، بر حسب میلی‌گرم درگرم وزن تر محاسبه شد (Bradford, 1976).

آزمون پی سی آر رونویسی معکوس نیمه کمی (RT-sqPCR)

جهت سنجش بیان نسبی ژن SlHK4-Cytokinin inducer در نمونه‌های گوجه فرنگی تیمار شده با عصاره های آبی و الکلی گزنه، از آزمون پی سی آر رونویسی معکوس نیمه کمی (RT-sqPCR) مطابق روش (Antiabong *et al*., 2016) استفاده شد. استخراج RNA با استفاده از معرف RNX-Plus (Sinaclon-Iran) مطابق دستورالعمل شرکت انجام شد. محاسبه میزان غلظت RNA استخراج شده توسط دستگاه نانودراپ (NanoDrop 1000 spectrophotometer) انجام شد. برای حذف آلودگی DNA ژنومی و سنتز رشته اول ژنومی cDNA کیت (Quanti Tect, Reverse transcription kit, Cat No. 205311) شرکت کیاژن و آغازگر تصادفی شش‌تایی (Random hexamer primer) مورد استفاده قرار گرفت. واکنش دمایی و میزان حجم واکنشگرها در این آزمون برای تکثیر ژن SlHK4-Cytokinin inducer بر اساس مقاله موجود و با بهینه‌سازی آن بر اساس مواد و دستگاه‌های مورد استفاده انجام شد (Suzuki *et al*., 2010). برای انجام این آزمون، ۲ میکرولیتر از cDNA ساخته و برای انجام آزمون PCR از آن استفاده شد. همچنین جهت تعیین بهترین چرخه تکثیر توالی ژنتیکی هدف از چرخه‌های ۲۵، ۳۰ و ۳۵در PCR استفاده شد. مواد این آزمون برای یک واکنش به طور معمول شامل: 10X PCR Buffer به میزان ۲/۵ میکرولیتر، dNTP mix به میزان ۰/۵ میکرولیتر (از استوک ۱۰ میلی‌مولار)، $MgCl_2$ به میزان ۱ میکرولیتر (از استوک ۵۰ میلی‌مولار)، Reverse Primer به میزان ۱ میکرولیتر (از استوک ۱۰ پیکومول)، Forward Primer به میزان ۱ میکرولیتر (از استوک ۱۰ پیکومول) مطابق جدول ۱، آنزیم Taq DNA Polymerase (5 U/mL) شرکت فرمنتاس به میزان ۰/۲ میکرولیتر و آب مقطر استریل (D.D.W (nuclease free به میزان ۱۶/۸ میکرولیتر بود. برای آزمون RT-sqPCR از ژن 18S rRNA به عنوان کنترل داخلی برای نرمال کردن داده‌ها استفاده شد. برنامه دمایی استفاده شده برای آغازگرهای مختلف مورد استفاده شبیه بودند و آزمون PCR به صورت doublex RT-PCR انجام شد. برنامه حرارتی عبارت بود از ۵ دقیقه دمای ۹۵ درجه سانتیگراد یک چرخه برای

واسرشت سازی اولیه و ۳۲ چرخه حرارتی شامل۳۰ ثانیه دمای ۹۵ درجه سانتیگراد برای واسرشت سازی، ۲۰ ثانیه دمای ۵۶ درجه سانتیگراد برای اتصال آغازگر و۳۰ ثانیه دمای ۷۲ درجه سانتیگراد برای طویل سازی و در نهایت یک چرخه حرارتی به مدت ۵ دقیقه دمای ۷۲ درجه سانتیگراد جهت طویل سازی نهایی. بعد از اتمام PCR برای مشاهده مناطق تکثیر شده تولیدات PCR بر روی ژل آگاروز ۱/۲ درصد الکتروفورز شد. از مارکر وزن مولکولی ۱۰۰bp (سیناکلن، ایران) در الکتروفورز استفاده شد. سنجش میزان رونوشت های RNA از ژن SlHK4-Cytokinin inducer در برگ گوجه فرنگی تیمار شده با غلظت‌های مختلف عصاره‌های آبی و الکلی گزنه و گیاهان تیمار نشده به عنوان شاهد با استفاد ه از RT-sqPCR صورت گرفت. مقدارعددی و انحراف از معیار (±SD) هر نمودار از سنجش کمی میزان میانگین شدت نور مربوط به باندهای حاصل از PCR ژن هدف بر 18SrRNA در سه تکرار و توسط نرم افزار Image J و بر مبنی عدد ۱ محاسبه شده است.

جدول۱: اطلاعات مربوط به آغازگرهای مورد استفاده برای سنجش کمی بیان ژن SIHK4-Cytokinin inducer

Table 1. Informations for the primers used to quantitative assessment of SIH4-Cytokinin inducer gene expression level.

نام آغازگر Primer Names	اندازه محصول PCR (bp) PCR amplicon size (bp)	نوع آغازگر Kind of primer	توالی آغازگر Primer Sequence	دمای ذوب (°C) Melting Temperature (°C)	منبع Reference
SLHK4-Cytokinin inducer	200	F	5-'ACTGGAGAATACTCATCTCT-3'	60	Suzuki *et al*.,2010
		R	5'- GAGTACTTTTGCTGAGTACA-3'	63	
18srRNA	461	F	5'-AACGGCTACCACATCCAAG-3'	57	Suzuki *et al*.,2010
		R	5'-TCATTACTCCGATCCCGAA-3'	55	

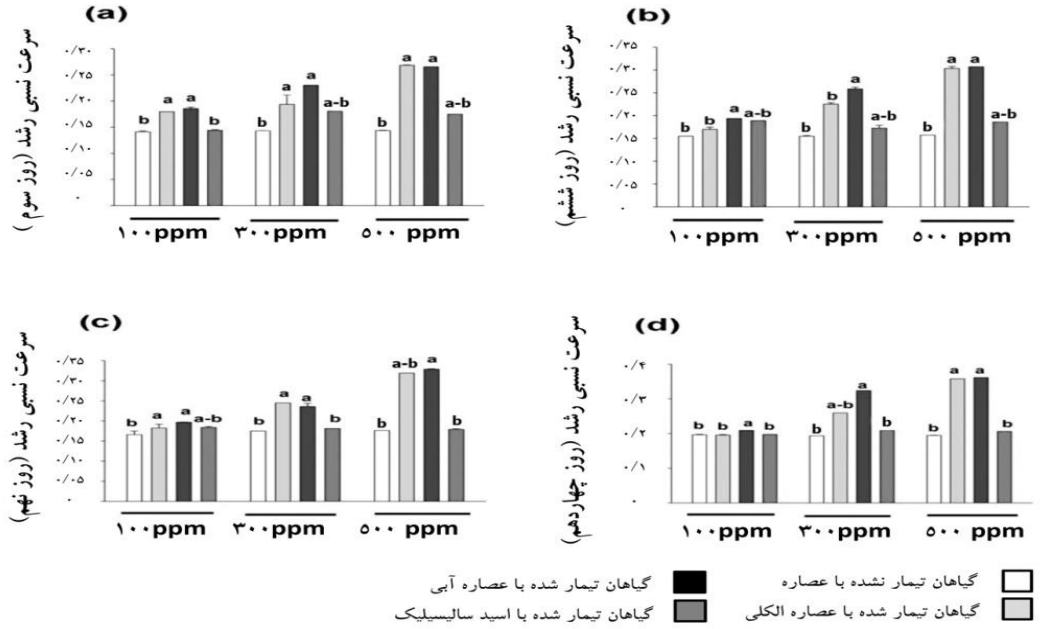
تجزیه و تحلیل آماری داده ها

آزمون های این پژوهش با سه تکرار و در هر تکرار با حداقل ۵ نمونه برای هر یک از تیمارها (عصاره الکلی و آبی) به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملا تصادفی انجام گرفت. گیاهان تیمار نشده با عصاره گیاه گزنه به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. همچنین از اسیدسالیسیلیک به عنوان ماده موثر در افزایش مولفه های بیوشیمیایی و رشد گیاهان با غلظت های مشابه با عصاره‌های آبی و الکلی گزنه جهت ارزیابی میزان کارایی عصاره‌ها در القای مولفه های فوق استفاده شد. برای مقایسه میانگین داده ها، از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۱درصد استفاده شد. تجزیه داده‌ها برای صفات مورد بررسی با استفاده از نرم افزار SAS (2009) انجام گرفت.

نتایج

در این بررسی، اثر عصاره‌های آبی و الکلی گزنه دوپایه کوهی ایران در غلظت‌های مختلف بر خصوصیات زیستی و رشدی گیاه گوجه فرنگی مورد ارزیابی قرار گرفت تا الگویی مناسب برای استفاده از آن در سیستم‌های تولیدی گلخانه‌ای ارائه شود. با توجه به داده‌های حاصل، عصاره های آبی و الکلی گزنه موجب افزایش معنی دار سرعت نسبی رشد در گیاهان گوجه فرنگی شدند (شکل ۱). در اغلب تیمارها، تفاوت معنی داری بین عصاره آبی و عصاره الکلی گزنه از لحاظ افزایش سرعت نسبی رشد در گیاه گوجه فرنگی وجود نداشت و استفاده از غلظت‌های بالاتر هر یک از عصاره‌ها موجب شد سرعت نسبی رشد بیشتر افزایش

یابد. در واقع، رابطه معنی داری بین سرعت نسبی رشد و غلظت عصاره وجود داشت (شکل ۱). در روز ۱۴ پس از تیمار، بالاترین میزان رشد تا حدود ۲ برابر نمونه کنترل منفی در گیاهان تیمار شده با غلظت‌های ۵۰۰ppm عصاره‌های آبی و الکلی و ۳۰۰ppm عصاره آبی مشاهده شد. اگرچه در غلظت‌های مذکور از عصاره‌های آبی و الکلی تفاوت معنی‌داری در سرعت نسبی رشد گیاهان تیمار شده، در روزهای مختلف بعد از تیمار وجود نداشت. همچنین نتایج بیانگر آن بود که ماده اسید سالیسیلیک در غلظت‌ها و روزهای مختلف پس از تیمار موجب افزایش معنی دار سرعت نسبی رشد در نمونه های تیمار شده در مقایسه با شاهد نمی شود (شکل ۱). در مجموع می‌توان نتیجه گرفت که عصاره‌های آبی و الکلی گزنه با توان یکسان موجب افزایش سرعت نسبی رشد گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی شدند و بیشترین تاثیر، ۱۴ روز پس از تیمار با غلظت ۵۰۰ppm عصاره های آبی و الکلی گزنه مشاهده شد.

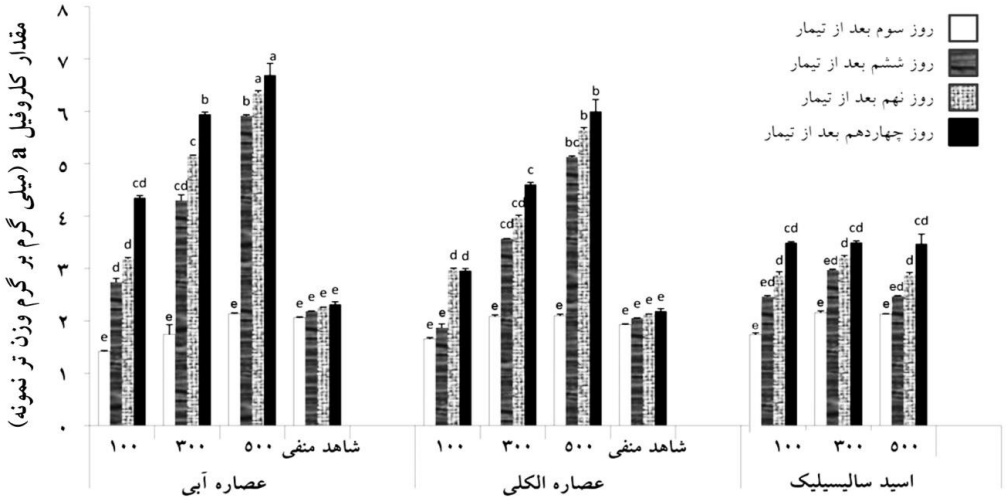


شکل ۱: مقایسه سرعت نسبی رشد در گیاهان گوجه فرنگی تیمارشده با غلظت‌های مختلف (۵۰۰ ppm، ۳۰۰ و ۱۰۰)، از عصاره های آبی و الکلی گزنه دوپایه و اسیدسالیسیلیک پس از ۳ روز (a)، ۶ روز (b)، ۹ روز (c) و ۱۴ روز (d) بر مبنای میلی گرم ماده خشک تولید شده به ازای واحد ماده خشک اولیه برگ در طول زمان. گیاهان تیمار نشده به عنوان شاهد منفی در نظر گرفته شد. حروف غیر یکسان روی نمودارها نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار است (P<0.01).

Figure 1. Comparing the relative growth rate between the treated tomato samples. Tomato samples treated with the 100, 300 and 500 ppm concentrations of salicylic acid and the alcoholic and aquatic extracts of the Bipod nettle weed extracts, distinctly. The relative growth rate was assessed on the basis of the milligram of the produced dry mass during the 3 (a), 6 (b), 9 (c) and 14 (d) days after treatment in relation to the primary dry mass of the leaf. Not treated plant just received the water used as the negative controls in each assay. Letters on the histogram indicated to the significant level ($p<0.01$.)

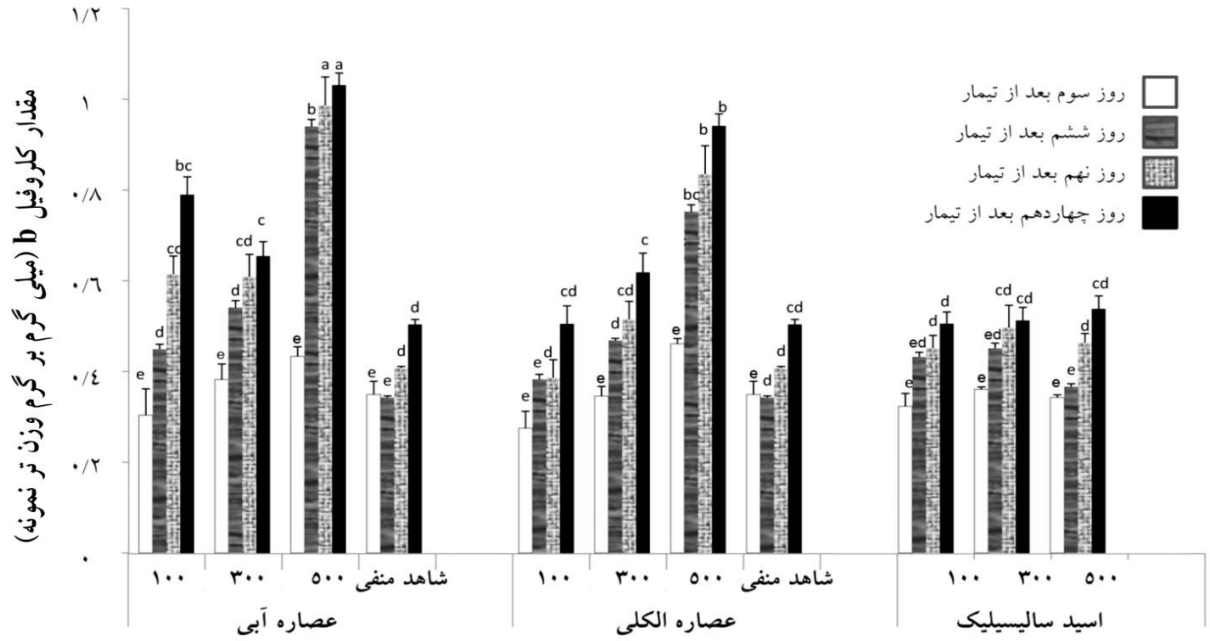
نتایج نشان داد که تیمار با عصاره‌های آبی و الکلی گزنه در غلظت‌های مختلف موجب افزایش معنی‌دار مقدار کلروفیل های a و b در گیاهان گوجه فرنگی در مقایسه با شاهد می شوند (شکل های ۲ و ۳). در غلظت‌های ۵۰۰ppm و ۳۰۰ppm عصاره

های آبی و الکلی مقدار کلروفیل های a و b در مقایسه با نمونه شاهد افزایش یافت و بهترین تاثیر در غلظت ۵۰۰ppm عصاره های آبی و الکلی تا ۳/۵ برابر نسبت به نمونه شاهد مشاهده شد. نتایج بیانگر تفاوت معنی‌دار بین مقدار کلروفیل‌های a و b در تیمار با غلظت های ۱۰۰ppm و ۳۰۰ppm، در روزهای ۹ و ۱۴ در مقایسه با شاهد بود. با این وجود غلظت‌های مورد استفاده عصاره‌های آبی و الکلی گزنه در روز سوم بعد از تیمار در مقایسه با سایر روزها در نمونه شاهد کمتر در افزایش مقدار کلروفیل های مورد سنجش تاثیر گذار بودند. همچنین نتایج نشان داد کاربرد عصاره آبی در غلظت‌های ۵۰۰ppm و ۳۰۰ppm موثرتر از عصاره الکلی در همان غلظت‌ها است (شکل ۲). اسیدسالیسیلیک تنها در زمان های ۹ و ۱۴ روز بعد از تیمار در غلظت‌های ۵۰۰ppm و ۳۰۰ppm موجب افزایش معنی دار مقدار کلروفیل های a و b در مقایسه با نمونه شاهد گردید ولی تاثیر آن در افزایش مقدار کلروفیل‌ها در سایر زمان ها و غلظت‌های عصاره گزنه معنی‌دار نبود (شکل های ۲ و ۳) و غلظت ۵۰۰ppm موثرترین غلظت بود.



شکل ۲: مقایسه مقدار کلروفیل a در برگ گیاهان گوجه فرنگی تیمار شده با غلظت‌های مختلف (ppm ۵۰۰، ۳۰۰ و ۱۰۰) از عصاره‌های آبی و الکلی گزنه دوپایه و اسیدسالیسیلیک پس از ۳، ۶، ۹ و ۱۴ روز. مقدار کلروفیل a بر حسب میلی گرم بر گرم وزن تر نمونه محاسبه شد. نمونه های تیمار نشده با عصاره به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. حروف غیر یکسان روی نمودارها نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار است (P<0.01).

Figure 2. Comparing the chlorophyll a content in tomato leaves treated with the alcoholic and aquatic of Bipod nettle weed extracts. Tomato samples treated with the 100, 300 and 500 ppm concentrations of the salicylic acid and alcoholic and aquatic extracts of the Bipod nettle weed extracts, distinctly. Data expressed as the milligram of chlorophyll a over the fresh weight unit during the 3 (a), 6 (b), 9 (c) and 14 (d) days after treatment for each sample. Plants just received water used as the negative controls, beside other treatments in each assay. Letters on the histogram indicated to the significant level (p<0.01.)

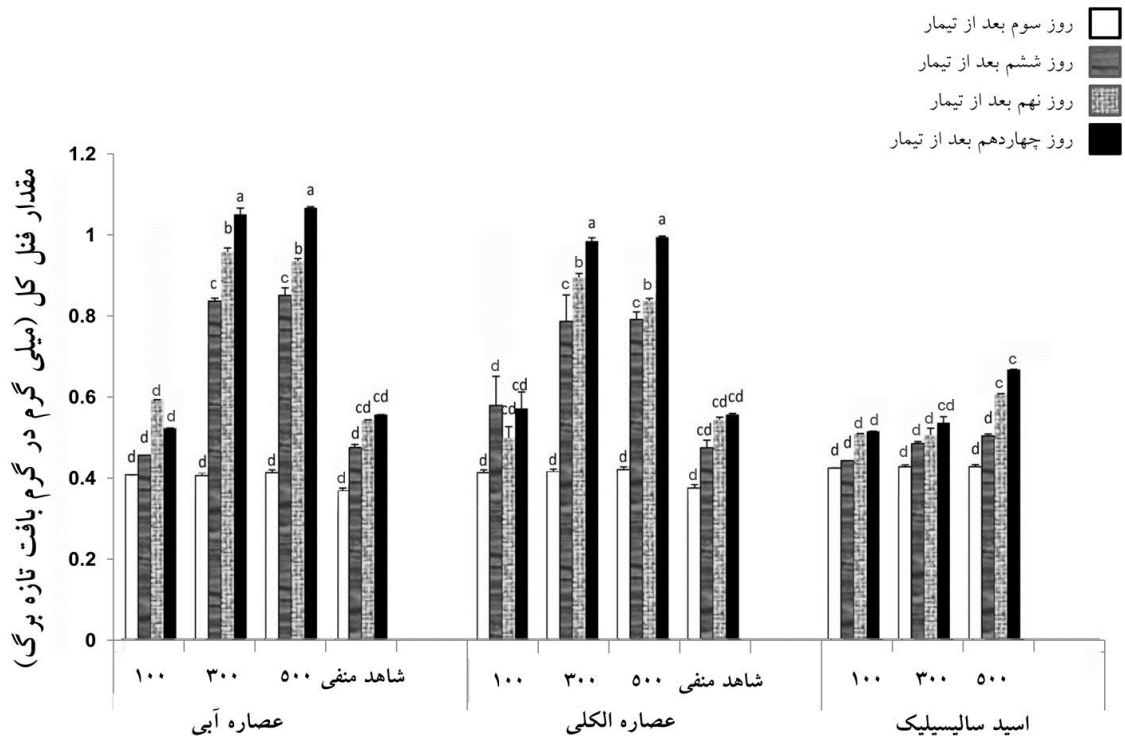


شکل ۳: مقایسه تغییر مقدار کلروفیل b در برگ نمونه های گوجه فرنگی تیمار شده با غلظت‌های مختلف (۱۰۰ ppm، ۳۰۰ و ۵۰۰) از عصاره های آبی و الکلی گزنه دوپایه و اسیدسالیسیلیک پس از ۳، ۶، ۹ و ۱۴ روز. مقدار کلروفیل b بر حسب میلی گرم بر گرم وزن تر نمونه محاسبه شد. نمونه های تیمار نشده با عصاره به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. حروف غیر یکسان روی نمودارها نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار است (P<0.01).

Figure 3. Comparing the chlorophyll b content in tomato leaves treated with the alcoholic and aquatic of Bipod nettle weed extracts. Tomato samples treated with the 100, 300 and 500 ppm concentrations of the salicylic acid and the alcoholic and aquatic extracts of the Bipod nettle weed extracts, distinctly. Data expressed as the milligram of chlorophyll b over the fresh weight unit during the 3 (a), 6 (b), 9 (c) and 14 (d) days after treatment for each sample. Plants just relieved the water used as the negative controls in each assay. Letters on the histogram indicated to the significant level (p<0.01.)

نتایج این تحقیق بیانگر تاثیر مثبت کاربرد عصاره‌های آبی و الکلی گیاه گزنه در افزایش مقدار فنل کل در برگ نمونه‌های گوجه فرنگی تیمارشده به صورت وابسته به غلظت بود (شکل ۴). تیمار گیاهان گوجه فرنگی با غلظت‌های ۵۰۰ppm و ۳۰۰ppm عصاره‌های آبی و الکلی در روزهای۶، ۹ و ۱۴ بعد از تیمار موجب افزایش معنی دار مقدار فنل کل تا ۲/۵ برابر در مقایسه با نمونه شاهد شدند. غلظت ۱۰۰ppm عصاره‌های آبی و الکلی گزنه در زمان‌های مورد تحقیق بعد از تیمار موجب افزایش معنی‌دار مقدار

فنل کل در نمونه‌های تیمار شده در مقایسه با شاهد نشد (شکل ۴). بهترین تاثیر هر کدام از عصاره ها در غلظت ۵۰۰ppm عصاره دیده شد (شکل ۴). به غیر از غلظت ۱۰۰ppm در سایر غلظت‌ها تفاوت معنی داری بین روزهای ۶، ۹ و ۱۴ پس از تیمار و افزایش فنل کل در برگ گیاهان مورد بررسی در مقایسه با شاهد مشاهده شد. اسیدسالیسیلیک تنها در غلظت ۵۰۰ppm در روزهای نهم و چهاردهم پس از تیمار موجب افزایش معنی‌دار مقدار فنل کل در بافت برگ گیاهان گوجه فرنگی گردید و در سایر غلظت‌ها و زمان‌های مورد بررسی، افزایش معنی‌دار مقدار فنل کل بافت برگ در نمونه‌های گوجه فرنگی تیمار شده در مقایسه با نمونه شاهد منفی مشاهده نشد (شکل ۴).

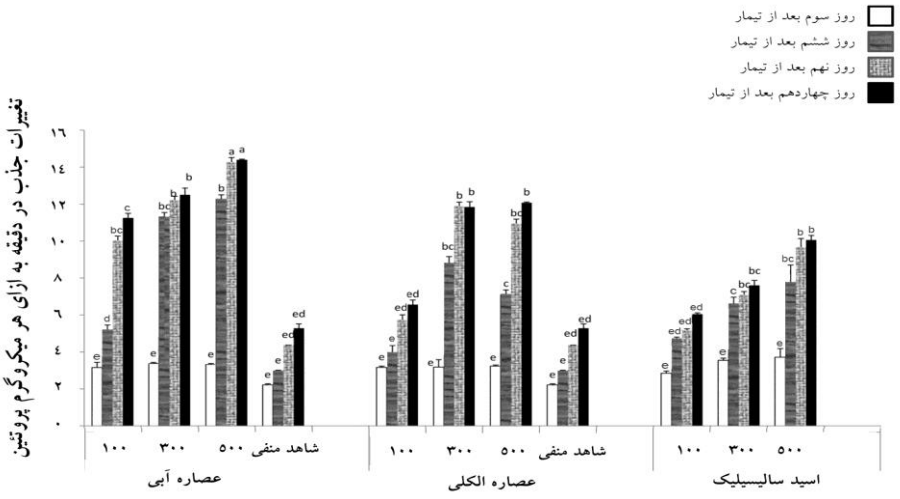


شکل ۴: مقایسه تغییر مقدار فنل کل در برگ نمونه های گوجه فرنگی تیمار شده با غلظت های مختلف (۵۰۰ ppm، ۳۰۰ و ۱۰۰) از عصاره های آبی و الکلی گزنه دوپایه و اسیدسالیسیلیک پس از ۳، ۶، ۹ و ۱۴ روز. از نمونه های تیمار نشده با عصاره به عنوان شاهد استفاده شد. حروف غیر یکسان روی نمودارها نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار است (P<0.01).

Figure 4. Comparing the amount of total phenol in tomato leaves treated with the alcoholic and aquatic of Bipod nettle weed extracts. Tomato samples treated with the 100, 300 and 500 ppm concentrations of the salicylic acid and alcoholic and aquatic extracts of the Bipod nettle weed extracts, distinctly. Data expressed as the milligram of the available total phenol over the fresh weight of the treated tomato leaf during the 3 (a), 6 (b), 9 (c) and 14 (d) days after treatment for each sample. Plants just received the water used as the negative controls in each assay. Letters on the histogram indicated to the significant level (p<0.01.)

نتایج بیانگر آن بود که فعالیت اختصاصی آنزیم پراکسیداز (POX) در نمونه های گوجه فرنگی تیمار شده با غلظت‌های ۵۰۰ppm و ۳۰۰ppm عصاره‌های آبی و الکلی گزنه در روزهای ۶، ۹ و ۱۴ روز بعد از تیمار در مقایسه با گیاه شاهد بطور معنی دار افزایش یافته است و در هیچکدام از تیمارها افزایش معنی‌دار در فعالیت آنزیم در روز سوم بعد از تیمار مشاهده نشد (شکل

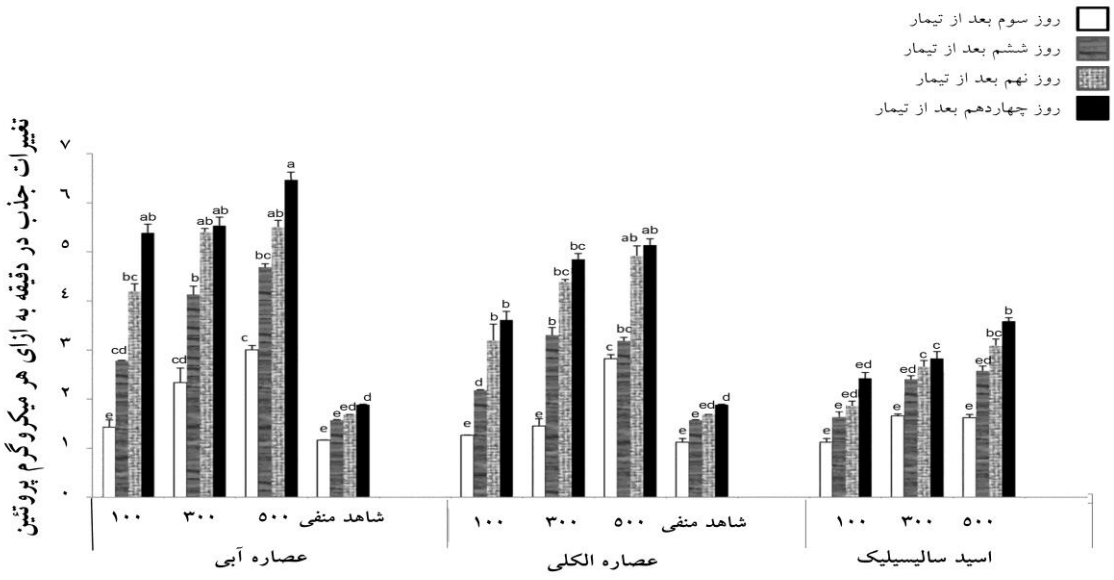
۵). به غیر از عصاره آبی در هیچکدام از تیمارها افزایش معنی‌دار میزان فعالیت آنزیم POX در مقایسه با نمونه شاهد در غلظت ppm ۱۰۰ در زمان‌های بعد از تیمار مشاهده نشد (شکل ۵). با افزایش غلظت عصاره‌های آبی و الکلی گزنه از ppm ۳۰۰ به ppm۵۰۰ میزان فعالیت اختصاصی POX در گیاهان تیمار شده در تمام روزهای مورد بررسی به غیر از روز سوم بعد از تیمار در مقایسه با نمونه شاهد منفی بطور معنی دار افزایش یافت. تیمار گیاهان گوجه فرنگی با غلظت‌های ppm۵۰۰ و ppm ۳۰۰ عصاره آبی در روزهای ۹ و ۱۴ بعد از تیمار به ترتیب موجب افزایش معنی‌دار فعالیت اختصاصی آنزیم POX به میزان ۳ برابر و با عصاره الکلی در غلظت‌ها و زمان‌های مذکور تا ۲ برابر نمونه شاهد شد. همچنین مشخص شد عصاره آبی گزنه تاثیر بیشتری را در افزایش فعالیت اختصاصی این آنزیم در مقایسه با عصاره الکلی دارد. در گیاهان گوجه فرنگی تیمار شده با اسیدسالیسیلیک نیز فعالیت این آنزیم در مقایسه با گیاهان تیمار نشده به صورت وابسته به غلظت افزایش یافت. غلظت‌های ppm ۵۰۰ و ppm ۳۰۰ اسیدسالیسیلیک در روزهای نهم و چهاردهم پس از تیمار موجب افزایش معنی‌دار فعالیت اختصاصی POX به ترتیب به میزان ۲ و ۱/۵ برابر در مقایسه با نمونه شاهد منفی شدند و غلظت ppm۱۰۰ اسیدسالیسیلیک تاثیر معنی‌داری در فعالیت آنزیم POX در روزهای مختلف بعد از تیمار نداشت (شکل ۵).



شکل ۵: ارزیابی فعالیت اختصاصی آنزیم پراکسیداز (POX) در برگ نمونه های گوجه فرنگی تیمار شده با غلظت های مختلف (ppm ۵۰۰، ۳۰۰ و ۱۰۰) از عصاره های آبی و الکلی گزنه دوپایه و اسیدسالیسیلیک پس از ۳، ۶، ۹ و ۱۴ روز. میزان فعالیت اختصاصی آنزیم بر مبنی میزان واحد آنزیم بر پروتئین کل بافت برگ بر حسب میکروگرم محاسبه شد. از نمونه های تیمار نشده با عصاره به عنوان شاهد استفاده شد. حروف غیر یکسان روی نمودارها نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار است ($P<0.01$).

Figure 5: valuating the peroxidase (POX) specific activity in tomato leaves treated with the alcoholic and aquatic of Bipod nettle weed extracts. Tomato samples treated with the 100, 300 and 500 ppm concentrations of the salicylic acid and the alcoholic and aquatic extracts of the Bipod nettle weed extracts, distinctly. Data evaluated by the level of the POX enzyme unit over the microgram of the total protein of treated tomato leaf during the 3 (a), 6 (b), 9 (c) and 14 (d) days after treatment. Plants just received the water

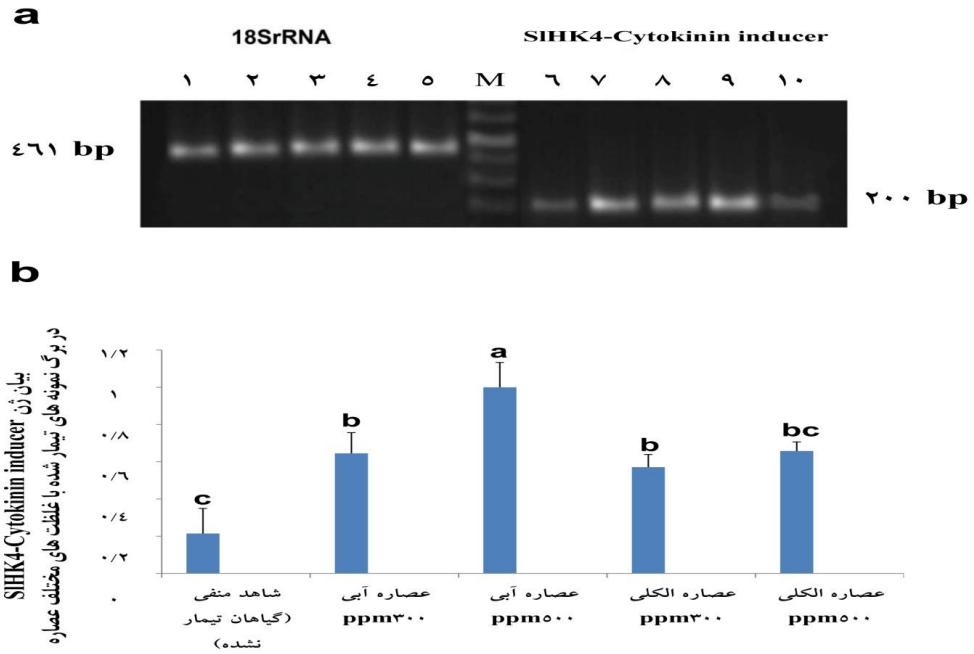
فعالیت اختصاصی آنزیم PPO در نمونه های گوجه فرنگی تیمارشده با عصاره‌های گزنه نیز مانند، آنزیم POX در روزهای ششم، نهم و چهاردهم پس از تیمار روند افزایشی معنی‌دار در مقایسه با نمونه شاهد نشان داد. هردو عصاره آبی و الکلی گزنه موجب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم PPO در تمامی غلظت‌های مورد استفاده شدند و بیشترین میزان افزایش در غلظت‌های ۵۰۰ ppm و ۳۰۰ ppm عصاره‌های آبی گزنه در روز چهاردهم پس از تیمار به میزان به ترتیب ۴ و ۳/۵ برابر در مقایسه با نمونه شاهد مشاهده شد (شکل ۶). عصاره الکلی گزنه در غلظت های ۵۰۰ ppm و ۳۰۰ ppm در روز چهاردهم پس از تیمار موجب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم PPO به میزان ۳ برابر در مقایسه با نمونه شاهد شد (شکل ۶). نتایج نشان داد غلظت ۵۰۰ ppm عصاره آبی گزنه دوپایه در مقایسه با سایر تیمارها به میزان بیشتری موجب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم PPO در گیاهان گوجه فرنگی تیمار می شود. تیمار گیاهان گوجه فرنگی با غلظت های ۵۰۰ ppm و ۳۰۰ ppm اسیدسالیسیلیک تنها در زمان های ۹ و ۱۴ روز پس از تیمار موجب افزایش معنی‌دار فعالیت اختصاصی آنزیم PPO به میزان ۲ برابردر مقایسه با نمونه شاهد شد و غلظت ۱۰۰ ppm آن در هیچکدام از زمان‌های بعد از تیمار موجب افزایش معنی‌دار PPO نشد (شکل ۶).



شکل ۶:ارزیابی فعالیت اختصاصی آنزیم پلی فنل اکسیداز (PPO) در برگ نمونه های گوجه فرنگی تیمار شده با غلظت‌های مختلف (ppm ۵۰۰، ۳۰۰ و ۱۰۰) از عصاره‌های آبی و الکلی گزنه دوپایه و اسیدسالیسیلیک پس از ۳، ۶، ۹ و ۱۴ روز. میزان فعالیت اختصاصی آنزیم بر مبنی میزان واحد آنزیم بر پروتئین کل بافت برگ بر حسب میکروگرم محاسبه شد. از نمونه های تیمار نشده با عصاره به عنوان شاهد استفاده شد. حروف غیر یکسان روی نمودارها نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار است

Figure 6. Evaluating the Polyphenoloxidase (PPO) specific activity in tomato leaves treated with the alcoholic and aquatic of Bipod nettle weed extracts. Tomato samples treated with the 100, 300 and 500 ppm concentrations of the salicylic acid and the alcoholic and aquatic extracts of the Bipod nettle weed extracts, distinctly. Data evaluated by the level of the PPO enzyme unit over the microgram of the total protein of treated tomato leaf during the 3 (a), 6 (b), 9 (c) and 14 (d) days after treatment. Plants just received the water used as the negative controls in each assay. Letters on the histogram indicated to the significant level ($p<0.01$) . ($P<0.01$)

در این پژوهش میزان بیان نسبی ژن مسئول تولید پروتئین القاشونده توسط سیتوکینین (SlHK4-Cytokinin inducer) به عنوان شاخصی برای ارزیابی میزان تولید این تنظیم کننده رشدی در گیاهان گوجه فرنگی تیمارشده با عصاره گزنه مورد ارزیابی قرار گرفت. غلظت‌های ۳۰۰ppm و ۵۰۰ppm از عصاره‌های آبی و الکلی گیاه گزنه میزان بیان ژن SlHK4-Cytokinin inducer را به‌طور معنی‌داری در مقایسه با شاهد افزایش دادند (شکل ۷). اگرچه عصاره آبی تاثیر بیشتری را در مقایسه با عصاره الکلی داشت. با توجه به نتایج بدست آمده، تیمار با غلظت‌های ۳۰۰ppm و ۵۰۰ppm عصاره آبی گزنه به مدت ۱۴ روز، به ترتیب موجب افزایش ۳ و ۵ برابری میزان بیان ژن مذکور نسبت به شاهد شد در صورتی که غلظت‌های مختلف عصاره الکلی هر یک موجب افزایش میزان بیان ژن تا حدود ۳ برابر گیاهان شاهد شدند (شکل ۷). در عصاره‌های آبی و الکلی گزنه با افزایش میزان غلظت عصاره توان تاثیر در افزایش میزان بیان ژن افزایش پیدا کرد.



شکل ۷: بررسی بیان ژن SlHK4-Cytokinin inducer در برگ گیاهان گوجه فرنگی تیمار شده با غلظت های ۵۰۰ ppm و ۳۰۰ppm از عصاره های آبی و الکلی گیاه گزنه دوپایه پس از ۱۴ روز، (a) واکنش RT-PCR نیمه کمی برای ژن‌های SlHK4-Cytokinin inducer (۲۰۰ جفت باز) و 18SrRNA (۴۶۱جفت باز): ۱ و ۶: شاهد منفی (گیاهان تیمار نشده) ۲ و ۷: گیاهان تیمار شده با غلظت ۳۰۰ppm عصاره آبی گزنه، ۳ و ۸: گیاهان تیمار شده با غلظت ۵۰۰ppm عصاره آبی گزنه، ۴ و ۹: گیاهان تیمار شده با غلظت ۵۰۰ppm عصاره الکلی گزنه، ۵ و ۱۰: گیاهان تیمار شده با غلظت ۳۰۰ppm عصاره الکلی گزنه. M: مارکر با وزن مولکولی ۱۰۰ bp. (b) میزان بیان نسبی ژن SlHK4 Cytokinin inducer در برگ گوجه فرنگی تیمار شده با غلظت‌های مختلف عصاره‌های آبی و الکلی گزنه در مقایسه با گیاهان شاهد. حروف متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار (P<0.01) است.

Figure 7. Semi-quantitative RT-PCR (RT-sqPCR) for the transcript level analysis of the SlHK4-Cytokinin inducer gene in Tomato samples treated with the, 300 and 500 ppm concentrations of aquatic and alcoholic extracts of the Bipod nettle weed extracts, 14 days after treatment. (a) Electrophoresis analysis of the 18SrRNA and SIH4-Cytokenin inducer gene amplicons after 25

cycles of PCR. Amplified products for SlHK4-Cytokinin inducer and 18SrRNA genes are 200 and 461 bp in size, respectively. Numbers indicate to the different concentrations of the treated nettle extracts for 18SrRNA (1 to 5) and SIH4-Cytokinin inducer (6 to 10) genes as follow: 1 and 6: negative control in which cDNA from tomato sample treated with just water used as template for PCR; 2 and 7: tomato samples treated with the 300ppm concentration of aquatic nettle extract; 3 and 8: tomato samples treated with the 500ppm concentration of aquatic nettle extract; 4 and 9: tomato samples treated with the 500ppm concentration of ethanolic nettle extract spermidine; 5 and 10: tomato samples treated with the 300ppm concentration of ethanolic nettle extract. M: 100 bp DNA ladder (SinaClon Inc, Iran). The levels of SIH4-Cytokenin inducer messenger RNA accumulation compared with that of the housekeeping gene 18SrRNA. (b) Assessment by RT-sqPCR of SlHK4-Cytokinin inducer gene transcript levels in leaf tissue of tomato plants treated with the water as control and different concentrations of aquatic and ethanolic nettle extracts. Control: negative control. Each histogram represents the mean +SD (standard deviation) and values obtained from the relative densitometry analysis by Image J software for three independent RT-sqPCR reactions which given as an arbitrary value of 1. Relative band intensities were normalized to the 18srRNA band intensity. Letters on the histogram indicated to the significant level ($p<0.01$).

بحث

گیاهان داروئی به عنوان منابع سرشار از ترکیبات آلی مختلف مانند پروتئین‌ها، فنل‌ها، پپتیدها و متابولیت‌های ثانویه محسوب می‌شوند (Waziri, 2015). در حال حاضر در نقاط مختلف جهان توجه محققین به شناسائی انواع گونه‌های گیاهی با اثرات مطلوب در پزشکی و کشاورزی جلب شده است (Chrubasik *et al*., 2007; Jing *et al*., 2012). در این میان در خصوص استفاده از آنها به عنوان تنظیم کننده‌های رشد در گیاهان با امکان تولید گلخانه‌ای مانند گوجه فرنگی توجه زیادی نشده است. پژوهش‌ها نشان داده است که بیشترین میزان ترکیبات شیمیایی گزنه در برگ‌های آن وجود دارد (Gulcin *et al*., 2004) از اینرو برای این تحقیق از عصاره برگ گزنه استفاده شد. نتایج این بررسی در مجموع بیانگر آن بود که هر دو نوع عصاره خام گیاه گزنه (آبی و الکلی) می توانند در غلظت ppm ۵۰۰ در طول زمان موجب افزایش قدرت زیستی گیاه و بهتر شدن رشد گیاه گوجه فرنگی شوند. در این بررسی مشخص شد که هریک از عصاره‌های آبی و الکلی گزنه از توان افزایش سرعت نسبی رشد گیاه گوجه فرنگی برخوردارند و با افزایش میزان غلظت عصاره‌ها سرعت نسبی رشد افزایش پیدا می کند. سرعت نسبی رشد تابعی از وزن خشک گیاهچه‌های گوجه فرنگی بوده و افزایش آن بیانگر تثبیت بیشتر CO_2 در بافت‌های در حال رشد است. به این مفهوم که عصاره‌ها توانسته‌اند موجب بالا رفتن نرخ فتوسنتز، افزایش متابولیسم و احیای بیشتر CO_2 در بافت‌های نمونه های تیمار در مقایسه با نمونه کنترل بدون تیمار شوند. در تحقیقات گذشته مشخص شده بود که بین سرعت نسبی رشد و افزایش متابولیسم در گیاهان رابطه مستقیم وجود دارد (Macfarlane *et al*., 2005; Pyl *et al*., 2012). Garmendia و همکاران (۲۰۱۸) از عصاره آبی گزنه برای آبیاری مزرعه سیب زمینی استفاده نمودند و مولفه‌های مختلف رشد و شاخص‌های بیوشیمیایی برگ سیب زمینی های تیمار را در کنار میزان تولید محصول با نمونه شاهد مورد مقایسه قرار داده و نشان دادند که میزان تولید محصول در نمونه های سیب زمینی تیمار شده در مقایسه با شاهد افزایش یافته‌است. این محققین با آنالیز مقدار عناصر معدنی موجود در عصاره آبی گزنه تاثیر مثبت آنرا در افزایش مولفه‌های رشدی سیب زمینی را مرتبط با مقدار بالای نیتروژن و فسفر موجود در عصاره

آبی دانستند. در تحقیقی که به‌تازگی انجام پذیرفت مشخص شد که استفاده از عصاره آبی گزنه به صورت اسپری رو برگ‌ها و یا به عنوان کود در خاک می تواند موجب افزایش شاخصه‌های رشدی و بیوشیمیایی در لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L.) شود (Maricic *et al*., 2021).

نتایج نشان داد که در نمونه‌های گوجه فرنگی، تیمار با هر کدام از عصاره‌های آبی و الکلی گزنه محتوای کلروفیل‌های a و b در برگ افزایش می‌دهد. احتمال دارد که عصاره‌های آبی و الکلی گزنه موجب القای تولید تنظیم کننده‌های رشدی همچون سیتوکینین در گیاهچه‌های گوجه فرنگی تیمار شده باشند و از این طریق علاوه بر تسریع رشد گیاه موجب تجمع رنگدانه‌های فتوسنتزی در گیاه‌هان تیمار شده باشند. افزایش تجمع کلروفیل های a و b در غشاءهای تیلاکوئیدی موجب بهتر شدن رشد گیاه گوجه‌فرنگی می شود (Jianfeng *et al*., 2015). در تایید نتایج این تحقیق، Maricic و همکاران (۲۰۲۱) نشان دادند عصاره آبی گزنه با افزایش تجمع آهن در برگ‌های لوبیا موجب بهتر شدن فتوسنتز و تقویت مولفه‌های بیوشیمیایی مرتبط با رشد و در نهایت بهتر شدن رشد و عملکرد تولید محصول در لوبیا می‌شود. افزایش میزان محتوی کلروفیل a در بافت برگ گوجه‌فرنگی می‌تواند موجب تجمع رنگدانه لیکوپن در میوه و افزایش کیفیت میوه گوجه‌فرنگی شود (Antiabong *et al*., 2016; Hong *et al*., 2018). در مجموع می‌توان نتیجه گرفت که عصاره‌های آبی و الکلی گزنه توانسته اند موجب بهتر شدن رشد گیاه گوجه‌فرنگی شوند.

نتایج این تحقیق نشان داد که عصاره گیاه گزنه دوپایه می تواند موجب افزایش میزان فنل کل در بافت‌های گیاه گوجه فرنگی شود. فنل‌ها ترکیبات آروماتیکی هستند که در جریان چرخه بیوشیمیایی وابسته به اسید شیکیمیک در گیاهان تولید می شوند و عملکردهای زیستی متفاوتی در سلول‌ها دارند (Duarte *et al*., 2008). تعداد زیادی از آنها در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیر زیستی محیط نقش دارند (Leser & Treutter 2005; David *et al*., 2016). همچنین اهمیت این ترکیبات در فرایندهای رشد و نمو گیاهان، تجمع رنگدانه، بهتر شدن کیفیت میوه، ایجاد سدهای فیزیکی در برابر آسیب‌های مکانیکی، همچنین جلب حشرات گرده افشان، پاسخ‌های دفاعی گیاه و دفع علف های هرز اثبات شده است (Lo & Nicholson, 1998; Al-Amri, 2013). در یک بررسی، تیمار بذر گوجه‌فرنگی با اسید شیکیمیک قبل از کاشت، موجب افزایش فاکتورهای رشدی مانند رنگدانه‌های فتوسنتزی، قندهای محلول در میوه، وزن تر و خشک و مقدار مواد آلی و معدنی شد (Al-Amri, 2013). به این مفهوم که مواد فنلی می‌توانند موجب بهبود رشد در گیاه گوجه‌فرنگی شوند.

افزایش مقدار فنل در برگ گوجه‌فرنگی تیمار شده با هر یک از عصاره‌های گزنه همزمان با افزایش میزان فعالیت اختصاصی آنزیم‌های پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز سنجش شده در این تحقیق مشاهده شد. نتایج این پژوهش نشان داد فعالیت آنزیم های پلی فنل اکسیداز و پراکسیداز در نمونه‌های تیمار شده با عصاره‌های آبی و الکلی گزنه افزایش یافت و در زمان دو هفته پس از تیمار، بیشترین میزان فعالیت آنزیم‌های مذکور در نمونه های گوجه‌فرنگی دیده شد (اشکال ۵ و ۶).

پراکسیدازها با کاتابولیسم و اکسیداسیون هورمون اکسین (IAA) در بافت‌های گیاهان جهت رشد و تمایز ضرورت دارند (Shi *et al*., 2013) و موجب مقاومت آنها به تنش‌های زیستی و غیر زیستی می‌شوند (Almagro *et al*., 2009; El-Gaied *et al*., 2013; Pandey *et al*., 2017). نتایج پژوهش‌ها نشان داده است که پراکسیدازها با افزایش مقدار تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مانند اکسین و سیتوکینین در گیاهان خانواده بادنجانیان مانند گوجه‌فرنگی و فلفل موجب افزایش رشد و میزان مقاومت

آنها به تنش‌های زیستی و غیر زیستی می‌شوند (Maki & Morohashi , 2006; Pandey *et al*., 2017). آنزیم پلی فنل اکسیداز در غشاء تیلاکوئید کلروپلاست‌ها به بیشترین میزان در گیاه گوجه‌فرنگی وجود دارد و وظیفه آن اکسیداسیون ترکیبات است (Maki & Morohashi, 2006). اگرچه فعالیت بیش از اندازه آن در میوه گوجه‌فرنگی در انبارداری و پس از برداشت میوه فاکتوری منفی برای حفظ سلامت میوه محسوب شده و موجب قهوه ای شدن و فساد میوه می‌شود ولی نتایج پژوهش‌های پیشین نشان داده است که فعالیت آنزیم مذکور در بهتر رشدن رشد و نمو گیاهان تولید کننده میوه نقش موثری دارد (Thipyapong *et al*., 2007). تیمار گیاه قاشقک .(*Scutellaria alpina* L) با فرم های مختلف تنظیم کننده رشد گیاهی مانند زآتین و کینتین موجب افزایش محتوی ترکیات فنلی، متابولیت‌های ثانویه ضد میکروبی، رنگدانه ها، آنزیم‌های مرتبط با پاسخ های تنش مانند پراکسیداز، کاتالاز و پلی فنل اکسیداز در گیاه و در نهایت موجب افزایش رشد و نمو و مقاومت آن در برابر تنش‌های زیستی و غیر زیستی شد (Gerszberg *et al*., 2015).

در این بررسی مشخص شد که غلظت‌های مختلف عصاره‌های آبی و الکلی گزنه قادر به افزایش معنی‌دار میزان بیان ژن مربوط SlHK4-Cytokinin inducer در نمونه‌های گوجه‌فرنگی هستند. به این مفهوم که باعث تحریک به تولید تنظیم کننده رشدی سیتوکنین در گیاه گوجه‌فرنگی می‌شوند (Shi *et al*., 2013). در حقیقت نام این ژن مخفف Solanum lycopersicum histidine kinase 4 (SlHK4) است. این ژن حاوی اطلاعات ژنتیکی برای ترجمه پروتئینی است که در سلول‌های برگ گیاه‌گوجه فرنگی به عنوان گیرنده سیتوکینین عمل نموده و لذا با افزایش میزان این تنظیم کننده رشدی میزان بیان ژن مذکور و نسخه برداری و تولید mRNA از آن به نسبت میزان سیتوکینین افزایش می‌یابد. نتایج پژوهش‌های پیشین مشخص ساخت که افزایش تنظیم کننده رشدی سیتوکینین می‌تواند موجب افزایش میزان کلروفیل و ترکیبات فنلی مختلف در بافت‌ها و همچنین جلوگیری از تنش‌های اکسیداتیو منجر به مرگ در بافت‌ها گردد (Honig *et al*., 2018). در تایید نتایج پژوهش‌های پیشین (Honig *et al*., 2018)، نتایج این پژوهش نیز نشان داد با افزایش میزان سیتوکینین در بافت‌های تیمار شده با عصاره‌های آبی و الکلی، مقدار کلروفیل های a و b و میزان فنل کل موجود افزایش یافته است و عصاره آبی گزنه در غلظت ۵۰۰ppm بیشترین تاثیر را در این افزایش داشته است. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که احتمالا عصاره‌های آبی و الکلی گزنه از طریق تاثیر در سیستم ژنتیکی میزبان و افزایش سیتوکینین توانسته اند با تحریک به تولید ترکیبات فنولی در گیاه گوجه‌فرنگی، موجب رشد بهتر و افزایش متابولیسم و توان زیستی آن شوند. از آنجائی که در گذشته ارتباط مستقیمی بین تیمار گیاه گوجه‌فرنگی با اسیدسالیسیلیک و افزایش رشد مشاهده شده بود (Wasti *et al*., 2012) لذا در این تحقیق از غلظت‌های مختلف اسیدسالیسیلیک به عنوان تاثیر کننده مثبت در رشد برای تیمار گیاهچه های گوجه فرنگی استفاده شد. با این وجود به غیر از تاثیر مثبت معنی‌داری که در افزایش تجمع ماده کلروفیل در بافت برگ گوجه‌فرنگی های تیمار مشاهده شد، در سایر فاکتورهای رشدی مورد تحقیق ارتباط معنی‌داری بین نمونه‌های کنترل و تیمار، در غلظت‌های مورد بررسی مشاهده نشد. این احتمال وجود دارد که مصرف اسیدسالیسیلیک به صورت مستقیم در خاک به دلایل متفاوتی از جمله جذب نشدن آن از طریق ریشه، نتوانسته موجب القا بیشتر فاکتورهای رشدی در گیاهچه‌های گوجه فرنگی تیمار شده با آن در مقایسه با عصاره‌های گزنه مورد بررسی تحت شرایط گلخانه‌ای شود. با این وجود در همین شرایط، عصاره‌های خام گزنه موثر واقع شدند.

پژوهش‌های گذشته مشخص ساخت که عصاره‌های آبی و الکلی برگ گزنه دوپایه حاوی مقادیر زیادی از ترکیبات فنلی شامل Fumaric acid و Quercetin است (Otles & Yalcin, 2012). تاثیر مثبت ترکیبات مختلف فنلی در رشد گیاهان اثبات شده است (Makoi & Ndakideimi, 2007; Sulusoglu, 2014; Ertani *et al*., 2016). شاید تاثیری که در تحریک رشد گیاهچه های گوجه‌فرنگی مشاهده می شود بدلیل حضور این ترکیبات فنلی در عصاره‌های آبی و الکلی گزنه دو پایه باشد.

نتیجه گیری

به طور کلی، محلول پاشی با عصاره‌های آبی و الکلی گزنه در غلظت مناسب می‌تواند به عنوان روشی کاربردی برای بهبود رشد گیاه گوجه‌فرنگی رقم Super Chef مورد استفاده قرار گیرد. تأثیر تیمار با عصاره‌های آبی و الکلی گزنه بر افزایش خصوصیات رشدی گوجه‌فرنگی را می‌توان به دلیل تأثیرآن بر فعالیت آنتی اکسیدانی و تجمع ترکیبات فنلی و همچنین افزایش مقدار تنظیم کننده رشدی سیتوکینین گیاه مرتبط دانست. در مجموع عصاره‌های آبی و الکلی گزنه توانسته اند در غلظت ۵۰۰ppm با اضافه شدن مستقیم در خاک تا ۱۴ روز پس از تیمار، با افزایش توان متابولیسمی گیاه گوجه‌فرنگی، موجب افزایش رشد آن شوند. با این وجود عصاره آبی گزنه در غلظت ۵۰۰ ppm موثرتر از سایر تیمارها بود. بهترین این نتایج می تواند برای استفاده از عصاره‌های گیاه گزنه به عنوان یک ترکیب زیستی و جایگزین تسریع کننده‌های شیمیایی رشد موجود در سطح گلخانه‌های کشور مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

ابراهیم قوچی، ز.، محسن آبادی، غ. (۱۳۹۸). تأثیر نیتروژن آلی و معدنی بر عملکرد و خصوصیات فیتوشیمیایی دو گونه گزنه در منطقه رامسر. مجله فن آوری تولیدات گیاهی. ۱۹ (۲): ۱۹۱-۱۷۹.

عقیقی شاهوردی، م.، عطایی سماق، ح.، ممیوند، ب. (۱۳۹۴). تاثیر عصاره آبی گیاه گزنه (*Urtica dioica L.*) بر مولفه های جوانه زنی و رشد اولیه گیاهچه دو رقم گندم. مجله اکوفیزیولوژی بذر. ۱ (۲): ۸۹- ۱۰۴.

Al- Amri, S.M. (2013) Improved growth, productivity and quality of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants through application of Shikimic Acid. Saudi Journal of Biological Sciences 20 (1): 339-345

Almagro, L., Gómez-Ros, L.V., Belchi-Navarro, S., Bru, R., Ros Barceló, A. and Pedreño, M.A. (2009). Class III peroxidases in plant defense reactions. Journal of Experimental Botany 60: 377-390.

David, A.V.A., Arulmoli, R. and Parasuraman, S. (2016). Overviews of biological importance of quercetin: A bioactive flavonoid. Pharmacognosy Reviews 10 (20): 84-89.

Antiabong, J.F, Ngoepe, M.G. and Abechi, A.S. (2016). Semi-quantitative digital analysis of polymerase chain reaction-electrophoresis gel: Potential applications in low-income veterinary laboratories. Veterinary World (9): 935-939.

Bisht, S., Bhandari, S. and Bisht, N. S. (2012). *Urtica dioica* (L): an undervalued, economically important plant. International Journal of Agricultural Science Research 2: 250-252.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72 (7): 248-254.

Chrubasik, J.E., Boufogalis, B.O., Wagner, H. and Chrubasik, S. (2007). A comprehensive review on the stinging nettle, effect and efficacy profiles. Phytomedicine 14 (7): 568- 579.

Chandrashekaraiah, S., Niranjana, S.R. and Umesha, S. (2009). Role of Phenylalanine Ammonia Lyase and Polyphenol Oxidase in Host Resistance to Bacterial Wilt of Tomato. Journal of Phytopathology 157 (9): 552-557.

Cowan, M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews 12 (4): 564-582.

Di Cesare, L.F., Migliori, C., Ferrari, V., Parisi, M., Campanelli, G., Candido, V. and Perrone, D. (2012). Effects of irrigation-fertilization and irrigation-mycorrhization on the alimentary and nutraceutical properties of tomatoes. In: Lee, T.S. (Ed.), Irrigation Systems and Practices in Challenging Environments. In Tech Press, Rijeka, China. 207-332.

Duarte, L.M.L., Salatino, M.L.F., Salatino, A., Negri, G. and Barradas, M.M. (2008). Effect of Potato virus X on total phenol and alkaloid contents in *Datura stramonium* leaves. Summa Phytopathology 34 (2): 65-67.

El-Gaied, L.F., El-Heba, G.A.A. and El-Sherif, N.A. (2013). Effect of growth hormones on some antioxidant parameters and gene expression in tomato, GM Crops & Food. 4 (1): 67-73. https://doi.org/10.4161/gmcr.24324.

FAOSTAT. (2012). FAOSTAT Database results from FAO website. Food and Agriculture Organization of the United Nations. http://faostat3.fao.org.

Ertani, A., Pizzeghello, D., Francioso, O., Tinti, A. and Nardi, S. (2016). Biological Activity of Vegetal Extracts Containing Phenols on Plant Metabolism. Molecules 21(2): 205. https://doi.org/10.3390/molecules21020205.

Filipovic, V., Ugrenovic, V., Glamoclija, D., Jevdovic, R., Grbic, J. and Sikora, V. (2011). Analysis of Ca, Mg, Fe, and Zn contents in aboveground biomass of wild nettle (*Urtica dioca* L.). Lek. Sirovine 31: 47-54.

Gardner, F.P., Pearce, R.B., and Mitchell, R.L (1985). Physiology of Crop Pants, pp. 187-208. Iowa State University Press, U.S.A.

Gerszberg, A., Hnatuszko-Konka, K., Kowalczyk, T. and Kononowicz, A.K. (2015). Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) in the service of biotechnology**.** Plant Cell Tissue and Organ Culture 120 (3): 881-902.

Godlewska, K., Ronga, D. and Michalak, I. (2021). Plant extracts - importance in sustainable agriculture. Italian Journal of Agronomy 16 (2). 1851-1875.

Garmendia, A., Raigoin, M.D., Marques, O., Ferriol, M., Royo, J., and Merle, H. (2018). Effects of nettle slurry (*Urtica dioica* L.) used as foliar fertilizer on potato (*Solanum tuberosum* L.) yield and plant growth. Peer J. 7: :e4729. https://doi.org/10.7717/peerj.4729.

Gulcin, O., Kufrevioglu, I., Oktay, M. and Buyukokuroglu, M.E. (2004). Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.). Journal of Ethnopharmacology 90: 205-215.

Habibi-Lahigi, S.K., Amini, Moradi, P. and Asaadi, K. (2011). Investigating the chemical composition of different parts extracts of bipod nettle *Urtica dioica* L. in Tonekabon region. Iranian Journal of Plant Physiology 2**:** 339-342.

Hönig, M., Plíhalová, L., Husičková, A., Nisler, J., & Doležal, K. (2018). Role of Cytokinins in Senescence, Antioxidant Defence and Photosynthesis. *International journal of molecular sciences*, *19*(12), 4045. https://doi.org/10.3390/ijms19124045.

Jianfeng, W., Dongxian, H., Jinxiu, S., Haijie, D. and Weifen, D. (2015). Non-destructive measurement of chlorophyll in tomato leaves using spectral transmittance. International Journal of Agricultural and Biological Engineering (8) 5: 73- 78.

Jing, B., Ma, Z., Feng, J., Liang, H., Li, C. and Zhang, X. (2012). Evaluation of the Antiviral Activity of Extracts from Plants Grown in the Qinling Region of China Against Infection by *Tobacco mosaic virus* (TMV). Journal of Phytopathology 160: 181-186.

Korpe, D., IserI, D.A., Sahin, O.D., Cabi, F.I. and Haberal, M. (2012). High-antibacterial activity of Urtica spp. seed extracts on food and plant pathogenic bacteria. International Journal of Food Sciences and Nutrition 64 (3): 355-362.

Kregiel, D., Pawlikowska, E. and Antolak, H. (2018). Urtica spp.: Ordinary Plants with Extraordinary Properties. Molecules 23 (7): 1664.
https://doi.org/10.3390/molecules23071664.

Leser, C. and Treutter, D. (2005) Effects of nitrogen supply on growth, contents of phenolic compounds, and pathogen (scab) resistance of apple trees. Plant Physiology 123 (3): 49-56.

Lichtenthaler, H.K. and Buschmann, C. (2001). Chlorophylls and Carotenoids: Measurement UNIT F4.3 and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. *Current* Protocols in *Food Analytical* Chemisın. (S1): F4.3.1-F4.3.8.

Lo, S.C. and Nicholson, R. L. (1998). Reduction of light-induced anthocyanins accumulation in inoculated sorghum mesocotyls: Implications for a compensatory role in the defense response. Plant Physiology 116 (3): 979-989.

Macfarlane, C., Hansen, L.D., Edwards, J., White, D.A. and Adams, M.A. (2005). Growth efficiency increases as relative growth rate increases in shoots and roots of Eucalyptus globulus deprived of nitrogen or treated with salt. Tree Physiology 25 (2): 571- 582.

Maki, H. and Morohashi, Y. (2006). Development of polyphenol oxidase activity in the micropylar endosperm of tomato seeds. Journal of Plant Physiology 163 (1): 1-10.

Makoi, J.H.J. and Ndakidemi, P.A. (2007). Biological, ecological and agronomic significance of plant phenolic compounds in rhizosphere of the symbiotic legumes. African Journal of Biotechnology 6 (12): 1358-1368.

Maricic, B., Radman, S., Romic, M., Perkovic, J., Major, N., Urlic, B. Palcic, I., Ban, D., Zoric, Z. and Ban, S.G. (2021). Stinging Nettle (*Urtica dioica* L.) as an Aqueous Plant-Based Extract Fertilizer in Green Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Sustainable Agriculture. Sustainability 13: 4042-4054. https:// doi.org/10.3390/su13074042.

Murthy, K.N., Uzma, F. and Srinivas, C.C. (2014). Induction of Systemic Resistance in Tomato against Ralstonia solanacearum by Pseudomonas fluorescens. American Journal of Plant Sciences 5 (2): 1799-1811.

Pandey, V.P., Awasthi, M., Singh, S., Tiwari, S. and Dwivedi, U.N. (2017). A Comprehensive Review on Function and Application of Plant Peroxidases. Biochem Anal Biochem 6 (1): 308. https://doi.org/10.4172/2161-1009.1000308.

Pyl, E.T., Piques, M., Ivakov, A., Schulze, W., Ishihara, H., Stitt, M. and Sulpice, R. (2012). Metabolism and Growth in Arabidopsis Depend on the Daytime Temperature but Are Temperature-Compensated against Cool Nights. The Plant Cell (24): 2443-2469.

Rakhshandehroo, F., Modarres, A. and Zamanizadeh, H.R. (2009). Study on the antiviral effect of aquatic and alcoholic extracts of *Urtica dioica* L. on rose mosaic viral disease in vitro culture. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants* 25 (3): 403-413.

Rakhshandehroo, F., Shahsavan Behboodi, B. and Mohammadi, M. (2012). Changes in Peroxidase Activity and Transcript Level of the MYB1 Gene in Transgenic Tobacco Plants Silenced for the RDR-1 Gene After Systemic Infection with Potato virus Yº. Journal of Phytopathology 160 (4):187-194.

Rivera, M.C., Wright, E.R., Salice, S. and Fabrizio, M.C. (2012). Effect of plant preparations on lettuce yield. Acta Horticulture 933: 173-179.

Safamehr, A., Mirahmadi, M. and Nobakht, A. (2012). Effect of nettle *(Urtica dioica*) medicinal plant on growth performance, immune responses, and serum biochemical parameters of broiler chickens. *International journal* of *basic science* in medicine. 3 (1): 721-728.

Shi, X., Gupta. S., Lindquist, I.E., Cameron, C.T., Mudge, J. and Rashotte, AM. (2013). Transcriptome Analysis of Cytokinin Response in Tomato Leaves. PLoS ONE 8.1:e55090. doi:10.1371/journal.pone.0055090.

Sulusoglu, M. (2014). Phenolic Compounds and Uses in Fruit Growing. Turkish Journal of Agricultural and Natural Sciences 1: 947-956.

Suzuki, Y., Kihara-Doi, Kawazu, T., Miyake, C. and Makino, A. (2010). Differences in Rubisco content and its synthesis in leaves at different positions in Eucalyptus globules seedlings. Plant Cell Environ 33: 1314-1323.

Wasti, S., Mimouni, H., Smiti, S., Zid, E. and Ben Ahmed, H. (2012). Enhanced salt tolerance of tomatoes by exogenous salicylic acid applied through rooting medium. OMICS 16 (4): 200-207.

Waziri. H.M.A. (2015). Plants as Antiviral Agents. Journal of Plant Pathology and Microbiology 6 (2): 254-259.

The effect of the aquatic and alcoholic extracts of bipod nettle weed on the growth and some biochemical features of tomato plant under the greenhouse condition

E. Ryazi[1], F. Rakhshandehroo[2]*, V. Abdossi[3]

Received: 2021.8.6
Accepted:2021.9.4

Abstract

In this research, the effects of bipod nettle aquatic and alcoholic extracts on the growth and some biochemical parameters of the tomato plant, Superchef cultivar, were investigated under the greenhouse condition. For this purpose, aquatic and alcoholic extracts are prepared from dried stems and leaves of the nettle weed plant. Tomato seedlings were treated by direct injection of the extracts into the soil rhizosphere medium at the defined concentrations of 100,300 and 500 ppm. The growth and some biochemical parameters in treated tomato plants were assessed 3, 6, 9, and 14 days after treatment. The expression level of the SlHK4-Cytokinin inducer gene was also evaluated 14 days after the treatment using RT-sqPCR assay. Results showed that aquatic and alcoholic extracts of the nettle plants at the concentration of 500ppm significantly increased the relative growth rate, chlorophyll a and b concentrations, total phenol content, the specific activities of peroxidase (POX) and polyphenol oxidase (PPO) as well as the expression level of SlHK4-Cytokinin inducer gene in treated tomato plants. The results of this study can be used as an applicable method to improve the growth of the tomato plant under greenhouse condition.

Keywords: Gene expression, Nettle, Peroxidase enzyme, Polyphenol oxidase enzyme, Total phenol

---

1 MS.c graduated, Department of Horticulture, College of Agricultural Sciences and Food Industries, Science and Research Branch, Islamic Azad university, Tehran, Iran,
2 Assocaite Professor, Department of Plant Protection, College of Agricultural Sciences and Food Industries, Science and Research Branch, Islamic Azad university, Tehran, Iran,(*corresponding Author: akhshandehroo_fa@srbiau.ac.ir)
3 Assistant Professor, Department of Horticulture, College of Agricultural Sciences and Food Industries, Science and Research Branch, Islamic Azad university, Tehran, Iran