Iranian Journal of Field Crop Science
Vol 52, No 3, Autumn 2021 (219-233)
DOI: 10.22059/IJFCS.2020.302070.654719

علوم گیاهان زراعی ایران
دورهٔ ۵۲، شمارهٔ ۳، پائیز ۱۴۰۰ (ص۲۳۳-۲۱۹)

بررسی اثرات ۲۴-اپی‌براسینواستروئید بر برخی از خصوصیات گیاه شنبلیله (*Trigonella foenum-graecum* L.) تحت شرایط تنش دمای بالا

شهلا شیخی[۱]، امین ابراهیمی[۲]، پرویز حیدری[۲]، محمد رضا عامریان[۳*]، امیر مرادی سرابشلی[٤]

۱و۲و۳- به‌ترتیب کارشناسی ارشد، استادیار و دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود،

٤- دکتری، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری.

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۲/۱٦ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۵/۱٤)

چکیده

هدف از این مطالعه، بررسی تأثیر ۲٤-اپی‌براسینواستروئید بر برخی خصوصیات فیزیولوژیک شنبلیله تحت تنش دمای بالا بود. تیمارهای این آزمایش شامل سطوح مختلف ۲٤-اپی‌براسینواستروئید (صفر، دو، پنج و ۱۰ ppm)، بازه‌های زمانی شش و ۲٤ ساعت (پس از اعمال تنش دمایی و یا کاربرد ۲٤-اپی‌براسینواستروئید) و شرایط دمایی (۲۳ درجه سانتی‌گراد و تنش دمای ٤۲ درجه سانتی‌گراد) بودند. نتایج این پژوهش نشان داد که تنش دمای بالا، منجر به کاهش محتوای کلروفیل *a*، *b* و کلروفیل کل، کاروتنوئید و افزایش محتوای مالون‌دی‌آلدهید و درصد نشت الکترولیت شد و کاربرد ۲٤-اپی‌براسینواستروئید در طول تنش به‌صورت قابل توجهی مانع از کاهش محتوی رنگیزه و افزایش نشت الکترولیت شد. کاربرد سطوح مختلف ۲٤-اپی‌براسینواستروئید در دماهای بالا، محتوای مالون‌دی‌آلدهید را کاهش و تحمل شنبلیله را افزایش داد که این افزایش تحمل به دلیل کاهش پراکسیداسیون اسید غیرچرب بود. فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز در شرایط تنش افزایش یافت و سطوح مختلف ۲٤-اپی‌براسینواستروئید منجر به افزایش بیشتر فعالیت این آنزیم-ها تحت شرایط تنش شد. در این پژوهش ۲٤-اپی‌براسینواستروئید باعث تحریک سیستم دفاعی گیاه (تحریک بیان ژن‌های دخیل در سازوکارهای دفاعی) و در نتیجه افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (آسکوربات پراکسیداز، کاتالاز و گایاکول پراکسیداز) شد. در مجموع نتایج این تحقیق نشان داد که ۲٤-اپی‌براسینواستروئید، فعالیت ژن‌های دخیل در فتوسنتز و ژن‌های درگیر در سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی گیاه شنبلیله را تحریک می‌کند و با کاهش تنش اکسیداتیو، تحمل شنبلیه را نسبت به تنش دمایی بالا افزایش می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، براسینواستروئید، شنبلیله، محتوای مالون‌دی‌آلدهید، محتوای کلروفیل، دایوسجنین.

Evaluation of 24-Epi-brassinosteroid effects on some properties of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum L.*) under high temperature stress

Shahla Sheikhi[1], Amin Ebrahimi[2], Parviz Heidari[2], Mohamad Reza Amerian*[3], Amir Moradi Sarabsheli[4]

1,2,3. Department of Agriculture and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Shahrood University of Technology, Iran. 4. Department of Agriculture and Plant Breeding, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, Iran.

(Received: May 5, 2020 - Accepted: August 4, 2020)

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the effect of 24-epi-brassinosteroid on some of the physiological properties of fenugreek under high temperature stress. The treatments consisted of 24-epi-brassinosteroid (2, 5 and 10 ppm), different harvest times (6 and 24 h) and high temperature stress (42° C). Results showed that high temperature stress reduced chlorophyll a, b and total chlorophyll and carotenoid contents and increased malondialdehyde content and electrolyte leakage. 24-epi-brassinosteroid treatment during stress significantly prevented carotenoid, chlorophyll a, b and total chlorophyll contents to be deceased. Applying different levels of 24-epi-brassinosteroid (2 and 5 ppm) at high temperatures decreased malondialdehyde and increased fenugreek tolerance, due to the reduced non-fatty acid peroxidation. The activity of catalase, guaiacol peroxidase and ascorbate peroxidase enzymes enhanced in stress condition and application of 2 and 5 ppm 24-epi-brassinosteroid resulted in further increase of these enzymes activity. The application of 24-epi-brassinosteroid resulted in increased defense gene activity and enhanced content of antioxidant enzymes including ascorbate peroxidase, catalase and guaiacol peroxidase by stimulating the plant defense system. Overall, the results of this study showed that 24-epi-brassinosteroid stimulates the activity of genes involved in either photosynthesis or the antioxidant defense system of fenugreek, and fenugreek tolerance to high temperature stress increased, by reducing oxidative stress.

Keywords: Antioxidant enzymes, brassinosteroid, chlorophyll contents, diosgenin, fenugreek, malondialdehyde.

* Corresponding author E-mail: Amerian@shahroodut.ac.ir

مقدمه

شنبلیله با نام علمی *Trigonella foenum-graecum* گیاهی دو لپه، متعلق به راسته گل سرخ[1] تیره نخود[2] و جنس *Trigonella* است (Srinivasan, 2006). این گیاه دارای خاصیت ضد کلسترول و کاهنده قند خون، ضد التهاب، سرطان و نفخ، ملین، تب‌بر و انگل‌کش می‌باشد (Mehrafarin *et al.*, 2011). مهم‌ترین خاصیت دارویی این گیاه به‌علت وجود ماده موثره دایوسجنین است (Joanna Ciura *et al.*, 2015). دایوسجنین برای اولین بار در سال ۱۹۳۶، از گیاه *Dioscorea tokoro* ژاپنی جداسازی شد (Fujii & Matsukawa,1936) و در درمان بیماری‌های متابولیکی مانند چاقی، دیابت، کلسترول و چربی خون بالا، التهاب و سرطان موثر می‌باشد (Upadhyay *et al.*, 2014).

گیاهان پاسخ‌های فیزیولوژیکی، مورفولوژیکی و مولکولی متفاوتی نسبت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی از خود نشان می‌دهند (Patel *et al.*, 2013)، به‌طوری‌که برای حفاظت از خود در برابر تنش‌ها، از سیستم‌های پاکسازی‌کننده رادیکال‌های آزاد شامل آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (سوپراکسید دیسموتاز، پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز) و همچنین ترکیبات غیرآنزیمی (کاروتنوئیدها و اسید آسکوربیک) استفاده می‌کنند (Hussain *et al.*, 2012). تنش‌های محیطی منجر به کاهش رشد و عملکرد گیاهان زراعی می‌شوند؛ بنابراین شناسایی و بررسی پاسخ و سازوکارهای دفاعی گیاهان نسبت به تنش‌های محیطی، در تولید و اصلاح گیاهان زراعی ضروری می‌باشد (Des Marais, 2013). تنش دمایی منجر به ایجاد تغییراتی در بیان ژن‌های درگیر در محافظت از تنش می‌شود. این ژن‌ها، مسئول بیان اسموپروتئین‌ها، آنزیم‌های سم‌زدا و پروتئین‌های تنظیم‌کننده هستند. اخیرا، کاربرد خارجی ترکیبات محافظت‌کننده از قبیل اسموپروتئین‌ها (Morgutti *et al.*, 2019; Estaji *et al.*, 2019; Annunziata *et al.*, 2019)، فیتوهورمون‌ها (Sharma, 2019; Sytar *et al.*, 2019)، مولکول‌های پیام‌رسان (نیتریک اکسید)، پلی آمین‌ها (El Amrani *et al.*, 2019; Xu *et al.*, 2019) در مقابله با آسیب ناشی از تنش در گیاهان گزارش شده است.

براسینواستروئیدها، گروهی از هورمون‌های استروئیدی هستند که در بسیاری از فرآیندهای نموی در گیاهان از قبیل تقسیم و رشد طولی و سلولی ساقه و ریشه، اندام‌زایی، پیری برگ و پاسخ به تنش‌ها نقش دارند. نقش براسینواستروئیدها در رشد و نمو کالوس و جنین در بسیاری از گیاهان به اثبات رسیده است. همچنین وجود آثار متقابل این هورمون با اکسین و جیبرلین در بسیاری از آزمایش‌ها مشاهده شده است (Hasanuzzaman *et al.*, 2013).

در یک پژوهش، عکس العمل آرابیدوپسیس در مواجهه با عنصر شیمیایی آنتیموان[3] در تیمار با اپی براسینواستروئید بررسی شد. نتایج نشان داد که کاربرد اپی‌براسینواستروئید (10^{-4} تا 10^{-1} میکرومول) منجر به افزایش محتوای پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، پرولین و افزایش طول ریشه می‌شود. در ضمن محتوای مالون‌دی‌آلدهید در نمونه‌های تیمار شده با اپی‌براسینواستروئید کاهش یافت. آن‌ها نتیجه گرفتند که کاربرد اپی‌براسینواستروئید می‌تواند بیان ژن‌های درگیر در مسیر تولید آنتی‌اکسیدان‌ها را افزایش دهد و به‌عنوان یک محرک مناسب جهت بهبود تحمل گیاه به سمیت ناشی از غلظت عناصر شیمیایی موجود در خاک مؤثر باشد (Wu *et al.*, 2019).

نتایج یک تحقیق نشان داد که مقادیر مختلف عنصر روی، دارای اثرات سمی بر گیاه *Raphanus sativus* هستند و منجر به کاهش محتوای کلروفیل *a*، *b* و کاروتنوئید می‌شوند. کاربرد سطوح متفاوت براسینواستروئید (نیم، یک و دو میکرومول)، از تجزیه کلروفیل *a*، *b* و کاروتنوئید جلوگیری کرد و به‌صورت موثری این صفات را افزایش داد (Ramakrishna *et al.*, 2015). نتایج یک پژوهش نشان داد که تنش

[1] - *Rosase*
[2] - *Legouminosae*
[3]- Antimony

شوری به‌صورت معنی‌داری منجر به کاهش محتوای کلروفیل *a*، *b*، کاروتنوئید، نسبت کلروفیل *a* به *b* و نسبت کلروفیل کل به کاروتنوئید در گیاه *Eucalyptus urophylla* شد. در این تحقیق، کاربرد سطوح متفاوت براسینواستروئید به‌صورت اسپری‌پاشی از تجزیه این صفات جلوگیری کرد و منجر به افزایش نرخ فتوسنتز و تحمل گیاه نسبت به تنش شوری شد (De oliveira *et al*., 2018).

شنبلیله با طبیعت گرم و خشک، به علت زمستانه بودن نسبت به دمای پایین مقاوم است. این گیاه در طول فصل رویش به هوای نسبتا گرم و معتدل نیاز دارد؛ اگرچه وقوع دمای بالا (بالاتر از ۳۵ درجه سانتی‌گراد) به این گیاه آسیب می‌رساند (Pant *et al*., 2013; Osman *et al*., 2015; Lamaouie *et al*., 2018). با توجه به اهمیت گیاه شنبلیه به‌عنوان یک گیاه دارویی مهم و حساسیت این گیاه دارویی نسبت به تنش دمای بالا، این تحقیق با هدف بررسی آثار هورمون ۲۴-اپی‌براسینواستروئید بر برخی از خصوصیات فیزیولوژیک شنبلیله تحت تنش دمای بالا انجام شد. نتایج حاصل از این تحقیق می‌تواند در شناخت سازوکارهای فیزیولوژیکی گیاه شنبلیله و نحوه تاثیرگذاری ۲۴-اپی‌براسینواستروئید بر افزایش تحمل گیاه شنبلیله در برنامه‌های اصلاحی آینده مفید باشد.

مواد و روش‌ها

به‌منظور بررسی اثرات ۲۴-اپی‌براسینواستروئید بر برخی ویژگی‌های فیزیولوژیکی شنبلیله، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار انجام شد. تیمارهای این آزمایش شامل هورمون ۲۴-اپی‌براسینواستروئید در چهار سطح صفر،دو، پنج و ۱۰ ppm (Cao & Hua, 2008; Kurepin *et a*l., 2008; Aghdam & Mohammadkhani, 2014) و دو شرایط دمایی ۴۲ درجه سانتی‌گراد (تنش دمای بالا) و ۲۳ درجه سانتی‌گراد (دمای نرمال) و دو بازه زمانی شش و ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش بودند. در این آزمایش، ابتدا بذور گیاه شنبلیله (رقم همدان) ضدعفونی شدند و پس از کاشت در گلدان‌های ۲۰ سانتی‌متری با ترکیب پیت ماس و پرلیت، در اتاقک رشد با دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی قرار گرفتند. گیاهان پنج هفته‌ای با سه سطح هورمون ۲۴-اپی-براسینواستروئید اسپری‌پاشی شدند. نیمی از گلدان‌ها در شرایط نرمال و نیمی دیگر به اتاقک رشد به‌منظور اعمال تنش گرمایی منتقل شدند. سپس در زمان‌های شش و ۲۴ ساعت پس از تنش دمای بالا، از برگ‌های گیاه نمونه‌برداری شد و بلافاصله نمونه‌ها در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند.

اندازه گیری محتوای کلروفیل و کاروتنوئید

برای این منظور، میزان جذب با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و در طول موج‌های ۴۸۰، ۵۱۰، ۶۴۵ و ۶۶۳ نانومتر تعیین شد و محتوای کلروفیل *a*، *b*، مجموع آن‌ها و کاروتنوئید بر اساس روش (Arnon, 1967) محاسبه شدند.

قابلیت هدایت الکتریکی غشای پلاسمایی (نشت الکترولیت)

قابلیت هدایت الکترولیتی نمونه‌ها بر اساس روش Popov *et al*. (2005) تعیین شد. برای این منظور و با استفاده از دستگاه پانچ، دیسک‌هایی از برگ‌ها تهیه شد و به لوله‌های آزمایش حاوی ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر منتقل شدند. به‌منظور جذب بهتر آب، از پمپ خلا استفاده شد و سپس لوله‌های آزمایش به مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه شیکر قرار گرفتند و درصد هدایت الکترولیتی نمونه‌ها (EC1) با استفاده از دستگاه EC متر اندازه‌گیری شد. در مرحله بعد، لوله‌های آزمایش در حمام آب گرم قرار گرفتند و به مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه شیکر به خوبی همزده شدند و در نهایت درصد هدایت الکترولیتی نمونه‌ها (EC2) تعیین شد. مقدار شاخص خسارت بر اساس معادله یک محاسبه شد:

$$I = \frac{Ec_1}{Ec_2} \times 100$$

معادله ۱

محتوای مالون‌دی‌آلدهید

میزان اکسیداسیون گیاهچه‌ها براساس تجمع مالون

دی‌آلدهید (MDA[1]) برگ و با استفاده از محلول تیوباربیتوریک اسید (TBA)[2] تعیین شد. برای این منظور، میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۳۲ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شدند و محتوای مالون‌دی‌آلدهید بر اساس معادله ۲ محاسبه شد (Health & Packer., 1968):

معادله ۲ $M= A/B$

در این معادله، A: عدد قرائت شده و B: ضریب تمایز مولار (مول/سانتی‌متر $^{-5}$ ۱۰×۱/۵۶) است.

پروتئین کل و سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

نمونه‌های برگی با استفاده از ازت مایع به خوبی پودر شدند و ۰/۲۵ گرم از پودر حاصل به فالکون‌های ۱۵ میلی‌لیتری منتقل شدند و ۲/۵ میلی‌لیتر بافر استخراج به آن‌ها افزوده شد. پس از ورتکس نمونه همراه با بافر استخراج، نمونه‌ها به مدت ۱۵دقیقه با سرعت ۱۵۰۰×g در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند و از مایع رویی برای قرائت محتوای پروتئین کل و سنجش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز (CAT)، گایاکول پراکسیداز (GPX)، آسکوربات پراکسیداز (APX) استفاده شد. فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۴۰ نانومتر و با روش Aebi (1983) اندازه‌گیری شد. برای این منظور، ۳۰۰۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم (pH =۷) ۵۰ میلی‌مولار، پنج میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۳/۴۱ مولار و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیم با یکدیگر ترکیب شدند و فعالیت آنزیم به مدت پنج دقیقه (در فواصل زمانی ۲۰ ثانیه‌ای) ثبت شد. فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPX) با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۷۰ نانومتر و با روش Dionisio-Sese and Tobita (1988) اندازه گیری شد. برای این منظور، ۳۰۰۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم (pH =۷) ۵۰ میلی‌مولار، پنج میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۳/۴۱ مولار، سه میکرولیتر محلول گایاکول[3] ۲۰۰ میلی مولار و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیم با یکدیگر ترکیب شدند. فعالیت آنزیم با فاز تاخیری ۶۰ ثانیه‌ای، به مدت پنج دقیقه و در فواصل زمانی ۲۰ ثانیه‌ای ثبت شد. فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) با استفاده از روش Ranieri et al (2000) اندازه‌گیری شد و در طول موج ۲۹۰ نانومتر نمونه‌ها قرائت شد. مخلوط واکنش حاوی ۵۰۰ میکرولیتر از EDTA ۰/۱ میلی مولار، ۲۱۰۰ میکرولیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH=۷، ۳۵۰ میکرولیتر آسکوربیک اسید ۰/۵ میلی‌مولار، پنج میکرولیتر H_2O_2 ۳۰ درصد و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. سنجش فعالیت آنزیم در طول پنج دقیقه ثبت شد.

آنالیز داده‌ها

آنالیز داده‌ها به صورت آزمایش فاکتوریل و در قالب طرح کاملا تصادفی با استفاده از نرم‌افزار R، رسم نمودار با استفاده از اکسل ۲۰۱۳ و مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال یک درصد انجام شد.

نتایج و بحث

محتوای کلروفیل و کاروتنوئید

نتایج تجزیه واریانس صفات مطالعه شده در این تحقیق در جدول ۱ آمده است. داده‌های حاصل از این پژوهش با استفاده از آزمایش فاکتوریل و بر پایه طرح کاملا تصادفی و با سه تکرار آنالیز شد. نتایج مقایسه میانگین اثر سه‌گانه دما (۲۳ و ۴۲ درجه سانتی‌گراد)، زمان (شش و ۲۴ ساعت) و غلظت‌های مختلف ۲۴-اپی‌براسینواستروئید بر محتوای کلروفیل *a* در شکل ۱A آمده است. در این آزمایش، تیمار دمای نرمال (۲۳ درجه سانتی‌گراد) و عدم کاربرد ۲۴-اپی-براسینواستروئید (سطح صفر) به‌عنوان تیمار شاهد در نظر گرفته شد و بیشتر مقایسات بر مبنای همین تیمار انجام شد. محتوای کلروفیل *a* پس از اعمال تنش دمای بالا (۴۲ درجه سانتی‌گراد و بدون کاربرد ۲۴-اپی‌براسینواستروئید) نسبت به شرایط دمای نرمال (۲۳ درجه سانتی‌گراد) و بدون کاربرد ۲۴-اپی براسینواستروئید، به‌صورت معنی‌داری کاهش یافت. محتوای کلروفیل *a* در تنش دمای بالا (۴۲ درجه سانتی‌گراد) و با کاربرد سطوح مختلف هورمون ۲۴-

[1]- Malondialdeide
[2] - Thiobarbituric acid
[3] - Guaiacol

اپی‌براسینواستروئید نسبت به همین شرایط دمایی و عدم کاربرد ۲۴-اپی براسینواستروئید در هر دو زمان برداشت (شش و ۲۴ ساعت) به‌صورت معنی‌داری افزایش یافت. بیشترین محتوای کلروفیل *a* در شرایط دمای بالا و در زمان شش ساعت پس از اعمال تنش (غلظت پنج ppm) و همچنین در زمان ۲۴ ساعت (غلظت دو ppm) مشاهده شد که با تیمار عدم کاربرد ۲۴-اپی‌براسینواستروئید اختلاف معنی داری داشتند.

جدول ۱- تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه در گیاه شنبلیله تحت تنش دمای بالا.

Table 1. Variance analysis of the studied traits of fenugreek under high temperature stress

Sources of variances	Degrees of freedom	Chlorophyll *a*	Chlorophyll *b*	Total chlorophyll	Carotenoid	Malondialdehyde	Electrolyte leakage	Total protein	Catalase	Ascorbate peroxidase	Guaiacol peroxidase
		Mean of Squares									
Temperature (T)	1	28.81**	0.003^{ns}	26.742**	26.74**	50.14**	94.9**	10916**	5.61**	3.567**	2.67**
Concentration (C)	3	5.11**	23.20**	10.865**	10.865**	3.02	724.4**	6437**	9.352**	0. 86**	3.67**
Time (Ti)	1	3.78**	1.49^{ns}	10.01**	10.026**	36.33**	536.7**	1543*	5.353**	0.084**	0.024^{ns}
T*C	3	7.13**	3.02**	3.239**	3.239**	5.21**	646.09**	3147**	1.27**	0.13**	0.8270**
T*Ti	1	0.073^{ns}	1.07^{ns}	0.574^{ns}	0.594^{ns}	7.08**	399.6**	615**	0. 91**	0.032**	0.1280^{ns}
C*Ti		1.70*	3.24**	9.46**	9.14**	0.07^{ns}	752.4**	453*	0.99**	0.06**	0. 3050*
T*C*Ti	3	1.46*	3.66**	3.91**	3.305**	1.68**	65.7**	341*	.084**	0.02**	0. 33*
Error	32	0.46	0.375	0.54	0.54	0.29	6.8	95	0.025	0.0001	0.089

^{ns}، * و **: به ترتیب نشان‌دهنده عدم معنی داری و معنی داری در سطح احتمال پنج و یک درصد می باشند.

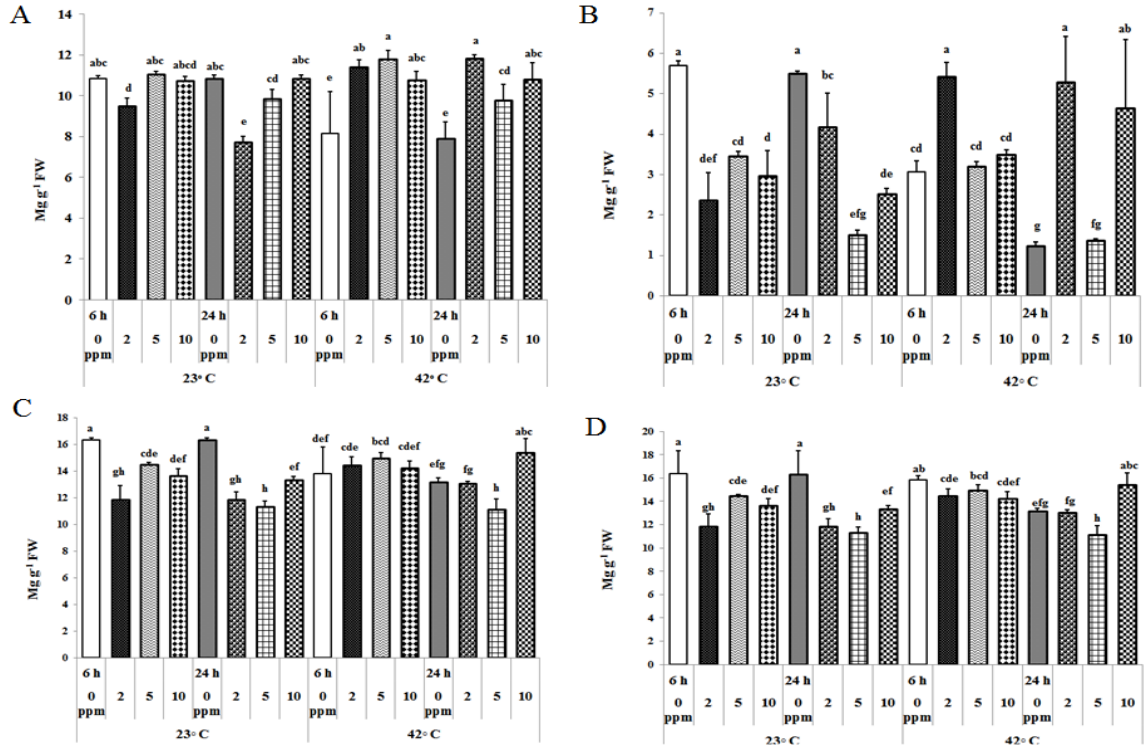
^{ns}, *, and **: non-significant and significant at the 5% and 1% of probability levels, respectively.

نتایج مقایسه میانگین آثار متقابل سه‌گانه بر محتوای کلروفیل *b* در شکل ۱ (B) نمایش داده شده است. نتایج نشان داد که محتوای کلروفیل *b* در زمان اعمال تنش دمای بالا (۴۲ درجه سانتی‌گراد، شش و ۲۴ ساعت و سطح صفر از هورمون ۲۴-اپی-براسینواستروئید) نسبت به تیمار شاهد (۲۳ درجه سانتی‌گراد و سطح صفر از هورمون ۲۴-اپی-براسینواستروئید) به‌صورت معنی‌داری کاهش یافت؛ در حقیقت محتوای کلروفیل *b* با تداوم تنش دمایی تجزیه شده است. در زمان شش ساعت پس از تنش دمای بالا و غلظت دو ppm از ۲۴-اپی-براسینواستروئید، محتوای کلرفیل *b* افزایش یافت و دارای اختلاف معنی‌داری با همین تیمار دمایی و عدم کاربرد ۲۴-اپی‌براسینواستروئید بود. محتوای کلروفیل *b* در تیمار دمای بالا (۴۲ درجه سانتی‌گراد، ۲۴ ساعت پس از تنش) با کاربرد غلظت‌های دو و ۱۰ppm نسبت به غلظت صفر ۲۴-اپی‌براسینواستروئید به‌صورت معنی‌داری افزایش یافت.

تغییرات محتوای کلروفیل کل در دما، زمان و غلظت‌های مختلف ۲۴-اپی براسینواستروئید در شکل ۱C ارایه شده است. محتوای کلروفیل کل در شرایط دمایی نرمال و ۲۴ ساعت پس از کاربرد ۲۴-اپی-براسینواستروئید، بیشتر از همین تیمار دمای در زمان شش ساعت بود؛ اگرچه این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود. اعمال تنش دمایی (۴۲درجه سانتی-گراد)، موجب کاهش محتوای کلروفیل کل در زمان-های شش و ۲۴ ساعت نسبت به تیمار دمای نرمال (۲۳ درجه سانتی‌گراد) و عدم کاربرد ۲۴-اپی-براسینواستروئید (سطح صفر) شد. محتوای کلروفیل کل در زمان ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمار دمای بالا (در غلظت ۱۰ppm از هورمون ۲۴-اپی-براسینواستروئید) بیشتر از غلظت‌های دو و پنج ppm بود.

نتایج مقایسه میانگین آثار متقابل سه‌گانه بر صفت کاروتنوئید در شکل ۱D ارایه آمده است. نتایج نشان داد که محتوای کاروتنوئید در زمان اعمال تنش دمای بالا (۴۲ درجه سانتی‌گراد، ۲۴ ساعت پس از تنش و سطح صفر از هورمون ۲۴-اپی‌براسینواستروئید) نسبت به شرایط نرمال (۲۳ درجه سانتی‌گراد و سطح صفر از هورمون ۲۴-اپی‌براسینواستروئید) کاهش یافت. محتوای کاروتنوئید با کاربرد هورمون ۲۴-اپی-براسینواستروئید در برخی سطوح در زمان اعمال تنش دمایی (۴۲ درجه سانتی‌گراد) نسبت به عدم کاربرد ۲۴-اپی‌براسینواستروئید در زمان اعمال تنش (۴۲

درجه سانتی‌گراد) کاهش معنی‌داری نداشت. کاربرد پنج و ۱۰ ppm از هورمون ۲۴-اپی‌براسینواستروئید، به‌صورت معنی‌داری از کاهش کاروتنوئید در شرایط تنش جلوگیری کرد. همچنین محتوای کاروتنوئید در تیمار دمای بالا (۴۲ درجه سانتی‌گراد، ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش و در غلظت ۱۰ ppm) نسبت به همین تیمار دمایی و عدم کاربرد ۲۴-اپی‌براسینواستروئید به‌صورت معنی داری افزایش یافت.



شکل ۱- نتایج مقایسه میانگین سه‌گانه دما، زمان و سطوح مختلف ۲۴-اپی‌براسینواستروئید بر محتوای کلروفیل *a* (A)، *b* (B)، کل (C) و کاروتنوئید (D). مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال یک درصد انجام شد. ستون‌هایی با حروف مشابه، دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نیستند).

Figure 1. Triple mean comparison of temperature, time and different levels of 24-Epi-brassinosteroid on chlorophyll *a* (A), chlorophyll *b* (B), total chlorophyll (C) and carotenoid content(D). Mean comparison was done based on Duncan test at 1% of probability level. Columns with the similar letters are not significantly different.

در تحقیق حاضر محتوای کلروفیل *a* در اثر تنش دمای بالا نسبت به شرایط نرمال، به‌صورت معنی‌داری کاهش یافت. اگرچه تداوم تنش از شش ساعت به ۲۴ ساعت منجر به کاهش کلرفیل *a* شد، اما این کاهش چندان معنی‌دار نبود. همچنین در این پژوهش، محتوای کلروفیل *b* در شرایط تنش دمای بالا نسبت به شرایط نرمال کاهش یافت و تداوم تنش از شش به ۲۴ ساعت منجر به کاهش معنی‌داری در محتوای کلرفیل *b* شد. در حقیقت گذشت زمان در شرایط تنش دمای بالا (از شش ساعت به ۲۴ ساعت) منجر به عدم سنتز و یا تجزیه کلروفیل *b* شده است. نتایج تحقیقات مختلف نشان داده است که با افزایش شدت تنش، محتوای رنگدانه‌ها نیز کاهش می‌یابند و احتمال کاهش در کلروفیل *b* در مقایسه با کلروفیل *a* محتمل‌تر است (Kaya, *et al.*, 2001).

در این پژوهش، محتوای کلروفیل *b* با شدت بیشتری نسبت به کلروفیل *a* و با گذشت مدت زمان تنش، کاهش یافت، زیرا در اثر تنش، کمپلکس پروتئینی جذب کننده نور (chl *a/b*) در فتوسیستم II تحت تاثیر قرار گرفته است و آسیب می‌بینند. از آن‌جا که بخش کلروفیل *b* این کمپلکس پروتئینی در درون غشای کلروپلاست قرار دارد، با افزایش تشکیل

گونه‌های فعال اکسیژن در کلروپلاست در اثر شرایط تنش، تخریب غشاهای کلروپلاست نیز افزایش می‌یابد و از این رو در اثر تنش، تخریب کمپلکس پروتئینی chl *a/b* و در نتیجه تخریب کلروفیل *b* نیز افزایش می‌یابد (Kaya, *et al.*, 2001). با توجه به این‌که کلروفیل کل از مجموع دو کلروفیل *a* و *b* تشکیل می‌شود، در این پژوهش محتوای کلروفیل کل با شروع شرایط تنش کاهش یافت و این کاهش با گذشت زمان (از شش ساعت به ۲۴ ساعت) محسوس‌تر بود. یکی از دلایل کاهش محتوای کلروفیل، احتمالا افزایش فعالیت آنزیم کلروفیلاز است (Kaya *et al.*, 2001). از دلایل دیگر کاهش غلظت کلروفیل، می‌توان به مشترک بودن مسیر بیوسنتزی کلروفیل و آلفا توکوفرول اشاره کرد. در حقیقت در شرایط تنش، گیاه با متوقف کردن مسیر بیوسنتزی کلروفیل، مسیر بیوسنتزی آنتی‌اکسیدان آلفاتوکوفرول را فعال می‌نماید. همچنین تغییر در مسیر متابولیسم نیتروژن، به علت ساخت ترکیب‌هایی مانند پرولین، دلیل مهمی دیگری است (Kaya *et al.*, 2001). از آن‌جا که گلوتامین، پیش ماده مشترک ساخت کلروفیل و پرولین است، این پیش ماده در شرایط تنش کمتر در مسیر ساخت کلروفیل شرکت می‌کند و بیشتر به سمت تولید پرولین گرایش دارد (Mahajan & Tuteja, 2005).

در تحقیق حاضر، قرار گرفتن طولانی مدت (۲۴ ساعت) در معرض تنش دمای بالا، منجر به کاهش محتوای کاروتنوئید شد. در شرایط کوتاه مدت تنش دمایی (شش ساعت)، محتوای کاروتنوئید کاهش معنی‌داری نداشت. در این شرایط، عدم تغییر محتوای معنی‌دار کاروتنوئید، موجب حفاظت گیاه در برابر شرایط تنش می‌شود و احتمالا گیاه با شرایط تنش مقابله کرده است. اما مدت زمان طولانی تنش (۲۴ ساعت)، موجب تخریب کاروتنوئید شده است و احتمالاً گیاه از طریق مسیرهای آنتی اکسیدانی، شرایط تنش را تحمل کرده است. یکی از مهم‌ترین وظایف کاروتنوئیدها، جلوگیری از آسیب اکسیداتیو می‌باشد که این عمل را با تعدیل سریع وضعیت برانگیخته کلروفیل و حفاظت نوری انجام می‌دهند. در شرایط تنش، مقدار کاروتنوئید کاهش می‌یابد و بنابراین کارتنوئید قادر به ایفای نقش حفاظتی خود نمی‌باشد؛ اگرچه کاهش آن‌ها نسبت به کلروفیل‌ها کمتر است (Wang *et al.*, 2010). کاهش در محتوای کاروتنوئید در شنبلیه تحت تنش دمای بالا، احتمالا به علت اکسیداسیون توسط گونه‌های فعال اکسیژن و تخریب ساختار آن‌ها روی داده است.

در این پژوهش، اعمال تیمار ۲۴-اپی‌براسینواستروئید در شرایط تنش دمایی بالا، موجب افزایش محتوای کلروفیل و کاروتنوئید شد. ۲۴-اپی‌براسینواستروئیدها، موجب بهبود خصوصیات کمی گیاهان می‌شوند (Vardhini & Anju, 2015) و با بهبود فعالیت سیستم آنتی اکسیدانی، گیاه را در برابر تنش محافظت می‌کنند (Arora *et al.*, 2010). در این پژوهش، کاربرد هورمون براسینواسترئید در شرایط تنش دمای بالا و در زمان ۲۴ ساعت، موجب افزایش محتوای کاروتنوئید شد. اپی‌براسینواستروئیدها با افزایش فعالیت آکواپورین‌ها (Morillon *et al.*, 2001) و پمپ پروتونی، نقش مهمی را در برقراری فشار اسمزی و تداوم توسعه اندامک‌ها ایفا می‌نمایند و بدین ترتیب موجب افزایش تحمل گیاهان به تنش می‌شوند. همچنین براسینواستروئیدها، پایداری غشاء را در برابر آسیب‌های ناشی از تنش‌های غیرزیستی افزایش می‌دهند. نتایج این تحقیق ثابت کرد که ۲۴-اپی-براسینواستروئید به‌صورت قابل توجهی آثار تنش بر روی شنبلیه را کاهش می‌دهد و موجب افزایش محتوای رنگدانه می‌شود. یکی از دلایل اثر تیمار ۲۴-اپی‌براسینواستروئید در افزایش رنگیزه‌های فتوسنتزی و کاروتنوئیدها، به احتمال زیاد مربوط به افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی است که تحت تاثیر این تیمارها فعال شدند و از تخریب و یا تجزیه رنگدانه‌ها جلوگیری کردند (Hayat *et al.*, 2010). در یک بررسی (Ramakrishna & Rao, 2015) مشخص شد که اثرات سمیت عنصر روی در گیاه *Raphanus Sativus* می‌تواند منجر به تجزیه کلروفیل *a*، *b*، کل و کاروتنوئید شود و کاربرد براسینواستروئید منجر به افزایش محتوای کلروفیل و کاروتنوئید شد. همچنین نتایج تحقیق De Olivera *et*

al. (2019) ثابت کرد که تنش شوری منجر به کاهش محتوای کلروفیل *a*، *b* و کاروتنوئید در گیاه *Eucalyptus urophylla* می‌شود. در مجموع نتایج این محققان نشان داد که براسینواستروئید به‌صورت موثری از تخریب کلروفیل و کاروتنوئید جلوگیری می‌کند و از این طریق منجر به افزایش مقاومت گیاه تحت شرایط تنش می‌شود.

درصد نشت الکترولیت و محتوای مالون‌دی‌آلدهید

درصد نشت الکترولیت تحت شرایط تنش دمای بالا در شنبلیله افزایش یافت (شکل ۲A). در تیمار تنش دمای بالا (۴۲ درجه سانتی‌گراد، بدون کاربرد ۲۴-اپی‌براسینواستروئید و۲۴ ساعت پس از اعمال تنش دمایی)، درصد نشت الکترولیت در مقایسه با سایر تیمارها به بالاترین مقدار خود رسید. همچنین مقدار این صفت در همین تیمار دمایی و شش ساعت پس از اعمال تنش نسبت به شرایط نرمال دمایی (۲۳ درجه سانتی‌گراد و بدون کاربرد ۲۴-اپی‌براسینواستروئید) افزایش معنی‌داری داشت. در حقیقت کاربرد سطوح مختلف ۲۴-اپی‌براسینواستروئید در زمان اعمال تنش دمای بالا و در هر دو زمان شش و ۲۴ ساعت، به‌صورت معنی‌داری درصد نشت الکترولیت را نسبت به شرایط عدم کاربرد ۲۴-اپی‌براسینواستروئید کاهش داد. سطوح دو و پنج ppm از ۲۴-اپی‌براسینواستروئید در زمان شش ساعت پس از اعمال تنش دمای بالا، به‌صورت موثری درصد نشت الکترولیت را نسبت به همین تیمار دمایی (بدون کاربرد ۲۴-اپی‌براسینواستروئید) کاهش دادند؛ بدین معنی که کاربرد این هورمون در شرایط تنش دمایی به‌صورت موثری از افزایش این صفت جلوگیری کرد. همچنین کاربرد سطوح مختلف این هورمون، به‌صورت معنی‌داری درصد نشت الکترولیت را در تیمار دمای بالا (۲۴ ساعت پس از تنش) نسبت به عدم کاربرد ۲۴-اپی‌براسینواستروئید کاهش دادند.

محتوای مالون‌دی‌آلدهید (شکل ۲B) در تنش دمای بالا در شنبلیله، به‌صورت معنی‌داری افزایش یافت. در تیمار تنش دمای بالا (۴۲ درجه سانتی‌گراد، بدون کاربرد ۲۴-اپی‌براسینواستروئید و ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش)، محتوای مالون‌دی‌آلدهید در مقایسه با سایر تیمارها به بالاترین میزان خود رسید. همچنین محتوای این صفت در تیمار شش ساعت پس از اعمال تنش دمایی نسبت به شرایط نرمال دمایی (۲۳ درجه سانتی‌گراد و بدون کاربرد ۲۴-اپی‌براسینواستروئید) افزایش معنی‌داری داشت. کاربرد سطوح مختلف ۲۴-اپی‌براسینواستروئید در زمان اعمال تنش دمای بالا و در هر دو زمان شش و ۲۴ ساعت، به‌صورت معنی‌داری محتوای مالون‌دی‌آلدهید را نسبت به همین شرایط دمایی و عدم کاربرد ۲۴-اپی براسینواستروئید کاهش داد. در حقیقت سطح دو ppm از ۲۴-اپی براسینواستروئید در زمان شش ساعت پس از اعمال تنش دمایی بالا، به‌صورت موثری از افزایش این صفت در مقایسه با تیمار دمایی بالا و عدم کاربرد این هورمون جلوگیری کرد. همچنین تمامی سطوح ۲۴-اپی‌براسینواستروئید به‌صورت موثری محتوای مالون‌دی‌آلدهید و در نتیجه آسیب‌پذیری گیاه نسبت به تنش دمایی را کاهش دادند. در حقیقت کاربرد تمامی سطوح ۲۴-اپی‌براسینواستروئید در زمان اعمال تنش دمای بالا و زمان برداشت ۲۴ ساعت، به‌صورت معنی‌داری مانع از افزایش پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی شدند.

در این تحقیق، تنش دمای بالا منجر به افزایش درصد نشت الکترولیت و محتوای مالون‌دی‌آلدهید شد. در حقیقت تنش دمای بالا، موجب افزایش آسیب به غشاء سلول شد و در نتیجه محتوایات درونی سلول به خارج از سلول هدایت شدند. کاربرد ۲۴-اپی‌براسینواستروئید موجب کاهش درصد نشت الکترولیت و محتوای مالون‌دی‌آلدهید نسبت به شرایط تنش دمای بالا (بدون کاربرد ۲۴-اپی‌براسینواستروئید) شد. گزارشاتی مبنی بر تاثیر اپی‌براسینواستروئید در کاهش محتوای مالون‌دی‌آلدهید و نشت الکترولیت به دلیل حفظ لیپیدهای غشاء از خسارت حاصل از گونه های فعال اکسیژن وجود دارد (Wu *et al.*, 2019).

نتایج این تحقیق ثابت کرد که ۲۴-اپی‌براسینواستروئیدها، محتوای مالون‌دی‌آلدهید حاصل از

پراکسیداسیون لیپیدهای غشا را کاهش می‌دهند؛ بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که این هورمون بر روی ترکیب اسیدهای چرب و نفوذپذیری غشا اثر می‌گذارند و دارای آثار مثبتی بر تجمع مواد محلول هستند (Aghdam *et al.*, 2012). بنابراین در این تحقیق، کاهش درصد نشت الکترولیت و محتوای مالون‌دی‌آلدهید در نتیجه کاربرد ۲۴-اپی-براسینواستروئید در شرایط تنش دمایی، نشان دهنده کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و حفظ سلامت غشا تحت تنش دمای بالا است. از اثرات ۲۴-اپی-براسینواستروئیدها می‌توان به فعال کردن ژن‌های پروتئین‌های شوک حرارتی اشاره کرد که با تولید آنزیم‌های محافظتی، مولکول‌های زیستی و سلول‌ها را در مقابل شرایط نامساعد محافظت می‌کنند (Safari *et al.*, 2012).

اعمال تنش دمای بالا موجب افزایش درصد نشت الکترولیت و محتوای مالون‌دی‌آلدهید شد. قرار گرفتن طولانی مدت در معرض تنش دمای بالا (۲۴ ساعت)، درصد نشت الکترولیت و محتوای مالون‌دی‌آلدهید را به مقدار بیشتری در مقایسه با زمان کوتاه مدت (شش ساعت) تنش افزایش داد. این افزایش در درصد نشت الکترولیت و محتوای مالون‌دی‌آلدهید، احتمالا نتیجه تخریب بیشتر ساختار غشا و آسیب بیشتر به گیاه می‌باشد. نتایج پژوهش De Olivera *et al.* (2019) نشان داد که محتوای مالون‌دی‌آلدهید و درصد نشت الکترولیت در *Eucalyptus urophylla* تحت شرایط تنش شوری افزایش می‌یابد، درحالی‌که کاربرد براسینواستروئید به صورت اسپری پاشی مانع از افزایش این صفات شد.

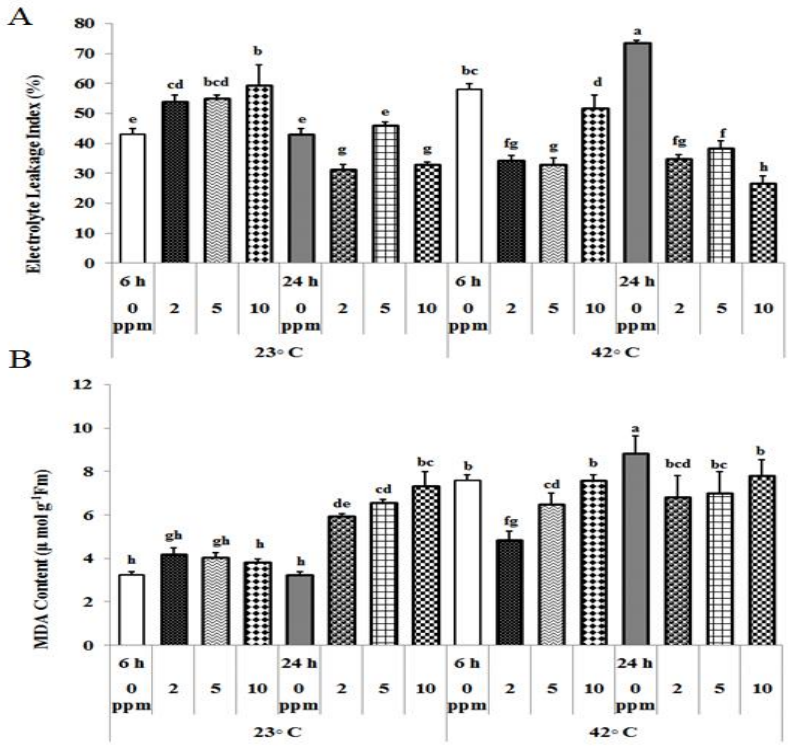
محتوای پروتئین کل و آنزیم‌های آنتی اکسیدان

نتایج مقایسه میانگین آثر متقابل دما، زمان و غلظت‌های ۲۴-اپی‌براسینواستروئید بر محتوای پروتئین کل در شکل ۳A آمده است. اعمال تنش دمایی، موجب افزایش محتوای پروتئین کل در هر دو زمان شش و ۲۴ ساعت شد؛ اگرچه محتوای آن در زمان ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش بیشتر بود. در شرایط دمایی نرمال (۲۳ درجه سانتی‌گراد و شش ساعت)، غلظت پنج ppm از ۲۴-اپی‌براسینواستروئید، موجب افزایش معنی‌دار محتوای پروتئین کل نسبت به شاهد (۲۳ درجه سانتی‌گراد و غلظت صفر) شد. بالاترین محتوای پروتئین کل در تیمار تنش بالا (غلظت دو ppm از ۲۴-اپی‌براسینواستروئید و ۲۴ ساعت پس از تنش) به‌دست آمد که با تیمار شاهد دارای اختلاف معنی‌داری بود.

روند تغییرات در تیمار دمایی نرمال و زمان ۲۴ ساعت متفاوت بود؛ به‌گونه‌ای که با افزایش غلظت ۲۴-اپی-براسینواستروئید از محتوای پروتئین کل کاسته شد. اعمال تیمار تنش دمایی به مدت ۲۴ ساعت، افزایش معنی‌داری را در محتوای پروتئین کل در مقایسه با شاهد (۲۳ درجه سانتی‌گراد و غلظت صفر) در پی داشت. در تیمار دمایی بالا (غلظت دو ppm از ۲۴-اپی‌براسینواستروئید در زمان‌های شش و ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش)، محتوای پروتئین کل نسبت به همین تیمار دمایی (زمان‌های شش و ۲۴ ساعت، بدون کاربرد ۲۴-اپی‌براسینواستروئید) به‌صورت معنی‌داری افزایش یافت، درحالی‌که محتوای پروتئین کل در غلظت‌های پنج و ppm۱۰ در تیمار دمای بالا (زمان‌های شش و ۲۴ ساعت) با همین تیمار دمایی (زمان‌های شش و ۲۴ ساعت، بدون کاربرد ۲۴-اپی-براسینواستروئید) اختلاف معنی‌داری نداشتند.

مقایسه میانگین آثار متقابل سه‌گانه بر فعالیت آسکوربات پراکسیداز در شکل ۳B (قسمت) آمده است. نتایج نشان داد که فعالیت آسکوربات پراکسیداز در زمان اعمال تنش دمای بالا (شش ساعت و ۲۴ ساعت) نسبت به شرایط نرمال (۲۳ درجه سانتی‌گراد)، به‌صورت معنی‌داری افزایش یافت. همچنین، فعالیت آسکوربات پراکسیداز با کاربرد ۲۴-اپی‌براسینواستروئید در برخی سطوح در زمان اعمال تنش دمایی نسبت به عدم کاربرد ۲۴-اپی‌براسینواستروئید در همین تیمار دمایی به‌صورت معنی‌داری افزایش یافت. در زمان‌های شش و ۲۴ ساعت پس از تنش دمای بالا و در سطوح دو و پنج ppm، فعالیت آسکوربات پراکسیداز به‌صورت معنی‌داری نسبت به تنش دمایی بالا و عدم کاربرد ۲۴-اپی‌براسینواستروئید افزایش یافت. بیشترین میزان فعالیت آسکوربات پراکسیداز در سطح دو ppm و زمان ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمار دمای بالا به‌دست آمد

که نشان‌دهنده نقش این آنزیم در افزایش تحمل گیاه به تنش است.



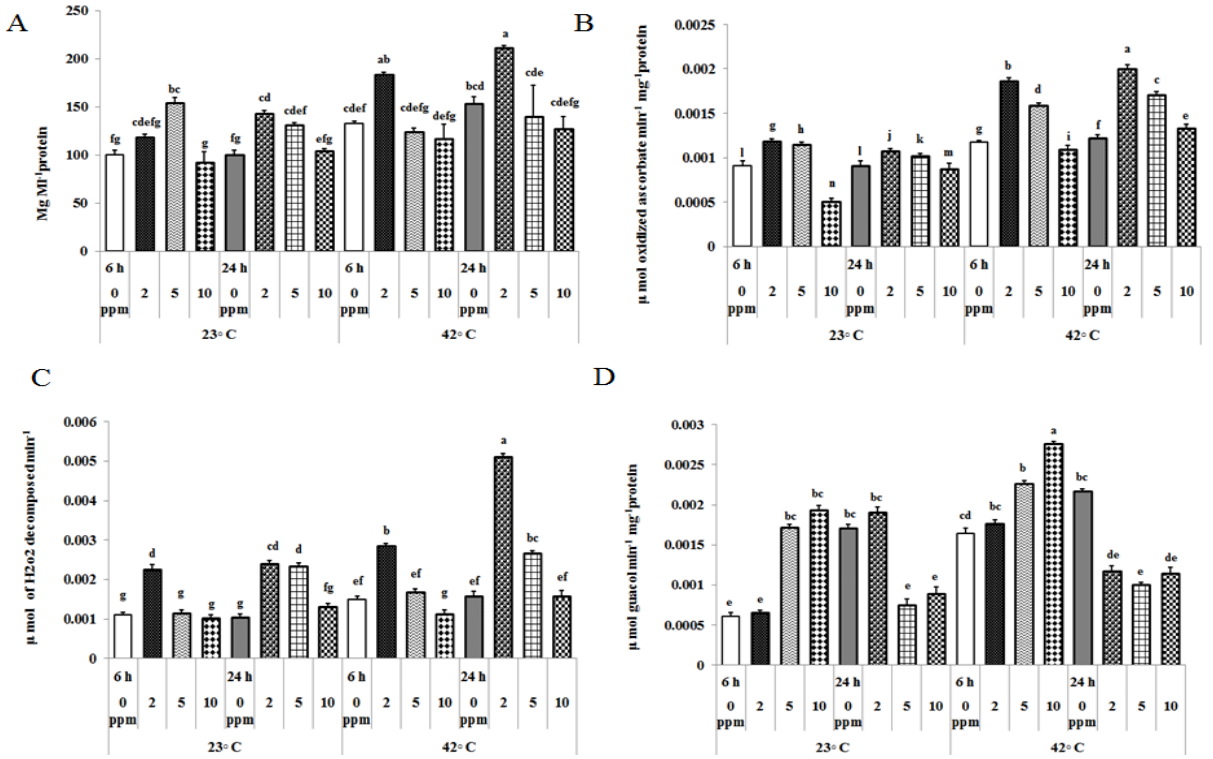
شکل ۲- مقایسه میانگین سه‌گانه دما، زمان و سطوح مختلف ۲۴-اپی‌براسینواستروئید بر درصد نشت الکترولیت (A) محتوای مالون‌دی‌آلدهید (B). مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال یک درصد انجام شد. ستون‌هایی با حروف مشابه، دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نیستند.

Figure 2. Triple mean comparison of temperature, time and different levels of 24-Epi-brassinosteroid on percentage of electrolyte leakage (A), malondialdehyde content (B). Mean comparison was done based on Duncan test at 1% of probability level. columns with the similar letters are not significantly different.

نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل سه‌گانه بر فعالیت کاتالاز در شکل C ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که فعالیت کاتالاز در زمان اعمال تنش دمای بالا (۴۲ درجه سانتی‌گراد و شش ساعت) نسبت به شرایط نرمال (۲۳ درجه سانتی‌گراد) به‌صورت معنی‌داری افزایش یافت. فعالیت کاتالاز با کاربرد ۲۴-اپی-براسینواستروئید در برخی سطوح در زمان اعمال تنش دمایی نسبت به عدم کاربرد ۲۴-اپی‌براسینواستروئید در زمان اعمال تنش به‌صورت معنی‌داری افزایش یافت. در زمان شش ساعت پس از تنش دمای بالا و در سطح دو ppm و در زمان ۲۴ ساعت پس از تنش و در سطوح دو و پنج ppm فعالیت کاتالاز به‌صورت معنی‌داری نسبت به تنش دمایی بالا و عدم کاربرد ۲۴-اپی‌براسینواستروئید افزایش یافت. بیشترین میزان فعالیت کاتالاز در سطح دو ppm از هورمون ۲۴-اپی-براسینواستروئید و زمان ۲۴ ساعت به‌دست آمد که نشان‌دهنده نقش این آنزیم در افزایش تحمل گیاه به تنش است.

بر اساس نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل سه‌گانه بر فعالیت گایاکول پراکسیداز (3D)، فعالیت گایاکول پراکسیداز در زمان اعمال تنش دمای بالا (۴۲ درجه سانتی‌گراد و شش و ۲۴ساعت) نسبت به شرایط نرمال (۲۳ درجه سانتی‌گراد) به‌صورت معنی‌داری افزایش یافت. بین میزان فعالیت گایاکول پراکسیداز در زمان اعمال تنش دمایی بالا در زمان‌های شش و ۲۴ ساعت پس از تنش اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. میزان فعالیت گایاکول پراکسیداز با کاربرد ۲۴-اپی-براسینواستروئید در برخی سطوح در زمان اعمال تنش

دمایی نسبت به عدم کاربرد ۲۴-اپی‌براسینواستروئید در همین تیمار دمایی به‌صورت معنی‌داری افزایش یافت. در زمان شش ساعت پس از تنش و در سطوح پنج و ۱۰ ppm، فعالیت گایاکول پراکسیداز نسبت به تنش دمایی بالا و عدم کاربرد ۲۴-اپی‌براسینواستروئید به‌صورت معنی‌داری افزایش یافت. بیشترین میزان فعالیت گایاکول پراکسیداز در سطح ۱۰ ppm از ۲۴-اپی‌براسینواستروئید و زمان شش ساعت به‌دست آمد که این میزان با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت.



شکل ۳- مقایسه میانگین سه‌گانه دما، زمان و سطوح مختلف ۲۴-اپی‌براسینواستروئید بر پروتئین کل (A)، آسکوربات پراکسیداز (B)، کاتالاز (C) و گایاکول پراکسیداز (D). مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال یک درصد انجام شد. ستون‌هایی با حروف مشابه، دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نیستند.

Figure 3. Triple mean comparison of temperature, time and different levels of 24-Epibrassinosteroid on total protein (A), ascorbate peroxidase (B), catalase (C), and gayacol peroxidase (D). Mean comparison was done based on Duncan test at 1% of probability level. Columns with the similar letters are not significantly different.

در تحقیق حاضر، تنش دمای بالا موجب افزایش محتوای پروتئین کل در مقایسه با شرایط دمایی نرمال شد. قرار گرفتن طولانی مدت در معرض دمای بالا، موجب افزایش محتوای پروتئین کل در مقایسه با مدت زمان کوتاه تنش شد. قرار گرفتن طولانی مدت در معرض تیمار ۲۴-اپی‌براسینواستروئید (دو و پنج ppm) در شرایط دمای نرمال (۲۳ درجه سانتی‌گراد)، افزایش محتوای پروتئین کل نسبت به تیمار شاهد را در پی داشت. در شرایط تنش دمای بالا، تیمار دو ppm در هر دو بازه زمانی شش و ۲۴ ساعت، موجب افزایش محتوای پروتئین کل برگ شد. ۲۴-اپی-براسینواستروئیدها باعث افزایش تحمل گیاهان در برابر تنش‌های گوناگون می‌شوند. این ترکیبات در سطح مولکولی، بیان ژن، متابولیسم و بیوسنتز اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌ها را تغییر می‌دهند (Arfan *et al.*, 2019). همچنین اپی-براسینواستروئیدها، تحمل گیاهان را در محدوده وسیعی از تنش‌های محیطی از قبیل خشکی، شوری،

سرما و گرما افزایش می‌دهند و این افزایش عموماً به تولید و رونوشت ژن‌های ضد تنش از جمله پروتئین شوک گرمایی وابسته است که نشان‌دهنده افزایش رونوشت ژن‌های مسئول پاسخ به تنش برای بالا بردن تحمل به تنش در درون گیاهان تیمار شده با اپی-براسینواستروئید است (Arfan *et al.*, 2019).

در این پژوهش، فعالیت آسکوربات پراکسیداز با گذشت زمان تنش از شش ساعت به ۲۴ ساعت، به‌صورت معنی‌داری افزایش یافت. در مجموع، کاربرد ۲۴-اپی‌براسیتواستروئید منجر به افزایش فعالیت آسکوربات پراکسیداز، هم در شرایط نرمال و هم در شرایط تنش دمای بالا شد. نتایج این تحقیق نشان داد که ۲۴-اپی‌براسینواستروئید از طریق تاثیر بر بیان ژن‌های مسئول کنترل فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، باعث افزایش تحمل شنبلیله در برابر خسارت اکسیداتیو ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن در شرایط تنش دمای بالا می‌شود (Choe *et al.*, 2006). در یک پژوهش، محتوای پرولین و سطوح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در زمان کاربرد اپی‌براسینواستروئید تحت شرایط تنش سرما و شرایط کنترل افزایش یافت که در نهایت منجر به افزایش مقاومت گیاه شد (Khan *et al.*, 2019).

در این مطالعه، فعالیت کاتالاز در اثر تنش دمایی بالا نسبت به شرایط نرمال افزایش یافت. فعالیت آنزیم کاتالاز در شرایط تنش دمای بالا و تیمار با ۲۴-اپی-براسینواستروئید (سطح دو ppm) نسبت به تیمار عدم کاربرد ۲۴- اپی‌براسینواستروئید به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. این افزایش احتمالا به دلیل افزایش گونه‌های فعال اکسیژن در شرایط تنش دمای بالا است؛ بنابراین در این شرایط، گیاه به‌منظور مقابله با گونه‌های فعال اکسیژن نیاز به افزایش فعالیت کاتالاز دارد. بنابراین شنبلیله به‌منظور حفاظت از غشای سلولی و سایر اندام‌ها از خسارت ناشی از تنش اکسداتیو، سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی را توسعه داده است (Maia *et al.*, 2010). نتایج پژوهش‌های متعدد نشان داد است که اپی‌براسینواستروئیدها از طریق تاثیر بر بیان ژن‌های مسئول کنترل فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، منجر به افزایش تحمل گیاهان در برابر خسارت ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن در شرایط تنش می‌شوند (Choe *et al.*, 2006). افزایش بیان و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بعد از کاربرد اپی-براسینواستروئید ممکن است به علت افزایش بیان ژن-های Det[1] رخ دهد، که باعث افزایش تحمل گیاه به تنش‌های اکسیداتیو می‌شود. وجود و کارکرد این ژن در آرابیدوپسیس در بافت‌هایی حاوی رادیکال‌های آزاد اثبات شده است (Kaya *et al.*, 2019).

Arfan *et al* (2019) نشان دادند که کاربرد اپی-براسینواستروئید و براسینولوئید (بازدارنده سنتز اپی-براسینواستروئید) تحت شرایط تنش دمای پایین در آرابیدوپسیس، به‌ترتیب منجر به افزایش و کاهش محتوای کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، پلی فنول اکسیداز و آسکوربات پراکسیداز شدند. همچنین محتوای مالون‌دی‌آلدهید به‌ترتیب افزایش و کاهش یافت. همچنین نتایج تحقیق Efimova *et al.* (2018) ثابت کرد که تیمار گوجه فرنگی با ۲۴-اپی-براسینولوئید و ۲۸-هوموبراسینولوئید تحت شرایط تنش شوری، منجر به افزایش محتوای کلروفیل *a*، *b*، کاروتنوئید و کاهش محتوای مالون‌دی آلدهید می‌شود. در حقیقت کاربرد تیمارهای مذکور، منجر به افزایش ویژگی‌های رشدی و کاهش تنش اکسیداتیو شدند.

در پژوهش حاضر، اعمال تنش دمای بالا به‌صورت معنی‌داری موجب افزایش فعالیت گایاکول پراکسیداز در هر دو بازه زمانی در مقایسه با شرایط دمایی نرمال (۲۳ درجه سانتی‌گراد) شد. قرار گرفتن طولانی مدت (۲۴ ساعت) در معرض تنش دمای بالا نسبت به تنش کوتاه مدت (شش ساعت)، موجب افزایش فعالیت گایاکول پراکسیداز شد؛ اگر چه این اختلاف معنی‌دار نبود. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که ۲۴-اپی-براسینواستروئید احتمالا از طریق تنظیم فعالیت ژن-های دفاعی، در رشد و نمو طبیعی گیاه و افزایش تحمل به تنش‌های محیطی ایفای نقش می‌کند. همچنین ثابت شد که ۲۴-اپی‌براسینواستروئید، بیان

[1] Deetiolated (Det)

ژن‌های آنتی‌اکسیدان را افزایش می‌دهد. نتایج متضادی در مورد اثر تحریک‌کننده‌های مختلف بر افزایش تحمل گیاهان نسبت به انواع تنش‌های زیستی و غیرزیستی وجود دارد. پاسخ گیاهان با توجه به مدت زمان در معرض محرک بودن، سن و مرحله رشدی و غلظت محرک‌ها بسیار متفاوت است؛ بنابراین بهینه کردن شرایط تیمار با این محرک‌ها از قبیل شناسایی بهترین غلظت محرک، حساس‌ترین مرحله رشدی گیاه و مناسبترین زمان در معرض قرارگیری محرک از فاکتورهای موثر در شناسایی محرک‌های مناسب است (Angelova *et al*., 2006: Namdeo, 2007; Parsa *et al*., 2016;)

نتیجه گیری کلی

در این تحقیق، اثر ۲۴-اپی‌براسینواستروئید بر برخی از ویژگی‌های فیزیولوژیک شنبلیله تحت تنش دمای بالا بررسی شد. نتایج نشان داد که کاربرد ۲۴-اپی-براسینواستروئید به‌صورت محلول‌پاشی، تا حدود زیادی از پراکسیداسیون اسیدهای چرب جلوگیری به-عمل می‌آورد و در نتیجه منجر به کاهش درصد نشت الکترولیت و محتوای مالون‌دی‌آلدهید می‌شود که منجر به افزایش تحمل شنبلیله به تنش گرما شدند. کاربرد ۲۴-اپی‌براسینواستروئید ممکن است از طریق تحریک سیستم‌های مقاومتی گیاه، منجر به افزایش بیان ژن‌های درگیر و افزایش محتوای آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از قبیل آسکوربات پراکسیداز، کاتالاز و گایاکول پراکسیداز شود و در نهایت تحمل گیاه افزایش یابد.

REFERENCES

1. Aebi, H.E. (1983). Catalase: In "Methods of enzymatic analysis" (2nd ed.). Verlag Chemie Weinheim. Academic Press, Inc. New York and London.
2. Aghdam, M.S. & Mohammadkhani, N. (2014). Enhancement of chilling stress tolerance of tomato fruit by postharvest brassinolide treatment. *Food Bioprocess Technology*, 7, 909–914.
3. Aghdam, R., Najarian, S., Shakhesi, S., Khanlari, S., Shaabani, K. & Sharifi, S. (2012). Investigating the effect of PGA on physical and mechanical properties of electrospun PCL/PGA blend nanofibers. *Journal of Applied Polymer Science*, 124(1), 123-131.
4. Angelova, Z., Georgiev, S. & Roos, W. (2001). Elicitation of plants. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 20, 72-83.
5. Annunziata, M. G., Ciarmiello, L. F., Woodrow, P., Dell'Aversana, E. & Carillo, P. (2019). Spatial and temporal profile of glycine betaine accumulation in plants under abiotic stresses. *Frontiers in plant science*, 10, 1-13.
6. Arfan, M., Zhang, D. W., Zou, L., Luo, S. S., Tan, W. R., Zhu, T. & Lin, H. H. (2019). Hydrogen peroxide and nitric oxide crosstalk mediates brassinosteroids induced cold stress tolerance in *Medicago truncatula*. *International journal of molecular sciences*, 20(1), 144- 159.
7. Arnon, A. N. (1967). Method of extraction of chlorophyll in the plants. *Agronomy Journal*, 23(1), 112-121.
8. Arora, P., Bhardwaj, R., & Kanwar, M. K. (2010). 24-Epibrassinolide induced antioxidative defense system of *Brassica juncea* L. under Zn metal stress. *Physiology & Molecular Biology of Plants*, 16, 285–293.
9. Cao, Y. Y. & Hua, Z. H. A. O. (2008). Protective roles of brassinolide on rice seedlings under high temperature stress. *Rice Science*, 15(1), 63-68.
10. Chen, X., Kanokporn, T., Zeng, Q., Wilkins, T. A. & Wood, A. J. (2002).Characterization of the V-H^+ ATPase in the resurrection plant Tortola ruralis: accumulation and polysomal. *Journal of Experimental Botany*, 53,367-372.
11. Choe, E. & Min, D. B. (2006). Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 5(4), 169-186.
12. De oliveira, V. P., Lima, M. D. R., da Silva, B. R. S., Batista, B. L. & da Silva Lobato, A. K. (2019). Brassinosteroids confer tolerance to salt stress in Eucalyptus urophylla plants enhancing homeostasis, antioxidant metabolism and leaf anatomy. *Journal of Plant Growth Regulation*, 38(2), 557-573.

13. DesMarais, D. L., Hernandez, K. M. & Juenger, T. E. (2013). Genotype-by-environment interaction and plasticity: exploring genomic responses of plants to the abiotic environ. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 44, 5-29.
14. Dionisio-Sese, M. L. & Tobita, S. (1998). Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. *Plant Science*, 135(1), 1-9.
15. El Amrani, A., Couée, I., Berthomé, R., Ramel, F., Gouesbet, G. & Sulmon, C. (2019). Involvement of polyamines in sucrose-induced tolerance to atrazine-mediated chemical stress in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of plant physiology*, 238, 1-11.
16. Estaji, A., Kalaji, H. M., Karimi, H. R., Roosta, H. R. & Moosavi-Nezhad, S. M. (2019). How glycine betaine induces tolerance of cucumber plants to salinity stress? *Photosynthetica*, 57(3), 753-761.
17. Fujii, K. & Matsukawa, T. (1936). Saponins and sterols Saponin of Dioscorea tokoro Makino. *The Pharmaceutical Society of Japan*, 56, 408-414.
18. Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Alam, M. M., Roychowdhury, R. & Fujita, M. (2013). Physiological, Biochemical, and Molecular Mechanisms of Heat Stress Tolerance in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 9643-9684.
19. Hayat, S., Hasan, S. A., Yusuf, M., Hayat, Q. & Ahmad, A. (2010). Effect of 28-homobrassinolide on photosynthesis, fluorescence and antioxidant system in the presence or absence of salinity and temperature in *Vigna radiata*. *Environmental and Experimental Botany*, 69(2), 105-112.
20. Heath, R.L. & Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125, 189-198.
21. Hussain, M. S., Fareed, S., Ansari, S., Rahman, M. A., Ahmad, I. Z. & Saeed, M. (2012). Current approaches toward production of secondary plant metabolites. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 4(1), 10-20.
22. Joanna, C., Magdalena, S. & Tyrka, M. (2015). Optimization of in vitro culture conditions for accumulation of diosgenin by fenugreek. *Medicinal Plants Studies*, 3(3), 22-25.
23. Kaya, C., Ashraf, M., Wijaya, L. & Ahmad, P. (2019). The putative role of endogenous nitric oxide in brassinosteroid-induced antioxidant defence system in pepper (*Capsicum annuum L.)* plants under water stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 143, 119-128
24. Kaya, C., Kirnak H. & Higgs D. (2001). Enhancement of growth and normal growth parameters by foliar application of potassium and phosphorus in tomato cultivars grown at high (NaCl) salinity. *Journal of Plant Nutrition*, 24(2), 357-367.
25. Khan, T. A., Yusuf, M., Ahmad, A., Bashir, Z., Saeed T., Fariduddin, Q. & Wu, T. (2019). Proteomic and physiological assessment of stress sensitive and tolerant variety of tomato treated with brassinosteroids and hydrogen peroxide under low-temperature stress. *Food chemistry*, 289, 500-511.
26. Kurepin, L. V., Qaderi, M. M., Back, T. G. (2008). A rapid effect of applied brassinolide on abscisic acid concentrations in Brassica napus leaf tissue subjected to short-term heat stress. *Plant Growth Regulation*, 55, 165–167.
27. Lamaoui, M., Jemo, M., Datla, R., & Bekkaoui, F. (2018). Heat and drought stresses in crops and approaches for their mitigation. *Frontiers in chemistry*, *6*, 26.
28. Mahajan, S. & Tuteja, N. (2005). Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of biochemistry and biophysics*, 444(2), 139-158.
29. Maia, J. M, de Macedo, C. C., Voigt, E. L., Freitas, J. B. S. & Silveira, J. A. G. (2010). Antioxidative enzymatic protection in leaves of two contrasting cowpea cultivars under salinity. *Biologia Plantarum*, 54(1), 159-163.
30. Mehrafarin, A., Rezazadeh, S., Naghdi, B. H., Noormohammadi, G & Qaderi, A. (2011). A review on biology, cultivation and biotechnology of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) as a valuable medicinal plant and multipurpose. *Journal of Medicinal Plants*, 10(37), 6-24.
31. Morgutti, S., Negrini, N., Pucciariello, C. & Sacchi, G. A. (2019). Role of Trehalose and Regulation of its Levels as a Signal Molecule to Abiotic Stresses in Plants. *In Plant Signaling Molecules*. (pp. 235-255.) Woodhead Publishing.

32. Namdeo, A. (2007). Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. *Pharmacognosy reviews*, 1(1). 69-79.
33. Osman, M. E., El-Feky, S. S., Abo-Hamad, S. A., & Seliem, H. S. (2015). Improvement of harmful effects induced by temperature stress on *Trgonella foenum-graecum* L. by on putrescine. *The Egyptian Journal of Experimental Biology*, 11(2), 197-205.
34. Pant, G., Hemalatha, S., Arjunan, S., Malla, S., & Sibi, G. (2013). Effect of heat stress in synthesis of heat shock proteins and antioxidative enzyme response in *Trigonella foenum-graceum* L. *Journal of Plant Sciences*, *1*(4), 51-56.
35. Parsa, M. & Zeinali, A. (2016). Effects of salicylic acid elicitor on the production of tropane alkaloids (atropine and scopolamine) in hairy roots and in vitro roots cultures of *Hyoscyamus niger* L. *Scientific Journal Management System*, 32(4), 655-666.
36. Patel, H & Krishnamurthy, R. (2013). Elicitors in plant tissue culture. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2(2), 60-65.
37. Popov, V. N, Orlova I. V. & Kipaikina, T. (2005). The effect of tobacco plant transformation with a gene for acyl-lipid Δ9-desaturase from *Synechococcus vulcanus* on plant chilling tolerance. *Russian Journal of Plant Physiol*, 52, 664–667.
38. Ramakrishna, B. & Rao, S. S. R. (2015). Foliar application of brassinosteroids alleviates adverse effects of zinc toxicity in radish (*Raphanus sativus* L.) plants. *Protoplasma*, 252(2), 665-677.
39. Ranieri, A., Castagna, A. & Soldatini, G. F. (2000). Differential stimulation of ascorbate peroxidase isoforms by ozone exposure in sunflower plants. *Journal of Plant Physiology*, 156(2), 266-271.
40. Safari, M., Ghanati, F., Hajnoruzi, A., Rezaei, A., Abdolmaleki, P. & Mokhtari-Dizaji, M. (2012). Maintenance of membrane integrity and increase of taxanes production in hazel (*Corylusavellana L.*) cells induced by low-intensity ultrasound. *Biotechnology letters*, 34(6), 1137-1141.
41. Sharma, A., Shahzad, B., Kumar, V., Kohli, S. K., Sidhu, G. P. S., Bali, A. S. & Zheng, B. (2019). Phytohormones regulate accumulation of osmolytes under abiotic stress. *Biomolecules*, 9(7), 285-321.
42. Srinivasan, K. (2006). Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*): A review of health beneficial physiological effects. *Food-Reviews- International*, 22, 203–224.
43. Sytar, O., Kumari, P., Yadav, S., Brestic, M. & Rastogi, A. (2019). Phytohormone priming: regulator for heavy metal stress in plants. *Journal of Plant Growth Regulation*, 38(2), 739-752.
44. Upadhyay, S., Phukan, U. J., Mishra, S. & Shukla, R. K. (2014). De novo leaf and root transcriptome analysis identified novel genes involved in Steroidal sapogenin biosynthesis in *Asparagus racemosus*. *BMC genomics*, 15(1), 746.
45. Vardhini, B. V. & Anjum, N. A. (2015). Brassinosteroids make plant life easier under abiotic stresses mainly by modulating major components of antioxidant defense system. *Frontiers in Environmental Science*, 2, 1-16.
46. Wang, L. J., Fan, L., Loescher, W., Duan, W., Liu, G. J., Cheng, J. S., Luo, H. B. & Li, S. H. (2010). Salicylic acid alleviates decreases in photosynthesis under heat stress and accelerates recovery in grapevine leaves. *BMC plant biology*, 10(1), 34-48.
47. Wu, C., Li, F., Xu, H., Zeng, W., Yu, R., Wu, X. & Li, J. (2019). The potential role of brassinosteroids (BRs) in alleviating antimony (Sb) stress in Arabidopsis thaliana. *Plant Physiology and Biochemistry*, 141, 51-59.
48. Xu, J., Liu, T., Yang, S., Jin, X., Qu, F., Huang, N. & Hu, X. (2019). Polyamines are involved in GABA-regulated salinity-alkalinity stress tolerance in muskmelon. *Environmental and Experimental Botany*, 164, 181-189.