

Effect of different brassinosteroid sources on Brussels cabbage (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*) under heat stress

Saeed Khosravi¹, Maryam Haghighi^{2*}

1- Former MSc student, Department of Horticulture, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

2- Associate Professor, Department of Horticulture, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

*Corresponding author: mhaghighi@cc.iut.ac.ir

(Received: 28 May 2024

Revised: 22 August 2024

Accepted: 31 August 2024)

Extended Abstract

- 1. Introduction:** High temperature is a significant non-living stressor that inflicts considerable damage on the agricultural sector, particularly in vegetable production. The ability of plants to endure extreme temperatures involves complex physiological processes enabling survival under typically lethal conditions. Enhancing the intrinsic defense mechanisms of plants to cope with adverse environments is a crucial focus in the realm of biotechnology. In this context, the use of exogenous protectants, such as brassinosteroids, emerges as a promising strategy for improving plant resilience.
- 2. Materials and Methods:** The present research was conducted in the greenhouse of Isfahan University of Technology's horticulture department on Brussels sprouts plants (var. Long Island), using a factorial design in a completely randomized layout with three replications. The aim was to investigate the effect of brassinosteroid sources on Brussels sprouts under temperature stress. The factors included two temperature regimes ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$ and $40\pm 2^{\circ}\text{C}$) and three levels of brassinosteroid sources: distilled water (C), brassinosteroid (Br), and nano-brassinosteroid (N-Br) at a concentration of $1\text{ }\mu\text{M}$. The seeds were planted in culture trays containing a mixture of coco peat and perlite in a 1:1 volume ratio. After the seedlings reached the 4-leaf stage, they were sprayed with 500 ml of distilled water (control), $1\text{ }\mu\text{M}$ Br, and $1\text{ }\mu\text{M}$ N-Br three times per week until the 6-leaf stage. Then, they were kept in greenhouse conditions with a temperature of $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, relative humidity of 75%, and 8 hours of darkness and 16 hours of light, respectively. Subsequently, the treatment groups were transferred to the incubator at $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ under the same light, temperature, and humidity conditions as the greenhouse, except for a 6-hour heat stress at $40\pm 2^{\circ}\text{C}$. At the end of the research, some characteristics of Brussels sprouts were measured.
- 3. Results and Discussion:** The results obtained from the interaction effects of temperature regimes and brassinosteroid sources showed that shoot fresh weight, root fresh weight, and number of leaves decreased at 40°C compared to 25°C . Maximum length of the stem in both temperature regimes was observed in the control and Br treatment. Brassinosteroids, as signaling molecules, regulate both cell division and expansion. In general, the amount of proline, flavonoid, and abscisic acid increased at 40°C compared to 25°C , but no significant difference was observed between Br sources. Intracellular carbon dioxide increased at 40°C compared to 25°C , and the highest internal CO_2 of stomata was observed in Br treatment compared to control and N-Br in both temperature regimes. Stomatal conductance and transpiration rate increased in both temperature regimes in the control treatment compared to Br and N-Br. When the plants had more open stomata, they had more chances for internal CO_2 of stomata to enter the leaves and thus increased the rate of photosynthesis by 73% compared to the control treatment, which caused improved relative water content, internal CO_2 of stomata, and the activity of antioxidant enzymes under heat stress. Brassinosteroids improve osmotic regulation, which enhances turgor pressure and regulation of stomatal conductance in plants under stress conditions. The highest amount of electrolyte leakage at 40°C was observed in the control treatment, and the lowest amount was observed in the treatment with N-Br. The activity of antioxidant enzymes increased at 40°C with Br and N-Br treatment compared to the control. Because Brassinosteroids act as secondary messengers to induce the antioxidant defense system under stress conditions, as a result, plants can effectively eliminate reactive oxygen species (ROS) in stressed plants. Moreover, by stabilizing photosynthetic pigments and preserving chloroplast ultrastructure, BRs help maintain electron transport efficiency and reduce photoinhibition under high temperature. This coordinated modulation of gas exchange, osmolyte accumulation, and redox homeostasis ultimately translates into higher biomass retention, lower membrane damage, and improved recovery capacity after heat episodes.
- 4. Conclusion:** The Br treatment plays an important role in improving the growth of plants and increasing their resistance to high temperatures. At high temperatures, the electrolyte leakage and malondialdehyde, which are important traits of stress, increased, but Br decreased these traits by increasing the activity of

antioxidant enzymes. In addition, Br was able to improve the relative water content of leaves and the rate of photosynthesis by increasing root length under temperature stress conditions. The N-Br could not significantly improve the growth and resistance of plants compared to Br.

Keywords: Antioxidant, Abiotic stress, Flavonoid, Photosynthesis, Nanoparticles.

Citation: Khosravi, S., Haghighi, M. (2026). Effect of different brassinosteroid sources on Brussels cabbage (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*) under heat stress. *Journal of Vegetables Sciences*, 19(1), 83-108. doi:10.22034/iuvs.2024.2030464.1370

Copyrights:

Copyright for this article is retained by the author(s), with publication rights granted to Journal of Vegetables Sciences. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>).



تأثیر منابع مختلف براسینواستروئید بر روی کلم بروکسل (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*) تحت تنش گرمایی

سعید خسروی^۱، مریم حقیقی^{۲*}

۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

*نویسنده مسئول: mhaghghi@cc.iut.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۳/۰۸

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۶/۰۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۶/۱۰

چکیده

دمای بالا یکی از تنش‌های غیرزنده هست که خسارت قابل توجهی به بخش کشاورزی از جمله تولید سبزی‌ها وارد می‌کند. هورمون‌های استروئیدی گیاهی، مانند براسینواستروئیدها، نقش مهمی در رشد گیاه و سازگاری با تنش‌های محیطی دارند. پژوهش حاضر در گلخانه دانشگاه صنعتی اصفهان به صورت فاکتوریل (با دو فاکتور) در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار با هدف بررسی تأثیر منابع براسینواستروئید بر کلم بروکسل تحت تنش دمایی انجام گرفت. فاکتورها شامل دو سطح رژیم دمایی (۲۵±۲ و ۴۰±۲ درجه سانتی‌گراد) و سه سطح منابع براسینواستروئید (آب مقطر، براسینواستروئید و نانو براسینواستروئید) با غلظت ۱ میکرومولار می‌باشند. نتایج حاصل از پژوهش نشان داد که دمای بالا موجب کاهش صفات رشدی در کلم بروکسل شد، در حالی که میزان فلاونوئید و آسیدیک اسید در دمای بالا نسبت به دمای بهینه افزایش یافت. در دمای بهینه تیمار شاهد بیشترین تعداد برگ و هدایت روزنه‌ای را داشت در حالی که با افزایش دما نشت الکترولیت و مالون‌دی‌آلدئید افزایش یافت. براسینواستروئید در دمای بهینه سرعت فتوسنتز را ۷۳ درصد نسبت به شاهد افزایش داد و با افزایش دما طول ریشه، محتوای نسبی آب، دی‌اکسید کربن درون روزنه‌ای و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را بهبود بخشید. بیشترین میزان نشت الکترولیت و مالون‌دی‌آلدئید در دمای بهینه در تیمار با نانو براسینواستروئید مشاهده شد در حالی که فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد با تیمار براسینواستروئید و نانو براسینواستروئید در مقایسه با شاهد افزایش یافت. به طور کلی به نظر می‌رسد در هر دو رژیم دمایی براسینواستروئید در بهبود رشد و مقاومت به دمای بالا در کلم بروکسل نسبت به نانو براسینواستروئید مؤثرتر عمل کرد.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، تنش غیرزنده، فلاونوئید، فتوسنتز، نانو ذرات.

استناد: خسروی، س.، حقیقی، م. (۱۴۰۵). تأثیر منابع مختلف براسینواستروئید بر روی کلم بروکسل (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*) تحت تنش گرمایی. علوم سبزی‌ها، ۱۹(۱)، ۸۳-۱۰۸.

حق چاپ:



حق چاپ برای نویسنده (گان) این مقاله محفوظ است. بر اساس قوانین انتشارات با دسترسی آزاد، تمام مطالعات چاپ شده در این مجله به صورت آزاد در وب سایت مجله برای عموم بدون پرداخت هزینه قابل دسترسی است.

مقدمه

در سال‌های اخیر، تغییرات آب و هوایی جهانی باعث افزایش دما در سراسر کره زمین شده است (Zhou et al., 2015). پیش‌بینی‌های دانشمندان نشان می‌دهد که تا سال‌های ۲۰۸۱-۲۱۰۰، متوسط دمای جهانی به میزان ۲/۶-۴/۸ درجه سانتی‌گراد نسبت به سال‌های ۱۹۸۶-۲۰۰۵ افزایش خواهد یافت (Quan et al., 2022a). تنش گرمایی باعث افزایش تبخیر زیاد آب می‌شود که منجر به کاهش رسانایی روزنه‌ای و سرعت فتوسنتز می‌گردد (Haghighi & Abolghasemi, 2019; Ali et al., 2020)، در نتیجه عملکرد گیاه کاهش می‌یابد، به‌طوری‌که هر ۱ درجه سانتی‌گراد افزایش در دمای سالانه می‌تواند منجر به کاهش ۱۶-۲/۵ درصدی عملکرد محصول شود (Jahan et al., 2021).

کلم بروکسل (*Brassica oleracea*) یکی از سبزی‌های مهم خانواده کلم‌ها است که به خاطر خواص تغذیه‌ای و سلامتی‌اش شناخته می‌شود. این سبزی کم‌کالری و منبع غنی از گلوکوزینولات‌ها، کاروتنوئیدها، ویتامین‌ها، مواد معدنی و آنتوسیانین‌ها می‌باشد که برای سلامتی انسان مفید هستند (Ravanfar et al., 2017). کلم بروکسل معمولاً در فصل‌های سرد رشد می‌کند و حساسیت زیادی به دماهای بالا دارد. این حساسیت می‌تواند منجر به تغییرات مختلف و اغلب ناسازگار در رشد، نمو و فرآیندهای فیزیولوژیکی گیاه شود که ممکن است تأثیر منفی بر عملکرد محصول بگذارد (Hasanuzzaman et al., 2013). پاسخ گیاهان به دماهای بالا به عوامل مختلفی از جمله درجه افزایش دما، زمان قرار گرفتن در معرض دمای بالا و نوع گیاه بستگی دارد (Ahuja et al., 2010). در کلم بروکسل، اثرات منفی دماهای بالا شامل اندازه غیریکنواخت سر، سطح ناهموار سر، کاهش وزن و قطر سر و ایجاد رنگ‌های نامطلوب می‌باشد (Farnham & Bjorkman, 2011; Branham et al., 2017). همچنین، کاهش کیفیت سر به دلیل گرما عمدتاً در مرحله‌ی بزرگ شدن جوانه و شروع گل‌دهی رخ می‌دهد

که می‌تواند تأثیر منفی بر عملکرد و کیفیت محصول بگذارد (Bjorkman & Pearson, 1998).

پژوهشگران به بررسی نقش هورمون‌های گیاهی در افزایش تحمل گیاهان به شرایط دمای نامساعد پرداختند. براسینواستروئیدها، گروهی از هورمون‌های استروئیدی گیاهی و مولکول‌های سیگنالی اساسی هستند که در تنظیم رشد و نمو گیاه و فعالیت دفاعی نقش بسزایی دارند (Manghwar et al., 2022). تحقیقات متعدد نشان داده‌اند که کاربرد خارجی براسینواستروئیدها می‌تواند مقاومت گیاهان را در برابر تنش‌های زیستی مانند دمای پایین (Xia et al., 2018)، دمای بالا (Kothari & Lachowicz, 2021)، خشکی (Ahmad Lone et al., 2022)، سمیت فلزات سنگین (Maia Júnior et al., 2022) و سمیت فلزات سنگین (Maghsoudi et al., 2021; Yusuf et al., 2022) تقویت کنند. به‌علاوه، مطالعات نشان داده‌اند که استفاده از براسینواستروئیدها می‌تواند کارایی فتوسنتز برگ را در شرایط تنش گرمایی افزایش داده و منجر به بهبود عملکرد فتوسنتزی، تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی و تنظیم مثبت ژن‌های پاسخ به استرس مانند سوپر اکسید دیسموتاز، پراکسیداز و کاتالاز شود (Singh & Shono, 2005). تقویت مکانیسم‌های دفاعی ذاتی گیاه در برابر شرایط نامطلوب، یک ضرورت اساسی در زمینه پیشرفت‌های بیوتکنولوژیکی برای سازگاری هدفمند گیاهان است. در این زمینه خاص، استفاده از مولکول‌های محافظ مانند براسینواستروئیدها، به‌عنوان جایگزین‌های مؤثر مطرح می‌شود. همچنین استفاده از نانو ساختارهای براسینواستروئید به‌عنوان یک فرم جدید و کارآمدتر این هورمون گیاهی می‌تواند راهکاری مناسب برای افزایش مقاومت گیاهان به تنش‌های محیطی باشد.

امروز نانوتکنولوژی به‌طور گسترده‌ای به‌عنوان یک زمینه به‌سرعت در حال پیشرفت شناخته‌شده است (Khazaei et al., 2023)، زیرا کشاورزی و صنایع غذایی رشد قابل‌توجهی را در کاربرد نانو مواد مختلف مشاهده می‌کنند (Javed et al., 2017). نانوتکنولوژی

دوره نوری ۱۴ ساعت، چگالی شار فوتون فتوسنتزی ۲۷۰ میکرو مول بر مترمربع بر ثانیه، رطوبت نسبی ۵۰ درصد و دمای روز/شب به ترتیب 25 ± 2 و 17 ± 2 درجه سانتی‌گراد برای رشد نگهداری شدند. در طول هفته اول آزمایش، نشاءها با نصف مقدار توصیه‌شده محلول غذایی و سپس به‌تدریج با محلول غذایی کامل توصیه‌شده که شامل مقادیر (برحسب میلی‌گرم بر لیتر): نیتروژن (N=116)، فسفر (P=21)، پتاسیم (K=82)، کلسیم (Ca=125)، منیزیم (Mg=21)، گوگرد (S=28)، آهن (Fe=6.8)، منگنز (Mn=1.97)، روی (Zn=0.25)، بور (B=0.70)، مس (Cu=0.07) و مولیبدن (Mo=0.05) تغذیه شدند. این ترکیبات به‌صورت CuSO_4 ، Fe EDTA ، NH_4NO_3 ، KH_2PO_4 ، Na_2MO_4 ، $\text{Ca (NO}_3)_2$ ، ZnSO_4 ، MnSO_4 و H_3BO_3 برای تغذیه استفاده شدند (Jones, 2005). کلم‌ها تا مرحله ۶ برگی در هر هفته سه مرتبه با ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر (شاهد)، ۱ میکرو مولار Br و ۱ میکرو مولار N-Br محلول‌پاشی شدند. سپس، در مرحله ۱۰-۸ برگی در شرایط گلخانه با دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۷۵ درصد و به ترتیب ۸ و ۱۶ ساعت تاریکی و روشنایی نگهداری شدند. متعاقباً، گروه‌های تیمار با دمای 40 ± 2 درجه سانتی‌گراد به انکوباتور (EYELA LTI-1000 SD) تحت شرایط نور، دما و رطوبت یکسان با شرایط گلخانه به‌جز یک تنش حرارتی ۶ ساعته در دمای 40 ± 2 درجه سانتی‌گراد، منتقل شدند.

براسینواستروئید از شرکت سیگما تهیه شد و بر اساس روشی که توسط Mozafari و همکاران در سال ۲۰۰۸ و Halaji و همکاران در سال ۲۰۲۳ توضیح داده‌شده بود ذرات نانو براسینواستروئید در دانشگاه صنعتی اصفهان تولید شدند که مشخصات آن در جدول ۱ آمده است. در پایان پژوهش برخی از صفات رشدی، فیزیولوژی و بیوشیمیایی کلم بروکسل اندازه‌گیری شد.

شامل تولید مواد در مقیاس نانومتری است که ابعادی از ۱ تا ۱۰۰ نانومتر را در برمی‌گیرد (Javed et al., 2017). نانو ذرات همچنین می‌توانند در کوتاه‌ترین زمان از طریق کوتیکول و منافذ جذب برگ شوند، به شبکه آوندی، سلول‌های مزوفیل و آپوپلاست‌ها نفوذ کنند و تأثیر بیشتری روی گیاه بگذارند (Kumari et al., 2022; Nasrallah et al., 2022). نانو ذرات برای بهبود تولید گیاه از جمله جوانه‌زنی بذر، رشد گیاه، جذب مواد مغذی، سنتز متابولیت‌های ثانویه مهم و افزایش مقاومت گیاهان در برابر عوامل استرس‌زای غیر زیستی و زیستی نیز مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Javed et al., 2017). از آنجایی که فشارهای محیطی بر غلظت هورمون‌ها، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، هموستاز یونی، بیان ژن و عملکرد سیستم دفاعی تأثیر می‌گذارد، نشان داده‌شده است که نانو ذرات می‌توانند این آسیب‌ها را کاهش دهند (Nasrallah et al., 2022).

بنابراین، این تحقیق به بررسی واکنش‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی کلم بروکسل در مواجهه با دماهای بالا می‌پردازد و هدف آن شناسایی قابلیت‌های بالقوه براسینواستروئید و نانو براسینواستروئید به‌منظور افزایش مقاومت این گیاه در برابر تنش گرمایی است.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر در گلخانه گروه باغبانی دانشگاه صنعتی اصفهان بر روی کلم بروکسل (*Brassica oleracea* var. Long Island) به‌صورت فاکتوریل با دو فاکتور در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. فاکتورها شامل دو سطح رژیم دمایی (25 ± 2 و 40 ± 2 درجه سانتی‌گراد) و سه سطح منابع براسینواستروئید (آب مقطر (C)، براسینواستروئید (Br) و نانو براسینواستروئید (N-Br)) با غلظت ۱ میکرو مولار می‌باشند. بذرها در سینی‌های کشت حاوی مخلوط کوکوپیت و پرلیت با نسبت حجمی ۱:۱ کاشته شدند. پس از رسیدن نشاءها به مرحله ۴ برگی، آن‌ها به گلدان‌های ۵ کیلوگرمی با بستر کوکوپیت و پرلیت منتقل شدند و در گلخانه، با

جدول ۱- ویژگی‌های نانو براسینواستروئید (N-Br) مورد استفاده در آزمایش.

Table 1- Characteristics of nano-brassinosteroid (N-Br) used in the experiment.

اولتراسوند	روش نانو کپسوله‌سازی
۸۱ درصد	درصد موفقیت در سنتز نانو کپسول‌ها
۷۸-۹۴ نانومتر	اندازه ذرات بر اساس میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)
-۷۹/۱	پتانسیل زتا نانو ذرات

صفات مورد بررسی و نحوه اندازه‌گیری

صفات رشدی

پس از اینکه کلم‌ها به اندازه مطلوب برای مصرف رسیدند، برداشت و شسته شدند. سپس شاخساره‌ها با استفاده از چاقوی تیز از ریشه جدا شدند و وزن تازه اندام هوایی و ریشه با استفاده از ترازو آزمایشگاهی دقیق اندازه‌گیری شد. طول ریشه و ساقه نیز با استفاده از خط کش (سانتی‌متر) تعیین شد. همچنین حجم ریشه‌ها بر اساس میزان جابجایی آب به وسیله‌ی سانتی‌متر مکعب اندازه‌گیری شد. در نهایت، تعداد برگ‌ها در هر بوته از تعداد کل برگ‌ها شمارش شده در هر گیاه محاسبه شد.

شاخص سبزی‌نگی و فلورسانس کلروفیل

شاخص سبزی‌نگی با استفاده از دستگاه کلروفیل متر برگ (Minolta 502 plus, Japan) و فلورسانس کلروفیل با استفاده از دستگاه فلورومتر (RS232, UK, Handy PEA) اندازه‌گیری شد (Johnson, 2000; Loh *et al.*, 2002).

صفات فتوسنتزی

میزان فتوسنتز در واحد سطح برگ، دی‌اکسید کربن درون روزنه‌ای، هدایت روزنه‌ای و تعرق، با استفاده از دستگاه پرتابل سنجش فتوسنتز (Li-Cor, Li 3000, USA) اندازه‌گیری شد. تمام اندازه‌گیری‌ها در ساعت ۱۱ صبح و در شدت نور ۱۴۰۰-۱۲۰۰ میکرو مول فوتون بر مترمربع بر ثانیه انجام شد (Fisher *et al.*, 1998).

صفات فیزیولوژی

پتانسیل آب برگ

جهت سنجش پتانسیل آب برگ از دستگاه بمب فشار (SKPM1405, GBR) توسط اندامی که ۶ ثانیه قبل از گیاه جدا شده بود صورت گرفت (Rodriguez-Dominguez *et al.*, 2022).

محتوای نسبی آب برگ (RWC)

برگ‌های بالغ و کاملاً توسعه‌یافته با دقت از ساقه گیاه جدا و به سرعت وزن شدند (FW)، سپس برگ‌ها را روی سطح آب مقطر قرار داده و به مدت ۱۲ ساعت در دمای اتاق شناور کردند. برگ‌های دارای رطوبت بیش‌ازحد با استفاده از یک حوله کاغذی برای از بین بردن رطوبت سطح خشک شدند و وزن به‌عنوان وزن تورژسانس (TW) اندازه‌گیری شد. پس از آن وزن خشک با قرار دادن برگ‌های اشباع‌شده در آون با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به دست آمد (DW) و میزان RWC با استفاده از رابطه ۱ تعیین شد (López-Serrano *et al.*, 2019).

$$\text{RWC} = \frac{(FW - DW)}{(TW - DW)} \times 100 \quad \text{رابطه ۱}$$

محتوای پروتئین

جهت اندازه‌گیری پروتئین از روش Bradford (۱۹۷۶) استفاده شد. ابتدا از برگ کلم بروکسل عصاره گیاهی استخراج و سپس معرف Bradford به آن اضافه شد. پس از گذشت ۲۰ دقیقه، میزان جذب در طول موج ۵۹۵

با ارزیابی هدایت الکتریکی تخمین زده شد. ابتدا هدایت الکتریکی اولیه (E_{Ci}) توسط یک رسانایی سنج اندازه‌گیری شد و پس از گذشت ۲۲ ساعت، هدایت الکتریکی نهایی (E_{Cf}) اندازه‌گیری شد. سپس نمونه‌ها اتوکلاو شدند و سپس تا دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد خنک شدند، هدایت الکتریکی کل (E_{Ct}) اندازه‌گیری و سپس نشت الکترولیت با استفاده از رابطه ۲ محاسبه شد:

$$\text{رابطه ۲} \quad EL (\%) = \frac{(E_{Cf} - E_{Ci})}{(E_{Ct} - E_{Ci})} \times 100$$

پراکسیداسیون لیپیدهای غشای

میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشای برگ‌های بروکسل بر اساس تشکیل کمپلکس مالون دی آلدئید ایجادشده با تیوباری تیوریک اسید به‌وسیله اسپکتروفتومتر (UV 160A- Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) در دو طول‌موج ۵۳۵ و ۶۰۰ نانومتر سنجیده شد (Buege & Aust, 1978).

محتوای آبسزیک اسید

برای سنجش محتوای آبسزیک اسید در ۱ گرم از بافت تازه برگ، ابتدا نمونه با متانول ۸۰ درصد و ۰/۱ گرم پلی وینیل پیرولیدون در ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس محلول رویی جدا شد و متانول توسط خلأ تبخیر شده و به آن اتیل استات و اسید استیک اضافه شد. سپس نمونه به ستون فاز معکوس (Diamonsic, C18, 5 μ m) به طول ۲۵ سانتی‌متر و قطر ۴/۶ میلی‌متر در دستگاه Unicam-HPLC (Crystal-200, UK) تزریق شد. برای جداسازی از فاز متحرک، گرادیان متانول-اسید استیک (۳-۹۷ درصد) با سرعت چهار میلی‌لیتر در دقیقه به کار رفت و دتکتور diode array نیز استفاده شد. زیر منحنی در طول‌موج ۲۸۰-۲۱۰ نانومتر قرائت شد (Kishwar *et al.*, 2011). استاندارد اسید آبسزیک با خلوص ۹۹/۹۷ درصد از شرکت Sigma تهیه شد.

غلظت پتاسیم

نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (UV 160A- Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) قرائت و بر اساس مقایسه با منحنی استاندارد، غلظت پروتئین برحسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد.

محتوای پرولین

غلظت پرولین در برگ‌های کلم بروکسل، با روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) سنجیده شد. این اندازه‌گیری از طریق سنجش مقدار محصول رنگی حاصل از واکنش پرولین با نین هیدرین صورت گرفت و میزان جذب در طول‌موج ۵۲۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر (UV 160A- Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) اندازه‌گیری شد، سپس مقدار پرولین با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه و به واحد میکروگرم بر گرم وزن تر بیان شد.

محتوای فنول و فلاونوئید کل

میزان فنول کل در برگ‌های بروکسل با استفاده از روش فولین-سیوکالتو و بر اساس غلظت گالیک اسید در هر گرم وزن تازه برگ اندازه‌گیری شد. این اندازه‌گیری با کمک اسپکتروفتومتر مدل (UV 160A- Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) و در طول‌موج ۷۶۵ نانومتر انجام گردید (Singleton & Rossi, 1965). برای تهیه منحنی استاندارد، از محلول‌های گالیک اسید در حلال متانول استفاده شد که معادله کالیبراسیون آن به‌صورت $y = 0.01x + 0.26$ بود. همچنین، محتوای فلاونوئیدها با استفاده از روش ارائه‌شده توسط Yazdizadeh Shotorbani و همکاران (۲۰۱۳) و با تغییرات جزئی، با همان اسپکتروفتومتر و در طول‌موج ۴۱۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. منحنی استاندارد برای این اندازه‌گیری نیز با استفاده از محلول‌های کوئرستین در حلال متانول تهیه گردید و معادله کالیبراسیون آن به‌صورت $y = 0.03x - 0.07$ بود (Yazdizadeh Shotorbani *et al.*, 2013).

نشت الکترولیت

بر اساس مطالعه انجام‌شده توسط Bajji و همکاران در سال ۲۰۰۲، نشت الکترولیت (EL) از برگ‌های گیاهی

عنصر پتاسیم به روش خاکستر گیری خشک اندازه گیری شد. و در نهایت میزان پتاسیم با استفاده از دستگاه فلیم فتومتر (JENWAY PFP-7)، اندازه گیری شد (Murillo-Amador *et al.*, 2007).

ظرفیت آنتی اکسیدانی (سنجش DPPH)

ظرفیت آنتی اکسیدانی گیاه به شیوه مهار رادیکال های آزاد صورت گرفت، بدین منظور ابتدا به ۲۰۰ میکرو لیتر از عصاره متانولی استخراج شده از نمونه های برگ، ۸۰۰ میکرو لیتر بافر (Tris-HCl) اضافه شد. سپس ۱ میلی- لیتر محلول DPPH اضافه گردید و در دمای اتاق بدون هیچ نوری قرار داده شد. ۳۰ دقیقه پس از افزودن محلول DPPH، جذب محلول در طول موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد. میزان جذبی که هنگام معرفی نمونه تحلیلی مشاهده شد، به عنوان AS مشخص شد، در حالی که میزان جذب که هنگام معرفی اتانول در جای خود مشاهده می شد، به عنوان AC مشخص شد (Koleva *et al.*, 2002). درصد بازدارندگی DPPH با استفاده از رابطه ۳ زیر محاسبه شد:

$$\text{رابطه ۳} \quad \text{Inhibition ratio (\%)} = \left(\frac{Ac-As}{Ac} \right) \times 100$$

صفات بیوشیمیایی

فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی

فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی سوپر اکسید دیسموتاز، پراکسیداز و کاتالاز با استفاده از بافر استخراج عمومی و همچنین بافر فسفات عمومی برای تمامی آنزیم ها انجام گرفت. حدود ۲۰۰ میلی گرم از برگ های توسعه یافته بروکسل جمع آوری شده و توسط نیتروژن مایع تثبیت شد. سپس عصاره آن ها با استفاده از فر استخراج سانتریفوژ شد و میزان جذب آنزیم های سوپر اکسید دیسموتاز، پراکسیداز و کاتالاز به ترتیب در طول موج های ۵۶۰، ۴۷۰ و ۲۴۰ نانومتر اندازه گیری شد (Güneş *et al.*, 2019).

ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی

برای تحلیل ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی در نمونه های برگ، ۱۰۰ میلی گرم از بافت برگ در ۱۰ میلی لیتر متانول با ۸۰ درصد استخراج شد و سپس مخلوط در معرض هم زدن (۸ ساعت؛ ۱۱۰ دور در دقیقه؛ ۲۵ درجه سانتی گراد) قرار گرفت. سپس، نمونه های استخراج شده از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر عبور داده شد. تجزیه و تحلیل HPLC با استفاده از روش توسعه یافته توسط Lin و Harnly (۲۰۱۰) انجام شد. برای این منظور، از یک ستون Symmetry C18 با ابعاد ۴/۶ میلی متر × ۲۵۰ میلی متر و اندازه ذرات ۵ میکرومتر، به عنوان فاز ثابت استفاده شد. فاز متحرک مورد استفاده مخلوطی از اسید فرمیک (۰/۱ درصد) و استونیتریل بود و سرعت تزریق برای فاز متحرک به ستون ۰/۸ میلی لیتر در دقیقه تنظیم شد. همچنین، استاندارد ترکیبات فنولی و فلاونوئیدها از شرکت سیگما تهیه شدند و در متانول حل شدند. سپس، حجم تزریق ۲۰ میکرو لیتر برای وارد کردن ترکیبات محلول به ستون HPLC استفاده شد و کروماتوگرام ها با استفاده از طول موج ۲۰۰ تا ۴۰۰ نانومتر به دست آمدند (Lin & Harnly, 2010).

محتوای اسیدهای آمینه

برای تخمین اسیدهای آمینه، ۰/۳ گرم بافت تر با استفاده از اتانول ۸۰ درصد در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شد. سپس محلول رویی در دستگاه تغلیظ کننده قرار داده شد و سپس ۲۰۰ میکرو لیتر بافر بورات و در نهایت ۱۰۰ میکرو لیتر OPA اضافه شد. سپس با استفاده از سرنگ مخصوص، نمونه به دستگاه HPLC با ستون HALO, C18, 5 سانتی متر (دمای ستون ۲۵ درجه سانتی گراد) و فازهای متحرک (حلال ها) با شدت جریان ۱/۱ میلی لیتر بر دقیقه تزریق شد و با تعیین رابطه غلظت و سطح زیر منحنی، منحنی استاندارد رسم شده و مقادیر هر اسید آمینه محاسبه شدند (Lisiewska *et al.*, 2008).

تحلیل آماری

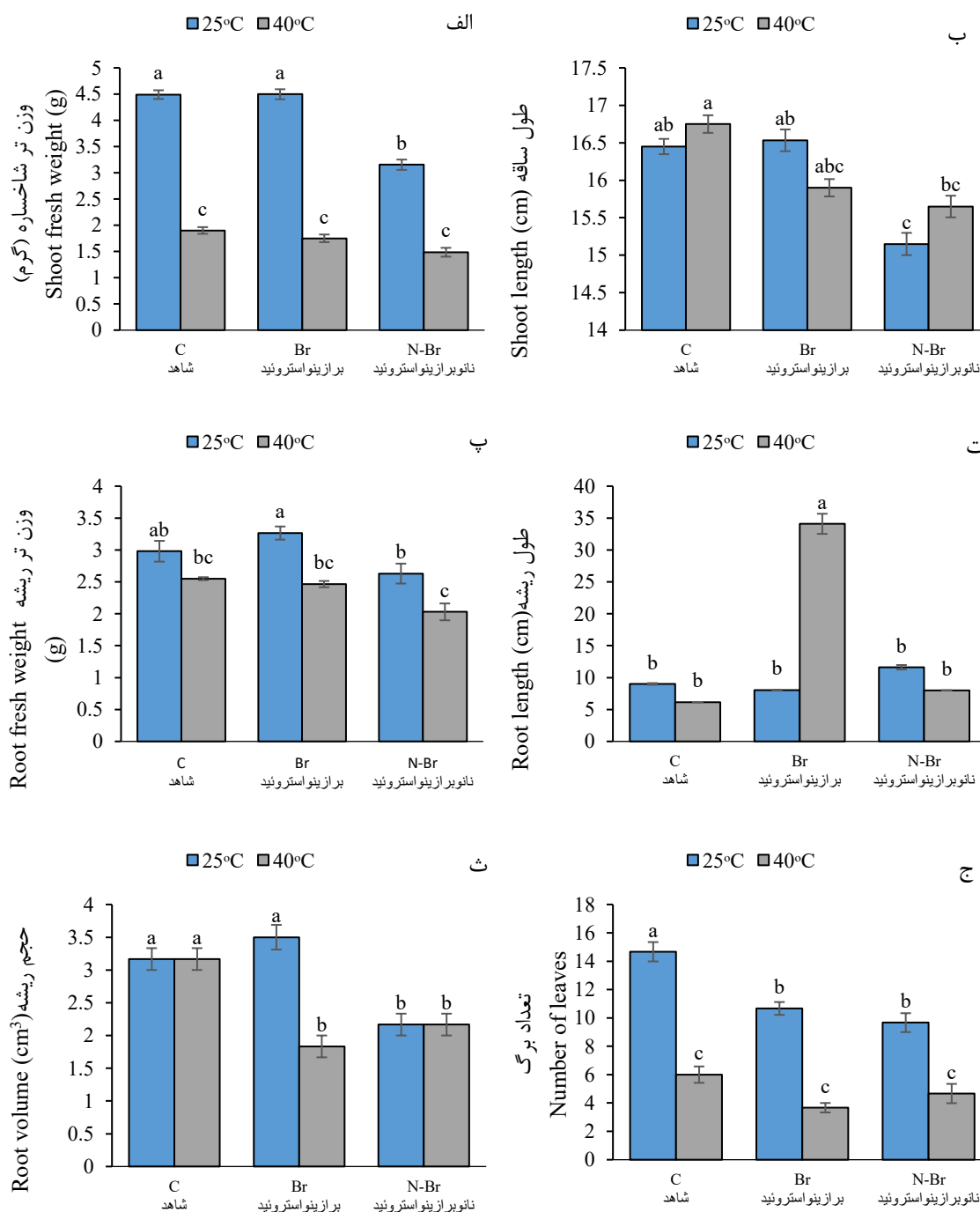
داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Statistix 8 تجزیه و تحلیل شدند و میانگین‌ها با استفاده از آزمون کمترین تفاوت معنی‌دار (LSD) در سطح معنی‌داری ۵ درصد ارزیابی شدند. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار اکسل استفاده شد. تجزیه و تحلیل مؤلفه اصلی (PCA) با استفاده از Statgraphics Centurion، نسخه XVI انجام گرفت.

نتایج و بحث

تأثیر تیمارها بر صفات رشدی کلم بروکسل

نتایج به دست آمده از اثرات متقابل تیمارها نشان داد که به طور کلی وزن تر شاخساره در دمای ۴۰ درجه سانتی-گراد نسبت به دمای ۲۵ درجه سانتی-گراد کاهش یافت، در دمای ۲۵ درجه سانتی-گراد تیمار شاهد (۱/۹۰۰ گرم) و براسینواستروئید (۱/۷۵۰ گرم) نسبت به نانو براسینواستروئید (۱/۴۸۵ گرم) بیشترین وزن تر شاخساره را داشت ولی در دمای ۴۰ درجه سانتی-گراد تفاوت معنی‌داری بین منابع براسینواستروئید مشاهده نشد (شکل ۱. الف). بیشترین طول ساقه در هر دو رژیم دمایی در تیمار شاهد و براسینواستروئید بود (شکل ۱. ب). وزن تر ریشه در دمای ۴۰ درجه سانتی-گراد کاهش یافت و کمترین میزان آن در تیمار نانو براسینواستروئید (۲/۰۳۰ گرم) بود، در دمای ۲۵ درجه سانتی-گراد بیشترین وزن تر ریشه در تیمار با براسینواستروئید (۳/۲۶۵ گرم) مشاهده شد (شکل ۱. پ). به طور خاص طول ریشه در دمای ۴۰ درجه سانتی-گراد در تیمار با براسینواستروئید (۳۴/۱۰۰ سانتی-متر) نسبت به شاهد (۶/۱۵۰ سانتی-متر) و نانو براسینواستروئید (۸/۰۰۰ سانتی-متر) افزایش یافت (شکل ۱. ت). تیمار با براسینواستروئید در دمای ۲۵ درجه سانتی-گراد بیشترین حجم ریشه (۳/۵۰۰ مترمکعب) و در دمای ۴۰ درجه سانتی-گراد کمترین حجم ریشه (۱/۸۳۳ مترمکعب) را داشت. در تیمار شاهد حجم ریشه در هر دو رژیم دمایی نیز حجم ریشه را نسبت به نانو براسینواستروئید افزایش داد (شکل ۱. ث). به طور کلی تعداد برگ در دمای ۴۰ درجه سانتی-گراد نسبت به

دمای ۲۵ درجه سانتی-گراد کاهش یافت اما تفاوت معنی‌داری بین منابع براسینواستروئید در دمای ۴۰ درجه سانتی-گراد مشاهده نشد، در حالی که در دمای ۲۵ درجه سانتی-گراد بیشترین تعداد برگ در تیمار شاهد بود (شکل ۱. ج).



شکل ۱- اثر رژیم‌های دمایی و منابع براسینواستروئید بر برخی شاخص‌های رشدی کلم بروکسل. میزان Error bar بر اساس خطای استاندارد رسم شده است و میانگین‌های دارای حروف مشترک، بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد با یکدیگر اختلاف معنی‌داری ندارند.

Figure 1- Effect of temperature regimes and sources of brassinosteroid on the growth characteristics of Brussels cabbage. The error bars are drawn based on the standard error and means followed by the same letters are not significantly different according to the LSD test ($p < 0.05$).

مطالعه تأثیر مثبتی بر وزن‌تر، تعداد برگ‌ها و ارتفاع بوته‌های کلم بروکسل در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد مشاهده نشد. به‌ویژه، در مقایسه با تیمار شاهد، اختلاف معنی‌داری در این پارامترها وجود نداشت. درحالی‌که، تحقیقات پیشین نشان می‌دهد که براسینواستروئیدها می‌توانند به بهبود فرآیندهای رشد کمک کنند (Kim et al., 2019)، اما نتایج ما حاکی از آن است که در شرایط خاص تنش گرمایی، این تأثیرات ممکن است محدود باشد. Phan و همکاران (۲۰۲۴) به این نتیجه رسیدند که غلظت مورد استفاده براسینواستروئید یک عامل کلیدی در بهبود رشد و عملکرد گیاهان سویا است. آن‌ها متوجه شدند که ارتفاع گیاه در غلظت ۰/۲ پی‌پی‌ام تفاوت معنی‌داری با گیاهان شاهد نداشت، درحالی‌که بیشترین ارتفاع گیاه در تیمار با ۰/۱ پی‌پی‌ام تحت تنش خشکی مشاهده شد. بنابراین، ضروری است که در تحقیقات آینده، غلظت براسینواستروئید و سایر عوامل مؤثر بر عملکرد گیاهان در معرض تنش حرارتی به‌طور دقیق‌تری مورد بررسی قرار گیرند.

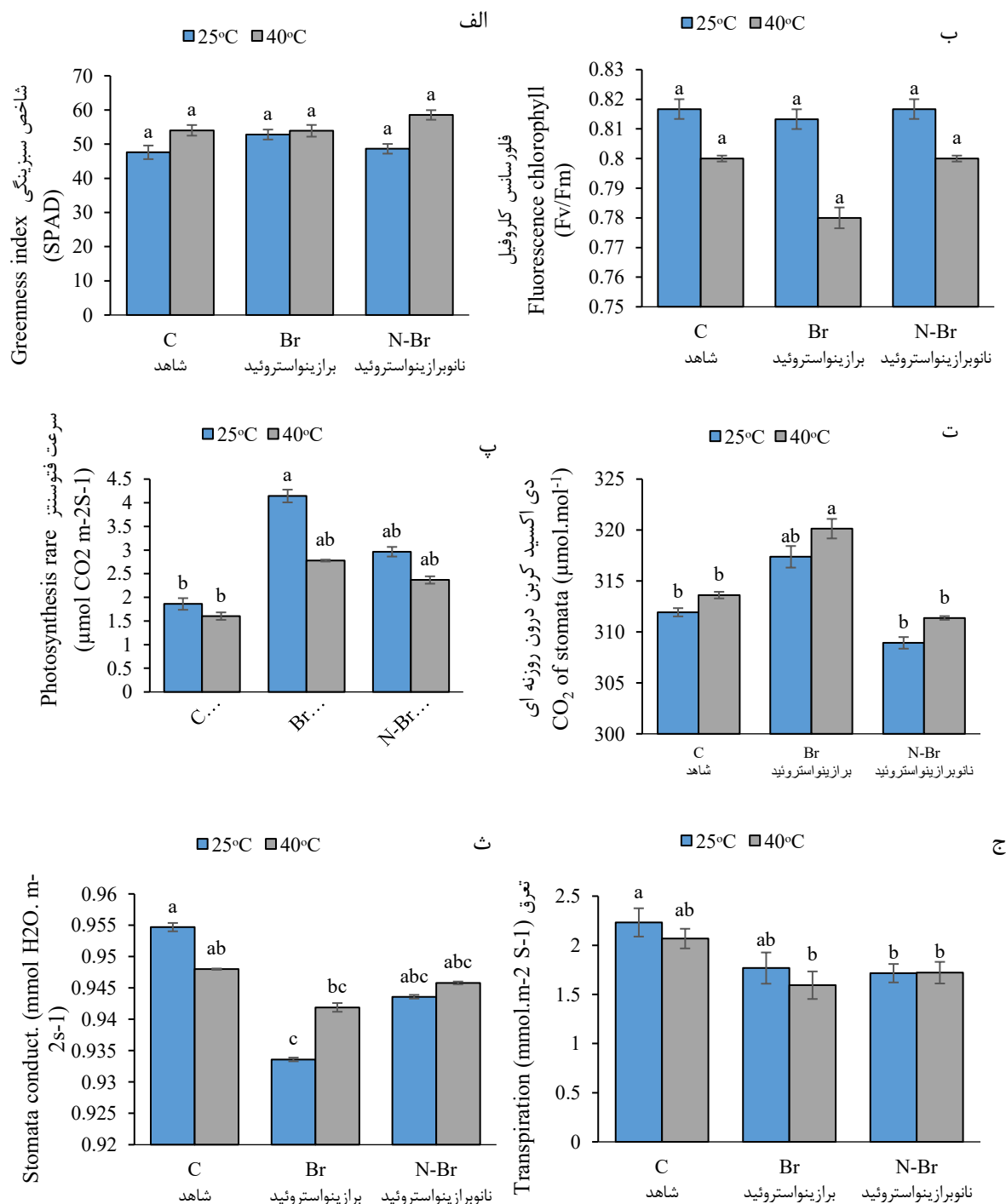
تأثیر تیمارها بر صفات فتوسنتزی کلم بروکسل

شاخص سبزی‌نگی و فلورسانس کلروفیل برگ‌های کلم بروکسل در هر دو رژیم دمایی و با منابع براسینواستروئید تفاوت معنی‌داری نشان نداد (شکل ۲. الف و ب). به‌طور خاص سرعت فتوسنتز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در تیمار با براسینواستروئید (۲/۷۷۷ میکرو مول دی‌اکسید کربن بر مترمربع بر ثانیه) نسبت به شاهد افزایش (۱/۶۰۳ میکرو مول دی‌اکسید کربن بر مترمربع بر ثانیه) یافت، اما تفاوت معنی‌داری با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد نداشت (شکل ۲. پ). دی‌اکسید کربن درون روزنه‌ای در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد نسبت به ۲۵ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت اگرچه این افزایش از نظر آماری معنی‌دار نبود و بیشترین دی‌اکسید کربن درون روزنه‌ای در تیمار با براسینواستروئید نسبت به شاهد و نانو براسینواستروئید در هر دو رژیم دمایی مشاهده شد (شکل ۲. ت). هدایت روزنه‌ای در هر دو رژیم دمایی در تیمار شاهد و نانو براسینواستروئید در

کلم‌ها محصولات گیاهی برگ‌داری می‌باشند که در سطح جهانی کشت و کار می‌شوند. آن‌ها محصولات فصل خنک هستند که به دماهای سرد کاملاً متحمل بوده اما با دماهای بالا سازگاری ندارند و عملکرد و کیفیت آن‌ها عمدتاً تحت تأثیر دماهای بالا قرار می‌گیرد (Quan et al., 2022b). بنابراین، بهبود تحمل تنش گرمایی مورد توجه پرورش‌دهندگان انواع کلم‌ها است. نتایج حاصل از مطالعات پیشین نشان داده است که محلول‌پاشی با براسینواستروئید موجب بهبود تحمل به تنش گرمایی در گیاهان سویا (Wang et al., 2022)، فلفل (Preet et al., 2023) و برنج (Nazir et al., 2023) شده است. مشاهده شده است که تنش‌های غیر زیستی باعث ایجاد تغییراتی در مورفولوژی، فیزیولوژی و بیوشیمی گیاهان می‌شوند. با این حال، در سال‌های اخیر، استفاده از نانو ترکیبات به‌عنوان یک استراتژی جهت کاهش تنش‌های غیرزنده مطرح شده است. Halaji و همکاران (۲۰۲۳) مطرح کردند در گیاهان فلفلی که تحت تنش دمای بالا بودند کاربرد نانو کپسول پتاسیم نسبت به فرم آزاد پتاسیم موجب کاهش شاخص‌های تنش گردید، بنابراین کاربرد نانو کپسول پتاسیم به‌کاررفته در دماهای بالا نسبت به پتاسیم استفاده‌شده در دماهای بالا از نظر صفات رشدی فلفل و اقدامات مقاومتی ارجحیت نشان داد.

گزارش شده است که تنش گرمایی باعث کاهش رشد اندام هوایی، رشد ریشه، تعداد ریشه، قطر ریشه، ارتفاع بوته و زیست‌توده گیاهی می‌شود (Siddiqui et al., 2015). بنابراین، کاهش زیست‌توده گیاه می‌تواند با کاهش ارتفاع گیاه، پژمردگی و ریزش برگ‌ها ناشی از تنش گرمایی همراه باشد (Wassie et al., 2019). در همین راستا نتایج حاصل از پژوهش ما نیز نشان داد که با کاهش ارتفاع و تعداد برگ‌های کلم بروکسل وزن‌تر اندام هوایی نیز کاهش یافت. با توجه به نتایج تحقیق حاضر، علی‌رغم اینکه براسینواستروئیدها به‌عنوان مولکول‌های سیگنال‌دهنده در فرآیندهای رشد شناخته می‌شوند (Chaiwanon & Wang, 2015)، در این

مقایسه با براسینواستروئید افزایش یافت (شکل ۲. ث). میزان تعرق نیز در هر دو رژیم دمایی در تیمار شاهد و افزایش پیدا کرد (شکل ۲. ج).



شکل ۲- اثر رژیم‌های دمایی و منابع براسینواستروئید بر برخی ویژگی‌های فتوسنتزی کلم بروکسل. میزان Error bar بر اساس خطای استاندارد رسم شده است و میانگین‌های دارای حروف مشترک، بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد با یکدیگر اختلاف معنی‌داری ندارند.

Figure 2- Effect of temperature regimes and sources of brassinosteroid on some photosynthesis characteristics of Brussels cabbage. The error bar is drawn based on the standard error, and means followed by the same letters are not significantly different according to the LSD test ($p < 0.05$).

Singh و Shono (۲۰۰۵) گزارش کردند که نشاء-های گوجه‌فرنگی تیمار شده با اپی براسینواستروئید دارای سرعت فتوسنتز بالاتری نسبت به گوجه‌فرنگی تیمار نشده تحت رژیم دمای بالا در روز/شب ۳۵/۲۷ درجه سانتی‌گراد بودند و کاربرد اپی براسینواستروئید سرعت فتوسنتز را هنگامی که گیاهان در معرض ۲۵/۲۵ قرار گرفتند افزایش داد. مطابق با نتایج فوق، نتایج پژوهش حاضر نیز نشان داد که براسینواستروئید در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد بیشترین سرعت فتوسنتز (۴/۱۴۲ میکرومول کربن دی‌اکسید بر مترمربع بر ثانیه) را نسبت به شاهد (۱/۸۶۰ میکرومول کربن دی‌اکسید بر مترمربع بر ثانیه) نشان داد. در مطالعه Thussaganpanit و همکاران (۲۰۱۵)، افزایش فتوسنتز خالص ناشی از کاربرد اپی براسینواستروئید منجر به افزایش رسانایی روزنه‌ای شد. علاوه بر این، گیاهان تیمار شده با اپی براسینواستروئید تعداد روزنه‌های باز بیشتری نسبت به تیمار شاهد داشتند (Serna *et al.*, 2012). هنگامی که گیاهان تعداد روزنه‌های باز بیشتری داشتند، شانس بیشتری برای ورود کربن دی‌اکسید به برگ‌ها و در نتیجه افزایش سرعت فتوسنتز داشتند (Serna *et al.*, 2012).

تأثیر تیمارها بر صفات فیزیولوژیکی کلم بروکسل

بیشترین پتانسیل آب برگ در هر دو رژیم دمایی در تیمار با براسینواستروئید بود (شکل ۳. الف). در هر دو رژیم دمایی تیمار با براسینواستروئید بیشترین محتوای نسبی آب را نشان داد و کمترین محتوای نسبی آب در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد در تیمار شاهد مشاهده شد (شکل ۳. ب). بیشترین میزان پروتئین در هر دو رژیم دمایی در تیمار با نانو براسینواستروئید بود (شکل ۳. پ). به‌طور کلی میزان پروتئین در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد نسبت به ۲۵ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت و بین منابع براسینواستروئید تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۳. ت). میزان فنول بر اساس میلی‌گرم گالیک اسید بر وزن تر گیاه در هر یک از منابع براسینواستروئید بین دو رژیم دمایی تفاوت معنی‌داری نداشت (شکل ۳. ث).

به‌طور کلی میزان فلاونوئید بر اساس میلی‌گرم کوئرستین بر وزن تر گیاه در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد نسبت به دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد افزایش پیدا کرد اما تفاوت معنی‌داری بین منابع براسینواستروئید مشاهده نشد (شکل ۳. ج). بیشترین میزان نشت الکترولیت در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد در تیمار شاهد (۹۴ درصد) و کمترین میزان آن در تیمار با نانو براسینواستروئید (۱۴/۸۰۳ درصد) مشاهده شد (شکل ۳. چ). کمترین میزان مالون دی‌آلدئید در هر دو رژیم دمایی در تیمار با براسینواستروئید نسبت به شاهد و نانو براسینواستروئید مشاهده شد (شکل ۳. ح). به‌طور کلی در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد آسبیزیک اسید نسبت به دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت اما بین منابع براسینواستروئید تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد بیشترین آسبیزیک اسید در تیمار با نانو براسینواستروئید بود (شکل ۳. خ). در هر دو رژیم دمایی با منابع مختلف براسینواستروئید تفاوت معنی‌داری در میزان پتاسیم برگ کلم بروکسل مشاهده نشد (شکل ۳. د).

در پژوهش حاضر تیمار با براسینواستروئید در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد بیشترین پتانسیل آب برگ (۱۵۲/۰- مگا پاسکال) را نسبت به تیمار شاهد (۳۶۰/۴- مگا پاسکال) نشان داد. Chaves و Seraphin (۲۰۰۱) نشان دادند که اپی براسینواستروئید تنظیم اسمزی را بهبود می‌بخشد که موجب بهبود تورژسانس و تنظیم هدایت روزنه در گیاهان در شرایط تنش می‌شود (Silveira *et al.*, 2009). گزارش شده است که کاربرد اپی براسینواستروئید محتوای نسبی آب را در گیاهان فلفل چیلی در شرایط خشکسالی افزایش داد (Khamsuk *et al.*, 2018). آن‌ها افزایش وضعیت آب گیاهان توسط اپی براسینواستروئید در شرایط تنش آبی را به دلیل افزایش پروتئین عنوان کردند. از آنجایی که اپی براسینواستروئید باعث افزایش محتوای پروتئین و کاهش قندهای محلول در گیاهان شد، بنابراین این نشان می‌دهد که پروتئین منبع اصلی تنظیم اسمزی است

(Rattan *et al.*, 2012). نتایج حاصل از پژوهش حاضر نیز نشان داد که در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد براسینواستروئید بیشترین محتوای نسبی آب (۷۰/۵۳۸ درصد) را نشان داد اما برخلاف نتایج فوق میزان پرولین در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد و نانو براسینواستروئید نداشت.

پرولین به‌عنوان یک اسیدآمین و یک املاح سازگار، در پاسخ به تنش‌های غیر زیستی مختلف، مانند دماهای بالا، تجمع می‌یابد و از غشای سلولی در برابر آسیب محافظت می‌کند تا استرس اسمزی را کاهش دهد (Ben Rejeb *et al.*, 2012). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد پرولین نسبت به دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در تیمار شاهد ۷۳ درصد افزایش یافت. نتایج حاصل از پژوهش Kaya و همکاران (۲۰۱۹) نشان داد که اپی براسینواستروئید در گیاهان فلفل تحت تنش آبی محتوای پرولین را افزایش داد، درحالی‌که در پژوهش حاضر تفاوت معنی‌داری بین تیمار براسینواستروئید و نانو براسینواستروئید با شاهد مشاهده نشد.

به گفته Pourcel و همکاران (۲۰۰۷) فلاونوئیدها متابولیت‌های ثانویه موجود در گیاهان هستند که تجمع آن‌ها در بافت‌ها و اندام‌های رویشی گیاه تحت تأثیر شرایط تنش زیستی و غیر زیستی قرار می‌گیرد. نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد فلاونوئیدها نسبت به دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد افزایش قابل‌توجهی داشتند. افزایش بیوسنتز فلاونوئیدها ممکن است نقش تنظیمی در فعال‌سازی سیستم آنزیم آنتی‌اکسیدانی ایفا کند، زیرا آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (سوپر اکسید دیسموتاز، پراکسیداز و کاتالاز) به‌طور گسترده به‌عنوان یک مکانیسم مهم توسط گیاهان برای سم‌زدایی گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) مورداستفاده قرار می‌گیرند. در یک مطالعه، Li و همکاران (۲۰۱۷) نشان دادند که براسینواستروئیدها می‌توانند غلظت فلاونوئید را در برگ‌های چای افزایش دهند. براسینواستروئیدها فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیاک لیاز را افزایش داده که موجب تولید مشتقات

فنیل پروپانوئیدهای خاص مانند فلاونوئیدها را افزایش می‌دهد (Li *et al.*, 2017).

آسیب‌های ناشی از تنش گرمایی ساختار غشا را تغییر می‌دهد و در نتیجه نشت الکترولیت از داخل سلول‌های گیاهی ایجاد می‌شود (Rann *et al.*, 2016). مالون دی‌آلدئید و نشت الکترولیت برای تعیین یکپارچگی غشای سلولی پس از مواجهه گیاهان با تنش - های مختلف استفاده می‌شود (Xu *et al.*, 2021). افزایش محتوای مالون دی‌آلدئید و نشت الکترولیت ناشی از تنش گرمایی در برگ‌های گوجه‌فرنگی مشاهده شد (Guo *et al.*, 2022). تنش گرمایی تغییراتی را در سیالیات غشا، نفوذپذیری و ترکیبات لیپیدی ایجاد می‌کند و باعث ناپایداری غشا از طریق نشت الکترولیت می‌شود (Niu & Xiang, 2018). نتایج حاصل از پژوهش حاضر نیز نشان داد که در تیمار شاهد دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد بیشترین نشت الکترولیت (۹۴ درصد) را نسبت به دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد (۲۵/۱۳۷ درصد) نشان داد و همچنین مالون دی‌آلدئید در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد (۹۶/۶۱۷ نانو مول بر گرم وزن‌تر) نسبت به دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد (۳۴/۲۷۲ نانو مول بر گرم وزن‌تر) مشاهده شد. گزارش شده است که براسینواستروئیدها باعث کاهش محتوای H_2O_2 و مالون دی‌آلدئید در برگ‌های گیاه گوجه‌فرنگی تحت دمای بالا می‌شود (Ogwen *et al.*, 2009). همسو با نتایج فوق نتایج حاصل از پژوهش حاضر نیز نشان داد که براسینواستروئید کمترین میزان مالون دی‌آلدئید (۴۲/۱۹۴ نانو مول بر گرم وزن‌تر) تحت تنش دمایی نسبت به تیمار شاهد (۹۶/۶۱۷ نانو مول بر گرم وزن‌تر) مشاهده شد. فرض بر این است که براسینواستروئیدها به‌عنوان پیام‌رسان ثانویه برای القای سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی در شرایط تنش عمل می‌کنند و در نتیجه گیاهان می‌توانند به‌طور مؤثری ROS را در گیاهان تحت تنش از بین ببرند (Mazorra *et al.*, 2011).

دمای بالا ممکن است تخریب را تحریک کند، اما تخریب افزایش‌یافته می‌تواند باعث کمبود آب شود که در نهایت باعث ایجاد سطح آب‌سبزیک اسید برای بسته شدن روزنه

نتایج فوق نشان داد که براسینواستروئید فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز و پراکسیداز را نسبت به شاهد افزایش داد، همچنین بیشترین فعالیت آنزیم کاتالاز نیز در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد در تیمار با نانو براسینواستروئید مشاهده شد.

تأثیر تیمارها بر ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی کلم بروکسل

کلیه‌ی ترکیبات فنولی در دمای بالا با کاربرد براسینواستروئید نسبت به شاهد و نانو براسینواستروئید افزایش یافتند و از میان ترکیبات فنولی کاتچین و سینامیک اسید بیشترین مقدار را نسبت به سایر ترکیبات فنولی در کلم بروکسل در تیمار با همه‌ی منابع براسینواستروئید داشتند. از میان ترکیبات فلاونوئیدی کوئرستین نسبت به سایر ترکیبات بیشترین مقدار را داشت که در تیمار شاهد مشاهده گردید، درحالی‌که کامفرول و مریستین در تیمار با براسینواستروئید نسبت به شاهد و نانو براسینواستروئید بیشتر بود (جدول ۲).
نتایج اثر تیمارها بر اسیدهای آمینه نشان داد که به‌طورکلی تیمار با براسینواستروئید و نانو براسینواستروئید در مقایسه با شاهد میزان اسیدهای آمینه را در دمای بالا افزایش داد و از میان اسیدهای آمینه، اسیدهای آمینه ضروری در کلم بروکسل بیشترین تغییر را در مقایسه با سایر اسیدهای آمینه نشان داد (جدول ۳).

طبق نتایج حاصل از نمودار PCA در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد تیمار براسینواستروئید بیشترین وزن‌تر و خشک ریشه، محتوای نسبی آب و سرعت فتوسنتز را نشان داد. در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تیمار شاهد بیشترین میزان پتاسیم، آبسیزیک اسید، پرولین و همچنین بیشترین میزان نشت الکترولیت و مالون دی آلدئید را نشان داد. براسینواستروئید فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، طول ریشه و دی‌اکسید کربن درون روزنه‌ای را در دمای بالا افزایش داد. (شکل ۵).

نتیجه‌گیری کلی

می‌شود (Macková *et al.*, 2013). در مطالعه Kurepin و همکاران (۲۰۰۸) کاربرد براسینولید برای گیاهانی که تحت تنش دمایی بالای ۴۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند، غلظت آبسیزیک اسید برگ را به‌طور مؤثر دو برابر کرد. درواقع براسینولید ممکن است با افزایش غلظت آبسیزیک اسید بافت برگ، تحمل تنش گرمایی را به گیاهان اعطا کند. نتایج حاصل از پژوهش حاضر نیز نشان داد که آبسیزیک اسید به‌طور قابل‌توجهی در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد نسبت به دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت.

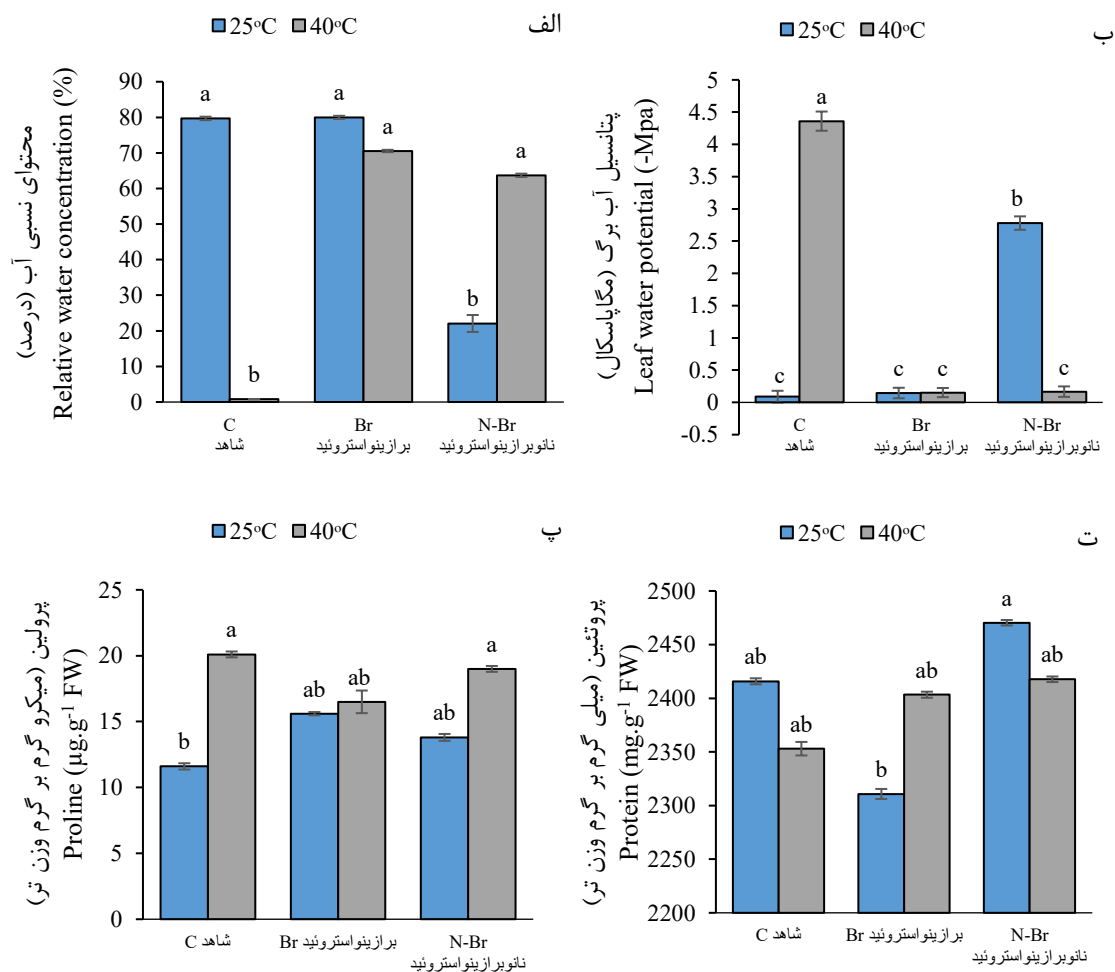
تأثیر تیمارها بر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کلم بروکسل

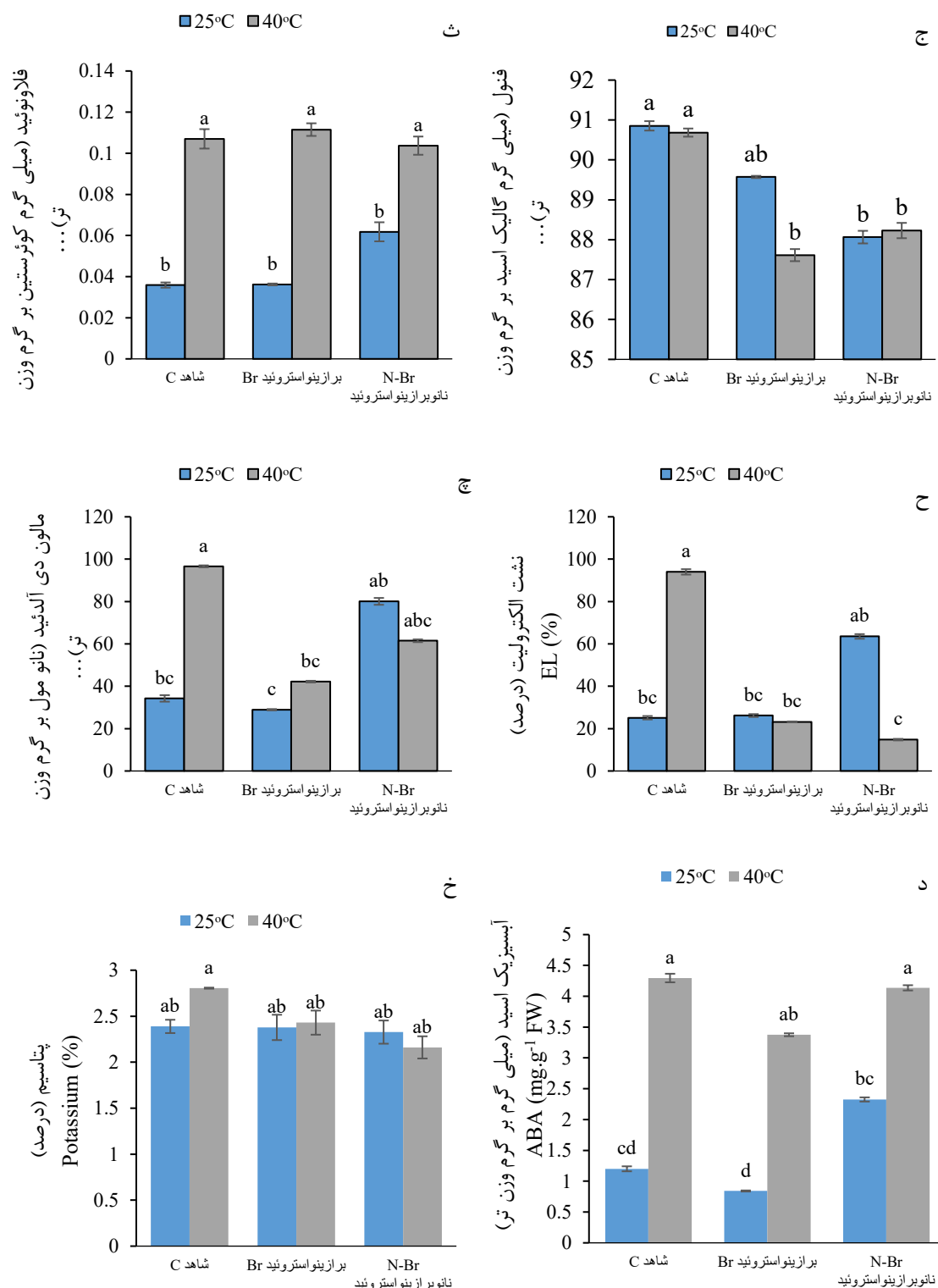
ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در هر دو رژیم دمایی بین منابع براسینواستروئید تفاوت معنی‌داری نداشت (شکل ۴. الف). به‌طور خاص فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد با تیمار براسینواستروئید و نانو براسینواستروئید نسبت به شاهد افزایش یافت (شکل ۴. ب). بیشترین فعالیت پراکسیداز در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد در تیمار براسینواستروئید مشاهده شد، در حالی‌که بین تیمار شاهد و نانو براسینواستروئید در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۴. پ). کاتالاز در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و در تیمار با نانو براسینواستروئید بیشترین میزان و در تیمار شاهد کمترین میزان فعالیت را داشت (شکل ۴. ت).

ای‌پی براسینواستروئید به‌طور مؤثر فعالیت آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز، پراکسیداز و کاتالاز را در برگ‌های سویا را بهبود بخشید که با کاهش قابل‌توجهی در میزان مالون‌دی‌آلدئید و H_2O_2 در مقایسه با تیمار شاهد شد (Wang *et al.*, 2022). این نتایج نشان می‌دهد که تیمار ای‌پی براسینواستروئید می‌تواند هموستاز ROS را تحت تنش گرمایی در برگ‌های سویا با افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی حفظ کند، که ممکن است برای کاهش آسیب به فتوسیستم ناشی از تنش گرمایی مفید باشد و درنهایت باعث رشد گیاه شود (Thussagunpanit *et al.*, 2015). نتایج حاصل از پژوهش حاضر نیز همسو با

براسینواستروئید با افزایش طول ریشه در شرایط تنش دمایی توانست محتوای نسبی آب برگ و میزان فتوسنتز را بهبود بخشد. نانو براسینواستروئید نتوانست بهبود معنی‌داری در رشد و مقاومت کلم‌ها نسبت به براسینواستروئید ایجاد کند.

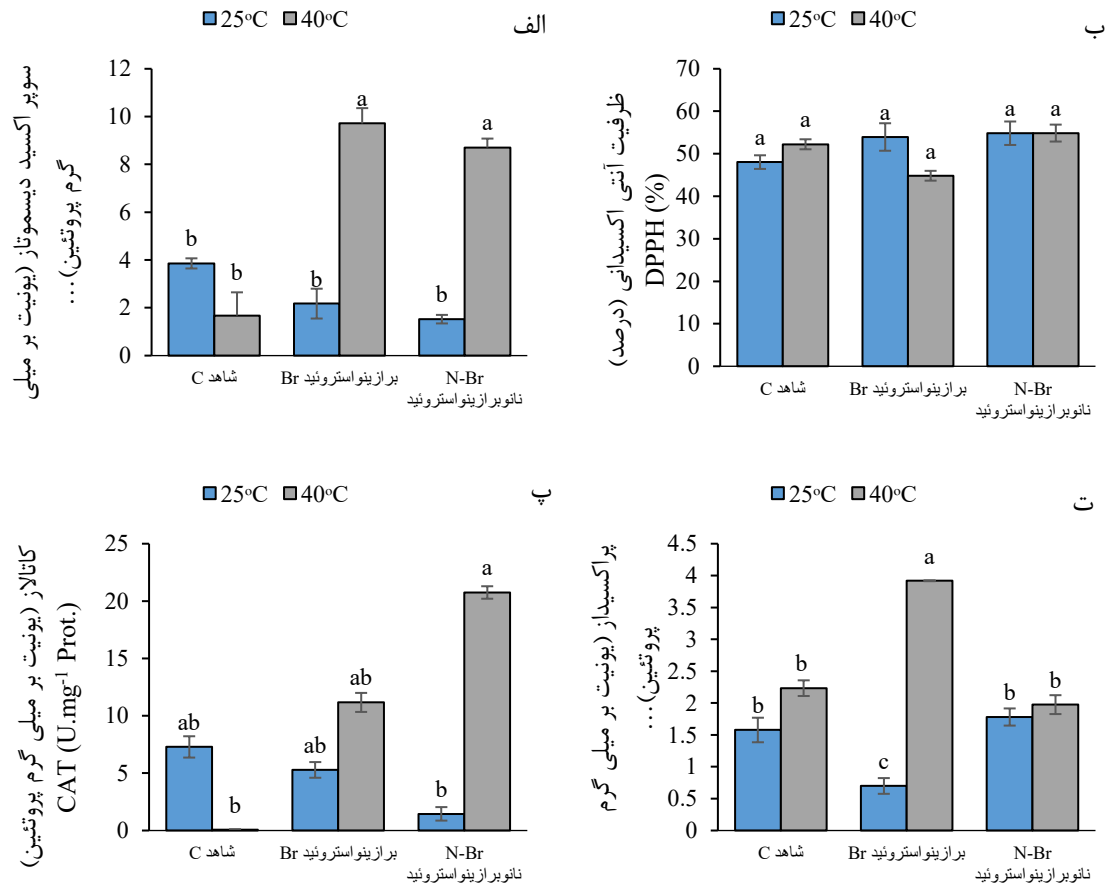
بر اساس نتایج ارائه‌شده، دمای بالا به‌عنوان یک تنش غیرزنده، باعث کاهش صفات رشدی در گیاه کلم بروکسل شد. از طرف دیگر، براسینواستروئید نقش مهمی در افزایش مقاومت کلم‌ها به دمای بالا ایفا کرد. در دمای بالا نشت الکترولیت و مالون‌دی‌آلدئید که از صفات مهم تنش هستند افزایش یافت اما براسینواستروئید با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی-اکسیدانی موجب کاهش این صفات گردید. علاوه بر این





شکل ۳- اثر رژیم‌های دمایی و منابع براسینواستروئید بر برخی ویژگی‌های فیزیولوژیکی کلم بروکسل. میزان Error bar بر اساس خطای استاندارد رسم شده است و میانگین‌های دارای حروف مشترک، بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد با یکدیگر اختلاف معنی‌داری ندارند.

Figure 3- Effect of temperature regimes and sources of brassinosteroid on some physiological characteristics of Brussels cabbage. The error bars are drawn based on the standard error, and means followed by the same letters are not significantly different according to the LSD test (p<0.05).



شکل ۴- اثر رژیم‌های دمایی و منابع براسینواستروئید بر فعالیت آنزیم‌های کلم بروکسل. میزان Error bar بر اساس خطای استاندارد رسم شده است و میانگین‌های دارای حروف مشترک، بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد با یکدیگر اختلاف معنی‌داری ندارند.

Figure 4- Effect of temperature regimes and sources of brassinosteroid on the enzyme activity of Brussels cabbage. The amount of error bar is drawn based on the standard error, and means followed by the same letters are not significantly different according to the LSD test ($p < 0.05$).

جدول ۲- تفاوت محتوای ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی در دمای بالا در مقایسه با دمای بهینه کلم بروکسل در تیمار با منابع مختلف براسینواستروئید.

Table 2- The difference in phenolic and flavonoid compounds content at high temperature compared to the optimal temperature of Brussels in the treatment with different brassinosteroid sources.

ترکیبات (Compounds)	شاهد (C)	براسینواستروئید (Br)	نانو براسینواستروئید (N-Br)
فتولیک اسید (میلی گرم بر ۱۰۰ گرم وزن خشک) Phenolic acid (mg.100 g ⁻¹ DW)			
گالیک اسید Gallic acid	10.629±0.096	14.781±0.131	10.720±0.097
کلروژنیک اسید Chlorogenic acid	8.864±0.064	12.669±0.116	7.548±0.062
وانیلیک Vanillic	8.849±0.074	12.550±0.115	7.520±0.062
کافئیک اسید Caffeic acid	8.872±0.076	12.815±0.117	7.561±0.063
روتین Rutin	11.691±0.107	17.012±0.141	12.628±0.1117
پ-کوماریک اسید P-Coumaric acid	9.384±0.083	13.868±0.122	8.481±0.074
کاتچین Catechines	25.475±0.152	25.439±0.152	37.398±0.170
فرولیک Ferulic	8.849±0.074	12.550±0.115	7.520±0.063
بنزوئیک Benzoic	8.872±0.076	12.815±0.117	7.561±0.064
آکاستین Acacatin	11.691±0.105	17.012±0.141	12.628±0.116
پیروکالول Pyrogallol	13.105±0.120	13.727±0.121	15.168±0.140
جنیستین Genistein	11.737±0.107	14.988±0.131	12.710±0.117
سینامیک اسید Cinnamic acid	11.408±0.104	25.688±0.154	12.120±0.110
کومارین Coumarin	8.467±0.071	14.366±0.130	6.834±0.060
لوتئولین Luteolin	8.497±0.072	12.550±0.115	6.889±0.061
فلاونوئید (میلی گرم بر ۱۰۰ گرم وزن خشک) Flavonoid (mg.100 g ⁻¹ DW)			
کوئرستین Quercetin	14.888±0.132	6.899±0.061	8.468±0.071
کامپفرول Kaempferol	2.867±0.021	3.541±0.031	2.770±0.021
مریستین Myricetine	2.476±0.020	3.249±0.031	1.929±0.018

داده‌ها تفاوت بین محتوای فنول و فلاونوئید را در دمای بالا در مقایسه با دمای بهینه نشان می‌دهد.

The data show the difference between phenol and flavonoid content at high temperatures compared with the optimum temperature.

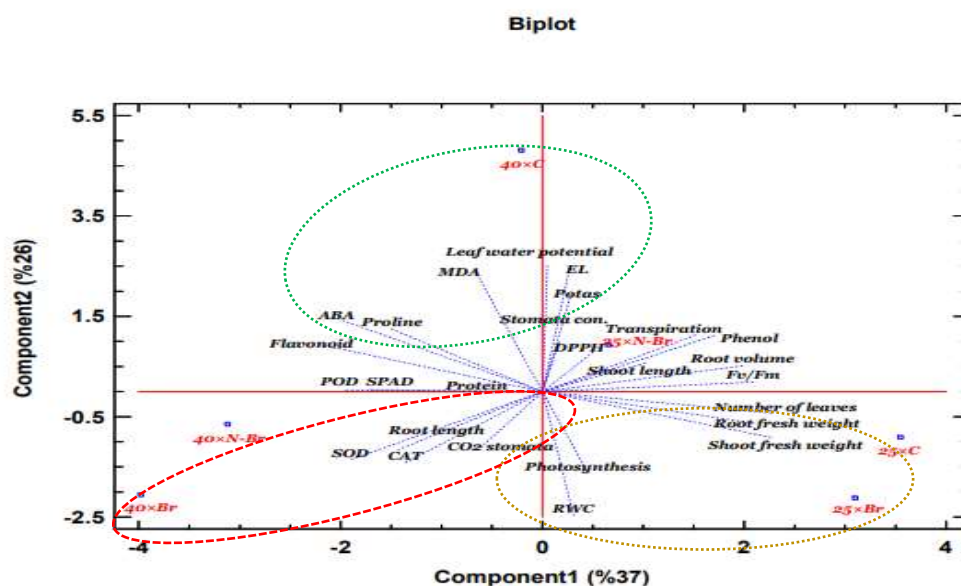
جدول ۳- تفاوت محتوای اسیدهای آمینه در دمای بالا در مقایسه با دمای بهینه کلم بروکسل در تیمار با منابع مختلف براسینواستروئید.

Table 3- The difference in amino acid content at high temperature compared to the optimal temperature of Brussels in the treatment with different brassinosteroid sources.

اسیدهای آمینه (میلی گرم بر ۱۰۰ گرم وزن تر) Amino acid (mg.100 g ⁻¹ FW)	شاهد C	براسینواستروئید Br	نانو براسینواستروئید N-Br
کل اسیدهای آمینه سولفوردار Total sulphur amino acids	-2.248 ±0.022	3.289 ±0.031	3.634 ±0.033
کل اسیدهای آمینه معطر Total aromatic amino acids	-2.973 ±0.024	3.850 ±0.036	4.200 ±0.040
کل اسیدهای آمینه ضروری Total essential amino acids	-3.093 ±0.030	3.928 ±0.037	4.361 ±0.041
کل اسیدهای آمینه غیرضروری Total non-essential amino acids	-35.070 ±0.165	47.824 ±0.180	48.031 ±0.180
کل اسیدهای آمینه Total amino acids	-63.300 ±0.188	90.550 ±0.193	88.340 ±0.192

داده‌ها تفاوت بین محتوای اسیدهای آمینه در دمای بالا را در مقایسه با دمای بهینه نشان می‌دهد. منفی کاهش اسید آمینه در دمای بالا را نسبت به دمای بهینه نشان می‌دهد.

The data shows the difference between amino acid content at high temperatures compared with optimum temperature. Minus shows the decrease in amino acid in high temperatures compared with the optimum temperature



شکل ۵- نمودار تجزیه و تحلیل مؤلفه اصلی (PCA) اثر رژیم‌های دمایی و منابع براسینواستروئید بر صفات مورفولوژی، فیزیولوژی و بیوشیمیایی کلم بروکسل. تیمارها شامل دو سطح رژیم دمایی (۲۵±۲ و ۴۰±۲ درجه سانتی‌گراد) و سه سطح منابع براسینواستروئید (آب مقطر (C)، براسینواستروئید (Br) و نانو براسینواستروئید (N-Br)).

Figure 5- Principal component analysis (PCA) plot of the effect of temperature regimes and brassinosteroid sources on morphological, physiological and biochemical traits of Brussels sprouts. Treatments included two levels of temperature regime (25±2 and 40±2°C) and three levels of brassinosteroid sources (distilled water (C), brassinosteroid (Br) and nano-brassinosteroid (N-Br)).

References

- Ahmad Lone, W., Majeed, N., Yaqoob, U. & John, R. (2022). Exogenous brassinosteroid and jasmonic acid improve drought tolerance in *Brassica Rapa* L. genotypes by modulating osmolytes, antioxidants and photosynthetic system. *Plant Cell Reports*, 41, 603-617. <https://doi.org/10.1007/s00299-021-02763-9>
- Ahuja, I., de Vos, R.C.H., Bones, A.M. & Hall, R.D. (2010). Plant molecular stress responses face climate change. *Trends in Plant Science*, 15, 664-674. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.08.002>
- Ali, S., Rizwan, M., Arif, M.S., Ahmad, R., Hasanuzzaman, M., Ali, B. & Hussain, A. (2020). Approaches in enhancing thermotolerance in plants: An updated review. *Journal of Plant Growth Regulation*, 39, 456-480. <https://doi.org/10.1007/s00344-019-09994-x>
- Bajji, M., Kinet, J.M. & Lutts, S. (2002). The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat. *Journal of Plant Growth Regulation*, 36, 61-70. <https://doi.org/10.1023/A:1014732714549>
- Bates, L.S., Waldram, R.P. & Teare, I.P. (1973). Rapid determination of free proline for water studies. *Plant and Soil*, 39, 205-208. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>
- Ben Rejeb, K., Abdelly, C. & Saviouré, A. (2012). Proline, a multifunctional amino-acid involved in plant adaptation to environmental constraints. *Biologie Aujourd'hui*, 206, 291-299. <https://doi.org/10.1051/jbio/2012030>
- Bjorkman, T. & Pearson, K.J. (1998). High temperature arrest of inflorescence development in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica* L.). *Journal of Experimental Botany*, 49, 101-106. <https://doi.org/10.1093/jxb/49.318.101>
- 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, 248-254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Branham, S.E., Stansell, Z.J., Couillard, D.M. & Farnham, M.W. (2017). Quantitative trait loci mapping of heat tolerance in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) using genotyping-by-sequencing. *Theoretical and Applied Genetics*, 130, 529-538. <https://doi.org/10.1007/s00122-016-2832-x>
- Buege, J.A. & Aust, S.D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, 52, 302-310. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(78)52032-6)
- Chaiwanon, J. & Wang, Z.Y. (2015). Spatiotemporal brassinosteroid signaling and antagonism with auxin pattern stem cell dynamics in Arabidopsis roots. *Current Biology*, 25, 1031-1042. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.02.046>
- Chaves, F.J.T. & Seraphin S.E. (2001). Change in osmotic potential and soluble carbohydrates levels in *Solanum lycocarpum* St.-Hil. In response to water stress. *Brazilian Journal of Botany*, 24, 199-204. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042001000200010>
- Farnham, M.W. & Bjorkman, T. (2011). Breeding vegetables adapted to high temperatures: a case study with broccoli. *HortScience*, 46, 1093-1097. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.46.8.1093>
- Fisher, R.A., Rees, D., Sayre, K.D., Lu, Z.M., Candon, A.G. & Saavedra, A.L. (1998). Wheat yield progress associated with higher stomatal conductance and photosynthetic rate, and cooler canopies. *Crop Science*, 38, 1467-1475. <https://doi.org/10.2135/cropsci1998.0011183X003800060011x>
- Güneş, A., Kordali, S., Turan, M. & Usanmaz Bozhüyük, A. (2019). Determination of antioxidant enzyme activity and phenolic contents of some species of the Asteraceae family from medicinal plants. *Industrial Crops and Products*, 137, 208-213.

- <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.05.042>
- Guo, T., Gull, S., Ali, M.M., Yousef, A.F., Ercisli, S., Kalaji, H.M., Telesiński, A., Auriga, A., Wróbel, J., Radwan, N.S. & Ghareeb, R.Y. (2022). Heat stress mitigation in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) through foliar application of gibberellic acid. *Scientific Reports*, 12, 11324. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-15590-z>
- Haghighi, M. & Abolghasemi, R. (2019). The effect of high and low temperature stress on growth, photosynthesis and antioxidant activity in the vegetative growth stage of tomato. *Journal of Vegetables Sciences*, 3, 53-65. (In Persian). <https://doi.org/10.22034/iuvs.2019.32822>
- Halaji, B., Haghighi, M., Amiri, A. & Kappel, N. (2023). Effects of potassium and nanocapsule of potassium on pepper growth and physiological changes in high-temperature stress. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 23, 6317-6330. <https://doi.org/10.1007/s42729-023-01486-y>
- 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. <https://doi.org/10.3390/ijms14059643>
- Jahan, M.S., Guo, S., Sun, J., Shu, S., Wang, Y., El-Yazied, A.A., Alabdallah, N.M., Hikal, M., Mohamed, M.H.M., Ibrahim, M.F.M. & Hasan, M.M. (2021). Melatonin-mediated photosynthetic performance of tomato seedlings under high-temperature stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 167, 309-320. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.08.002>
- Javed, R., Usman, M., Yücesan, B., Zia, M. & Gürel, E. (2017). Effect of zinc oxide (ZnO) nanoparticles on physiology and steviol glycosides production in micropropagated shoots of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Plant Physiology and Biochemistry*, 110, 94-99. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.05.032>
- Jones, J.B. (2005). Hydroponics: a practical guide for the soilless grower. CRC Press.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.08.024>
- Khamsuk, O., Sonjaroon, W., Suwanwong, S., Jutamanee, K. & Suksamrarn, A. (2018). Effects of 24-epibrassinolide and the synthetic brassinosteroid mimic on chili pepper under drought. *Acta Physiologiae Plantarum*, 40, 106. <https://doi.org/10.1007/s11738-018-2682-z>
- Khazaei, Z., Behnamian, M., Dezhsetan, S. & Estaji, A. (2023). The effect of green zinc oxide nanoparticles on the physicochemical properties of *Ganoderma lucidum* mushroom. *Journal of Vegetables Sciences*, 14, 01-24. (In Persian). <https://doi.org/10.22034/IUVS.2023.1972377.1247>
- Kim, H.J., Ku, K.M., Choi, S. & Cardarelli, M. (2019). Vegetal-derived biostimulant enhances adventitious rooting in cuttings of basil, tomato, and chrysanthemum via brassinosteroid-mediated processes. *Agronomy*, 9, 74. <https://doi.org/10.3390/agronomy9020074>
- Kishwar, A., Ranjit, S.G., Ram, N., Madhuban, G. & Aruna, T. (2011). A rapid method for estimation of abscisic acid and characterization of aba regulated gene in response to water deficit stress from rice. *American Journal of Plant Physiology*, 6, 144-156. <https://doi.org/10.3923/ajpp.2011.144.156>
- Koleva, I.I., van Beek, T.A., Linssen, J.P., de Groot, A. & Evstatieva, L.N. (2002). Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochemical Analysis*, 13, 8-17. <https://doi.org/10.1002/pca.611>

- Kothari, A. & Lachowiec, J. (2021). Roles of brassinosteroids in mitigating heat stress damage in cereal crops. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 2706. <https://doi.org/10.3390/ijms22052706>
- Kumari, A., Kumari, P., Rajput, V.D., Sushkova, S.N. & Minkina, T. (2022). Metal(loid) nanosorbents in restoration of polluted soils: Geochemical, ecotoxicological, and remediation perspectives. *Environmental Geochemistry and Health*, 44, 235-246. <https://doi.org/10.1007/s10653-021-00996-x>
- Kurepin, L.V., Qaderi, M.M., Back, T.G., Reid, D.M. & Pharis, R.P. (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. <https://doi.org/10.1007/s10725-008-9276-5>
- Li, X., Zhang, L., Ahammed, G.J., Li, Z.X., Wei, J.P., Shen, C., Yan, P., Zhang, L.P. & Han, W.Y. (2017). Nitric oxide mediates brassinosteroid-induced flavonoid biosynthesis in *Camellia sinensis* L. *Journal of Plant Physiology*, 214, 145-151. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2017.04.005>
- Lin, L.Z. & Harnly, J.M. (2010). Phenolic component profiles of mustard greens, yu choy, and 15 other brassica vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 6850-6857. <https://doi.org/10.1021/jf1004786>
- Lisiewska, Z., Kmiecik, W. & Korus, A. (2008). The amino acid composition of kale (*Brassica oleracea* L. var. acephala), fresh and after culinary and technological processing. *Food Chemistry*, 108, 642-648. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.030>
- Loh, F.C.W., Grabosky, J.C. & Bassuk, N.L. (2002). Using the SPAD 502 meter to assess chlorophyll and nitrogen content of benjamin fig and cottonwood leaves. *HortTechnology*, 12, 682-686. <https://doi.org/10.21273/HORTTECH.12.4.682>
- López-Serrano, L., Canet-Sanchis, G., Vuletin Selak, G., Peñella, C., San Bautista, A., López-Galarza, S. & Calatayud, Á. (2019). Pepper rootstock and scion physiological responses under drought stress. *Frontiers in Plant Science*, 10, 38. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00038>
- Macková, H., Hronková, M., Dobrá, J., Turečková, V., Novák, O., Lubovská, Z., Motyka, V., Haisel, D., Hájek, T., Prášil, I.T., Gaudinová, A., Štorchová, H., Ge, E., Werner, T., Schmülling, T. & Vanková, R. (2013). Enhanced drought and heat stress tolerance of tobacco plants with ectopically enhanced cytokinin oxidase/dehydrogenase gene expression. *Journal of Experimental Botany*, 64, 2805-2815. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert131>
- Maghsoudi, K., Ashrafi Dehkordi, E. & Mazloumi, S.M. (2021). The role of brassinosteroids and salicylic acid on spinach growth and cadmium accumulation under cadmium stress. *Journal of Vegetables Sciences*, 4, 15-33. (In Persian). <https://doi.org/10.22034/iuvs.2021.139084.1125>
- Maia Júnior, S.D.O., Andrade, J.R.D., Nascimento, R.D., Lima, R.F.D., Bezerra, C.V.D.C. & Ferreira, V.M. (2022). Brassinosteroid application increases tomato tolerance to salinity by changing the effects of stress on membrane integrity and gas exchange. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 44, e55647. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v44i1.55647>
- Manghwar, H., Hussain, A., Ali, Q. & Liu, F. (2022). Brassinosteroids (BRs) role in plant development and coping with different stresses. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 1012. <https://doi.org/10.3390%2Fijms23031012>
- Maxwell, K. & Johnson, G.N. (2000). Chlorophyll fluorescence a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51, 659-668. <https://doi.org/10.1093/jexbot/51.345.659>
- Mazorra, L.M., Holton, N., Bishop, G.J. & Núñez, M. (2011). Heat shock response in

- tomato brassinosteroid mutants indicates that thermotolerance is independent of brassinosteroid homeostasis. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49, 1420-1428.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.09.005>
- Mozafari, M.R., Johnson, C., Hatziantoniou, S. & Demetzos, C. (2008). Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology. *Journal of Liposome Research*, 18, 309-327.
<https://doi.org/10.1080/08982100802465941>
- Murillo-Amador, B., Yamada, S., Yamaguchi, T., Rueda-Puente, E., Ávila-Serrano, N., García-Hernández, J.L. & Nieto-Garibay, A. (2007). Influence of calcium silicate on growth, physiological parameters and mineral nutrition in two legume species under salt stress. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 193, 413-421.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-037X.2007.00273.x>
- Nasrallah, A.K., Kheder, A.A., Kord, M.A., Fouad, A.S., El-Mogy, M.M. & Atia, M.A. (2022). Mitigation of salinity stress effects on broad bean productivity using calcium phosphate nanoparticles application. *Horticulturae*, 8, 75.
<https://doi.org/10.3390/horticulturae8010075>
- Nazir, F., Jahan, B., Kumari, S., Iqbal, N., Albaqami, M., Sofo, A. & Khan, M.I.R. (2023). Brassinosteroid modulates ethylene synthesis and antioxidant metabolism to protect rice (*Oryza sativa*) against heat stress-induced inhibition of source-sink capacity and photosynthetic and growth attributes. *Journal of Plant Physiology*, 289, 154096.
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2023.154096>
- Niu, Y. & Xiang, Y. (2018). An overview of biomembrane functions in plant responses to high-temperature stress. *Frontiers in Plant Science*, 9, 915.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00915>
- Ogwen, J.O., Song, X.S., Hu, W.H., Shi, K., Zhou, Y.H. & Yu, J.Q. (2009). Detached leaves of tomato differ in their photosynthetic physiological response to moderate high and low temperature stress. *Scientia Horticulturae*, 123, 17-22.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.07.011>
- Phan, V.H., Le, T.T.H., Pham, D.M., Nguyen, L.T.T., Nguyen, K.C. & Bui, T.M. (2024). Effects of concentration and time of brassinosteroid treatment on growth and yield of soybean under drought stress conditions. *Plant Science Today*, 11.
<https://doi.org/10.14719/pst.3089>
- Pourcel, L., Routaboul, J.M. & Cheynier, V. (2007). Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. *Trends in Plant Science*, 12, 29-36.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.11.006>
- Preet, T., Ghai, N., Jindal, S.K. & Sangha, M.K. (2023). Salicylic acid and 24-epibrassinolide induced thermotolerance in bell pepper through enhanced antioxidant enzyme system and heat shock proteins. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 25, 171-183.
<https://doi.org/10.52547/jast.25.1.171>
- Quan, J., Zheng, W., Tan, J., Li, Z., Wu, M., Hong, S.B., Zhao, Y., Zhu, Z. & Zang, Y. (2022a). Glutamic acid and poly-γ-glutamic acid enhanced the heat resistance of Chinese cabbage (*Brassica Rapa* L. ssp. *pekinensis*) by improving carotenoid biosynthesis, photosynthesis, and ROS signaling. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 11671.
<https://doi.org/10.3390/ijms231911671>
- Quan, J., Zheng, W., Wu, M., Shen, Z., Tan, J., Li, Z., Zhu, B., Hong, S.B., Zhao, Y., Zhu, Z. & Zang, Y. (2022b). Glycine betaine and β-aminobutyric acid mitigate the detrimental effects of heat stress on Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) seedlings with improved photosynthetic performance and antioxidant system. *Plants*, 11, 1213.
<https://doi.org/10.3390/plants11091213>
- Rann, A., Anusontpornperm, S., Thanachit, S. & Sreewongchai, T. (2016). Response of KDML105 and RD41 rice varieties grown

- on a Typic Natrustalf to granulated pig manure and chemical fertilizers. *Agriculture and Natural Resources*, 50, 104-113. <https://doi.org/10.1016/j.anres.2015.12.001>
- Rattan, A., Kapoor, N. & Bhardwaj, R. (2012). Role of brassinosteroids in osmolytes accumulation under salinity stress in *Zea mays* plants. *International Journal of Science and Research*, 3, 1822-1827.
- Ravanfar, S.A., Orbovic, V., Moradpour, M., Abdul Aziz, M., Karan, R., Wallace, S. & Parajuli, S. (2017). Improvement of tissue culture, genetic transformation, and applications of biotechnology to Brassica. *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews*, 33, 1-25. <https://doi.org/10.1080/02648725.2017.1309821>
- Rodriguez-Dominguez, C.M., Forner, A., Martorell, S., Choat, B., Lopez, R., Peters, J.M.R., Pfautsch, S., Mayr, S., Carins-Murphy, M.R., McAdam, S.A.M., Richardson, F., Diaz-Espejo, A., Hernandez-Santana, V., Menezes-Silva, P.E., Torres-Ruiz, J.M., Batz, T.A. & Sack, L. (2022). Leaf water potential measurements using the pressure chamber: Synthetic testing of assumptions towards best practices for precision and accuracy. *Plant, Cell & Environment*, 45, 2037-2061. <https://doi.org/10.1111/pce.14330>
- Serna, M., Hernández, F., Coll, F. & Amorós, A. (2012). Brassinosteroid analogues effect on yield and quality parameters of field-grown lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Scientia Horticulturae*, 143, 29-37. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.05.019>
- Siddiqui, M.H., Al-Khaishany, M.Y., Al-Qutami, M.A., Al-Waibi, M.H., Grover, A., Ali, H.M. & Al-Wahibi, M.S. (2015). Morphological and physiological characterization of different genotypes of faba bean under heat stress. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22, 656-663. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.06.002>
- Silveira, J.A.G., Araújo, S.A.M., Lima, J.P.M.S. & Viégas, R.A. (2009). Roots and leaves display contrasting osmotic adjustment mechanisms in response to NaCl-salinity in *Atriplex nummularia*. *Environmental and Experimental Botany*, 66, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2008.12.015>
- Singh, I. & Shono, M. (2005). Physiological and molecular effects of 24- epibrassinolide, a brassinosteroid on thermotolerance of tomato. *Plant Growth Regulation*, 47, 111-119. <https://doi.org/10.1007/s10725-005-3252-0>
- Singleton, V.L. & Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158. <https://doi.org/10.5344/ajev.1965.16.3.144>
- Thussagunpanit, U., Jutamanee, K., Kaveeta, L., Chai-arree, W., Pankean, P., Homvisasevongsa, S. & Suksamrarn, A. (2015). Comparative effects of brassinosteroid and brassinosteroid mimic on improving photosynthesis, lipid peroxidation, and rice seed set under heat stress. *Journal of Plant Growth Regulation*, 34, 320-331. <https://doi.org/10.1007/s00344-014-9467-4>
- Wang, W., Xie, Y., Liu, C. & Jiang, H. (2022). The exogenous application of brassinosteroids confers tolerance to heat stress by increasing antioxidant capacity in soybeans. *Agriculture*, 12, 1095. <https://doi.org/10.3390/agriculture12081095>
- Wassie, M., Zhang, W., Zhang, Q., Ji, K. & Chen, L. (2019). Effect of heat stress on growth and physiological traits of alfalfa (*Medicago sativa* L.) and a comprehensive evaluation for heat tolerance. *Agronomy*, 9, 597. <https://doi.org/10.3390/agronomy9100597>
- Xia, X.J., Fang, P.P., Guo, X., Qian, X.J., Zhou, J., Shi, K., Zhou, Y.H. & Yu, J.Q. (2018). Brassinosteroid-mediated apoplastic H₂O₂-glutaredoxin 12/14 cascade regulates antioxidant capacity in response to chilling in tomato. *Plant, Cell & Environment*, 41,

1052-1064.

<https://doi.org/10.1111/pce.13052>

Xu, Y., Chu, C. & Yao, S. (2021). The impact of high-temperature stress on rice: Challenges and solutions. *Crop Journal*, 9, 963-976.

<https://doi.org/10.1016/j.cj.2021.02.011>

Yazdizadeh Shotorbani, N., Jamei, R. & Heidari, R. (2013). Antioxidant activities of two sweet pepper *Capsicum annuum* L cultivars phenolic extracts and the effects of thermal treatment. *American Physiological Society Journal*, 3, 25-34.

<https://doi.org/10.22038/ajp.2012.8>

Yusuf, M., Khan, M.T.A., Faizan, M., Khalil, R. & Qazi, F. (2022). Role of brassinosteroids and its cross-talk with other phytohormones in plant responses to heavy metal stress, in: Khan, M.T.A., Yusuf, M., Qazi, F. & Ahmad, A. (Eds), *Brassinosteroids signalling*. Springer, Singapore, pp. 179-201.

Zhou, B., Chao, Q. & Huang, L. (2015). The core conclusions and interpretation of working group I contribution to the fifth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. *Chinese Journal of Urban and Environmental Studies*, 3, 1550003.

<https://doi.org/10.1142/S234574811550007>