Crop Biotechnology Open Access

Autumn (2024) 14 (1): 15-28.
DOI: 10.30473/cb.2024.70956.1964

ORIGINAL ARTICLE

The effect of 24-epibrasinolide (24-EBL) on physiological and biochemical pathways of *Lactuca sativa* L. under drought stress conditions

Zeinab Chaghakaboodi[1](ORCID: 0000000170548803), Seyyed Hassan Mousavi[2], Mahdi Kakaei[3]

1. Department of Plant Production Engineering and Genetics, Campus of Agriculture and Natural Resources, Faculty of agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran.
2. Greenhouse and Controlled Environments Research Center, Department of Post Harvest Physiology and Technology, Horicultural Sceinces Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran.
3. Department of Agricultural Sciences, Payame Noor University, Tehran, Iran.

Correspondence:
Zeinab Chaghakaboodi
Email:
z.chaghakaboodi@razi.ac.ir

Received: 06, Apr. 2024
Accepted: 28, Aug. 2024

How to cite:
Chaghakaboodi, Z., Mousavi, S. H., & Kakaei, M. (2024). The effect of 24-epibrasinolide (24-EBL) on physiological and biochemical pathways of lettuce (*Lactuca sativa* L.) under drought stress conditions. *Crop Biotechnology*, 14 (1), 15-28.
(DOI: 10.30473/cb.2024.70956.1964)

ABSTRACT

Brassinosteroids are steroid hormones that are essential for the growth and development of plants and play a significant role in plant responses to stress. This study delves into examining how 24-epibrassinolide influences seedling indices, physiological and biochemical traits in specific lettuce genotypes under drought stress. The factorial experiment was conducted using a completely randomized statistical design with four replicates at the research laboratory of plant physiology, Faculty of Agriculture, Agriculture and Natural Resources Campus, Razi University, Kermanshah, Iran in 2023. The experiment included two selected lettuce genotypes, namely Icy and Romaine, as the first factor. The second factor comprised seed pretreatment at four levels of priming with 24-epibrassinolide (0, 50, 100, and 150 µM), while the third factor consisted of drought stress at four levels (0%, 10%, 20%, and 30%) induced by mannitol. The assessed traits encompassed germination rate, root length, stem length, Relative Water Content (RWC), total sugar content, total phenol content, and flavonoid content. Comparative analysis of average traits revealed that the levels of biochemical traits, specifically total sugar (0.480 mg/l), phenol (460.83 mg/l), and flavonoid (1.047 µg/l), escalated with higher levels of drought stress. Principal component analysis indicated that the first two components elucidated 64% of the variations. The findings suggest that priming with 150µM of 24-epibrassinolide hormone is advisable to attain the highest seedling indices in lettuce. According to the results obtained in this research, the Romaine line is introduced as the best line in drought stress conditions.

KEYWORDS

Lactuca sativa., Mannitol, Total phenol content, Total sugar content.

Copyright © 2024 The Authors. Published by Payame Noor University.
This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.

زیست‌فناوری گیاهان زراعی

سال چهاردهم، شماره یکم، پیاپی ۴۷، پاییز ۱۴۰۳ (۲۸-۱۵)

DOI: 10.30473/cb.2024.70956.1964

«مقاله پژوهشی»

اثر ۲۴-اپی‌براسینولید بر مسیرهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه *Lactuca sativa* L. تحت شرایط تنش خشکی

زینب چقاکبودی[۱](ارکید: ۰۰۰۰۰۰۰۱۷۰۵۴۸۸۰۳)، سید حسن موسوی[۲]، مهدی کاکائی[۳]

۱. گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران.

۲. پژوهشکده گلخانه و محیط های کنترل شده، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

۳. گروه علوم کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.

نویسنده مسئول:
زینب چقاکبودی
رایانامه: z.chaghakaboodi@razi.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۱/۱۸
تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۶/۰۷

استناد به این مقاله:
چقاکبودی، زینب؛ موسوی، سیدحسن و کاکائی، مهدی (۱۴۰۳). اثر ۲۴-اپی‌براسینولید بر مسیرهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه کاهو (*Lactuca sativa* L.) تحت شرایط تنش خشکی ، فصلنامه علمی زیست‌فناوری گیاهان زراعی، ۱۴ (۱)، ۲۸-۱۵.
(DOI: 10.30473/cb.2024.70956.1964)

چکیده

براسینواستروئیدها هورمون‌های استروئیدی هستند که برای رشد و نمو گیاه ضروری‌اند و نقش مهمی در پاسخ به تنش در گیاهان دارند. در این تحقیق اثر ۲۴- اپی‌براسینولید بر روی شاخص‌های گیاهچه و صفات بیوشیمیایی ژنوتیپ‌های انتخابی گیاه کاهو تحت تنش خشکی مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی با چهار تکرار در آزمایشگاه تحقیقاتی فیزیولوژی گیاهی دانشکده کشاورزی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه رازی در سال ۱۴۰۲ اجرا گردید. در این آزمایش فاکتور اول شامل دو لاین انتخابی کاهو شامل (یخی و رومن) بود. فاکتور دوم شامل پیش تیمار بذر در چهار سطح پرایمینگ با ۲۴- اپی براسینولید (صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار) و فاکتور سوم شامل تنش خشکی در چهار سطح (صفر، ۱۰٪، ۲۰٪ و ۳۰٪) با مانیتول بود. صفات مورد اندازه گیری شامل سرعت جوانه زنی، طول ریشه‌چه، طول ساقه چه، محتوای آب نسبی، محتوای قند کل، محتوای فنل کل و محتوای فلاوونوئید بود. مقایسه میانگین اثرات متقابل سه گانه نشان داد که با افزایش سطح تنش خشکی محتوای صفات بیوشیمیایی شامل قند کل (۰/۴۸۰ میلی گرم در لیتر)، فنل (۴۶۰/۸۳ میلی گرم در لیتر) و فلاوونوئید (۱/۰۴۷ میکروگرم در لیتر) افزایش یافتند. تجزیه به مولفه‌های اصلی نیز نشان داد که دو مولفه اول ۶۴ درصد از تغییرات را توجیه کردند. نتایج نشان داد که پرایمینگ با ۱۵۰ میکرومولار هورمون ۲۴- اپی‌براسینولید برای دستیابی به بیشترین مقدار شاخص‌های گیاهچه گیاه کاهو توصیه می‌گردد. با توجه به نتایج بدست آمده در این تحقیق لاین رومن به عنوان لاین برتر در شرایط تنش خشکی معرفی می‌گردد.

واژه‌های کلیدی

Lactuca sativa، مانیتول، محتوای کل فنل، محتوای قند کل.

حق انتشار این مستند، متعلق به نویسندگان آن است. ۱۴۰۳ ©. ناشر این مقاله، دانشگاه پیام نور است.

این مقاله تحت گواهی زیر منتشرشده و هر نوع استفاده غیرتجاری از آن مشروط بر استناد صحیح به مقاله و با رعایت شرایط مندرج در آدرس زیر مجاز است.
Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

مقدمه

Lactuca sativa یکی از مهمترین گیاهان برگی است که عمدتاً برای مصارف تازه خوری و سالادی استفاده می‌شود. در کشور ما نیز، کاهو یکی از معروف ترین و متداول ترین سبزی‌های برگی به شمار می‌رود که تقریباً در تمامی مناطق مستعد در شهرها و روستاهای ایران تولید م شود. کاهو به تنهایی به صورت تازه در تهیه سالاد یا همراه با سایر سبزی‌های سالادی بصورت خام مورد استفاده قرار می گیرد. در برخی از کشورها ساقه کاهو را بصورت پخته مصرف می‌کنند (Jafari *et al*., 2021). کاهو سرشار از ویتامین‌ها و مواد ضروری برای سلامتی انسان است. وجود مقادیر فراوانی از آهن، منگنز، فسفر، پتاسیم، بتا کاروتن، ویتامین‌های C وB9 در برگ‌های کاهو، ارزش غذایی این سبزی را ارتقا بخشیده است. کاهو با نام علمی (*Lactuca sativa* L.) یک سبزی برگی یکساله، خودگشن، دیپلوئید (2n=2x=18)، محصول فصل خنک از تیره کلاه‌پرکها[1] از زیرتیره شیکوریده[2] و از دولپه‌ای‌ها بوده و عمدتاً در مناطق معتدله بخاطر برگ‌های خوراکی مورد کشت و کار قرار می‌گیرد. مرکز اصلی و مبدا اولیه کاهو در نواحی مدیترانه و جنوب غرب آسیا است (Mohebi and Mousavi, 2019). کشت آن معمولاً شامل تکثیر محصول منحصراً از طریق بذر است که سپس برای رشد گیاهچه برای کاشت استفاده می‌شود (Chadha and Florentine, 2021).

کیفیت بذر نقش مهمی در توسعه موفق محصولات زراعی تکثیر شده با بذر مانند کاهو دارد. کیفیت بذر کاهو ارتباط تنگاتنگی با استقرار و رشد نهال دارد. بذور با بنیه کم یا کیفیت پایین ممکن است منجر به نهال‌هایی شود که نسبت به شرایط محیطی نامطلوب حساس تر هستند (Govindaraj *et al*., 2017؛ Gallegos-Cedillo *et al*., 2024). شرایط نامطلوب می‌تواند شامل عواملی مانند دمای زیاد، سطوح رطوبت ناکافی، کمبود مواد مغذی، یا قرار گرفتن در معرض آفات و بیماری‌ها باشد. نهال‌هایی که از دانه‌های با کیفیت پایین به دست می‌آیند ممکن است برای مقابله با این شرایط تلاش کنند که منجر به کاهش بنیه، رشد کندتر و افزایش آسیب پذیری در برابر عوامل استرس‌زا می‌شود (Gallegos-Cedillo *et al*., 2024). برای اطمینان از استقرار بهینه گیاهچه، استفاده از بذرهای با کیفیت بالا مهم است. کیفیت بذر توسط عوامل مختلفی از جمله صفات ژنتیکی، بلوغ بذر، شرایط نگهداری و تیمار بذر تعیین می شود. بذر کاهو با کیفیت بالا معمولاً دارای ویژگی‌هایی مانند سرعت جوانه زنی بالا، یکنواختی، قدرت و مقاومت در برابر بیماری ها است. با انتخاب و استفاده از بذر کاهو با کیفیت بالا، پرورش دهندگان می توانند شانس دستیابی به گیاهچه های سالم و قوی را افزایش دهند. این به نوبه خود به موفقیت کلی کشت کاهو کمک می‌کند و محصول قوی‌تری را تضمین می کند که می تواند بهتر در شرایط محیطی غیربهینه مقاومت کند.

تنش خشکی یکی از مهم‌ترین تنش‌های غیرزیستی است که هر ساله تلفات زیادی را به همراه دارد (Wang *et al*., 2024). عملکرد و بقاء گیاهان همیشه به‌واسطهٔ تنش‌های مختلف محیطی در معرض تهدید می‌باشد و به همین علت تحقیقات زیادی در ارتباط با بررسی پاسخ گیاهان از نقطه نظر ژنتیکی و فیزیولوژیکی جهت شناسایی سازوکارهای تحمل به تنش انجام شده است. اما این مهم، هنوز نیازمند درک عمیق‌تر از سازوکارهای سلولی و مولکولی پاسخ به تنش و تحمل آن در گیاه است. امروزه بیشترین توجه محققین به استفاده از مقاومت ژنتیکی که اقتصادی‌ترین و کم خطرترین روش از نظر زیست محیطی برای مقاوم سازی می‌باشد، معطوف گردیده است. لذا تحقیقاتی که منجر به درک عمیق اساس ژنتیک مقاومت و حساسیت می‌شوند از اولویت برخوردار بوده و به همین دلیل شناخت مکانیسم فیزیولوژیکی و مولکولی ایجاد تحمل و نحوه پاسخ گیاه در ارقام حساس و مقاوم از ضروری‌ترین موضوعات تحقیقاتی می‌باشد. لذا اجرای راهبردهای مبتنی بر بیوتکنولوژی نیازمند تحقیقات گسترده در شناسایی عوامل مؤثر در تحمل به تنش‌ها و عوامل تنظیم‌کننده می‌باشد. عوامل اکولوژیکی و ژنتیکی زیادی رشد و نمو گیاهان و بیوسنتز ترکیبات اولیه و ثانویه را تحت تأثیر قرار می‌دهند. اگر چه این ترکیبات اساساً با

1. Asteraceae
2. Chicorideae

هدایت فرآیندهای ژنتیکی ساخته می‌شوند، اما تاثیر محیط با توجه به مسیر بیوسنتزی متابولیت مورد نظر می‌تواند کم و یا بسیار شدید باشد. کیفیت و کمیت متابولیت‌های ثانویه، اسیدهای چرب و خصوصیات تغذیه‌ای در تنش‌های زیستی و غیرزیستی تغییر می‌یابد (Shiade *et al*., 2024).

براسینواستروئیدها، گروهی از هورمون‌های استروئیدی هستند که در بسیاری از پدیده‌های نموی در گیاهان از قبیل تقسیم و طویل شدن سلولی ساقه و ریشه، اندام‌زایی، پیری برگ و پاسخ به تنش‌ها نقش دارند. نقش اپی براسینواستروئید در رشد و نمو کالوس و رشد و نمو 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 (Hassanuzzaman *et al*., 2015). براسینوستروئیدها، تنها دسته مشخصی از هورمون‌های استروئیدی در گیاهان هستند. آن‌ها به صورت گسترده در گیاهان وجود داشته و در غلظت‌های خیلی کم نیز فعال هستند. براسینواستروئیدها تحمل به تنش غیرزیستی و رشد را ارتقاء داده و مسیرهای پیام‌رسانی آنها دارای آثار متقابلی با آبسزیک اسید، اکسین، سیتوکینین، اتیلن، جیبرلین، جاسمونیک اسید و سالیسیلیک اسید هستند. آبسزیک اسید و براسینواستروئیدها بسته شدن روزنه را از طریق نیتریک اکسید و تحمل به خشکی افزایش می‌دهند. در حالی‌که براسینواستروئیدها، بیوسنتز آبسزیک اسید را ارتقاء می‌دهند، براسینواستروئید و آبسزیک اسید به صورت مشترک تعدادی از ژن‌ها را تنظیم کرده، آبسزیک اسید به صورت منفی اجزاء مسیرهای پیام‌رسانی اپی براسینواستروئید را تنظیم می‌نماید (Planas-Riverona *et al*., 2019). براسینواستروئیدها علاوه بر افزایش رشد و تقسیم سلولی، رشد و تمایز آوند چوبی، تشکیل لوله گرده و رشد طولی آن، تمایز عروقی، فوتومورفوژنز، بزرگ شدن مریستم، افزایش میزان دریافت CO_2 و سرعت کربوکسیلاسیون توسط آنزیم روبیسکو، افزایش فتوسنتز و چرخه کالوین و تولید مثل گیاهان و پاسخ به تنش‌های زیستی و غیر زیستی را تنظیم می‌کنند. براسینواستروئیدها همچنین پیری را به تأخیر انداخته، اما پیر شدن در بافت در حال مرگ را سرعت می‌بخشند. کمبود براسینواستروئید، یا عدم توانایی جذب آن موجب کاهش جوانه زنی بذر، تأخیر در گل‌دهی، پیری، کوتولگی و کاهش باروری می‌شود. از طرفی، بیان بیش از حد ژن‌های بیوسنتز براسینواستروئید، موجب افزایش سطح درونی این هورمون، در نتیجه افزایش عملکرد و تحمل تنش می‌شود (Sirohi and Kapoor, 2020). براسینواستروئیدها با شرکت در سنتز سلولز موجب حفظ و تشکیل ساختار دیواره سلولی می‌شوند بنابراین مانع آسیب سلول‌های گیاهی به علت نوسانات یونی شده و اولین خط دفاعی در برابر فشار محیطی هستند. این هورمون‌ها در تنظیم چرخه سلول، تکثیر و تمایز سلول نقش دارند. علاوه بر این با فعال‌سازی فاکتورهای رونویسی در پاسخ به تنش‌های محیطی نقش دارند (Bartwal and Arora, 2020). در مطالعه ای که بر روی کاربرد ۲۴- اپی براسینولید بر پارامترهای فیزیولوژیکی، خصوصیات بیوشیمیایی و عملکرد گیاه بالنگوی شهری تحت شرایط تنش خشکی انجام شد نتایج نشان داد که استفاده از ۲۴- اپی براسینولید به مقدار یک میکرومول اثرات تنش خشکی بر محتوای کل کلروفیل، قند محلول و محتوای پروتئین را کاهش داد(Naservafaei *et al*., 2023). در مطالعه ای که بر روی استفاده از ۲۴- اپی براسینولید بر فعالیت های آنزیمی و غیرآنزیمی گیاه کالاندولا انجام شد نتایج نشان داد که کاربرد ۰/۰۱ و ۰/۱میکرومولار از هورمون باعث افزایش هورمون سوپراکسیداز دسموتاز، کاتالاز، پرولین و محتوای کل پروتئین تحت تنش خشکی شد (Hosseinpour *et al*., 2019). در بررسی بر روی مکانسیم فیزیولوژیکی و مولکولی براسینواستروئید در پاسخ به تنش نشان دادند که این هورمون باعث افزایش محتوای کلروفیل، ظرفیت فتوسنتزی، افزایش تحمل به تنش‌های مختلف در گیاهان می شوند (Anwar *et al*., 2018). در مطالعه‌ای که به بررسی اثرات ۲۴- اپی براسینولید بر خصوصیات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی نخود فرنگی پرداختند نتایج نشان داد که کاربرد این هورمون سبب افزایش عملکرد دانه (۰/۱۸)، وزن غلاف (۰/۱۶)، تعداد غلاف در بوته (۰/۱۸)، محتوای کلروفیل کل (۰/۱۰) و کاهش محتوای

مالون دی آلدهید (۰/۴۵) نسبت به گیاهانی که با ۲۴- اپی براسینولید تیمار نشده بودند(Gholami *et al*., 2023). در بررسی اثر اسپری پاشی ۲۴- اپی براسینولید برخصوصیات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی گیاه سوسن تحت تنش خشکی نشان دادند که محتوای پرولین (۱۱۵/۷۸٪) و کارایی مصرف آب (۱۳۵/۵۹٪) افزایش یافت(Omidian *et al*., 2022). با توجه به اهمیت کاهو به بعنوان یک محصول مهم کشاورزی و باغی و با توجه به اینکه مطالعات درحوزه‌ی بررسی وضعیت رشد گیاهچه در شرایط محیطی نامناسب مانند تنش‌های خشکی و شوری بر روی لاین‌های انتخابی صورت نگرفته است این مطالعه می‌تواند بعنوان مطالعه پایه و کاربردی در این زمینه باشد و لذا این تحقیق با این هدف انجام گردید.

مواد و روش ها

این تحقیق در آزمایشگاه فیزیولوژی دانشکده کشاورزی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه رازی کرمانشاه در سال ۱۴۰۲ انجام شد. آزمایش بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی درچهار تکرار انجام شد. فاکتور اول سطوح مختلف هورمون ۲۴- اپی براسینولید (صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار)، فاکتور دوم سطوح مختلف خشکی با مانیتول (صفر، ۱۰٪، ۲۰ ٪و ۳۰٪) و فاکتور سوم شامل لاین‌های یخی[1] و رومن[2] شماره هفت کاهو بود. در این تحقیق ابتدا بذور کاهو (ده عدد) با غلظت‌های مختلف ۲۴- اپی براسینولید (صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار) به مدت یک شبانه روز تیمار شدند. بعد از خشک شدن در دمای محیط در داخل پتری دیش با غلظت های مختلف محلول مانیتول (صفر، ۱۰٪، ۲۰ ٪و ۳۰٪) در چهار تکرار در اتاقک رشد با دمای بیست درجه سانتی گراد و فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. صفات جوانه زنی شامل سرعت جوانه زنی، طول ریشه‌چه، طول ساقه چه، وزن تر، وزن خشک و محتوای آب نسبی بود. بعد از گذشت دو هفته از کشت بذور در اتاقک رشد استخراج عصاره طبق روش (Sepehrifar *et al*., 2010) انجام شد. صفات بیوشیمیایی شامل میزان قند محلول (بر اساس روش Shlegl, 1986)، محتوای فنول کل (بر اساس روش Pandjaiton *et al*., 2005) و میزان فلاونویید (بر اساس روش Chang *et al*., 2002) اندازه گیری شد. تجزیه واریانس، مقایسه میانگین اثرات متقابل و تجزیه همبستگی صفات با استفاده از نرم افزار R انجام شد. جهت تهیه نقشه حرارتی و گروه بندی لاین‌های انتخابی بر اساس صفات مورد مطالعه و همچنین تجزیه به مولفه‌های اصلی از نرم افزار Clustvis استفاده شد.

نتایج و بحث

تجزیه واریانس صفات در مرحله گیاهچه و صفات بیوشیمیایی در لاین‌های انتخابی کاهو نشان داد که در بین تمام لاین‌ها از نظر صفات سرعت جوانه زنی، طول ریشه‌چه، طول ساقه چه، محتوای آب نسبی برگ و فنل کل در سطح آماری یک درصد اختلاف بسیار معنی‌داری مشاهده گردید (جدول ۱). که این اختلاف معنی‌دار حکایت از وجود تنوع قابل قبول بین لاین‌ها از نظر صفات مورد بررسی و پاسخ لاین‌ها به تغییرات محیطی مانند شرایط تنش خشکی می‌باشد. همچنین بین سطوح مختلف خشکی از نظر تمامی صفات مورد مطالعه به غیر از وزن تر، وزن خشک و محتوای قند محلول در سطح آماری یک درصد اختلاف بسیار معنی‌داری مشاهده گردید. بین سطوح مختلف هورمون ۲۴- اپی براسینولید نیز برای تمامی صفات مورد مطالعه به غیر از وزن تر، وزن خشک و محتوای قند محلول اختلاف بسیار معنی داری در سطح آماری یک درصد مشاهده گردید. همچنین برای اثرات متقابل دوگانه بین ژنوتیپ و سطوح هورمون ۲۴- اپی براسینولید برای تمامی صفت سرعت جوانه زنی اختلاف معنی‌داری در سطح آماری پنج درصد، و برای بقیه صفات به غیر از وزن تر، وزن خشک و محتوای قند محلول در سطح آماری یک درصد اختلاف بسیار معنی‌داری مشاهده شد.

1. Ice
2. Roman

جدول ۱. تجزیه واریانس صفات گیاهچه‌ای و بیوشیمیایی در لاین‌های انتخابی کاهو تحت شرایط تنش خشکی

Table 1. Analysis of Variance of Seedling and Biochemical Traits in Selected Lettuce Lines Under Drought Stress Conditions

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean of Square								
		سرعت جوانه زنی (درصد) Seed germination rate(%)	طول ریشه‌چه (میلی متر) Root lenght(mm)	طول ساقه چه (میلی متر) Shoot length(mm)	وزن تر (میلی گرم) Feresh weight(mg)	وزن خشک (میلی گرم) Dry weight(mg)	محتوای آب نسبی (درصد) Relative Water Content(%)	قندمحلول (میلی گرم در لیتر) Soluble Sugar(mg/L)	فنل کل (میلی گرم در لیتر) Total phenol(mg/L)	فلاونوئید (میکروگرم در لیتر) Flavonoid (µg/L)
ژنوتیپ Genotype	1	825.724**	8445.613**	1392.402**	0.001 ns	1.32 ns	134.480**	0.003 ns	9558.692**	0.004ns
۲۴- اپی براسینولید 24-epibrasinolide	3	199.078**	2472.901**	107.704**	0.001 ns	1.47 ns	2018.756**	0.003 ns	7847.792**	0.221**
سطوح مانیتول Manitol	3	27.535**	324.986**	332.712**	0.001 ns	5.70 ns	2153.664**	0.008 ns	10974.735**	0.075**
ژنوتیپ × ۲۴- اپی براسینولید Genotype×24-epibrasinolide	3	105.865*	616.297**	425.841**	0.001 ns	6.33 ns	387.851**	0.006 ns	21711.886**	0.037**
ژنوتیپ × مانیتول Genotype×Manitol	3	20.648**	630.661**	16.587**	0	3.07 ns	686.976**	0.003 ns	33767.468**	0.152**
۲۴- اپی براسینولید × مانیتول 24-epibrasinolide×Manitol	9	7.443 ns	518.312**	124.608**	0.001 ns	1.15ns	191.337**	0.003 ns	18659.577**	0.114**
ژنوتیپ × براسنیولید × مانیتول Genotype×brasinolide×Manitol	9	19.358 ns	449.182**	114.060**	0.001 ns	8.55 ns	301.844**	0.002 ns	12713.829**	0.050**
اشتباه آزمایشی Error	96	9.922	20.347	3.588	0.001	9.71	15.077	0.004	735.516	0.004
کل Total	127									
ضریب تغییرات (٪) Coefficient of Variation (%)		8.039	9.52	9.43	126.49	1997.47	77.36	77.36	10.58	10.04

*، ** و ns به تریتب معنی دار در سطح پنج درصد، یک درصد و غیر معنی دار.

*, **, and ns indicate significance at the 5% level, 1% level, and non-significant, respectively.

اثر متقابل دو گانه بین ژنوتیپ و سطوح مختلف مانیتول برای تمامی صفات به غیر از وزن تر، وزن خشک و محتوای قند محلول در سطح آماری یک درصد اختلاف بسیار معنی‌داری مشاهده گردید. بین سطوح مختلف هورمون ۲۴- اپی براسینولید و سطوح مختلف مانیتول برای تمامی صفات مورد مطالعه به غیر از سرعت جوانه زنی، وزن تر، وزن خشک و محتوای قند محلول اختلاف بسیار معنی داری در سطح آماری یک درصد مشاهده گردید. اثر متقابل سه گانه بین ژنوتیپ، سطوح مختلف هورمون ۲۴- اپی براسینولید و سطوح مختلف مانیتول نیز برای تمامی صفات مورد مطالعه به غیر از سرعت جوانه زنی، وزن تر، وزن خشک و محتوای قند محلول اختلاف بسیار معنی داری در سطح آماری یک درصد مشاهده گردید. نتایج میانگین اثرات متقابل سه گانه برای صفات مورد بررسی با استفاده از آزمون دانکن در سطح آماری پنج درصد در شکل ۱ آورده شده است.

نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل تنش خشکی و لاین‌های انتخابی (شکل ۱) نشان داد که با افزایش سطوح تنش خشکی صفات گیاهچه‌ای مانند سرعت جوانه زنی کاهش یافت. با افزایش سطوح تنش خشکی صفات طول ریشه‌چه و ساقه چه افزایش یافت. با توجه به نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل تنش خشکی و لاین‌های انتخابی، مشاهده شد که افزایش سطوح تنش خشکی به طور معمول باعث کاهش صفات گیاهچه‌ای مانند سرعت جوانه‌زنی می‌شود. این نتایج نشان می‌دهد که گیاهان در شرایط تنش خشکی تمایل دارند تا فرآیند جوانه‌زنی خود را کاهش دهند، که این ممکن است به منظور حفظ آب و انرژی باشد. در عین حال، با افزایش سطوح تنش خشکی، صفات طول ریشه و ساقه افزایش می‌یابند. که این نشان دهنده یک پاسخ فیزیولوژیکی به تنش خشکی، به منظور افزایش قدرت جذب آب و مواد مغذی از خاک توسط گیاه می باشد. افزایش طول ریشه و ساقه می‌تواند به گیاهان

کمک کند تا با شرایط تنش خشکی بهتر برخورد کنند و بهبود یابند. در کل، این نتایج نشان می‌دهد که گیاهان تحت تنش خشکی تغییراتی در صفات جوانه زنی، طول ریشه و ساقه را تجربه می‌کنند که ممکن است به تنظیم مناسبتر به شرایط محیطی خاص کمک کند. این نتایج می‌تواند در برنامه‌ریزی مناسب برای افزایش تحمل گیاهان به تنش خشکی و بهبود عملکرد کشاورزی در شرایط محیطی متغیر مفید باشد.

همچنین صفات بیوشیمیایی مانند محتوای قند محلول، فنل کل و فلاوونوئید با افزایش سطوح تنش خشکی نیز افزایش یافتند. از جمله نتایج جالب مشاهده شده در مقایسه میانگین اثرات متقابل تنش خشکی و لاین های انتخابی، افزایش در صفات بیوشیمیایی مانند محتوای قند محلول، فنل کل و فلاوونوئید با افزایش سطوح تنش خشکی است. این نتایج نشان می‌دهد که گیاهان تحت تنش خشکی تمایل دارند تا تغییراتی در محتوای مواد شیمیایی خود اعمال کنند تا با شرایط محیطی متغیر بهتری برخورد کنند. افزایش محتوای قند محلول در گیاهان تحت تنش خشکی ممکن است نشان دهنده تلاش گیاه برای تنظیم تعادل آب و استفاده بهینه از قند در فعالیت‌های متابولیک باشد. این تغییرات ممکن است به گیاه کمک کند تا در مقابل کمبود آب مقاوم‌تر باشد. افزایش فنل کل و فلاوونوئید نیز نشان‌دهنده فعالیت آنتی‌اکسیدانت‌ها در گیاهان است. این مواد ممکن است به عنوان دفاع از گیاه در برابر استرس‌های اکسیداتیو عمل کنند و در مقابل تنش خشکی واکنش نشان دهند. به طور کلی، این تغییرات در صفات بیوشیمیایی نشانگر توانایی گیاهان برای اعمال تنظیمات فیزیولوژیکی به منظور مقابله با تنش خشکی می‌باشد.

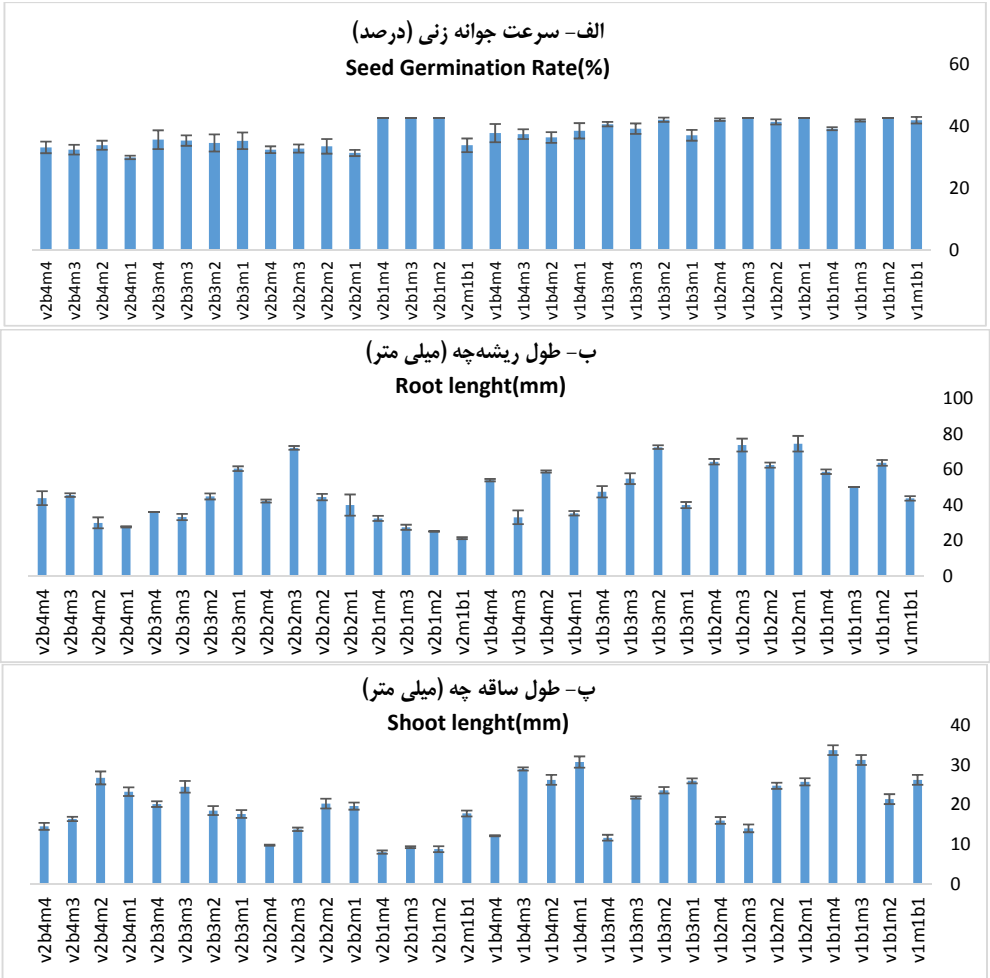
نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل (شکل ۱- الف) نشان داد که پیش تیمار با ۱۵۰ میکرومولار هورمون ۲۴- اپی براسینولید دارای بیشترین سرعت جوانه زنی (۴۲/۸۶) بود. یکی از اثرات استفاده از این هورمون به عنوان یکی از جنبه های مهم فیزیولوژیکی در افزایش سرعت جوانه زنی و در شرایط تنش از جمله تنش خشکی می باشد که به گیاهان کمک کند تا با شرایط سخت تر محیطی سازگارتر شوند. این امکان به گیاهان کمک می کند که سریع تر جوانه بزنند و به رشد سریع‌تری دست یابند. این بدان معنا است که پیش تیمار ۱۵۰میکرومولار هورمون بخوبی توانسته است اثرات ناشی از تنش خشکی را کاهش دهد. این نتایج با نتایج Anwar *et al*. (2018) مطابقت داشت.

مقایسه میانگین اثرات متقابل برای صفت طول ریشه‌چه (شکل ۱- ب) نشان داد که بیشترین مقدار طول ریشه‌چه (۷۳/۷۵ میلی متر) در سطوح تنش ۳۰ درصد و پیش تیمار ۱۵۰ میکرومولار بدست آمد. این ممکن است به دلیل تحریک فعالیت سلول های ریشه ای، افزایش تقسیم سلولی، و بهبود جذب آب و مواد معدنی باشد. تحقیقات نشان داده‌اند که استفاده از EBR ممکن است به گیاهان کمک کند تا مقاومت به تنش های مختلف، از جمله تنش خشکی، را افزایش دهند. این مقاومت ممکن است با افزایش طول ریشه و بهبود ساختار جذبی آب و مواد معدنی مرتبط باشد (Bajguz and Hayat, 2009).

در پیش تیمار با ۱۵۰ میکرومولار هورمون ۲۴- اپی براسینولید بیشترین طول ساقه چه (۳۳/۷۵ میلی متر) در بالاترین سطح تنش خشکی بدست آمد(شکل ۱- پ). این اثر به دلیل تحریک تقسیم و افزایش سلول های ساقه، و همچنین افزایش فعالیت سلول های کمربندی (فعالیت کامبیوم) می‌باشد. اپی براسینولید می‌تواند به تنظیم فعالیت آنزیم‌های مرتبط با رشد، نظیر آلفا-آمیلاز، پروتئین‌های رشد، و هورمون های دیگر، کمک کند. این تنظیمات می‌توانند به رشد ساقه‌ها و افزایش طول آنها کمک کنند. همچنین می‌تواند در افزایش مقاومت ساقه‌ها به تنش‌های مختلف، از جمله تنش های محیطی، نقش داشته باشد. این ممکن است به افزایش رشد و توسعه ساقه ها به نحوی که گیاهان با تنش‌های مختلف بهتر سازگار شوند، منجر شود.

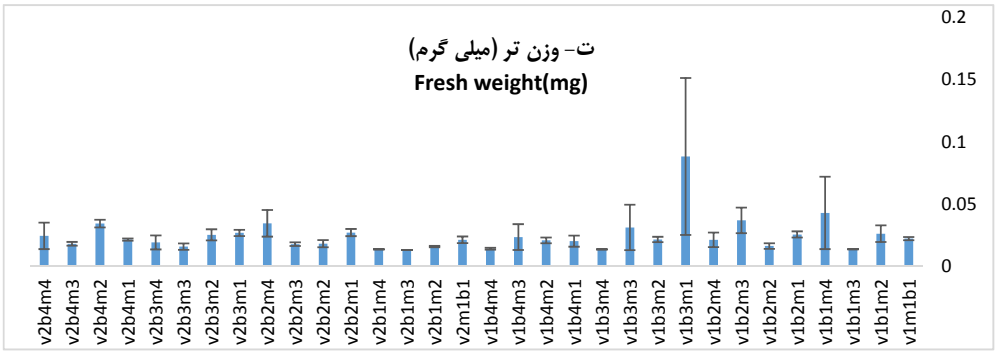
استفاده از هورمون ۲۴-اپی براسینولید منجر به افزایش محتوای آب نسبی گیاهان می شود. این افزایش ممکن است بهبود جذب و نگهداری آب در سلول های گیاهی را نشان دهد. همچنین، این هورمون ممکن است در تنظیم باز کردن و بسته شدن گیاهان به آب کمک کند. EBR می تواند در تنظیم فعالیت استوماها نقش داشته باشد. استوماها مسئول کنترل تراز آب و گازها در گیاهان

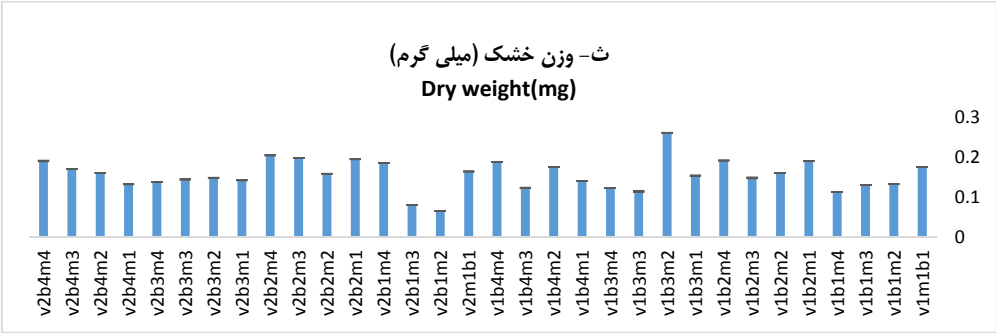
هستند. افزایش فعالیت استوماها ممکن است باعث افزایش تراز آب در گیاه شود. همچنین این هورمون اثرات خود را از طریق تنظیم فعالیت آنزیم‌های مرتبط با متابولیسم آب و تعادل آبی گیاهان اعمال می کند. این تأثیرات ممکن است به کنترل تراز آب نسبی در گیاهان کمک کنند. همچنین بیشترین مقدار وزن تر(شکل ۱- ت) (۰/۰۸۸۱میلی گرم)، وزن خشک (شکل ۱- ث) (۰/۰۰۳۸ میلی گرم)، محتوای آب نسبی (شکل ۱- ج) (۹۷/۲۵ درصد)، محتوای قند محلول (شکل ۱- چ) (۰/۴۸۰ میلی گرم در لیتر)، محتوای کل فنل (شکل ۱- ح) (۴۶۰/۸۳میلی گرم در لیتر) و فلاوونوئید (شکل ۱- خ) (۱/۰۴۷ میکروگرم در لیتر) نیز در پیش تیمار با ۱۵۰ میکرومولار هورمون ۲۴- اپی براسینولید در بالاترین سطح تنش خشکی به دست آمد. که این واقعیت بیانگر تاثیر مثبت و معنی دار پیش تیمار با هورمون ۲۴- اپی براسینولید در جهت کاهش اثرات تنش بر صفات گیاهچه‌ای، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی تحت شرایط تنش خشکی می‌باشد. این نتایج با نتایج Naservafaei *et al.* (2023)، Sheikhi *et al.* (2021)، Mohammadi *et al.* (2020) و Li *et al.* (2012) مطابقت دارد. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، استفاده از هورمون ۲۴-اپی براسینولید به عنوان یک پیش تیمار موثر برای افزایش تحمل گیاهان کاهو به شرایط تنش خشکی می‌باشد. این یافته‌ها می‌توانند به بهبود بهره‌وری کشاورزی و مدیریت بهینه منابع آب کمک کنند.

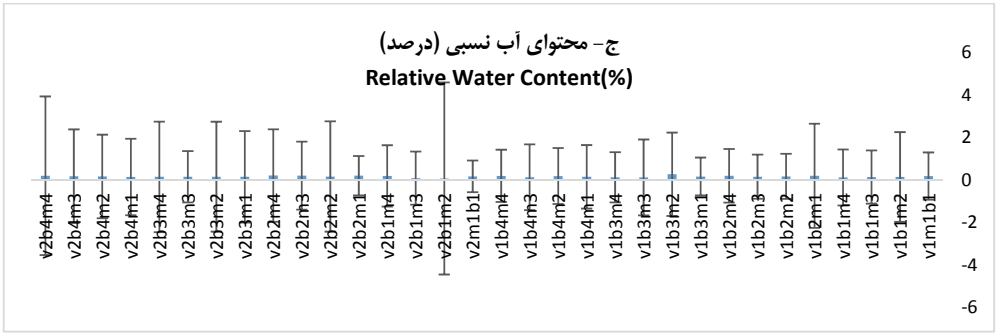


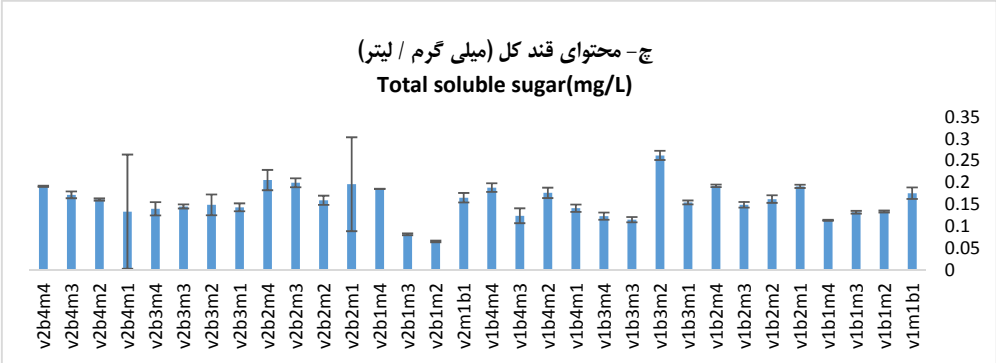
شکل ۱. نمودار اثرات متقابل سه گانه برای صفات مورد بررسی در لاین های انتخابی کاهو تحت شرایط تنش خشکی

Figure 1. Triple interaction effects diagram for the traits studied in selected lettuce lines under drought stress conditions



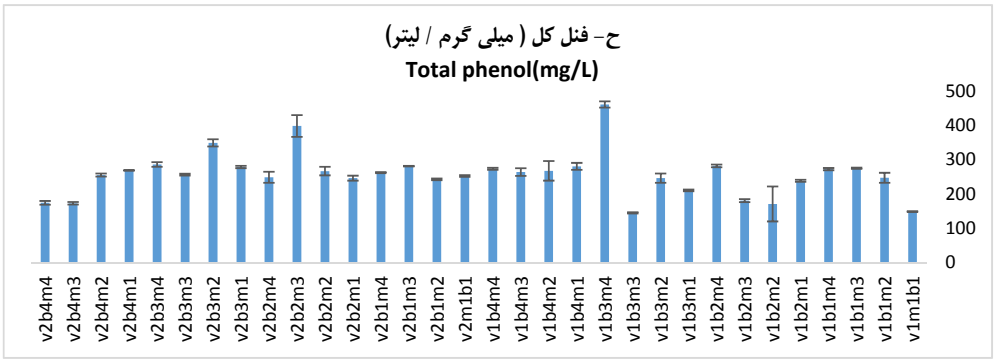


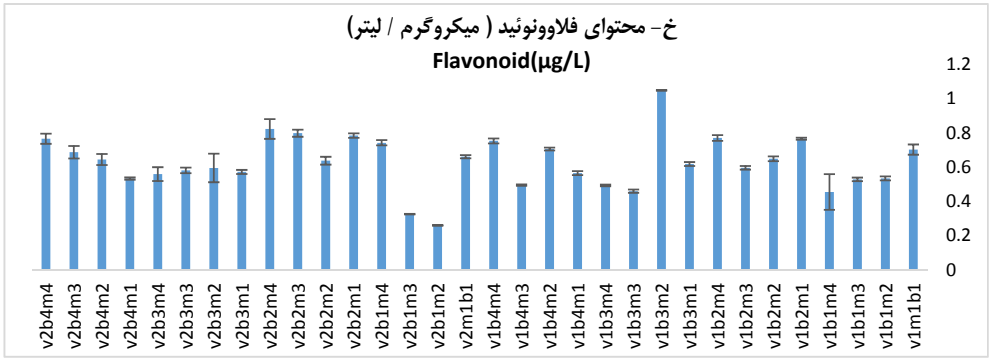




ادامه شکل ۱. نمودار اثرات متقابل سه گانه برای صفات مورد بررسی در لاین های انتخابی کاهو تحت شرایط تنش خشکی

Continue the Figure 1. Triple interaction effects diagram for the traits studied in selected lettuce lines under drought stress conditions.

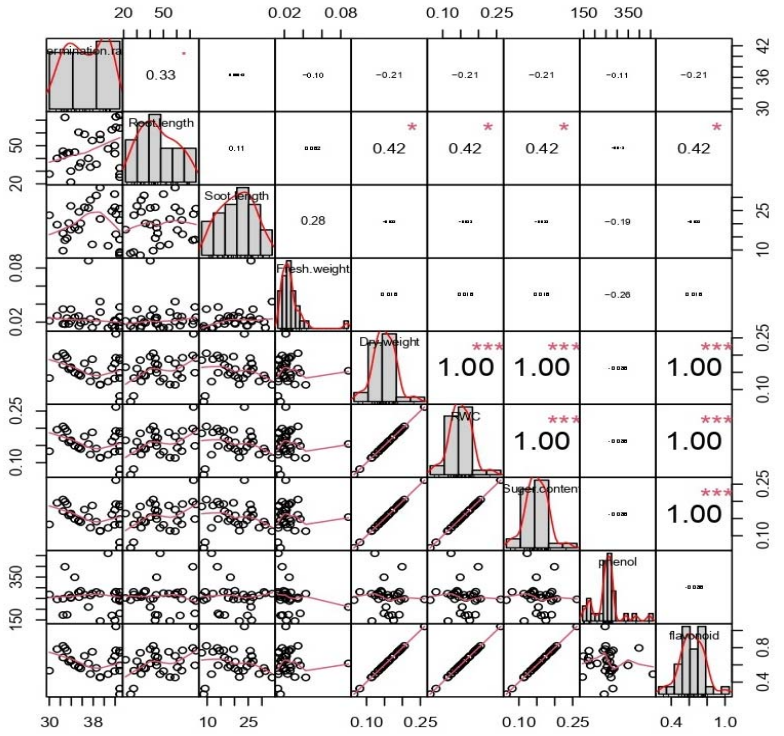




ادامه شکل ۱. نمودار اثرات متقابل سه گانه برای صفات مورد بررسی در لاین های انتخابی کاهو تحت شرایط تنش خشکی

Continue the Figure 1. Triple interaction effects diagram for the traits studied in selected lettuce lines under drought stress conditions.

نتایج همبستگی بین صفات مورد مطالعه (شکل ۲) نشان داد که بین صفات وزن خشک و طول ریشه (۰/۴۱۹*)، محتوای آب نسبی و طول ریشه‌چه (۰/۴۱۹*)، محتوای قند محلول و طول ریشه‌چه (۰/۴۱۹*) و فلاوونوئید و طول ریشه (۰/۴۱۹*) همبستگی مثبت و معنی داری مشاهده گردید. بین صفات محتوای آب نسبی و وزن خشک (۰/۱۰۰**)، محتوای قند محلول و وزن خشک (۰/۱۰۰**) و فلاوونوئید و وزن خشک (۰/۱۰۰**) همبستگی مثبت و بسیار معنی داری مشاهده شد. همچنین بین محتوای قند محلول و محتوای آب نسبی (۰/۱۰۰**) و فلاوونوئید و محتوای آب نسبی (۰/۱۰۰**) همبستگی مثبت و بسیار معنی داری مشاهده گردید. این همبستگی مثبت بین وزن خشک و طول ریشه‌چه نشان می دهد که گیاهانی که دارای ریشه های بلندتر هستند، ممکن است دارای وزن خشک بیشتری نیز باشند. این ممکن است به این دلیل باشد که گیاهان با ریشه های بلندتر، دسترسی به منابع آب و مواد معدنی بیشتری دارند در نتیجه بر روی وزن اثرگذار است. همبستگی مثبت میان محتوای آب نسبی و طول ریشه نشان می‌دهد که گیاهان با طول ریشه بیشتر ممکن است توانمندی بیشتری در حفظ آب داشته باشند. ریشه های بلندتر می توانند منجر به افزایش سطح جذب آب و کاهش تبخیر باشند. همبستگی بین قند محلول و طول ریشه‌چه نیز نشان می دهد که گیاهانی که دارای ریشه های بلندتر هستند، ممکن است محتوای بیشتری از قندهای محلول را در خود نگه دارند. که این ممکن است به دلیل عملکرد فتوسنتز بیشتر و متابولیسم قندهای محلول بیشتر مرتبط باشد. همبستگی مثبت میان فلاوونوئید و طول ریشه نشان می دهد که گیاهان با طول ریشه بیشتر ممکن است فعالیت بیشتری در تولید فلاوونوئیدها داشته باشند. این ممکن است به این معنا باشد که فعالیت فنلی گیاهان در مقابل استرس‌های محیطی افزایش یافته است. این نتایج با نتایج Naservafaei *et al.* (2023) و Anjum *et al.* (2011) مطابقت داشت.



شکل ۲. همبستگی صفات گیاهچه‌ای، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی در لاین‌های انتخابی کاهو (صفات شامل: ستون ۱: سرعت جوانه زنی، ستون ۲:طول ریشه‌چه، ستون ۳: طول ساقه چه، ستون ۴: وزن تر، ستون ۵: وزن خشک، ستون ۶: محتوای آب نسبی، ستون ۷: محتوای قند کل، ستون ۸: محتوای کل فنل و ستون ۱۰: محتوای فلاوونوئید).

Figure 2. Correlation of seedling, physiological, and biochemical traits in selected lettuce lines (Traits include: Column 1: Seed germination rate, Column 2: Root length, Column 3: Shoot length, Column 4: Fresh weight, Column 5: Dry weight, Column 6: Relative water content, Column 7: Total sugar content, Column 8: Total phenol content, and Column 9: Flavonoid content)

* و ***: به ترتیب معنی دار درسطح پنج درصد و یک درصد.

* and *** indicate significance at the 5% level and 1% level, respectively.

گروه بندی لاین‌های انتخابی بر اساس صفات مورد بررسی نیز با استفاده از نقشه حرارتی انجام شد (شکل ۳) و نتایج نشان داد که لاین‌های انتخابی بر اساس صفات مورد بررسی در دو گروه جداگانه قرار گرفتند. گروه اول شامل لاین رومن بود که حاوی مقادیر بالایی از نظر محتوای آب نسبی، محتوای قند محلول، فنل کل و فلاوونوئید بودند و گروه دوم نیز شامل لاین انتخابی یخی بود که از نظر صفات سرعت جوانه زنی، طول ریشه‌چه، طول ساقه چه، وزن تر و وزن خشک حاوی مقادیر کمتر بودند.

تجزیه به مولفه‌های اصلی (PCA)[1] یک روش آماری است که برای کاهش ابعاد داده‌های چندمتغیره و تجزیه آنها به اجزای اصلی با حفظ حداکثر اطلاعات ممکن استفاده می‌شود. در اینجا، تجزیه به مولفه‌های اصلی (PCA) به تحلیل داده‌های حاصل از آزمایشات انجام شده برای ارتباط میان صفات مختلف گیاه کاهو (مانند محتوای آب نسبی، محتوای قند محلول، فلاوونوئید و وزن خشک) نشان داده شده در شکل ۴ اشاره دارد. در نتیجه این تجزیه، دو مولفه اول ۶۴٪ از تغییرات کل را توجیه می‌کنند. همچنین، مشخص شده است که صفات محتوای آب نسبی، محتوای قند محلول، فلاوونوئید و وزن خشک از اهمیت بیشتری در این بررسی برخوردار بودند. این نتایج نشان می‌دهند که این صفات دارای بیشترین تنوع و اثر معنی‌دار در شرایط تنش خشکی می‌باشند. بنابراین،

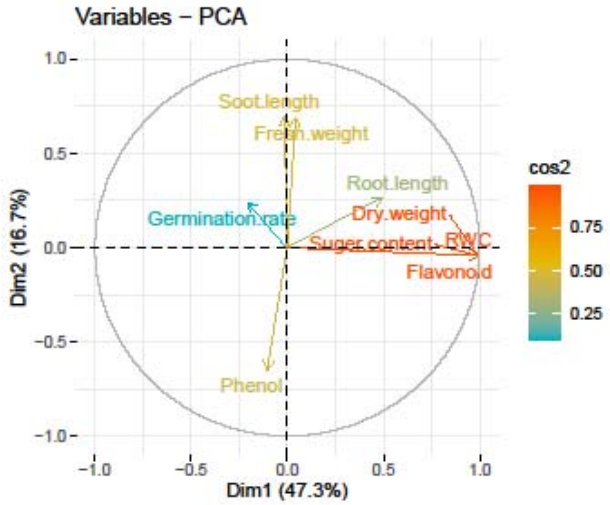
1. Principal Component Analysis

توصیه می‌شود که در مطالعات آینده از این صفات به منظور بررسی و توجیه تنوع حاصل از شرایط تنش خشکی استفاده شود. استفاده از این صفات می‌تواند به درک بهتری از پاسخ گیاهان به شرایط تنش خشکی کمک کرده و در طراحی استراتژی‌های بهبود مقاومت گیاهان در برابر این شرایط مؤثر باشد.

شکل ۳. آنالیز خوشه‌ای همراه با نقشه حرارتی لاین های انتخابی بر اساس صفات اندازه گیری شده

V1: لاین یخی، V2: لاین رومن، B: سطوح مختلف هورمون ۲۴- اپی براسینولید، M: سطوح مختلف مانیتول

Figure 3. Cluster analysis with a heatmap of selected lines based on measured traits. V1= Iceberg line, V2= Romaine line, B= Different levels of 24-epibrassinolide hormone, M= Different levels of mannitol



شکل ۴. تجزیه به مولفه‌های اصلی بر اساس صفات مورد مطالعه در لاین‌های انتخابی کاهو

Figure 4. Principal component analysis based on the studied traits in selected lettuce lines

REFERENCES

Anjum, S. A., Wang, L. C., Farooq, M., Hussain, M., Xue, L. L., & Zou, C. M. (2011). Brassinolide application improves the drought tolerance in maize through modulation of enzymatic antioxidants and leaf gas exchange. *Journal of Agronomy and Crop Science*, *197*(3), 177-185. https://doi.org/10.1111/j.1439-037X.2010.00459.x

Anwar, A., Liu, Y., Dong, R., Bai, L., Yu, X., & Li, Y. (2018). The physiological and molecular mechanism of brassinosteroid in response to stress: a review. *Biological Research*, *51*. http://dx.doi.org/10.1186/s40659-018-0195-2

Bajguz, A., & Hayat, S. (2009). Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. *Plant Physiology and biochemistry*, *47*(1), 1-8. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2008.10.002

Bartwal, A., & Arora, S. 2020. Brassinosteroids: molecules with myriad roles. *Co-Evolution of Secondary Metabolites*, 869-895.

Chadha, A., & Florentine, S. (2021). Biology, ecology, distribution and control of the invasive weed, Lactuca serriola L. (wild lettuce): a global review. Plants, 10(10), 2157. https://doi.org/10.3390/plants10102157

Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., & Chern, J. C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colometric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, *10*(3), 3. https://doi.org/10.38212/2224-6614.2748

Gallegos□Cedillo, V. M., Nájera, C., Signore, A., Ochoa, J., Gallegos, J., Egea□Gilabert, C., ... & Fernández, J. A. (2024). Analysis of global research on vegetable seedlings and transplants and their impacts on product quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. https://doi.org/10.1002/jsfa.13309

Gholami, F., Amerian, M. R., Asghari, H. R., & Ebrahimi, A. (2023). Assessing the effects of 24-epibrassinolide and yeast extract at various levels on cowpea's morphophysiological and biochemical responses under water deficit stress. *BMC Plant Biology*, *23*(1), 593.

Govindaraj, M., Masilamani, P., Albert, V. A., & Bhaskaran, M. (2017). Effect of physical seed treatment on yield and quality of crops: A review. *Agricultural Reviews*, 38(1), 1-14.

Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Alam, M. M., Ahmad, S., & Fujita, M. (2015). Exogenous application of phytoprotectants in legumes against environmental stress. *Legumes under environmental stress: Yield, improvement and Adaptations*, 161-197. https://doi.org/10.1002/9781118917091.ch11

Hosseinpour, M., Ebadi, A., Habibi, H., Nabizadeh, E., & Jahanbakhsh, S. (2020). Enhancing enzymatic and nonenzymatic response of Echinacea purpurea by exogenous 24-epibrassinolide under drought stress. *Industrial crops and products*, *146*, 112045. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.112045

Jafari, M. S., Noory, H., Liaghat, A. M., & Ebrahimian, H. (2021). Effect of Different Levels of Irrigation and Fertilizer on Water and Nitrogen Productivity in Lettuce. *Journal of Water Research in Agriculture*, *35*(1), 19-34(In Persian). https://doi.org/10.22092/jwra.2021.123732

Li, Y. H., Liu, Y. J., Xu, X. L., Jin, M., An, L. Z., & Zhang, H. (2012). Effect of 24-epibrassinolide on drought stress-induced changes in Chorispora bungeana. *Biologia Plantarum*, *56*, 192-196.

Mohammadi, M., Tavakoli, A., Pouryousef, M., & Mohseni Fard, E. (2020). Study the effect of 24-epibrassinolide application on the Cu/Zn-SOD expression and tolerance to drought stress in common bean. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, *26*, 459-474.

Mohebi, A.H. and Mousavi. S. H. 2019. Nutrition management in the production of commercial varieties of lettuce. Publication of agricultural education. 138 p.

Naservafaei, S., Sohrabi, Y., & Moradi, P. (2023). Effects of Exogenous Application of 24-Epibrassinolide on Photosynthesis Parameters, Grain Yield, and Protein of Dragon's Head (*Lallemantia iberica*) Under Drought Stress Conditions. *Journal of Plant Growth Regulation*, 1-13.

Omidian, M., Roein, Z., & Shiri, M. A. (2022). Effect of Foliar Application of 24-Epibrassinolide on Water Use Efficiency and Morpho-Physiological Characteristics of Lilium LA Hybrid under Deficit Irrigation. *Journal of Plant Growth Regulation*, *41*(4), 1547-1560.

Pandjaitan, N., Howard, L. R., Morelock, T., & Gil, M. I. (2005). Antioxidant capacity and phenolic content of spinach as affected by genetics and maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(22), 8618-8623. https://doi.org/10.1021/jf052077i

Planas-Riverola, A., Gupta, A., Betegón-Putze, I., Bosch, N., Ibañes, M., & Caño-Delgado, A. I. (2019). Brassinosteroid signaling in plant development and adaptation to stress. *Development*, *146*(5), dev151894. https://doi.org/10.1242/dev.151894

Sepehrifar, Roshank, & Hassanlou. (2010). Investigating polyphenol compounds, anthocyanins and total flavonoids and antioxidant properties of the medicinal plant of

Qaraqat (*Vaccinium arctostaphylos* L.) collected from four different regions of Iran. *Journal of Medicinal Plants*, 9(33), 66-74.

Sheikhi, S., Ebrahimi, A., Heidari, P., Amerian, M., & Moradi Sarabsheli, A. (2021). Evaluation of 24-Epi-brassinosteroid effects on some properties of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) under high temperature stress. *Iranian Journal of Field Crop Science*, 52(3), 219-233. 10.22059/ijfcs.2020.302070.654719

Shlegl, H. G., (1986). Die verwertung orgngischer souren durch chlorella lincht. *Plant Sciences*. 41, 47-51.

Shiade, S. R. G., Zand-Silakhoor, A., Fathi, A., Rahimi, R., Minkina, T., Rajput, V. D., ... & Chaudhary, T. (2024). Plant Metabolites and Signaling Pathways in Response to Biotic and Abiotic Stresses: Exploring Bio Stimulant Applications. Plant Stress, 100454. https://doi.org/10.1016/j.stress.2024.100454

Sirohi, G., & Kapoor, M. (2020). Brassinosteroids in Lowering Abiotic Stress□mediated Damages. Protective chemical agents in the amelioration of plant abiotic stress: *Biochemical and Molecular Perspectives*, 318-326. https://doi.org/10.1002/9781119552154.ch15

Wang, X., Li, X., Zhao, W., Hou, X., & Dong, S. (2024). Current views of drought research: experimental methods, adaptation mechanisms and regulatory strategies. *Frontiers in Plant Science*, *15*, 1371895. https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1371895