



Research Paper

Effect of Hydrogen Peroxide and 24-Epibrassinolide on Secondary Metabolites and Phytochemistry of Cumin (*Cuminum cyminum* L.) under Drought Stress

Nasim Roodbari^{1*}, Hossein Abbaspour²

¹ Department of Biology, Kah.C., Islamic Azad University, Kahnootj, Iran

² Department of Biology, NT.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received: 06/08/2025, Accepted: 07/09/2025

Abstract

Two signaling materials, namely hydrogen peroxide and 24-epi brassinosteroids, have significant biological effects on plant growth, including increasing plant tolerance to environmental stresses. In the present study, the effect of drought stress and its interaction with H₂O₂ and 24-epibrassinolide on protein content, sugars, essential oil percentage, photosynthetic pigments (chlorophyll a, b), auxiliary pigments (carotenoids, phenols, and flavonoids) were investigated. For this purpose, an experiment was conducted based on a factorial design in a completely randomized design with three repetitions in the research greenhouse of the Agricultural Research, Education and Natural Resources Centre of Southern Kerman, and the plants under went drought stress treatment at three levels of irrigation 100% (control), 75% (mild stress) and 50% field capacity (severe stress) in the fifth week after germination (the beginning of reproductive growth), Which successively, in 2 stages, first three days before stress, and 15 days later, spraying hydrogen peroxide on the plants was applied at concentrations (0, 0.5 and 1 mM) and 24-epi brosinosteroids (0, 0.5 and 1 mM). With increasing levels of stress, essential oil percentage, sugar soluble, carotenoids, phenolic compounds, flavonoids, the shoot increased, and protein of aerial organ and chlorophyll decreased. The use of H₂O₂ and 24-epibrassinolide in drought stress conditions had a positive and significant effect on the tested traits. The levels of protein, chlorophyll a and b increased by concentrations of H₂O₂ and 24-epibrassinolide in the same levels of stress. As a result, by spraying 24-epibrassinolide at 1 mM, chlorophyll a reached its highest level (mL-190/10). Spraying 24-epibrassinolide under severe stress conditions increased flavonoids of the aerial organ by 1.58 (Observance g) and decreased essential oil percentage (2.44%). In general, it can be said that drought stress reduced the ability of photosynthesis and plant production. Spraying hydrogen peroxide and 24-epibrassinolide was able to improve the photosynthetic system and resistance of the cumin plant to stress.

Keywords: 24-epibresino steroids, Hydrogen peroxide, Protein, Drought stress, Photosynthetic pigments, Cumin, and phenol

Citation: Roodbari N, Abbaspour H, Effect of Hydrogen Peroxide and 24-Epibrassinolide on Secondary Metabolites and Phytochemistry of Cumin (*Cuminum cyminum* L.) under Drought Stress. *Quality and Durability of Agricultural Products and Food Staffs*, 2025; 5(1): 39-54.

DOI: <https://doi.org/10.71516/qafj.2025.1214178>



© The Author(s) **Publisher:** Islamic Azad University of Kerman, Iran

Extended Abstract

Introduction Drought stress stands as one of the most critical abiotic constraints to global agricultural productivity, particularly in arid and semi-arid regions where water scarcity is a chronic issue. Medicinal and aromatic plants like cumin (*Cuminum cyminum* L.), which hold immense economic and therapeutic value, are especially vulnerable. Cumin, the world's second most popular spice after black pepper and Iran's most important cultivated medicinal herb, is predominantly grown in precisely these water-limited environments. This geographical reality necessitates the development of effective strategies to enhance its drought resilience. Plants combat drought-induced oxidative stress, primarily caused by the overproduction of Reactive Oxygen Species (ROS), through complex physiological and biochemical adaptations. Among these, the exogenous application of signaling molecules such as hydrogen peroxide (H_2O_2) and 24-epibrassinolide (EBR) has emerged as a promising approach. Brassinosteroids like EBR, even at nanogram levels, are known to bolster plant defenses against environmental stresses by protecting cellular structures like chloroplasts. Similarly, H_2O_2 , when applied at low, controlled concentrations, acts as a secondary messenger that activates antioxidant systems and induces stress tolerance. This study was therefore designed to systematically evaluate the protective roles of H_2O_2 and EBR in mitigating the adverse effects of drought stress on the phytochemical and physiological profile of cumin, with the aim of identifying practical solutions for sustainable cultivation.

Methods The experiment was conducted in a research greenhouse using a factorial arrangement within a completely randomized design, with three replications.

Cumin plants were grown in plastic pots filled with sandy-clay loam soil. Drought stress was imposed at three levels based on field capacity (FC): 100% FC (well-watered control), 75% FC (mild stress), and 50% FC (severe stress). Stress application began in the fifth week after germination, coinciding with the onset of reproductive growth. The signaling molecules, H_2O_2 and EBR, were applied as foliar sprays at concentrations of 0, 0.5, and 1 mM. Spraying was performed in two stages: first, three days before the induction of drought stress, and second, 15 days after the initial stress application. A comprehensive suite of biochemical and physiological traits was measured, including protein content, soluble and insoluble sugars, essential oil percentage, photosynthetic pigments (chlorophyll a and b), and auxiliary pigments (carotenoids, total phenols, and flavonoids). Standard laboratory protocols were employed for all analyses: the Bradford method for protein, the phenol-sulfuric acid method for sugars, Lichtenthaler's method for pigments, and spectrophotometric assays for phenols and flavonoids. Essential oil was extracted via hydrodistillation using a Clevenger apparatus. All data were subjected to analysis of variance (ANOVA) using SAS software, and mean comparisons were performed using Duncan's multiple range test at a 5% significance level.

Results and Discussion

The results demonstrated a clear and significant impact of drought stress on cumin's physiology. As water deficit intensified from 100% to 50% FC, a marked decline was observed in traits associated with primary metabolism and photosynthetic efficiency. Protein content in the aerial parts and concentrations of chlorophyll a and b decreased significantly, indicating damage to the photosynthetic machinery and protein synthesis pathways, likely due to ROS-induced degradation. Conversely, the

plant's secondary metabolism was strongly activated under stress. Levels of soluble sugars, carotenoids, total phenolic compounds, and flavonoids in the aerial organs increased substantially with stress severity. This is a well-documented survival strategy, where these compounds function as osmolytes to maintain cellular turgor and as potent antioxidants to neutralize harmful ROS. The application of H_2O_2 and EBR proved highly effective in counteracting these negative effects. Under identical stress conditions, foliar application of these signaling molecules led to a significant increase in protein content and chlorophyll a and b concentrations compared to untreated, stressed plants. This indicates that both compounds help preserve the plant's photosynthetic capacity under water stress. Notably, 1 mM EBR was exceptionally effective, elevating chlorophyll a to its highest recorded level of 10.90 mg/mL FW, underscoring its role in stabilizing chloroplast membranes. The interaction between drought stress and signaling molecules also significantly modulated secondary metabolism. While drought alone increased flavonoid content, the combined treatment of severe drought (50% FC) with 1 mM EBR resulted in a synergistic boost, raising flavonoid levels to 1.58 mg/g FW. This highlights EBR's ability to potentiate the plant's antioxidant defense system. Intriguingly, this same treatment (1 mM EBR under severe stress) led to a reduction in essential oil percentage to 2.44%. This inverse relationship suggests a metabolic trade-off, where the plant, under severe stress and hormonal signaling, prioritizes the synthesis of protective antioxidants over the energetically costly production of volatile essential oils. Carotenoid analysis revealed a similar adaptive pattern. Their concentration rose significantly with drought severity, peaking at 13.28 mg/mL FW under 50% FC, serving a critical photoprotective function. The application of H_2O_2 and EBR further amplified this

response. The highest carotenoid value (16.36 mg/mL FW) was recorded under the combined treatment of severe drought, 1 mM H_2O_2 , and 1 mM EBR, representing a remarkable ~70% increase over the control. This demonstrates the powerful, synergistic role of these signaling molecules in enhancing the plant's capacity to dissipate excess light energy and prevent photo-oxidative damage.

Conclusion Drought stress imposes a severe physiological burden on cumin, significantly impairing its photosynthetic efficiency and primary metabolic functions while triggering a defensive upregulation of secondary metabolites. The exogenous application of hydrogen peroxide and, more prominently, 24-epibrassinolide, serves as a highly effective strategy to mitigate this damage. These signaling molecules enhance the plant's resilience by bolstering its antioxidant defense system, thereby reducing oxidative damage, protecting vital photosynthetic pigments and proteins, and strategically modulating the biosynthesis of secondary metabolites. While both compounds demonstrated beneficial effects, 24-epibrassinolide exhibited superior efficacy in alleviating drought-induced damage and improving the overall physiological status of the cumin plant. This makes EBR a particularly promising, practical tool for improving the cultivation and yield stability of this valuable medicinal herb in water-scarce, arid, and semi-arid regions worldwide.

Keywords: 24- epibresino steroids, Hydrogen peroxide, Protein, Drought stress, Photosynthetic pigments, Cumin, and phenol

Funding: There was no external funding in this study.

Conflict of interest: The authors declare that there is no conflict of interest.

Authors' contribution: All authors contributed equally to the writing and preparation of this manuscript.



اثر پراکسید هیدروژن و ۲۴-اپی براسینواستروئید بر متابولیت‌های ثانویه و فیتوشیمیایی

زیره سبز *Cuminum cyminum* L. تحت تنش خشکی

نسیم رودباری^{۱*}، حسین عباسپور^۲

^۱گروه زیست‌شناسی، واحد کهنوج، دانشگاه آزاد اسلامی، کهنوج، ایران

^۲گروه زیست‌شناسی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

دریافت: ۱۴۰۴/۰۵/۱۵، پذیرش: ۱۴۰۴/۰۶/۱۶

چکیده

۲ ترکیب سیگنالینگ پراکسید هیدروژن و ۲۴-اپی براسینولید به عنوان ترکیبات مؤثر در بهبود رشد و افزایش تحمل به تنش‌های محیطی در گیاهان شناخته می‌شوند. در مطالعه حاضر، تأثیر تنش خشکی و برهم‌کنش آن با این دو ترکیب بر شاخص‌های بیوشیمیایی شامل محتوای پروتئین، قندها، درصد اسانس و همچنین سطوح رنگیزه‌های فتوسنتزی کلروفیل a و b و رنگدانه‌های کمکی (کاروتنوئیدها، فنل‌ها و فلاونوئیدها) مورد ارزیابی قرار گرفت. این پژوهش در قالب یک طرح آزمایشی فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در گلخانه تحقیقاتی مرکز مذکور انجام پذیرفت. عملیات کشت در گلدان‌های حاوی بستر خاک لومی رسی صورت گرفت. هفته پنجم جوانه‌زنی (شروع رشد زایشی)، گیاهان تحت تیمار تنش خشکی در سه سطح ۱۰۰٪ ظرفیت زراعی (شاهد)، ۷۵٪ (تنش ملایم) و ۵۰٪ ظرفیت زراعی (تنش شدید) قرار گرفتند. محلول‌پاشی گیاهان با ۲ ترکیب پراکسید هیدروژن و ۲۴-اپی براسینواستروئید با غلظت‌های (۰، ۵/۰ و ۱ میلی‌مولار) به‌طور متوالی در ۲ مرحله، ابتدا سه روز قبل از اعمال تنش و مجدداً ۱۵ روز بعد انجام شد. نتایج نشان داد اثرات اصلی تنش خشکی و محلول‌پاشی بر صفات مورد بررسی تأثیر معنی‌داری داشت بطوریکه با افزایش سطح تنش، درصد اسانس، قند محلول، کاروتنوئید، ترکیبات فنولی، فلاونوئیدها اندام هوایی افزایش و پروتئین اندام هوایی و کلروفیل کاهش یافت. با افزایش سطح پراکسید هیدروژن و ۲۴-اپی براسینولید بر میزان پروتئین، کلروفیل a و b افزوده شد، به‌طوری‌که محلول‌پاشی ۱ میلی‌مولار ۲۴-اپی براسینولید صفت کلروفیل a را به بیشترین میزان خود (۱۹۰/۱۰ - mg.mL) رساند. پاشش ۲۴-اپی براسینولید تحت شرایط تنش شدید، فلاونوئیدهای اندام هوایی را تا ۱/۸ میلی‌گرم بر گرم وزن تر افزایش و درصد اسانس را ۲/۴۴ درصد کاهش داد. به‌طور کلی می‌توان گفت تنش خشکی، توان فتوسنتز و تولید گیاه را کاهش داد. پاشش پراکسید هیدروژن و ۲۴-اپی براسینولید توانست سیستم فتوسنتزی و مقاومت گیاه زیره به تنش را بهبود بخشد.

واژه‌های کلیدی: اپی براسینواستروئید، پراکسید هیدروژن، پروتئین، تنش خشکی، رنگیزه‌های فتوسنتزی، زیره سبز و فنول

استناد: نسیم رودباری، حسین عباسپور، اثر پراکسید هیدروژن و ۲۴-اپی براسینواستروئید بر متابولیت‌های ثانویه و فیتوشیمیایی

زیره سبز *Cuminum cyminum* L. تحت تنش خشکی، کیفیت و ماندگاری تولیدات کشاورزی و مواد غذایی، (۱۴۰۴)، دوره

۵، شماره ۱، صفحات ۳۹-۵۴.

DOI: <https://doi.org/10.71516/qafj.2025.1214178>

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان، ایران



© نویسندگان

مقدمه

زیره سبز با نام علمی *Cuminum cyminum* L. گیاهی است علفی از تیره چتریان^۱ که ارتفاع آن به ۱۰ تا ۵۰ سانتی‌متر می‌رسد. برگ‌ها ظریف، متناوب و به‌ندرت متقابل، رنگ برگ‌ها سبز تیره و ظاهر آن شفاف و بدون کرک است. میوه فندقه، کشیده و دوکی شکل است که در دو طرف باریک می‌شود و به رنگ زرد یا خرمایی مایل به خاکستری است که در صنایع غذایی، دارویی و آرایشی-بهداشتی کاربرد گسترده‌ای دارد. امروزه زیره سبز بعد از فلفل سیاه به عنوان دومین ادویه مشهور جهان و از نظر دارویی به عنوان مهم‌ترین گیاه دارویی اهلی در ایران شناخته می‌شود (۱). گیاهان در طول زندگی خود همواره در معرض طیف وسیعی از تنش‌های غیرزیستی قرار دارند که هر ساله خسارت قابل توجهی را به اقتصاد و چرخه تولید کشورها تحمیل می‌کند (۲). تنش خشکی یکی از این تنش‌هاست که از عوامل عمده محدودیت تولید گیاهان در سراسر جهان محسوب شده و اثرات نامطلوبی بر رشد و نمو گیاه و سایر فرایندهای متابولیکی دارد. برای فرار از چنین شرایطی، در گیاهان فرایندهای پیچیده‌ای جهت واکنش مناسب به انواع تنش‌ها ایجاد می‌شود (۳). طبق تحقیقات صورت گرفته بیشتر مناطق کشت زیره سبز در ایران مربوط به مناطق خشک و نیمه‌خشک می‌باشد که با توجه به کمبود آب در بخش کشاورزی این مناطق، تحقیق در زمینه استفاده صحیح از آب در این بخش ضروری است. تعیین ظرفیت بردباری گیاه به شرایط شوری و خشکی، از طریق ارزیابی و سنجش تولید بیومس و تعیین محتوای کلروفیل قابل تشخیص می‌باشد (۴). رنگدانه‌های فتوسنتزی برای تولید محصول و تأمین انرژی مورد نیاز گیاه ضروری می‌باشند و نقش مهمی را در واکنش‌های فتوشیمیایی ایفا می‌کنند. کلروفیل یکی از اجزای اصلی کلروپلاست برای فتوسنتز می‌باشد که میزان فتوسنتز با حجم کلروفیل نسبت مستقیم دارد (۵). یکی از راه‌کارهای کلیدی گیاهان در مقابله با خشکی و کاهش خسارات اکسیداتیو ناشی از تولید گونه‌های اکسیژن فعال، تولید ترکیبات سیگنالینگ مثل ترکیبات آنزیمی و غیر آنزیمی می‌باشد. براسینواستروئیدها^۲ یکی از ترکیبات

سیگنالینگ هستند که در مقادیر بسیار پایین (نانوگرم) به‌طور طبیعی در گیاهان تولید می‌شوند و باعث افزایش مقاومت گیاهان در برابر تنش‌های محیطی می‌شوند. افزایش میزان مقاومت گیاهان تیمار شده با این ترکیبات، گویای این ادعاست. تیمار گیاهان مختلف از جمله برنج (۶) و خیار سبز (۷) تحت تنش دمایی پایین به‌وسیله براسینواستروئیدها رشد بهتری را نسبت به گیاهان شاهد نشان دادند. در گیاهان تحت تنش، براسینواستروئیدها مانع تخریب هسته و کلروپلاست شده و در نتیجه باعث محافظت از فراساختار سلول‌های برگ می‌شود. تحقیقات زیادی بر روی گیاهان مختلف نشان داده که کاربرد براسینواستروئید به‌تنهایی یا به همراه سایر ترکیبات سیگنالینگ، موجب افزایش عملکرد محصول و مقاومت به تنش در گیاهان مختلف می‌شود (۸). هیدروژن پراکسید یکی از اصلی‌ترین و باثبات‌ترین گونه‌های اکسیژن فعال در گیاهان است که عملکردهای آن در فرایندهای اساسی گیاه مانند نمو، سوخت‌وساز و برابری به تنش‌های زنده و غیرزنده گزارش شده است (۹). وقتی مقدار پراکسید هیدروژن در سلول توسط یکسری آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در حد طبیعی حفظ شود به عنوان یک پیامبر ثانویه و به همراه سایر سیگنال‌های سلولی برای حفاظت گیاهان در برابر تنش‌ها و تحریک تحمل به تنش عمل می‌کند (۱۰-۱۱). پراکسید هیدروژن همچنین می‌تواند نقشی دوگانه در گیاهان ایفا کند، به‌طوری‌که این ترکیب در غلظت‌های پایین به عنوان یک پیام حدواسط جهت تولید سالیسیلیک اسید و اتیلن عمل می‌نماید که سبب تطابق بیشتر با شرایط تنش‌زا می‌شود، اما پراکسید هیدروژن در غلظت‌های بالا تخریب بافت‌ها و در نهایت مرگ گیاه را به دنبال دارد (۱۲). بنابراین با تحقیقات گسترده بر روی گیاهان مختلف مشخص گردیده که این ماده نه تنها در غلظت‌های پایین باعث افزایش سازگاری گیاه به شرایط تنش بلکه سبب فعال شدن فرایندهای فیزیولوژیکی مرتبط با رشد گیاه را به دنبال دارد. Qiao و همکاران (۲۰۲۲) با آزمایش بر روی گیاه تنباکو، عنوان کردند اسپری پراکسید هیدروژن با غلظت ۵ میلی‌مولار بر روی گیاهان، با القای مجموعه‌ای از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی باعث محافظت گیاه از تنش اکسیداتیو شد (۱۳). همچنین تیمار گیاهان نعنای با پراکسید هیدروژن مقاومت آن‌ها را در برابر تنش اسمزی با فعال نمودن

^۱ Apiaceae^۲ Brassinosteroide

نوع شنی- رسی بود که سایر ویژگی‌های آن در جدول (۱)، آورده شده است. به دلیل کمبود مواد آلی، به خاک تمامی گلدان‌ها کودهای N, P, K و Fe, Mn, Zn به میزان مناسب و با توجه به نیاز این ترکیبات به خاک گلدان‌ها افزوده شد. پس از کود دهی خاک گلدان‌ها، بذره‌های زیره سبز با قوه نامیه و کیفیت بالا که از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شده بود با هیپوکلریت سدیم ۱۵٪ و اتانول ۱۰٪ به ترتیب به مدت ۲ دقیقه به‌طور جداگانه ضدعفونی و با ۳ بار شستشو با آب مقطر استریل انجام و به‌منظور رشد بهتر، به مدت ۲۴ ساعت در درون آب قرار گرفتند، بدین ترتیب مقدار زیادی از فنول‌های بذر که مانع جوانه‌زنی می‌شوند، آب شویی گردید. بذور استریل شده در گلدان‌های پلاستیکی زهکش دار با ارتفاع ۳۰ سانتی‌متر و گنجایش ۴ کیلوگرم خاک کاشته به‌طوری‌که درون هر گلدان به تعداد ۱۰ عدد بذر در عمق ۲-۱ سانتی‌متری خاک قرار گرفت و بعد از ۷ روز عملیات تنک کردن گیاهچه‌ها انجام و درنهایت به تعداد ۴ بوته در هر گلدان باقی ماند. حداقل و حداکثر دمای شبانه‌روز در داخل گلخانه به ترتیب ۱۶ و ۲۸ درجه سانتی‌گراد حفظ گردید. با توجه به اینکه تحقیقات در زیره سبز نشان داده که در درجه حرارت‌های بالا تعدادی گل‌های فاقد تخمدان (گل نر) به وجود می‌آید، سعی شد دمای گلخانه با استفاده از سیستم تهویه و خنک‌کننده حفظ شود. آبیاری تمام گیاهان تا هفته پنجم و آغاز رشد زایشی، با آب و با توجه به نیاز گیاهان به آبیاری انجام شد. در طول آزمایش و در طی مراحل مختلف رشد گیاه صفات بیوشیمیایی و فیزیولوژیک ازجمله محتوای پروتئین اندام هوایی، قندمحلول و نامحلول اندام هوایی، کلروفیل a و b، کاروتنوئید، فنل، فلاونوئید و درصد اسانس اندازه‌گیری شد.

سیستم آنتی‌اکسیدانی بهبود بخشیده است (۷). نظر به اهمیت غذایی و داروئی گیاه زیره سبز و موقعیت جغرافیایی بیشتر مناطق ایران به عنوان مناطق خشک و نیمه‌خشک، شناخت سازوکارهای مقابله با تنش خشکی و تشخیص اثرات تنش خشکی بر فرایندهای فیزیولوژیکی و متابولیسمی گیاه زیره سبز از بسیار حائز اهمیت می‌باشد. از این‌رو هدف از پژوهش حاضر، علاوه بر بررسی آسیب‌های غشایی خشکی در گیاه داروئی زیره سبز، بررسی نقش حفاظتی پراکسید هیدروژن و براسینواسستروئیدها و نیز برهمکنش آن در مقابله با تنش اکسیداتیو ناشی از خشکی می‌باشد.

روش کار

پژوهش حاضر، به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار در پاییز سال ۱۳۹۵ در گلخانه تحقیقاتی مرکز تحقیقات، آموزش کشاورزی و منابع طبیعی جنوب استان کرمان به اجرا درآمد. تیمارهای مورد بررسی شامل: ۳ سطح مختلف آبیاری بر اساس ظرفیت زراعی (FC)، T_1 : ۱۰۰٪ ظرفیت زراعی (شاهد)، T_2 : ۷۵٪ ظرفیت زراعی (تنش متوسط) و T_3 : ۵۰٪ ظرفیت زراعی (تنش شدید) در نظر گرفته شدند (۱۴). اعمال تنش خشکی با شروع گلدهی گیاهان و بر اساس ظرفیت زراعی (FC) و میزان آب موردنیاز گیاهان انجام شد. سه روز قبل از اعمال تنش کم‌آبی، هورمون ۲۴-اپی براسینواسستروئید (شرکت سیگما آلدریج) و پراکسید هیدروژن (H_2O_2 : مرک ۳۰٪) با غلظت‌های (صفر، ۰/۵ و ۱ میلی‌مولار) به‌صورت محلول‌پاشی روی سطح برگ طی دو مرحله، در دو روز متوالی و اوایل صبح صورت گرفت. مجدداً ۱۵ روز بعد، محلول‌پاشی تمامی گلدان‌های در حال تنش با ۲۴-اپی براسینواسستروئید و پراکسید هیدروژن انجام شد. خاک مورد استفاده در این پژوهش از

جدول ۱- خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک

بافت خاک	هدایت الکتریکی dS/m	pH	فسفر قابل جذب	پتاسیم قابل جذب	سدیم	کلسیم	منیزیم
(mg/Kg)							
شنی رسی	۰/۴۲	۷/۹	۶/۸	۱۵۰	۲/۳۴	۱۳۶۵	۱۰۵

محلول رویی توسط اسپکتروفتومتر مدل (Jenway Genova) در طول موج ۶۳۳ و ۶۴۵ نانومتر اندازه‌گیری و قرائت شد. در نهایت میزان کلروفیل a و b و کاروتنوئید بر حسب میلی گرم بر میلی لیتر محلول و با توجه به وزن تر نمونه‌ها به دست آمد. برای سنجش فنول از اندام هوایی، نمونه تر تهیه و پس از قرار گرفتن در ۱۰ میلی لیتر اتانول ۸۰٪ جوشانده شد. در ادامه سانتریفوژ نمودن نمونه‌ها، افزودن فولن رقیق شده و کربنات سدیم اشباع و سانتریفوژ مجدد صورت پذیرفت و میزان جذب در ۶۴۰ نانومتر در مقابل شاهد انجام شد. منحنی استاندارد با استفاده از کاتکول رسم و میزان ترکیبات فنلی بر حسب میلی گرم در گرم وزن تر محاسبه شد. جهت سنجش میزان فلاونوئید به میزان ۱ گرم بافت تر برگ در ۱۰ میلی لیتر متانول اسیدی (شامل الکل متیلیک ۹۹/۵ درصد و هیدروکلریک اسید خالص به نسبت ۹۹ به ۱) همگن و سانتریفوژ شد. میزان جذب عصاره رویی در ۳۰۰ نانومتر برای فلاونوئیدها با دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین شد و نتایج به صورت جذب در گرم وزن تر مورد مقایسه قرار گرفت (۱۶). برای استخراج اسانس، مقدار ۴۰ گرم از بذره‌های خشک شده گیاه در سایه (با احتساب میزان رطوبت موجود در دانه‌ها) و تحت جریان هوا، به همراه یک لیتر آب مقطر در بالن دستگاه کلونجر قرار گرفت. اسانس گیری پس از آسیاب نمودن نمونه‌ها با حرارت دادن بالن به مدت سه ساعت انجام و درصد اسانس موجود در هر نمونه تعیین شد. داده‌های تحقیق پس از جمع‌آوری با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS 9.1 بررسی و تحلیل شدند. مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون تعقیبی دانکن در سطح ۵ درصد و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel 2016 صورت گرفت.

نتایج و بحث

بررسی پروتئین اندام هوایی

نتایج تجزیه واریانس صفات نشان داد که از نظر پروتئین اندام هوایی بین سطوح مختلف خشکی، پراکسید هیدروژن و ۲۴-اپی براسینولید تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد مشاهده شد (جدول ۲).

سنجش پروتئین، از روش برادفورد انجام شد (۱۴). برای این منظور ۱ گرم از بافت تر اندام هوایی که در دمای ۴-۰ درجه سانتی‌گراد قرار داشت با ۵ میلی لیتر بافر تریس - HCl ۰/۵٪ مولار اسیدیته ۷/۵ به مدت ۳۰ دقیقه هموژن و پس از انتقال به ایندرف، به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۱۳۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ گردید. ۱۰۰ میلی لیتر از عصاره با ۵ میلی لیتر محلول برادفورد مخلوط و میزان جذب توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل (Spekol 2000) در طول موج ۵۹۵ نانومتر سنجش و میزان غلظت پروتئین بر حسب mg/L بیان گردید. برای سنجش قندها از روش فنل سولفوریک اسید استفاده شد که برای این منظور ۰/۱ گرم بافت اندام هوایی پس از خشک شدن درون دستگاه آون با دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک هفته با ۱۰ میلی لیتر اتانول ۸۰٪ مخلوط و پس از گذشت یک هفته محلول رویی برای اندازه‌گیری مقدار قندهای محلول و رسوبات باقی‌مانده برای سنجش قندهای نامحلول استفاده شد. به مقدار ۲ میلی لیتر محلول رویی با ۱ میلی لیتر فنول ۵٪ مخلوط و ۵ میلی لیتر اسیدسولفوریک نیز به محلول اضافه گردید. بعد از ۳۰ دقیقه میزان جذب توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Spekol 2000) در طول موج ۴۸۵ نانومتر مورد سنجش قرار گرفت. رسوبات پس از خشک شدن در آون با ۱۰ میلی لیتر آب مقطر مخلوط و ۱۵ دقیقه در حمام آب جوش قرار گرفت. پس از صاف کردن ۲ میلی لیتر از آن را برداشت و با ۱ میلی لیتر فنول و ۵ میلی لیتر اسیدسولفوریک مخلوط و میزان جذب در طول موج ۴۸۵ نانومتر محاسبه و بر حسب mg L^{-1} بیان گردید. میزان قند از طریق نمودار استاندارد مورد سنجش قرار گرفت. جهت سنجش رنگیزه‌های فتوسنتزی شامل کلروفیل a و b و کاروتنوئیدها از روش Lichtenthaler & Buschmann استفاده گردید (۱۵). برای این منظور ۰/۲ گرم بافت تازه از اندام هوایی توسعه یافته گیاه جدا، در هاون چینی همراه با ۱۰ میلی لیتر استون ۸۰٪ ساییده شده و عصاره حاصل با استفاده از دستگاه سانتریفوژ به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۵۰۰۰ سانتریفوژ گردید و عملاً جداسازی انجام شد. سپس حجم نهایی عصاره با ۱۰ میلی لیتر از استون ۸۰ درصد به ۲۰ میلی لیتر رسانده شد. طول موج جذبی

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر تنش خشکی، پراکسید هیدروژن و براسینواستروئید بر صفات مورد آزمون

منابع تغییر	پروتئین	قند محلول	قند نامحلول	کلروفیل a	کلروفیل b	کاروتنوئید	فنول mg/g	فلاونوئید جذب در g	درصد اسانس
mg/L FW				mg/mL FW					
خشکی									
شاهد (۱۰۰٪)	a۱۱/۱۹	c۱۰/۴۹	c۴/۳۱	a۱۰/۸۹	a۶/۵۱	a۷/۶۴	b۰/۷۷	c۰/۷۳	c۱/۹۲
٪۷۵ FC	a۱۱/۱۶	b۱۰/۷۸	b۴/۵۰	a۹/۶۵	b۵/۴۳	b۹/۵۲	b۰/۷۸	b۱/۱۷	b۲/۷۱
٪۵۰ FC	۱۰/۹۶ ^b	a۱۱/۶۹	۵/۱۴ ^a	b۷/۸۹	c۴/۷۹	a۱۳/۲۸	a۰/۹۵	a۱/۵۸	a۴/۳۸
H ₂ O ₂									
۰ mM	a۱۱/۰۷	b۱۰/۹۸	۴/۶۴ ^a	c۹/۳۸	ab۵/۳۴	b۹/۸۱	a۰/۸۲	b۱/۱۵	b۲/۹۱
۰/۵mM	a۱۱/۰۹	a۱۰/۹۹	۴/۶۵ ^a	ab۹/۵۵	a۵/۵۲	b۱۰/۱۱	a۰/۸۳	ab۱/۱۵	a۳/۰۲
۱mM	۱۱/۱۵ ^a	a۱۱/۰۰	a۴/۶۵	a۹/۹۲	b۵/۸۶	a۱۰/۵۲	a۰/۸۴	a۱/۱۸	a۳/۰۷
Br									
۰ mM	c۱۰/۸۷	c۱۰/۸۹	c۴/۴۷	c۸/۳۱	c۴/۰۹	a۸/۶۲	c۰/۷۷	c۱/۰۲	a۳/۶۶
۰/۵mM	b۱۱/۱۳	b۱۰/۹۷	ab۵/۳۴	b۱۰/۰۶	b۵/۵۲	b۱۰/۰۱	b۰/۸۳	b۱/۱۷	b۲/۹۱
۱mM	۱۱/۳۱ ^a	a۱۱/۱۰	a۵/۳۶	a۱۰/۹۰	a۷/۱۱	a۱۱/۸۱	a۰/۸۹	a۱/۲۹	c۲/۴۴

در هر ستون، میانگین‌های دارای حروف مشترک در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معناداری با هم ندارند.

(جدول ۴). تحت تأثیر تنش‌های غیرزیستی از جمله تنش خشکی، رادیکال‌های آزاد شده در اثر عامل تنشی سبب از بین رفتن پروتئین برگ می‌شوند که با تحقیقات Younis و همکاران (2024) در گیاه بامیه، Shahzad و همکاران (۱۸) در گیاه کلزا، Abd El-Monem (۱۹) در لوبیا مطابقت دارد. به دفعات زیادی در تحقیقات گزارش شده است که در گیاهان مختلفی که با براسینواستروئید تیمار شده بودند افزایش سنتز پروتئین مشاهده شده است که با نتایج تحقیق حاضر نیز مطابقت دارد، به‌طوری‌که برهم‌کنش ۲۴- اپی براسینواستروئید تنش خشکی در زیره سبز سبب افزایش میزان پروتئین در اندام هوایی شد که با نتایج پژوهش نوبخت و همکاران (۲۰) بر روی نعنای هم‌مخوانی دارد.

قند محلول و نامحلول اندام هوایی

نتایج تحقیق نشان داد از نظر قند محلول اندام هوایی بین سطوح مختلف تنش خشکی، پراکسید هیدروژن و ۲۴- اپی براسینوئید تفاوتی معنی‌دار در سطح ۵ درصد مشاهده شد (جدول ۲). اثر متقابل

اثرات ساده و متقابل سه‌گانه عوامل آزمایشی بر میزان پروتئین اندام هوایی نیز معنی‌دار گردید (جدول ۳ و ۴). تحت تأثیر تنش و با افزایش شدت تنش خشکی، از میزان پروتئین اندام هوایی کاسته شد بطوریکه این میزان تحت تأثیر تنش خشکی به‌طور معنی‌داری از ۱۱/۱۹ میلی‌گرم بر لیتر وزن تر در شرایط نرمال به ۱۰/۹۶ (میلی‌گرم بر لیتر) در شرایط تنش شدید (۵۰٪ ظرفیت زراعی) کاهش یافت (جدول ۳). محلول‌پاشی پراکسید هیدروژن با سطوح (۵/۰ و ۱ میلی‌مولار) در شرایط تنش خشکی، بر میزان پروتئین اندام هوایی معنی‌دار نشد (جدول ۳). این در حالی است که بالاترین میزان پروتئین با میانگین ۱۱/۳۱ mg/L در تیمار تنش، با محلول‌پاشی ۱ میلی‌مولار ۲۴- اپی براسینواستروئید و کمترین مقدار در عدم محلول‌پاشی با ۲۴- اپی براسینواستروئید با میانگین ۱۰/۸۷ mg/L به دست آمد (جدول ۳). همچنین با توجه به نتایج، برهم‌کنش پراکسید هیدروژن (۱ میلی‌مولار) و ۲۴- اپی براسینواستروئید (۱ میلی‌مولار) در تیمار ۱۰۰٪ ظرفیت زراعی (شاهد)، میزان پروتئین اندام هوایی را به میزان ۱۱/۵۵ mg L⁻¹ افزایش داد

در گیاه بامیه و همچنین سلیمی و همکاران (۲۰۱۶) در مطالعه‌ای روی گیاه بابونه هم‌خوانی دارد. علاوه بر این، کاربرد براسینواستروئید در شرایط تنش، با افزایش میزان اسمولیت‌هایی مانند پرولین و قندهای محلول، رابطه مستقیم و مثبتی با افزایش مقاومت گیاه در مواجهه با تنش‌های غیر محیطی دارد (۲۵).

بررسی میزان کلروفیل a

یافته‌ها نشان داد برهمکنش سطوح خشکی، محلول‌پاشی براسینواستروئید و پراکسید هیدروژن تأثیر معنی‌داری در سطح ۵ و ۱ درصد بر میزان کلروفیل a داشت (جدول ۲). در حالی‌که اثر متقابل سه‌گانه خشکی × براسینواستروئید × پراکسید هیدروژن بر میزان کلروفیل a معنی‌دار نشد (جدول ۴). با افزایش سطح تنش، از مقدار کلروفیل a کاسته شد به‌طوری‌که بیشترین و کمترین میانگین کلروفیل a به میزان ۱۰/۹۰ و ۷/۸۹ (mg mL^{-1}) به ترتیب مربوط به تیمار شاهد (۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی) و ۵۰ درصد ظرفیت زراعی بود، در حالی‌که در تمام سطوح تنش خشکی بیشترین میزان کلروفیل a با محلول‌پاشی ۱ میلی‌مولار ۲۴-اپی براسینولید و ۱ میلی‌مولار پراکسید هیدروژن به ترتیب به میزان ۱۰/۹۰ و ۹/۹۲ (mg mL^{-1} FW) به دست آمد. این امر نشان می‌دهد که محلول‌پاشی گیاه زیره سبز با ۲۴-اپی براسینولید و پراکسید هیدروژن توانست تا حدود زیادی اثرات تنش خشکی را کاهش دهد. مطابق با نتایج پژوهش حاضر، برخی محققین گزارش کردند که پیش تیمار گیاهان با پراکسید هیدروژن و براسینواستروئیدها، گیاهان را در برابر بسیاری از تنش‌ها محافظت می‌کنند (۱۳). واکنش گیاه به خشکی به ماهیت کمبود آب وابسته است و می‌تواند به‌صورت پاسخ‌های فیزیولوژیک کوتاه‌مدت یا بلندمدت بروز کند. تغییرات کلروفیل a و b به عنوان یک واکنش کوتاه‌مدت به تنش و معیاری از توان حفظ قدرت منبع در شرایط تنش خشکی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲۲). در مطالعه نوبخت و همکاران (۲۰۱۹) بر روی گیاه نعنای اعلام شد تنش خشکی موجب کاهش میزان رنگدانه‌ها به‌ویژه کلروفیل a گردیده است (۲۰). کاهش رنگدانه‌های فتوسنتزی تحت تأثیر تنش احتمالاً به علت افزایش تولید گونه‌های فعال

خشکی × براسینواستروئید × پراکسید هیدروژن نیز بر قند محلول و نامحلول اندام هوایی در سطح آماری ۵ درصد معنی‌دار شد (جدول ۴). بیشترین و کمترین میزان قند محلول اندام هوایی به ترتیب با میانگین $11/69 \text{ mg/L}$ و $10/49$ در شرایط تنش شدید (۵۰٪ ظرفیت زراعی) و عدم تنش (شاهد) به دست آمد که افزایشی حدوداً ۱۲ درصدی داشته است (جدول ۳). همچنین در شدت تنش ۵۰٪ ظرفیت زراعی و محلول‌پاشی سطح ۱ میلی‌مولار پراکسید هیدروژن میزان این صفت به 11 mg L^{-1} رسید و این در حالی است که میزان قند نامحلول اندام هوایی در چنین شرایط مشابهی با محلول‌پاشی پراکسید هیدروژن اختلاف معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد (جدول ۳). اثر متقابل سه‌گانه تنش خشکی × محلول‌پاشی براسینواستروئید × پراکسید هیدروژن نیز بر قند محلول و نامحلول اندام هوایی معنی‌دار شد (جدول ۴). بالاترین مقدار قند محلول مربوط به استفاده همزمان پراکسید هیدروژن (۱ میلی‌مولار) و ۲۴-اپی براسینواستروئید (۱ میلی‌مولار) و سطح بالای تنش (۵۰٪ ظرفیت زراعی) به میزان ۱۱/۱۶ (میلی‌گرم بر لیتر) حاصل شد (جدول ۴). عکس نتایج به‌دست‌آمده در مورد اثر متقابل بر میزان قند محلول، بالاترین میزان قند نامحلول اندام هوایی در تیمار شاهد (۱۰۰٪ ظرفیت زراعی)، محلول‌پاشی پراکسید هیدروژن (۱ میلی‌مولار) و ۲۴-اپی براسینواستروئید (۱ میلی‌مولار) با میانگین $(5/41 \text{ mg L}^{-1})$ به دست آمد (جدول ۴). علت افزایش میزان هیدرات کربن در اثر تنش خشکی این است که گیاه فشار اسمزی داخلی خود را بالا می‌برد تا بتواند از خاک مواد غذایی و آب جذب کند. توزیع مواد هیدروکربنی به‌طور مستقیم تحت تأثیر تنش‌ها مانند کمبود آب و به‌طور غیرمستقیم تحت تأثیر هورمون‌های گیاهی قرار می‌گیرند. تجمع ترکیبات آلی مانند هیدرات کربن و آمینواسیدها در سیتوپلاسم نقش مهمی در تنظیم فشار اسمزی گیاهان دارند (۲۱). گزارش شده است که تنش شوری و به دنبال آن خشکی علت بسیاری از تغییرات در مقدار کربوهیدرات‌های گیاهی است و آشکار شده است که با افزایش تنش در برگ‌ها مقدار قند نامحلول کاهش می‌یابد (۲۲). بر اساس نتایج به‌دست‌آمده، در گیاه زیره سبز تحت تنش خشکی، میزان قندهای محلول و نامحلول افزایش یافت. این یافته با نتایج باقی‌زاده و همکاران (۲۳)

و پراکسید هیدروژن بر میزان کلروفیل b بود (جدول ۲). اثر متقابل تنش خشکی × براسینواستروئید، تنش خشکی × پراکسید هیدروژن و تنش خشکی × پراکسید هیدروژن × براسینواستروئید بر میزان کلروفیل b نیز معنی دار شد (جدول ۳ و ۴). مقایسه میانگین مربوط به اثر متقابل تیمارهای آزمایشی نشان داد که تنش کم آبیاری موجب کاهش کلروفیل b گردید اما میزان کلروفیل در اثر کاربرد براسینواستروئید و پراکسید هیدروژن نسبت به شاهد و شرایط تنش افزایش یافت. بیشترین کلروفیل b (۷/۱۱ میلی گرم در میلی لیتر وزن تر) تحت شرایط تنش و ۱ میلی مولار ۲۴- اپی براسینواستروئید مشاهده شد. کمترین میزان کلروفیل b به شرایط تنش و عدم کاربرد ۲۴- اپی براسینواستروئید تعلق گرفت (جدول ۳).

اکسیژن می باشد. رادیکال های فعال باعث پراکسیداسیون و تجزیه رنگدانه ها می شوند (۲۳). نتایج احمدی موسوی و همکاران (۲۰۰۵) مطابق با پژوهش حاضر، نشان دهنده افزایش میزان کلروفیل با کاربرد براسینواستروئید در شرایط تنش خشکی بود (۲۷). به نظر می رسد علت افزایش کلروفیل ها در اثر کاربرد براسینواستروئید، افزایش مقاومت در برابر تنش اکسیداتیو باشد زیرا براسینواستروئیدها دارای خاصیت آنتی اکسیدانی می باشند و می توانند از تخریب کلروفیل جلوگیری نمایند. در توافق با نتایج تحقیق حاضر، بدل زاده و همکاران (۲۰۲۲) نیز بیان کردند براسینواستروئید می تواند از خسارت به غشاها و ماکرومولکول های گیاه در برابر تنش های محیطی جلوگیری کند (۲۳).

کلروفیل b

نتایج تجزیه واریانس داده ها حاکی از معنی داری اثر ساده سطوح مختلف خشکی، محلول پاشی ۲۴- اپی براسینوئید

جدول ۳- مقایسه میانگین اثر ساده تنش خشکی، پراکسید هیدروژن و براسینواستروئید بر صفات مورد آزمون

میانگین مربعات										
منابع تغییر	درجه آزادی	غلظت پروتئین	قند محلول اندام هوایی	قند نامحلول اندام هوایی	کلروفیل a	کلروفیل b	کاروتنوئید	فنول اندام هوایی	فلاونوئید اندام هوایی	درصد اسانس
فاکتور آبیاری (I)	۲	۰/۴۲**	۵/۲۵**	۵/۱۵۳**	۷۴/۴۴**	۲۰/۴۸**	۲۲۲/۰۷**	۰/۲۷۸۰**	۴/۹۴۴**	۴۲/۵۹**
Br	۲	۱/۳۵**	۰/۳۰**	۱/۶۴۹**	۲۲/۶۵**	۶۱/۹۰**	۶۸/۶۸**	۰/۱۰۰۲**	۰/۴۹۷**	۱۰/۱۵**
H ₂ O ₂	۲	۰/۰۵	۰/۰۰**	۰/۰۰۱	۰/۵/۲*	۱/۸۹	۳/۴۴**	۰/۰۰۳۴	۰/۰۰۹	۰/۱۸*
خشکی × براسینو	۴	۰/۱۶**	۰/۰۴**	۰/۱۳۷**	۲۷/۱	۰/۴۰	۶/۷۹**	۰/۰۰۸۴**	۰/۰۳۴**	۱/۴۲**
خشکی × پراکسید	۴	۰/۰۳	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۲۱/۰	۰/۷۳	۰/۲۳	۰/۰۰۰۴	۰/۰۰۰	۰/۰۳۱
براسینو × پراکسید	۴	۰/۰۲	۰/۰۰۱	۰/۰۰۰	۰/۲/۰	۰/۴۵	۰/۰۹	۰/۰۰۰۴	۰/۰۰۱	۰/۰۹۲
خشکی × براسینو × پراکسید	۸	۰/۰۳	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۱۵/۰	۰/۲۱	۰/۱۴	۰/۰۰۱۳	۰/۰۰۲	۰/۰۸*
خطا	۵۴	۰/۰۲	۰/۰۰۰۵	۰/۰۰۰۹	۶۶/۰	۰/۷۱	۰/۵۶	۰/۰۰۱	۰/۰۰۳	۰/۰۴
ضریب تغییرات	-	۱/۳۰	۰/۲۱	۰/۶۶	۸/۸۴	۱۵/۱۱	۷/۴۰	۴/۳۲	۴/۵۱	۶/۶۶

ns, *, ** , به ترتیب عدم معناداری و معنی داری در سطح ۵ و ۱ درصد می باشند.

جدول ۴- مقایسه میانگین اثر متقابل سه گانه خشکی $\times$ پراکسید هیدروژن $\times 24$ - اپی براسینواستروئید بر صفات

مورد آزمون

درصد اسانس	غلظت پروتئین	قند محلول	قند نامحلول	کلروفیل a	کلروفیل b	کاروتنوئید	فنول	فلاونوئید	درصد
٪	mg/L FW	mg/L FW	mg/mL FW	mg/g	جذب در gr	٪			
100%FC $\times$ H ₂ O ₂ 1mM $\times$ Br1mM	a ₁₁ /۵۵	c ₁₀ /۷۸	a ₅ /۴۱	a ₁₁ /۸۱	a ₈ /۴۶	c ₉ /۶۳	a ₀ /۹۶	c ₀ /۹۷	c ₁ /۳۰
75%FC $\times$ H ₂ O ₂ 1mM $\times$ Br1mM	b ₁₁ /۳۹	b ₁₀ /۹۳	b ₄ /۷۳	a ₁₁ /۶۰	b ₆ /۸۶	b ₁₃ /۹۰	b ₀ /۸۷	b ₁ /۳۰	b ₂ /۳۳
50%FC $\times$ H ₂ O ₂ 1mM $\times$ Br1mM	c ₁₁ /۱۹	a ₁₁ /۱۶	c ₄ /۶۳	a ₁₁ /۰۵	c ₅ /۹۳	a ₁₆ /۳۶	b ₀ /۸۶	a ₁ /۸۲	a ₃ /۱۶

تنش کم آبی، با افزایش پراکسیداسیون در غشاء کلروپلاست ها و تیلکوئیدها، همچنین خسارت به پروتئین های متصل به فتوسیستم ها تا حدود زیادی باعث کاهش میزان کلروفیل a و b و کاهش ظرفیت فتوسنتزی می شود (۲۲). تغییراتی که تحت شرایط تنش در میزان کلروفیل ایجاد می شود می تواند به علت اختلال در بیوسنتز یا تسریع در تجزیه رنگیزه باشد (۴). همچنین تخریب مولکولی کلروفیل در گیاهان تحت تنش به علت جدا شدن زنجیره فیتولی از حلقه پورفیرین در اثر تولید رادیکال های آزاد اکسیژن و یا فعالیت آنزیم کلروفیلاز (۲۵) و افزایش مقدار اتیلن می باشد. در تحقیق حاضر، مشخص شد تنش خشکی به شدت از میزان رنگیزه های فتوسنتزی کاسته است که با نتایج پژوهش نوبخت و همکاران (۲۰) نیز مطابقت دارد. محلول پاشی گیاهان با ۲۴- اپی براسینوئید و پراکسید هیدروژن باعث افزایش میزان بیوسنتز رنگدانه های فتوسنتزی و حفاظت از رنگدانه های فتوسنتزی در شرایط تنش در گیاه شد، که با نتایج بدل زاده و همکاران (۲۰۲۲) مطابقت دارد (۲۳). محلول پاشی گیاهان تحت تنش، باعث افزایش هدایت روزنه ای و میزان دی اکسید کربن در فضای روزنه ها می شود که به دنبال آن میزان فتوسنتز گیاه افزایش و به دنبال آن افزایش عملکرد گیاه را خواهد داشت (۲۱).

آنالیز میزان کاروتنوئید

مطابق نتایج تجزیه واریانس داده ها، محتوای کاروتنوئید تحت تأثیر تنش خشکی، محلول پاشی براسینواستروئید، پراکسید هیدروژن و همچنین اثر متقابل تنش خشکی و

براسینواستروئید قرار گرفت (جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین داده ها نشان داد، بیشترین میانگین کاروتنوئید ۱۳/۲۸ (میلی گرم بر میلی لیتر وزن تر) مربوط به ۵۰ درصد ظرفیت زراعی بود یعنی با افزایش تنش خشکی میزان کاروتنوئید نیز افزایش یافت (جدول ۳). تنش خشکی علاوه بر اینکه رشد و نمو را در گیاهان کاهش می دهد، باعث تغییر در مسیر برخی از فرآیندهای متابولیسمی نیز می شود. این تغییرات می تواند گیاه را در مقابل تنش مقاوم سازد (۲۲). افزایش میزان کاروتنوئیدها در شرایط تنش با توجه به نقش آن ها در سیستم دفاع آنتی اکسیدانی برای محافظت از رنگدانه های فتوسنتزی (کلروفیل) قابل انتظار است (۲۳). افزایش میزان کاروتنوئیدها در گیاه بابونه تحت تنش خشکی، در تحقیق انجام شده توسط Li و همکاران (۱۱) با نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد که نشان دهنده نقش آن در تعدیل میزان رادیکال های فعال اکسیژن می باشد. محلول پاشی گیاهان با ۲۴- اپی براسینواستروئید نیز توانست به میزان ۱۱/۸۱ (mg mL⁻¹FW) سبب افزایش میزان کاروتنوئید شود. محلول پاشی گیاهان تیمار شده در تنش خشکی با پراکسید هیدروژن (۱ میلی مولار) در شرایط تنش شدید (۵۰٪ ظرفیت زراعی) بیشترین محتوای کاروتنوئید به میزان ۱۰/۵۲ (میلی گرم بر میلی لیتر وزن تر) به دست آمد که نسبت به تیمار تنش ملایم (۷۵٪ ظرفیت زراعی) و تیمار شاهد افزایش معنی داری مشاهده گردید (جدول ۳). در حقیقت کاروتنوئیدها رنگدانه هایی هستند که از تخریب کلروفیل ها در تنش های اکسیداتیو جلوگیری می کنند. نتایج حاصل از این تحقیق نشان

می‌دهد که استفاده از براسینواستروئید چه در شرایط کنترل و چه در شرایط تنش متوسط (۷۵٪ ظرفیت زراعی) و شدید (۵۰٪ ظرفیت زراعی) سبب افزایش فعالیت‌های رنگیزه‌های فتوسنتزی از جمله کاروتنوئیدها شده است (جدول ۳). اثر سه‌گانه عوامل آزمایشی نشان داد که بالاترین مقدار کاروتنوئید مربوط به تیمار تنش شدید (۵۰٪ ظرفیت زراعی) و کاربرد همزمان پراکسید هیدروژن در غلظت (۱ میلی‌مولار) و ۲۴-پی براسینواستروئید (۱ میلی‌مولار) با میانگین ۱۶/۳۶ (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر وزن تر) به دست آمد که نسبت به شاهد حدود ۷۰ درصد افزایش داشته است. براسینواستروئیدها سبب افزایش میزان کاروتنوئیدها و به دنبال آن جلوگیری از تخریب کلروفیل‌ها در خردل (۱۲) و گندم (۱۱) شده است که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد.

فنول و فلاونوئید اندام هوایی

یافته‌های تحقیق تأیید نمود که از نظر فنول و فلاونوئید اندام هوایی بین سطوح مختلف تنش خشکی، پراکسید هیدروژن و ۲۴-پی براسینواستروئید تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد مشاهده شد (جدول ۲). مطابق نتایج مقایسه میانگین، بیشترین فلاونوئید اندام هوایی به مقدار ۱/۵۸ (جذب $\times$ گرم وزن تر) در سطح تنش شدید (۵۰ درصد ظرفیت زراعی) به دست آمد. با افزایش سطح تنش، میزان فلاونوئید اندام هوایی و ترکیبات فنولی افزایش یافت (جدول ۳). این چنین متابولیت‌هایی با جاروب کردن رادیکال‌های آزاد موجب حفاظت از گیاه در برابر تنش‌های اکسیداتیو می‌شوند (۲۶). محلول‌پاشی گیاهان با ۲۴-پی براسینواستروئید و پراکسید هیدروژن در سطح یک درصد بر میزان فلاونوئیدها و فنول اثرگذار بود (جدول ۴). فلاونوئیدها متابولیت‌های ثانویه‌ای هستند که در سیتوپلاسم و یا سطح سیتوزولی شبکه آندوپلاسمی سنتز می‌شوند و با فعالیت آنتی‌اکسیدانی برخی گیاهان را از تنش‌های زیستی و غیر زیستی محافظت می‌کنند. سطح تنش شدید خشکی (۵۰٪ ظرفیت زراعی) و عدم محلول‌پاشی منجر به بالاترین میزان فلاونوئید و فنول اندام هوایی به ترتیب با میانگین ۱/۵۸ (میلی‌گرم بر گرم وزن تر) و ۰/۹۵

(میلی‌گرم بر گرم وزن تر) گردید (جدول ۳). به جز اثر متقابل خشکی و پراکسید هیدروژن، سایر اثرات متقابل دو سه‌گانه عوامل آزمایشی بر صفت مورد اشاره نیز در سطح ۵ درصد معنی‌دار گردید. به طوری که در شرایط تنش شدید (۵۰ درصد ظرفیت زراعی) و استفاده همزمان از ۲۴-پی براسینولید (۱ میلی‌مولار) و پراکسید هیدروژن (۱ میلی‌مولار) ترکیبات فنولی اندام هوایی به کمترین مقدار خود به میزان (۰/۸۶ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) رسید (جدول ۴). نتایج حاصل نشان داد که در شرایط یکسان تنش خشکی و محلول‌پاشی پراکسید هیدروژن، میزان فنول اندام هوایی معنی‌دار نشد (جدول ۳). با توجه به نتایج جدول ۴، میزان ترکیبات فنولی نیز در تیمار تنش خشکی شدید (۵۰٪ ظرفیت زراعی) و با کاربرد همزمان پراکسید هیدروژن (۱ میلی‌مولار) و ۲۴-پی براسینولید (۱ میلی‌مولار) کاهش یافت که این کاهش می‌تواند به علت سنتز این ترکیبات به سایر ترکیبات فنولی از جمله لیگنین باشد. تحقیقات نشان داده که تحت تأثیر شرایط تنش، فنول‌های متصل به دیواره بیشتر از فنول‌های محلول تحت تأثیر قرار می‌گیرند (۲). ترکیبات فنولی هم به عنوان عوامل آنتی‌اکسیدان و هم به عنوان ترکیبات کلاته‌کننده فلزات، نقش مهمی در ایجاد تحمل گیاهان نسبت به تنش‌های غیرزیستی دارند (۱۶).

تأثیر تنش‌ها بر درصد اسانس

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد اثر ساده تنش خشکی، محلول‌پاشی ۲۴-پی براسینواستروئید و پراکسید هیدروژن و همچنین اثر متقابل دوگانه تنش خشکی و براسینواستروئید، همچنین اثر متقابل سه‌گانه تنش خشکی، ۲۴-پی براسینواستروئید و پراکسید هیدروژن بر درصد اسانس در سطح ۱ و ۵ درصد معنی‌دار شد (جدول ۲). درصد اسانس گیاه زیره سبز، با کاهش آبیاری افزایش معنی‌داری را (۵/۵٪) نشان داد بطوریکه با کاهش آبیاری به ۷۵ و ۵۰ درصد ظرفیت زراعی به ترتیب افزایش ۴۱ و ۱۲۸ درصدی در درصد اسانس نسبت به تیمار شاهد ثبت شد. مطابق نتایج مقایسه میانگین، بیشترین درصد اسانس زیره سبز به میزان (۴/۳۸ درصد) مربوط به سطح شدید تنش خشکی (۵۰٪ ظرفیت زراعی) و عدم محلول‌پاشی ۲۴-پی براسینولید به دست آمد.

افزایش مقاومت گیاه در برابر تنش در مناطق خشک و نیمه خشک سازگار باشند و اثرات مطلوبی بر شاخص های کمی و کیفی گیاه داشته باشد لازم و ضروری است. بر اساس نتایج به دست آمده از پژوهش می توان بیان کرد که هرچند با کاهش میزان آب مصرفی و به تبع آن بروز تنش خشکی، رشد و عملکرد گیاه تحت تأثیر قرار می گیرد اما کاربرد دو ترکیب سیگنالی براسینواسستروئید و پراکسید هیدروژن، می تواند فرایند رشد گیاه را بهبود بخشد. تنش خشکی باعث ایجاد تنش اکسایشی در گیاه زیره سبز شد که محلول پاشی براسینواسستروئید و پراکسید هیدروژن با از بین بردن گونه های فعال اکسیژن، توانستند نقش مهمی در مقاومت به تنش خشکی بازی کنند. با کاربرد این ترکیبات، اثرات مثبت و مؤثری بر صفات بیوشیمیایی مورد اندازه گیری شده زیره سبز در شرایط تنش خشکی از طریق بهبود صفات مورفولوژیکی، صفات فتوسنتزی و کاهش رادیکال های آزاد اکسیژن داشته است. در جمع بندی کلی می توان گفت محلول پاشی براسینواسستروئید در کاهش صدمات ناشی از تنش خشکی در گیاه زیره سبز بیش از پراکسید هیدروژن مؤثر واقع شد و گیاه را از قرار گرفتن در شرایط بحرانی نجات دهد.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می دارند که هیچ گونه تعارض منافع وجود ندارد.

محلول پاشی ۲۴- اپی براسینواسستروئید (۱ میلی مولار) در شرایط تنش شدید (۵۰٪) درصد اسانس را کاهش داد (جدول ۳). دلایل اثبات شده ای مبنی بر نحوه واکنش متابولیت های ثانویه گیاهان دارویی به تنش خشکی و مواد تنظیم کننده رشد گیاهی وجود ندارد. اما افت کارکرد چرخه کلونین، کاهش سطح برگ و کوچک شدن برگ ها در اثر عوامل محیطی مثل تنش آبی می تواند بیوسنتز اسیدهای چرب و روغن (اسانس) را کاهش دهد. مطابق نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل سه گانه صفات مورد آزمون (جدول ۴)، بیشترین میزان اسانس (۳/۱۶ درصد) مربوط به سطح ۵۰ درصد ظرفیت زراعی، غلظت ۱ میلی مولار پراکسید هیدروژن و ۱ میلی مولار ۲۴- اپی براسینواسستروئید مشاهده شد. انجام و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند که تنش آبی تأثیر معنی داری بر عملکرد شاخه گل دهنده، عملکرد روغن ضروری شاخه گل دهنده و درصد روغن ضروری گشنیز دارد و بالاترین عملکرد روغن و ماده خشک در تیمار آبیاری کامل و بیشترین درصد روغن شاخه گل دهنده در تیمار تنش شدید مشاهده شد (۵).

نتیجه گیری

شناخت عوامل محیطی از جمله تنش خشکی یک عامل مهم در موفقیت کشت گیاهان دارویی بوده و در این بین شناسایی مواد سیگنالی نگ رشدی که بتوانند در جهت

References

1. Mohammed FS, Sevindik M, Uysal İ, Çesko C, Koraqi H. Chemical composition, biological activities, uses, nutritional and mineral contents of cumin (*Cuminum cyminum*). Measurement: Food. 2024; 14:100157.
2. Lotfollahi L, Torabi H, Omid H. Salinity effect on proline, photosynthetic pigments and leaf relative water content in chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) in hydroponic condition. Journal of Plant Production Research. 2015;22(1):89-103.
3. Abbas M, Nawaz S, Fatima A, Kamran M, Aslam F, Atif S, Younas F. Estimation of the water productivity of different varieties of wheat and rice in the context of agronomic, physiological and nutritional attributes. International Journal of Agricultural and Biological Engineering. 2024;17(5):200-5.
4. Bakhshi S, Abbaspour H, Saeidisar S. Study of phytochemical changes, enzymatic and antioxidant activity of two halophyte plants: *Salsola dendroides* Pall and *Limonium reniforme* (Girard) Lincz in different seasons. Journal of Plant Environmental Physiology. 2018; 46:79–92. (In Persian)
5. Anjum SA, Ashraf U, Khan I, Saleem MF. Chromium toxicity induced alterations in growth, photosynthesis, gas exchange attributes and yield formation in maize. Pakistan Journal of Agricultural Sciences. 2016 ;53(4): 751-757.

6. Ramos-Fernández L, Gonzales-Quiquia M, Huanuqueño-Murillo J, Tito-Quispe D, Heros-Aguilar E, Flores del Pino L, Torres-Rua A. Water stress index and stomatal conductance under different irrigation regimes with thermal sensors in rice fields on the northern coast of Peru. *Remote Sensing*. 2024;16(5):796.
7. Liu Y, Gao Y, Qin Y, Yu J, Fan J, Ji X, Liu Y, Cao L, Xing G, Zhang C, Li S. Integrated physiological, transcriptomic, and metabolomic analyses reveal the stress response of cucumber seedlings under ozonated water stress. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2025;110245.
8. Panozzo A, Bolla PK, Barion G, Botton A, Vamerali T. Phytohormonal regulation of abiotic stress tolerance, leaf senescence and yield response in field crops: a comprehensive review. *BioTech*. 2025;14(1):14.
9. Orrico F., Ana C. Lopez., Nicolás Silva., Mélanie Franco., Isabelle Mouro-Chanteloup d, Ana Denicola , Mariano A. Ostuni d, Leonor Thomson, Matias N. Möller . Hydrogen peroxide diffusion across the red blood cell membrane occurs mainly by simple diffusion through the lipid fraction. *Free Radical Biology and Medicine*. 2025; 226: 389-396.
10. Hung SH, Yu CW, Lin CH. Hydrogen peroxide function as a stress signal in plants. *Botanical bulletin of Academia Sinica*. 2011; 46:1–10.
11. Li JT, Qiu ZB, Zhang XW. Exogenous hydrogen peroxide can enhance tolerance of wheat seedlings to salt stress. *Acta Physiologiae Plantarum*. 2011; 33:835–42.
12. Xiao-yi Y., MIAO Yu-qing., LÜ Wei., ZHANG Wen-qi., ZHANG Zhen-hua, and CHEN Hai-fei. Mechanism of hydrogen peroxide regulating cadmium tolerance and distribution in rice. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*. 2024; 30(4):677-688.
13. Qiao S, Feng Y, Yan J, Li K, Xu H. Overexpression of tomato SITpx improves salt stress tolerance in transgenic tobacco plants by scavenging H₂O₂. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 2022 ;151(2):321-33.
14. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976; 72, 248–254.
15. Lichtenthaler HK, Buschmann C. Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. *Current protocols in food analytical chemistry*. 2001;1(1): F4-3.
16. Chang C, Yang M, Wen H, Chern J, Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods, *Journal of Food and Drug Analysis* 2002; 10: 178-182.
17. Younis M, Akram NA, Ashraf M, El-Sheikh MA, Khan ZU. Impact of ascorbic acid-rich phyto-extracts on growth, yield and physio-biochemistry of okra [*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench.] subjected to drought stress. *Journal of King Saud University-Science*. 2024;36(6):103195.
18. Shahzad K, Hussain S, Arfan M, Hussain S, Waraich EA, Zamir S, Saddique M, Rauf A, Kamal KY, Hano C, El-Esawi MA. Exogenously applied gibberellic acid enhances growth and salinity stress tolerance of maize through modulating the morpho-physiological, biochemical and molecular attributes. *Biomolecules*. 2021;11(7):1005.
19. Abd El-Monem MI, Sharaf IF, Mahmoud R. Role of gibberellic acid in abolishing the detrimental effects of Cd and Pb on broad bean and lupin plants. *Research journal of agriculture and biological sciences*. 2009;5(5):668–73.
20. Nobakht P, Ebadi A, Parmoon G, Nickhah Bahrami R. Study role H₂O₂ in Photosynthetic pigments Peppermint (*Mentha piperita* L.) on Water stress conditions. *Journal of Plant Process and Function*. 2019 ;7(27):19-30. (In Persian)
21. Eskandari M, Tadaïun S, Ebrahimi HR. Effect of 28-hemobrassinolid to reduce the effects of drought stress on the medicinal herb savory. *Dissertation, University of Arsanjan*; 2010.
22. Nikolova T, Todorova D, Vatchev T, Stoyanova Z, Lyubenova V, Taseva Y, Yanashkov I, Sergiev I. Dose-dependent effect of the polyamine spermine on wheat seed germination, mycelium growth of *Fusarium* seed-borne pathogens, and in vivo fusarium root and crown rot development. *Agriculture*. 2025;15(15):1695.
23. Badalzadeh A, Shahraki AD, Ghobadinia M. The effect of different levels of manure, urea and their combination on some drought resistance physiological traits of moldavian balm

- (*Dracocephalum moldavica* L.) under different irrigation regimes. Iranian Journal of Field Crops Research. 2022 ;19(4) : 343
24. Salimi F, Shekari F, Hamzei J. Methyl jasmonate improves salinity resistance in German chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) by increasing activity of antioxidant enzymes. Acta Physiol Plant. 2016;38(1).
25. Debnath M, Ashwath N, Midmore DJ. Physiological and morphological responses to abiotic stresses in two cultivars of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. South African Journal of Botany. 2019; 123:124–32.
26. Kafashzade Z, Kalat SN, Abbasi MR, Darban AS. An Investigation into the efficacy of proline foliar application in ameliorating the deleterious effects of drought stress on different clover genotypes. Russian Journal of Plant Physiology. 2025;72(3):76.
27. Ahmadi Mousavi E, Manoukhehri Kalantari KH, Torkzadeh M. Effects of 24-epibrassinolide on lipid peroxidation, proline, sugar and photosynthesis pigments content of colza (*Brassica napus* L.) under water stress. Iranian Journal of Biotechnology. 2005;18(4):295–306. (In Persian)