

مقاله پژوهشی

مقایسه تأثیر جداگانه یا توأم تیمین و اپی براسینولید بر تغییر برخی شاخص‌های اکسیداتیو در گیاه دانه روغنی کلزا رقم Hyola 401 تحت تنش کادمیوم

شیماسنجرى^۱، حسین مظفری^{۲*}، بتول کرامت^۱ و نازی نادرنژاد^۱

^۱ بخش زیست‌شناسی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

^۲ گروه اکولوژی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران

چکیده

تنش کادمیوم، موجب القاء تنش اکسیداتیو در گیاهان مانند کلزا می‌شوند. استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد (PGR) یا ویتامین‌ها (مانند تیمین) می‌تواند به افزایش مقاومت به تنش‌هایی کادمیوم کمک کند. در این پژوهش سعی شد تأثیر مقایسه‌ای و متقابل تیمین و ۲۴-اپی براسینولید (EBL) بر بهبود پارامترهای رشد و مقاومت آنتی‌اکسیدانی کلزا رقم Hyola 401 تحت مقادیر سمی ۲۵۰ و ۵۰۰ میکرومولار کلرید کادمیوم در قالب ۲۷ کد تیماری در محیط گلخانه مورد مطالعه قرار گیرد. نتایج کلی نشان داد که کاربرد جداگانه تیمین یا ۲۴-اپی براسینولید توانست تأثیر چشمگیری نسبت به سایر الیستورهای جداگانه مورد کاربرد در بیشتر پارامترهای سنجش شده داشته و مقاومت آنتی‌اکسیدانی گیاه تحت تنش کادمیوم را با توجه به شاخص‌های سنجش شده به خوبی بهبود بخشد و حتی میزان تجمع کادمیوم در اندام هوایی را نیز کاهش داد. نتایج بدست آمده حاصل از سنجش پارامترهای مختلف رشد، بیوشیمیایی، آنزیمی و عناصر نشان داد که کاربرد جداگانه تیمین و ۲۴-اپی براسینولید، موجب بهبود رشد و مقاومت آنتی‌اکسیدانی گیاهان تحت تیمار سمیت به ویژه ۲۵۰ میکرومولار کادمیوم گردید و توانست آثار سمی تنش کادمیوم را بر گیاه کلزا تخفیف دهد. مثلاً میزان پراکسیداسیون غشا (MDA و آلدئیدها) به خوبی تحت تیمار ۲۵۰ میکرومولار کادمیوم تا میزان تقریبی ۵۰ درصد کاهش پیدا کرد. هر چند در برخی پارامترها مانند تغذیه منیزیمی، تیمار توأم تیمین و ۲۴-اپی براسینولید تأثیر بهتر داشت اما در برخی پارامترهای دیگر مانند محتوای آب و سطح برگ، کاربرد تیمارها موجب بهبود رشد گیاه تحت تنش کادمیوم شد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم کاتالاز، پراکسیداسیون لیپیدها، تغذیه منیزیمی، تنظیم‌کننده‌های رشد، مقاومت آنتی‌اکسیدانی

گیاهان دانه روغنی مانند کلزا پس از غلات و حبوبات، سومین

مقدمه

دریافت مقاله: ۱۴۰۴/۰۴/۲۶، بازنگری: ۱۴۰۴/۰۸/۰۱، پذیرش: ۱۴۰۴/۰۸/۰۷، اولین انتشار: ۱۴۰۵/۰۲/۱۲

* نویسنده مسئول، رایانامه: Mozafari.hossein@gmail.com



حق انتشار این مستند، متعلق به انجمن فیزیولوژی گیاهی ایران است. © ۱۴۰۳

این مقاله تحت گواهی زیر منتشر شده 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-nc/4.0/>

2023). محتوای کلروفیل و ظرفیت فتوسنتزی کاهش یافته و سیستم آنتی‌اکسیدانی تخریب می‌شود که نهایتاً منجر به کاهش رشد و عملکرد کلزا می‌گردد (Zhou et al., 2023; Elahi et al., 2023).

برای مقابله با تنش اکسیداتیو ناشی از کادمیوم، گیاهان استراتژی‌های بیولوژیکی مختلفی مانند اتصال و شلاته‌کردن کادمیوم، تجمع در واکوئل‌ها، تنظیم اسمزی، فعالسازی سیستم آنتی‌اکسیدانی و سنتز پروتئین‌های تنشی و فیتوهورمون‌ها را تکامل داده‌اند (Okla et al., 2023; Soares et al., 2020). استفاده از هورمون‌های رشد گیاهی مثل براسینوستروئیدها، یک روش مؤثر برای مقابله با تنش فلزات سنگین مانند کادمیوم در گیاهان است (Fu et al., 2023). براسینوستروئیدها (BRs) گروهی از هورمون‌های استروئیدی پلی‌هیدروکسیله در گیاهان هستند که فرآیندهای مختلف رشد و توسعه گیاه را تنظیم می‌کنند (Nolan et al., 2020). علاوه بر این، براسینوستروئیدها می‌توانند تحمل گیاه را در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی مانند بیماری‌ها، آفت‌کش‌ها، شوری، خشکی، فلزات سنگین و غیره افزایش دهند (Zhang et al., 2022; El Rasafi et al., 2022). براسینوستروئیدها همچنین سرعت فتوسنتز را به طور قابل توجهی افزایش می‌دهند (Farhat et al., 2022; Zhao et al., 2021). به رحال، براسینوستروئیدها تجمع فلزات سنگین را با کاهش جذب از ریشه‌ها و فعالسازی لیگاندهای خاصی مانند فیتوکلاتین‌ها کاهش می‌دهند (Ma et al., 2022). همچنین، توانایی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را افزایش می‌دهند که تولید گونه‌های اکسیژن فعال را خنثی می‌کنند (Yang et al., 2022; Heath and Packer, 1968). این ویژگی‌ها نشان می‌دهد که براسینوستروئیدها می‌توانند نقش مهمی در کاهش اثرات منفی فلزات سنگین بر گیاهان ایفا کنند.

۲۴- اپی‌براسینولید (EBR)، یک ترکیب زیست‌فعال از براسینوستروئیدها است که اثر تحریک‌کننده BRs را در گیاهان تقلید می‌کند (Ali et al., 2020; Verma et al., 2023). کاربرد خارجی آن می‌تواند تحمل گیاه به سمیت کادمیوم را با بهبود فتوسنتز، تحریک سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی برای مقابله با

منبع غذایی بزرگ در جهان هستند (Amiri et al., 2020). کلزا دومین محصول مهم جهت تولید روغن نباتی در جهان است. به دلیل محتوای بالای اسیدهای چرب غیراشباع و پروتئین، دارای ارزش اقتصادی و تغذیه‌ای قابل توجهی است. این گیاه منبع غنی از ترکیبات شیمیایی مفید مانند فنول‌ها، فلاونوئیدها، ویتامین‌ها، چربی‌ها و کاروتنوئیدها است (Atif et al., 2022; Zhu et al., 2006) و در صنایع شیمیایی و دارویی نیز کاربرد دارد (Zhao et al., 2021). این گیاه به دلیل عملکرد بهتر نسبت به سایر گیاهان دانه روغنی، سازگاری با آب و هوای ایران و کیفیت غذایی بالا، در مناطق مختلف کشور کشت می‌شود (Gharib et al., 2023; Siddiqi et al., 2021). با این حال، در طول رشد، معمولاً با بسیاری از تنش‌های محیطی، از جمله فلزات سنگین روبرو می‌شود (Amiri et al., 2020; Alam et al., 2020).

کادمیوم (Cd) یک فلز سنگین سمی است که رشد گیاهان و کیفیت محصول را کاهش می‌دهد و تجمع آن در زنجیره غذایی می‌تواند سلامت انسان و اکوسیستم را تهدید کند (Gharib et al., 2023). سازمان بهداشت جهانی کادمیوم را به عنوان یک منبع آلودگی غذایی نگران‌کننده و ماده‌ای سرطان‌زا معرفی کرده است (Heath and Packer, 1968). حضور این فلز در خاک به طور طبیعی یا به دلیل منابع انسانی رخ می‌دهد (Ali et al., 2020). کادمیوم به دلیل سمیت بالا، می‌تواند فرآیندهای مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی گیاهان را مختل کند (Jabeen et al., 2021; Alam et al., 2021). از جمله اثرات مخرب کادمیوم، می‌توان به کلروزگی، نکروزگی، پژمردگی (Mostafa et al., 2020)، ممانعت از جوانه‌زنی بذر (Haider et al., 2021; Liao et al., 2023)، مهارکننده فعالیت فتوسنتزی (Jafarhaddadian et al., 2021)، تنفس و تعرق (Hafeez et al., 2021)، اختلال در جذب مواد مغذی و تعادل یونی (Shah et al., 2020)، تغییر در فعالیت آنزیم‌ها (Ings et al., 2013) و تجزیه غشاهای سلولی (Akram et al., 2021) اشاره نمود. تحت تنش کادمیوم، دیواره‌های سلولی ریشه کلزا آسیب می‌بینند (Gharib et al., 2020).

کلزا به شمار می‌رود، نیاز به تحقیقات بنیادی و کاربردی در زمینه کاهش اثرات منفی این تنش بر رشد و مقاومت اکسیدانی گیاه کلزا بسیار ضروری به نظر می‌رسد. گزارش‌های متعددی در خصوص اثر بهبوددهنده براسینواستروئیدها یا تیامین در گیاهان مختلف در شرایط تنش‌های مختلف وجود دارد، اما اطلاعات جامعی در خصوص تأثیر جداگانه یا متقابل هر دو ترکیب بهبوددهنده رشد و مقاومت را بر گیاه کلزا تحت تنش کادمیوم موجود نیست. لذا هدف از پژوهش حاضر بررسی تأثیر عوامل تعدیل‌کننده یا تشدیدکننده تنش اکسیداتیو کادمیوم در کلزا رقم Hyola 401 تحت تیمار با استفاده از تیامین و ۲۴-اپی‌براسینولید به عنوان الیستور و تنظیم‌کننده رشد است تا مطلوب‌ترین شرایط از لحاظ مقاومت اکسیدانی و رشد بهتر کلزا تحت تنش فلز سنگین کادمیوم به دست آید و حتی میزان تأثیر متقابل یا جداگانه این دو الیستور و تنظیم‌کننده رشد مهم آنتی‌اکسیدانی و این عوامل تنظیم رشد گیاهی (PGR) مورد بررسی، مقایسه و ارزیابی علمی و آماری قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در آزمایشگاه تحقیقاتی فیزیولوژی گیاهی، بخش زیست‌شناسی دانشگاه شهید باهنر کرمان در سال ۱۳۹۵ انجام شد. بذره‌های کلزا (*Brassica napus* L.) رقم Hyola 401 از مرکز تحقیقات کشاورزی کرمان، بخش نهال و بذر تهیه شد. برای این منظور ابتدا بذره‌های یکسان کلزا با سدیم هیپوکلریت ۰/۵ درصد به مدت یک دقیقه ضدعفونی شده، سپس با آب مقطر شسته شده و در گلدان‌های پلاستیکی ۱۲ سانتی‌متر پر شده با پرلیت، کاشته شدند. در هفته اول کاشت بذرها، نهال‌ها با آب‌مقطر آبیاری شدند و سپس از محلول غذایی هوگلند ۱/۲ رقت اصلی برای آبیاری گیاهان استفاده شد. گیاهان در یک اتاق رشد با چرخه نوری ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی رشد کردند. دما در طول روز 2 ± 23 درجه سانتی‌گراد و در شب 2 ± 16 درجه سانتی‌گراد بود. شدت نور بالای سطح گیاهان ۱۴۰۰۰ لوکس (Lux) معادل تقریبی ۲۵۷/۶ میکرومول بر مترمربع ($\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) برای ۳۰ روز بود. پس از این دوره،

گونه‌های اکسیژن فعال (ROS)، افزایش بیوماس و عملکرد گیاهان را بهبود بخشید (Amiri et al., 2020). برای کاهش اثرات مضر تنش‌های مختلف، از جمله سمیت کادمیوم، استفاده از تنظیم‌کننده‌های زیستی مانند تیامین می‌تواند به بهبود تحمل گیاهان کمک کند.

تیامین یا همان ویتامین B1 یک ویتامین محلول در آب بوده و نقش حیاتی در متابولیسم کربن در موجودات زنده ایفا می‌کند (Ghasemi-Omran et al., 2021; Viana et al., 2022). تیامین برای بیوستز کوآنزیم تیامین پیروفسفات ضروری است و در این شکل، نقش مهمی در متابولیسم کربوهیدرات‌ها دارد. این ماده مغذی برای گیاهان و حیوانات ضروری است. در گیاهان، تیامین در برگ‌ها سنتز شده و به ریشه‌ها منتقل می‌شود، جایی که رشد را کنترل می‌کند (Fitzpatrick and Chapman, 2020; Wu et al., 2024). تیامین پیروفسفات (TPP) به عنوان یک کوفاکتور در چندین مرحله آنزیمی مهم در متابولیسم کربن، از جمله آنزیم‌های پیرووات دهیدروژناز، آلفا-کتوگلو تارات دهیدروژناز و ترانسکتولاز، عمل می‌کند (Wu et al., 2019; Jan et al., 2020). بنابراین، TPP در فرآیندهای گلیکولیز، چرخه اسید تری‌کربوکسیلیک، متابولیسم نوکلئوتیدها و سنتز اسیدهای آمینه شاخه‌دار ضروری است (Atif et al., 2022).

تیامین با تحمل تنش‌های زیستی و غیرزیستی از جمله فلزات سنگین مرتبط است (Liao et al., 2023; Mostafa et al., 2020). این ویتامین به طور مستقیم به عنوان یک آنتی‌اکسیدان عمل می‌کند، گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) را از بین می‌برد، همچنین به طور غیرمستقیم با تأمین انرژی سلول، انعطاف‌پذیری متابولیکی لازم را برای تطبیق سلول با شرایط جدید فراهم می‌کند (Rosado-Souza et al., 2020; Sun et al., 2024).

با توجه به اهمیت زراعی و اقتصادی گیاه دانه روغنی کلزا در تأمین غذایی و استخراج روغن، و نظر به اینکه تنش و آلودگی کادمیوم به دلایل مختلف وجود فعالیت‌های انسانی یا صنعتی، یکی از عوامل محدودکننده رشد و تولید کشاورزی

پس از این مدت، وزن تر برگ‌ها مجدداً اندازه‌گیری شد که به عنوان وزن تورژسانس (TW) شناخته می‌شود. نمونه‌های وزن شده (برگ‌های اشباع از آب) به مدت ۷۲ ساعت یا بیشتر (تا رسیدن به وزن ثابت) در آون با دمای ۷۰°C خشک شدند. سپس وزن خشک (DW) نمونه‌ها با ترازو اندازه‌گیری و محتوای نسبی آب برگ (RWC) با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (Ghasemi-Omaran et al., 2021).

$$RWC (\%) = [(FW - DW) / (TW - DW)] \times 100$$

سنجش مقدار کربوهیدرات‌های محلول: برای سنجش

کربوهیدرات‌های محلول از روش Fales (۱۹۵۱) استفاده گردید. مقدار ۰/۱ گرم اندام هوایی با استفاده از ۲/۵ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه (دو مرحله ۳۰ دقیقه‌ای) کربوهیدرات‌های محلول استخراج شدند و عصاره‌ها با کاغذ صافی صاف شده و سپس الکل آنها تبخیر گردید. رسوب حاصل در ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد. از هر نمونه ۲۰۰ میکرولیتر در یک لوله آزمایش ریخته و به آن ۵ میلی‌لیتر معرف آنترون اضافه شد. پس از مخلوط‌شدن، به مدت ۱۷ دقیقه در بن‌ماری ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و پس از سرد شدن جذب آنها در ۶۲۵ نانومتر خوانده شد. غلظت هر نمونه با استفاده از منحنی استاندارد بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه گردید (Jia et al., 2023).

میزان نشت یونی برگ گیاهان تیمارشده: جهت سنجش

میزان آسیب غشایی بافت برگی گیاهان تحت تیمار آزمایش، میزان نشت یونی به روش Ben Hamed و همکاران (۲۰۰۷) با استفاده از معادله ذیل، بر حسب درصد محاسبه گردید. (Basit et al., 2021).

$$\text{درصد نشت یونی} = \frac{Ec_1}{Ec_2} \times 100$$

استخراج و سنجش میزان پراکسید هیدروژن (H₂O₂):

نمونه‌های منجمد شده اندام هوایی به میزان ۰/۱ گرم در ۲ میلی‌لیتر TCA (اسید تری‌کلرو استیک) ۰/۱٪ عصاره‌گیری شدند. سوسپانسیون حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴

اثر تیمار با کادمیوم و سایر ترکیبات (EBL و تیمین) بر رشد و پارامترهای اکسیداتیو با جایگزینی محلول غذایی با محلول تازه حاوی ترکیبات تیماری اضافه شده مربوطه به مدت ۱۰ روز به صورت یک روز در میان بررسی شد. غلظت‌های کل تیمارها به صورت کلرید کادمیوم (از شرکت مرک آلمان) (صفر، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکرومولار)، تیمین (شرکت سیگما) (صفر، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار) و ۲۴- اپی براسینولید (شرکت سیگما) (صفر، ۰/۰۲ و ۰/۵ میکرومولار) در آب دیونیزه حل شده و اسیدیته محلول‌ها به صورت pH= ۵/۸ با محلول‌های ۰/۱ مولار KOH یا ۰/۱ مولار HCl تنظیم شدند تا خطای تغییرات و اختلاف اسیدیته محلول غذایی و تیمارها بر تیمارها تأثیرگذار نباشد (جدول ۱). ترکیب تیمارها ابتدا با آزمایش فاکتوریل مشخص شدند و سپس بهینه‌سازی لازم و سنجش پارامترهای مربوطه صورت گرفته و ترکیب نهایی کدهای تیماری در جدول ذیل به صورت ۲۷ کد تیماری در پژوهش نهایی استفاده گردید. تیمار (B1×E1×C1)، شاهد (Control) بوده و همان محلول هوگلند پایه بدون افزودن تیمین، اپی براسینولید و کادمیوم است. در سایر تیمارها حداقل یکی از این مواد به محلول پایه اضافه شده است.

تیمارهای فوق در قالب طرح کاملاً تصادفی به گیاهان کلزا ۱۴ روزه با حداقل سه تکرار تیمار شدند. پس از اتمام زمان تیمارها در این آزمایش، ساقه و برگ سوم گیاهان برداشت شده و در نیتروژن مایع منجمد و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد برای انجام تحلیل‌های بیوشیمیایی ذخیره شدند. در برخی پارامترها هم از نمونه‌های تازه گیاهی (fresh) استفاده شد (جدول ۱ و شکل ۲ و ۱).

اندازه‌گیری شاخص‌های رشد، بیوشیمیایی و اکسیداتیو

گیاهان کلزا تحت تیمار، محتوای نسبی آب برگ: محتوای نسبی آب برگ‌ها با استفاده از روش Ings و همکاران (۲۰۱۳) اندازه‌گیری شد. برگ‌ها بلافاصله پس از تیمار و برداشت، وزن شدند و به عنوان وزن تر برگ (FW) ثبت گردید. سپس نمونه‌های برگ در آب دوبار تقطیر استریل غوطه‌ور شده و به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی و در دمای ۴°C نگهداری شدند.

جدول ۱- ترکیب و غلظت تیمارهای نهایی مورد استفاده در تحقیق پس از بهینه‌سازی که حاوی تیامین، ۲۴-اپی براسینولید و مقادیر سمی کادمیوم در پایه‌ای از محلول هوگلند با رقت ۱/۲ است.

کلرید کادمیوم (μM)	اپی براسینولید (μM)	تیامین (μM)	کدهای تیماری
۰	۰	۰	Control (B1×E1×C1)
۲۵۰	۰	۰	C2
۵۰۰	۰	۰	C3
۰	۰/۰۲	۰	E2
۲۵۰	۰/۰۲	۰	E2×C2
۵۰۰	۰/۰۲	۰	E2×C3
۰	۰/۵	۰	E3
۲۵۰	۰/۵	۰	E3×C2
۵۰۰	۰/۵	۰	E3×C3
۰	۰	۱۰۰	B2
۲۵۰	۰	۱۰۰	B2×C2
۵۰۰	۰	۱۰۰	B2×C3
۰	۰/۰۲	۱۰۰	B2×E2
۲۵۰	۰/۰۲	۱۰۰	B2×C2×C2
۵۰۰	۰/۰۲	۱۰۰	B2×E2×C3
۰	۰/۵	۱۰۰	B2×E3
۲۵۰	۰/۵	۱۰۰	B2×E3×C2
۵۰۰	۰/۵	۱۰۰	B2×E3×C3
۰	۰	۲۰۰	B3
۲۵۰	۰	۲۰۰	B3×C2
۵۰۰	۰	۲۰۰	B3×C3
۰	۰/۰۲	۲۰۰	B3×E2
۲۵۰	۰/۰۲	۲۰۰	B3×E2×C2
۵۰۰	۰/۰۲	۲۰۰	B3×E2×C3
۰	۰/۵	۲۰۰	B3×E3
۲۵۰	۰/۵	۲۰۰	B3×E3×C2
۵۰۰	۰/۵	۲۰۰	B3×E3×C3

تاریکی و در دمای اتاق قرار گرفت و سپس جذب آنها در طول موج ۳۹۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. میزان پراکسید هیدروژن با توجه به منحنی استاندارد غلظت‌های مختلف پراکسید هیدروژن محاسبه گردید

درجه سانتی‌گراد و با سرعت ۱۲۰۰۰g سانتریفیوژ شد. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول رویی با ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی‌مولار با pH=۷ و ۱ میلی‌لیتر محلول KI یک مولار مخلوط شد. مخلوط واکنش به مدت یک ساعت در



شکل ۱- گیاهان کشت شده ۱۴ روزه کلزا (*Brassica napus* L.) رقم Hyola، کشت شده و در حال رشد در گلدان‌های پلاستیکی ۱۲ سانتی متری پر شده با بستر کشت پرلیت



شکل ۲- تأثیر برخی تیمارهای آزمایش حاوی تیامین و براسینولید بر رشد ظاهری و مورفولوژیک گیاهان کلزا رقم Hyola401 تحت تنش کادمیوم. کدهای تیماری روی هر تصویر طبق جدول تیمار در بخش مواد و روش‌ها بیان شده‌اند. Cd; Cadmium, E; Epibrassinolide, B; Thiamine

(Hajbageri *et al.*, 2017).

سنجش مقدار پراکسیداسیون لیپیدها: اندازه‌گیری مالون دالڈئید (MDA) به روش Heath و Packer (۱۹۶۹) انجام شد. طبق این روش ۰/۲ گرم از بافت فریزشده گیاه (ریشه و برگ) با ۵ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید (TCA) ۰/۱ درصد سائیده شد. عصاره حاصل با استفاده از سانتریفوژ به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰g سانتریفوژ شد. به ۱ میلی‌لیتر از محلول رویی حاصل از سانتریفوژ، ۴ میلی‌لیتر محلول تری کلرواستیک اسید (TCA) ۲۰ درصد که حاوی ۰/۵ درصد تیوباربتوریک اسید (TBA) بود، اضافه گردید. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد در حمام آب‌گرم حرارت داده شده سپس بلافاصله در یخ سرد شد و دوباره مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰g سانتریفوژ شد. شدت جذب این محلول با استفاده از اسپکتروفتومتر مدل Varian Cary50 (ساخت استرالیا) در طول موج ۵۳۲ نانومتر خوانده شد. ماده مورد نظر برای جذب در این طول‌موج، کمپلکس قرمز MDA-TBA است. جذب بقیه رنگیزه‌های غیراختصاصی و مزاحم در ۶۰۰ نانومتر تعیین گردید و از این مقدار کسر شد. برای محاسبه غلظت MDA از ضریب خاموشی معادل $155 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ استفاده و نتایج حاصل از اندازه‌گیری بر حسب نانومول بر گرم وزن تر محاسبه شد (Heath and Packer, 1968; Ings *et al.*, 2013).

سنجش سایر آلدئیدها (پروپانال، بوتانال، هگزانال، هپتانال و پروپانال دی‌متیل استال): برای محاسبه غلظت سایر آلدئیدها از طول‌موج ۴۵۵ نانومتر و ضریب خاموشی $10^5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1} \times 0/458$ استفاده شد. نتایج به صورت میکرومول بر گرم وزن تر گیاه گزارش شد (Ings *et al.*, 2013).

سنجش تجمع پرولین اندام هوایی: برای اندازه‌گیری پرولین از روش Bates (۱۹۷۳) استفاده شد. ۰/۰۲ گرم از بافت فریزشده گیاه (ساقه و برگ) در ۱۰ میلی‌لیتر محلول ۳ درصد سولفوسالیسیلیک اسید سائیده و عصاره حاصل به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰g سانتریفوژ شد. سپس ۲ میلی‌لیتر از مایع رویی را با ۲ میلی‌لیتر معرف نین‌هیدرین و ۲ میلی‌لیتر استیک

اسید خالص مخلوط کرده و یک ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد در حمام آب‌گرم قرار گرفت سپس بلافاصله لوله‌های محتوی مخلوط در حمام یخ سرد شد. بعد ۴ میلی‌لیتر تولونن به مخلوط اضافه گردید و لوله‌ها به خوبی تکان داده شد. با ثابت نگه داشتن لوله‌ها به مدت ۱۵ تا ۲۰ ثانیه دو لایه مجزا تشکیل شد. میزان جذب لایه رنگی فوقانی که حاوی تولونن و پرولین بود در ۵۱۸ نانومتر تعیین شد و برای محاسبه مقدار پرولین از منحنی استاندارد پرولین استفاده گردید و نتایج بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه شد (Khadem moghadam *et al.*, 2020).

اندازه‌گیری میزان ترکیبات فنلی: محتوای ترکیبات فنلی کل با استفاده از روش Sonald و Laima (۱۹۹۹) انجام گرفت. ۰/۱ گرم از اندام هوایی گیاه را در ۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد سائیده و به مدت ۷۲-۲۴ ساعت در تاریکی نگهداری شد. سپس به ۱ میلی‌لیتر محلول رویی ۱ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد اضافه و با آب مقطر دوباره تقطیر حجم محلول به ۵ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر معرف فولین ۵۰ درصد و ۱ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۵ درصد به آن اضافه گردید. مخلوط حاصل به مدت یک ساعت در تاریکی نگهداری شد و سپس جذب هر نمونه در طول موج ۷۲۵ نانومتر خوانده شد و با استفاده از منحنی استاندارد غلظت ترکیبات فنلی کل بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه شد (Izadi *et al.*, 2021).

سنجش میزان فلاوونوئیدها: اندازه‌گیری فلاوونوئیدهای کل با استفاده از روش کالریمتری آلومینیوم کلراید که توسط Zhishen و همکاران (۱۹۹۹) توصیف شده، انجام شد. مقدار کل ترکیبات فلاوونوئیدی موجود در عصاره با استفاده از معادله به دست آمده از منحنی استاندارد کوئرستین محاسبه و نتایج بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر بیان شد (Noctor *et al.*, 2018).

میزان آنتوسیانین: اندازه‌گیری میزان آنتوسیانین‌ها براساس روش Wagner (۱۹۷۹) انجام شد. برای محاسبه غلظت آنتوسیانین‌ها از ضریب خاموشی $33000 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ استفاده شد. غلظت با استفاده از فرمول $A = \epsilon bc$ محاسبه گردید. نتایج

روش Bradford (۱۹۷۶) استفاده شد. به این منظور به لوله‌های آزمایش مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره پروتئینی، ۵ میلی‌لیتر معرف بیوره افزوده و سریعاً ورتکس شد. پس از دو دقیقه و قبل از یک ساعت جذب محلول‌ها با دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول‌موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد و غلظت پروتئین با استفاده از منحنی استاندارد آلومین محاسبه و بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه گردید (Kamal et al., 2023).

این پژوهش به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار برای هر کد تیمار تعیین شده انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۸ و آزمون آنالیز واریانس دو طرفه صورت گرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطوح آماری با احتمالات آماری ۱٪ و ۵٪ انجام شد. جدول‌های آماری شامل آنالیز واریانس، مقایسه میانگین‌ها و بررسی آماری تأثیر کلی و جزئی تیمارها (فاکتورهای آزمایش) بر متغیرهای آزمایش در بخش نتایج ارائه شده است.

نتایج و بحث

تحلیل آماری داده‌ها نشان داد که تفاوت معنی‌داری در بیشتر پارامترها تحت اثر متقابل (تیمین × کادمیوم) و (اپی براسینولید × کادمیوم) مشاهده شد. فقط اثر متقابل تیمین و کادمیوم بر میزان پروتئین کل تحت شرایط تنش کادمیوم معنی‌دار نبود (جدول ۲). بطورکلی نتایج این پژوهش نشان داد که اثر متقابل سه فاکتور تیمین، براسینولید و کادمیوم بر پارامترها معنی‌دار در دو سطح احتمالی ۱ و ۵ درصد نبوده و جداول آنالیز واریانس و آزمون دانکن حاصل این موضوع را نشان می‌دهد. اما همان‌طور ذکر اثر توأم تیمین و کادمیوم یا براسینولید و کادمیوم بر تغییر میزان پارامترهای سنجش شده به ویژه شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی معنی‌دار بوده است. به رحال این تأثیر جداگانه تیمار تیمین و براسینولید بر میزان و درصد تغییر شاخص‌ها متفاوت بوده که بخش‌های ذیل نتایج آورده شده است. به عبارت دیگر تأثیر کلی تیمارها بر پارامترها معنی‌داری بوده اما در بررسی جزئی‌تر آماری با جدول آنالیز واریانس و آزمون

به صورت میکرومول بر گرم وزن تر گزارش شدند. در این فرمول، A میزان جذب در طول‌موج ۵۵۰ نانومتر، E ضریب خاموشی $33000 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ، b عرض کووت ۱ cm و C غلظت محلول مورد نظر بر حسب میلی‌مولار است (Ren et al., 2023).

استخراج و ارزیابی فعالیت مهار رادیکال DPPH:

استخراج و ارزیابی فعالیت مهار رادیکال DPPH (دیفنیل-پیکریل هیدرازیل) طبق روش Zhu و همکاران (۲۰۰۶) اندازه‌گیری شد. درصد مهار DPPH طبق معادله زیر محاسبه شد (Maghsoudi et al., 2021):

$$\text{درصد مهار} = \frac{\text{جذب نمونه} - \text{جذب کنترل}}{\text{جذب کنترل}} \times 100$$

سنجش مقدار اسید آسکوربیک و اسید دی‌هیدرو

آسکوربیک: برای سنجش آسکوربات، عصاره گیاه از مخلوط نمونه گیاهی ساییده شده در محلول حاوی اسید متافسفریک و EDTA بدست آمد. ۳۰۰ میکرولیتر از عصاره سانتریفوژ شده فوق درون لوله آزمایش ریخته شد و محلول‌های زیر به ترتیب به آن اضافه شد. ابتدا ۷۵۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۵۰ میلی‌مولار و سپس ۳۰۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه و مخلوط حاصل ورتکس گردید و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. سپس به ترتیب ۶۰۰ میکرولیتر تری کلرواستیک اسید ۱۰ درصد، ۶۰۰ میکرولیتر ارتوفسفریک اسید ۴ درصد و ۶۰۰ میکرولیتر آلفا آلفادی پیریدیل ۴ درصد و ۱۰ میکرولیتر FeCl_3 ۰/۳ درصد اضافه و مخلوط حاصل بلافاصله ورتکس گردید و به مدت ۲۰ دقیقه در حمام آب‌گرم با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس لوله آزمایش از حمام خارج و مجدداً ورتکس شد و برای بار دوم به مدت ۲۰ دقیقه در حمام آب‌گرم با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس شدت جذب در طول‌موج ۵۲۵ نانومتر خوانده شد. برای محاسبه مقدار آسکوربات از منحنی استاندارد آسکوربات استفاده شد و نتایج بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر گزارش شد (Loi et al., 2020).

سنجش پروتئین کل: جهت سنجش مقدار پروتئین کل از

محتوای کربوهیدرات‌های محلول: نتایج نشان داد که بیشترین مقدار کربوهیدرات‌ها در تیمار با غلظت ۱۰۰ میکرومولار تیمامین (۰/۷۷ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) و ۰/۰۲ میکرومولار اپی براسینولید (۰/۸۱ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) مشاهده شد. در مورد اثر کادمیوم، بیشترین میزان این پارامتر در گیاهان کنترل (غلظت صفر میکرومولار کادمیوم) با مقدار ۰/۹۴ میلی‌گرم بر گرم وزن تر و کمترین میزان آن در گیاهان تیمار شده با غلظت ۵۰۰ میکرومولار کادمیوم (۰/۵۰ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) به دست آمد.

همچنین، اثرات متقابل تیمامین و کادمیوم نشان داد که بیشترین مقدار کربوهیدرات‌ها در تیمار با غلظت ۱۰۰ میکرومولار تیمامین و صفر میکرومولار کادمیوم (۰/۹۴ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) در مقایسه با گیاهان تحت تنش کادمیوم مشاهده شد. در حالیکه بیشترین میزان این سنجش در تیمار با غلظت ۰/۰۲ میکرومولار اپی براسینولید و صفر میکرومولار کادمیوم (۱/۰۷ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) در مقایسه با تنش کادمیوم به تنهایی به دست آمد (جدول ۲).

شاخص نشت یونی برگ: نتایج نشان داد که کمترین مقدار نشت یونی در تیمار با غلظت ۱۰۰ میکرومولار تیمامین (۵۴/۱۳ درصد) و ۰/۰۲ میکرومولار اپی براسینولید (۴۷/۳۰ درصد) مشاهده شد. در مورد کادمیوم، بیشترین و کمترین مقدار نشت یونی به ترتیب مربوط به تیمار با غلظت ۵۰۰ میکرومولار کادمیوم (۶۶/۱۰ درصد) و صفر میکرومولار کادمیوم (۴۵/۵۴ درصد) بود. در رابطه با اثرات متقابل تیمامین و کادمیوم، اگر چه بیشترین نشت یونی در تیمار با غلظت صفر میکرومولار تیمامین و ۵۰۰ میکرومولار کادمیوم (۷۸/۶۵ درصد) مشاهده شد، اما هیچ کدام از غلظت‌های تیمامین نتوانستند به طور معنی‌داری نشت یونی را کاهش دهند. همچنین، در مورد اپی براسینولید، کمترین میزان نشت یونی در تیمار با غلظت ۰/۰۲ میکرومولار اپی براسینولید و صفر میکرومولار کادمیوم (۴۰/۶۸ درصد) در مقایسه با تنش کادمیوم به تنهایی به دست آمد (جدول ۲).

پراکسیداسیون لیپید منجر به برهم خوردن ساختار دو لایه‌ای، سیالیت و نفوذپذیری غشاء به مواد مختلف و همچنین

دانکن اثر متقابل ۳ فاکتور مهم پژوهش معنی‌دار نبود اما تیمارهای حاوی تیمامین و براسینولید دارای اثرات بهبود بخشی در گیاهان تحت تنش کادمیوم بودند (جدول ۳ و ۴). که البته بستگی به نوع غلظت تیمار و نوع پارامتر سنجش شده، تغییرات متفاوت بود. هر چند در برخی پارامترها مانند تغذیه منیزیمی، تیمار توأم تیمامین و ۲۴- اپی براسینولید تأثیر بهتر داشت اما در برخی پارامترهای دیگر مانند محتوای آب و سطح برگ، کاربرد تیمارها موجب بهبود رشد گیاه تحت تنش کادمیوم شد.

محتوای آب نسبی برگ (RWC): نتایج محتوای آب نسبی برگ نشان داد که بیشترین محتوای آب نسبی برگ مربوط به تیمار با غلظت ۱۰۰ میکرومولار تیمامین (۶۶/۱۵ درصد) و ۰/۰۲ میکرومولار اپی براسینولید (۶۶/۱۵ درصد) بود. در رابطه با اثر کادمیوم نیز بیشترین میزان این پارامتر مربوط به گیاه کنترل یعنی غلظت (صفر میکرومولار کادمیوم) مشاهده شد (۷۳/۰۷ درصد) و کمترین میزان آن در گیاهان تیمار شده با غلظت ۵۰۰ میکرومولار کادمیوم (۵۹/۲۹ درصد) به دست آمد (جدول ۲).

همچنین، اثرات متقابل تیمامین و کادمیوم نشان داد که بیشترین محتوای آب نسبی برگ در تیمار با غلظت ۱۰۰ میکرومولار تیمامین و صفر میکرومولار کادمیوم (۷۳/۰۷ درصد) در مقایسه با اثر کادمیوم به تنهایی مشاهده شد. در حالیکه بیشترین میزان این سنجش در تیمار با غلظت ۰/۰۲ میکرومولار اپی براسینولید و صفر میکرومولار کادمیوم (۷۳/۰۷ درصد) در مقایسه با اثر کادمیوم به تنهایی به دست آمد (جدول ۲). محتوای آب نسبی (RWC) در برگ‌ها نشان‌دهنده وضعیت آب و فعالیت متابولیکی گیاه است. تجمع فلزات سنگین مانند کادمیوم در ریشه باعث توقف انتقال آب و مواد محلول به اندام هوایی و ایجاد تنش خشکی می‌شود. فلزات سنگین با صدمه زدن به غشاء پلاسمایی و کاهش انتقال آب، روابط آبی گیاهان را مختل می‌کنند (Alam et al., 2021). نتایج ما نیز نشان داد که تیمار EBL و تیمامین به تنهایی باعث افزایش محتوای آب نسبی در گیاه کلزا شدند و تنش خشکی ناشی از کادمیوم را کاهش دادند (جدول ۲، ۳ و ۴).

جدول ۲- تجزیه واریانس داده‌های حاصل از سنجش پارامترهای DPPH، قند، پروتئین کل، پرولین، فنل، آنتوسیانین، آسکوربات، دی‌هیدرو آسکوربات، فلاونوئیدها، MDA، RWC، آلدئیدها، EL، H₂O₂ در پژوهش در سطح معنی‌دار ۹۹ درصد.

میانگین مربعات							درجه آزادی	منابع تغییر
آسکوربات	آنتوسیانین	فنل	پرولین	پروتئین	قند	DPPH		
۰/۰۱ ^{ns}	۰/۰۰ ^{ns}	۰/۰۰ ^{ns}	۰/۰۵ ^{ns}	۰/۰۰ ^{ns}	۰/۰۰ ^{ns}	۰/۵۹ ^{ns}	۲	تکرار
۰/۸۱ ^{**}	۰/۰۳ ^{**}	۱/۲۹ ^{**}	۴/۷۰ ^{**}	۰/۰۰ ^{**}	۰/۰۱ ^{**}	۲۰۹/۹۷ ^{**}	۲	تیمین
۳/۳۵ ^{**}	۰/۰۵ ^{**}	۰/۳۱ ^{**}	۸/۸۷ ^{**}	۰/۰۵ ^{**}	۰/۰۶ ^{**}	۳۳/۷۵ ^{**}	۲	EBL
۶/۷۱ ^{**}	۰/۰۷ ^{**}	۱/۴۰ ^{**}	۲۸/۴۹ ^{**}	۴/۵۷ ^{**}	۰/۳۱ ^{**}	۱۱۰۷/۹۷ ^{**}	۲	کادمیوم
۰/۱۱ ^{**}	۰/۰۲ ^{**}	۰/۱۶ ^{**}	۰/۷۶ ^{**}	۰/۰۵ ^{**}	۰/۰۱ ^{**}	۵/۵۳ ^{**}	۴	EBL × کادمیوم
۰/۵۳ ^{**}	۰/۰۲ ^{**}	۰/۲۵ ^{**}	۰/۸۲ ^{**}	۰/۰۰ ^{ns}	۰/۰۱ ^{**}	۵۵/۷۶ ^{**}	۴	تیمین × کادمیوم
۰/۰۰ ^{ns}	۰/۰۱ ^{ns}	۵۵/۷ ^{ns}	۰/۳۵ ^{ns}	۰/۰۱ ^{ns}	۰/۰۱۵ ^{ns}	۶۶/۱۱ ^{ns}	۲۶	EBL × تیمین × کادمیوم
۰/۰۲	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۵	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۹۳	۲۸	خطا
۳/۳۸	۴/۶۲	۲/۳۰	۳۱/۳۵	۱/۸۷	۲/۴۸	۳/۶۵		(%) C.V

** نشانگر معنی‌ار بودن در سطح احتمال ۱ درصد و ^{ns} غیر معنی‌دار

ادامه جدول ۲-

میانگین مربعات							درجه آزادی	منابع تغییر
H ₂ O ₂	EL	آلدئیدها	MDA	RWC	فلاونوئید	دی هیدروآسکوربات		
۰/۰۰ ^{ns}	۰/۰۲ ^{ns}	۰/۰۰ ^{ns}	۰/۰۰ ^{ns}	۰/۰۰ ^{ns}	۰/۰۰ ^{ns}	۰/۰۴ ^{ns}	۲	تکرار
۰/۰۳ ^{**}	۱۲۷/۹۳ ^{**}	۰/۰۰ ^{**}	۰/۰۰ ^{**}	۰/۰۰ ^{**}	۱/۲۷ ^{**}	۱/۰۲ ^{**}	۲	تیمین
۰/۵۲ ^{**}	۵۷۲/۰۱ ^{**}	۰/۰۳ ^{**}	۰/۰۱ ^{**}	۱۱/۴۵ ^{**}	۱/۰۲ ^{**}	۰/۲۰ ^{**}	۲	EBL
۰/۱۷ ^{**}	۲۴۴/۶۳ ^{**}	۰/۰۱ ^{**}	۰/۰۳ ^{**}	۲۷۲/۵۹ ^{**}	۰/۲۶ ^{**}	۱۱/۷۸ ^{**}	۲	کادمیوم
۰/۰۱ ^{**}	۹۶/۱۰ ^{**}	۰/۰۰۶ ^{**}	۰/۰۱ ^{**}	۳/۲۰ ^{**}	۰/۱۵ ^{**}	۰/۶۷ ^{**}	۴	EBL × کادمیوم
۰/۰۱ ^{**}	۱۲۷/۹۳ ^{**}	۰/۰۰ ^{**}	۰/۰۰ ^{**}	۰/۰۰ ^{**}	۰/۱۲ ^{**}	۰/۵۷ ^{**}	۴	تیمین × کادمیوم
۰/۰۴ ^{ns}	۲۱۳/۶۴ ^{ns}	۰/۰۳ ^{ns}	۰/۰۲ ^{ns}	۰/۰۱ ^{ns}	۰/۳۲ ^{ns}	۰/۹۲ ^{ns}	۲۶	EBL × تیمین × کادمیوم
۰/۰۰	۰/۰۳	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۳	۲۸	خطا
۳/۹۹	۹/۶۲	۱/۰۱	۲/۸۵	۸/۸۳	۸/۶۴	۹/۳۶		(%) C.V

** نشانگر معنی‌ار بودن در سطح احتمال ۱ درصد و ^{ns} غیر معنی‌دار

فلز در نظر گرفته شده است (Kour et al., 2021). عملکرد دوگانه H₂O₂ در ایجاد آسیب اکسیداتیو و سیگنالینگ در تحریک واکنش دفاع تا حدودی وابسته به تجمع H₂O₂ در بافت‌ها است (Khan et al., 2024). غلظت‌های بالای H₂O₂ به عنوان عامل ایجادکننده تنش اکسیداتیو به

ضخامت غشاء می‌شود (Wagner et al., 1979). این تغییرات به دلیل اکسیداسیون چربی‌ها و پروتئین‌های غشاء است که باعث اختلال شیب یون‌ها، در نتیجه تغییر فرآیندهای متابولیکی می‌شود (Zhang et al., 2022). حفظ یکپارچگی غشاء سلولی تحت تنش فلز به عنوان مکانیسم تحمل در برابر

جدول ۳- مقایسه تأثیر ساده، دوگانه و سه‌گانه فاکتورهای آزمایش بر میانگین برخی پارامترهای رشد، آنتی‌اکسیدانی و بیوشیمایی در گیاه کلزا تحت تیمارهای حاوی تیامین (B)، اپی‌براسینولید (E) و تنش کادمیوم (C)

اثر ساده							تیمارهای آزمایش
فلاونوئیدها	پرولین	H ₂ O ₂	EL	آلدهیدها	MDA	RWC	
۴/۳۹ ^b	۷/۴۷ ^d	۵/۱۰ ^d	۵۶/۵۸ ^e	۴/۷۲ ^d	۰/۴۱ ^g	۶۵/۱۵ ^{ab}	Control
۵/۷۶ ^a	۱۰/۴۵ ^b	۷/۱۱ ^b	۶۴/۱۳ ^b	۶/۷۰ ^c	۰/۵۹ ^b	۵۶/۱۵ ^b	C2
۶/۵۰ ^b	۱۳/۷۱ ^a	۸/۲۰ ^a	۸۴/۱۳ ^b	۶/۷۰ ^b	۰/۶۹ ^a	۴۶/۱۵ ^c	C3
۴/۴۳ ^c	۷/۱۷ ^c	۵/۱۸ ^b	۵۶/۳۰ ^b	۴/۷۰ ^b	۰/۴۰ ^b	۶۶/۱۴ ^b	E2
۴/۱۵ ^c	۴/۴۳ ^c	۴/۹۷ ^c	۴۵/۵۴ ^c	۴/۶۷ ^c	۰/۳۱ ^c	۷۳/۰۷ ^a	E3
۳/۴۵ ^f	۲/۵۸ ^g	۵/۱۰ ^d	۴۶/۷۵ ^d	۴/۶۶ ^e	۰/۳۰ ^d	۷۳/۰۷ ^b	B2
۳/۴۵ ^f	۲/۵۸ ^g	۴۶/۷۵ ^c	۴۶/۷۵ ^g	۴/۶۶ ^g	۰/۳۰ ^h	۷۳/۰۷ ^b	B3
اثر دوگانه							
فلاونوئیدها	پرولین	H ₂ O ₂	EL	آلدهیدها	MDA	RWC	
۴/۳۹ ^b	۷/۴۷ ^d	۵/۱۰ ^d	۵۶/۵۸ ^e	۴/۷۲ ^d	۰/۴۱ ^g	۶۵/۱۵ ^{ab}	Control
۴/۶۸ ^a	۸/۲۳ ^a	۴/۸۲ ^c	۴۷/۳۰ ^c	۴/۷۰ ^c	۰/۳۷ ^c	۶۶/۱۵ ^a	E2×C2
۴/۴۶ ^b	۷/۸۳ ^b	۵/۲۶ ^a	۶۱/۷۰ ^a	۴/۷۶ ^a	۰/۴۴ ^a	۶۴/۱۹ ^c	E2×C3
۴/۵۵ ^b	۸/۶۲ ^b	۵/۱۳ ^b	۵۵/۱۶ ^b	۴/۷۱ ^b	۰/۴۰ ^b	۶۴/۹۱ ^b	E3×C2
۴/۷۵ ^a	۹/۴۹ ^a	۵/۲۷ ^a	۶۶/۱۰ ^a	۴/۷۵ ^a	۰/۵۰ ^a	۵۹/۲۹ ^c	E3×C3
۴/۲۹ ^e	۷/۵۸ ^d	۵/۲۴ ^b	۵۶/۵۷ ^c	۴/۷۱ ^c	۰/۴۰ ^c	۶۵/۶۱ ^d	B2×C2
۴/۳۲ ^e	۸/۸۸ ^b	۵/۳۰ ^a	۷۸/۶۵ ^a	۴/۷۲ ^a	۰/۵۶ ^a	۵۹/۷۵ ^f	B2×C3
۴/۳۳ ^e	۴/۳۶ ^f	۴/۹۲ ^c	۴۶/۷۵ ^d	۴/۶۶ ^f	۰/۳۱ ^d	۷۳/۰۷ ^a	B2×E2
۴/۳۰ ^e	۵/۱۳ ^c	۵/۰۹ ^d	۴۶/۷۵ ^d	۴/۶۶ ^e	۰/۳۲ ^d	۷۳/۰۷ ^a	B2×E3
۴/۲۹ ^e	۷/۵۸ ^d	۵/۶۵ ^c	۵۶/۵۷ ^d	۴/۷۱ ^d	۰/۴۰ ^d	۶۵/۶۱ ^d	B3×C2
۴/۳۲ ^e	۸/۸۸ ^c	۷۸/۶۵ ^a	۷۸/۶۵ ^b	۴/۷۲ ^b	۰/۵۶ ^b	۵۹/۷۵ ^g	B3×C3
۴/۳۱ ^e	۵/۴۴ ^e	۴۰/۶۸ ^h	۴۰/۶۸ ^h	۴/۶۶ ^g	۰/۳۱ ^g	۷۳/۰۷ ^a	B3×E2
۴/۳۸ ^d	۴/۶۲ ^f	۴۶/۷۵ ^c	۴۶/۷۵ ^g	۴/۷۱ ^f	۰/۳۲ ^f	۷۳/۰۷ ^b	B3×E3
اثر سه‌گانه							
فلاونوئیدها	پرولین	H ₂ O ₂	EL	آلدهیدها	MDA	RWC	
۴/۳۹ ^b	۷/۴۷ ^d	۵/۱۰ ^d	۵۶/۵۸ ^e	۴/۷۲ ^d	۰/۴۱ ^g	۶۵/۱۵ ^{ab}	Control
۴/۹۵ ^b	۸/۴۷ ^c	۵/۱۲ ^d	۵۶/۵۷ ^c	۴/۷۱ ^d	۰/۴۰ ^c	۶۵/۶۲ ^c	B2×C2×C3
۵/۰۱ ^a	۹/۵۱ ^a	۵/۳۰ ^a	۵۹/۰۶ ^b	۴/۷۲ ^b	۰/۴۶ ^b	۵۹/۷۶ ^e	B2×E2×C3
۴/۳۷ ^d	۸/۴۷ ^c	۵/۲۰ ^c	۵۶/۵۷ ^c	۴/۷۱ ^d	۰/۳۹ ^c	۶۵/۶۱ ^c	B2×E3×C2
۴/۸۲ ^c	۹/۵۱ ^a	۵/۳۰ ^a	۵۹/۰۶ ^b	۴/۷۲ ^b	۰/۴۷ ^b	۵۹/۷۶ ^e	B2×E3×C3
۴/۷۵ ^b	۹/۲۵ ^{bc}	۴۷/۲۱ ^c	۴۷/۲۱ ^f	۴/۷۱ ^e	۰/۳۹ ^c	۶۵/۶۱ ^c	B3×E2×C2
۴/۹۸ ^a	۱۰/۰۰ ^a	۵۴/۳۱ ^b	۵۴/۳۱ ^e	۴/۷۲ ^c	۰/۴۱ ^c	۵۹/۷۵ ^f	B3×E2×C3
۴/۳۸ ^d	۹/۳۲ ^{bc}	۵۸/۹۱ ^b	۵۸/۹۱ ^c	۴/۷۱ ^d	۰/۴۰ ^{de}	۶۲/۱۰ ^e	B3×E3×C2
۴/۶۲ ^c	۹/۵۳ ^{ab}	۷۹/۴۳ ^a	۷۵/۴۳ ^a	۴/۸۶ ^a	۰/۶۰ ^a	۵۷/۴۱ ^h	B3×E3×C3

حروف مختلف لاتین در یک ستون، بیانگر معنی‌دار بودن بین دو میانگین در همان پارامتر سنجش شده در سطح معنی‌دار ۵ درصد است. سطوح غلظتی C1, B1, E1 مربوط به شاهد بوده و دارای غلظت صفر هستند.

مکانیسم‌های دفاعی آنزیمی و غیرآنزیمی باعث کاهش تولید گونه‌های واکنشگر اکسیژن گردیده و موجب ممانعت از آسیب‌های غشایی ناشی از تنش کادمیوم به گیاهان کلزا شده است (جدول ۲ و ۳).

میزان پراکسید هیدروژن (H₂O₂): نتایج نشان داد که کمترین مقدار پراکسید هیدروژن در تیمار با غلظت صفر میکرومولار (۵/۱۰ میکرومول بر گرم وزن تر) و ۱۰۰ میکرومولار تیمین (۵/۱۱ میکرومول بر گرم وزن تر) مشاهده شد. در مورد اپی براسینولید، کمترین مقدار پراکسید هیدروژن مربوط به غلظت ۰/۰۲ میکرومولار (۴/۸۲ میکرومول بر گرم وزن تر) بود. بیشترین و کمترین مقدار پراکسید هیدروژن در تیمار با غلظت ۵۰۰ میکرومولار کادمیوم (۵/۲۷ میکرومول بر گرم وزن تر) و صفر میکرومولار کادمیوم (۴/۹۷ میکرومول بر گرم وزن تر) مشاهده شد. در رابطه با اثرات متقابل تیمین و کادمیوم، هیچ کدام از غلظت‌های تیمین نتوانستند به طور معنی‌داری پراکسید هیدروژن را کاهش دهند. کمترین مقدار پراکسید هیدروژن در تیمار با غلظت ۱۰۰ میکرومولار تیمین و صفر میکرومولار کادمیوم (۴/۹۲ میکرومول بر گرم وزن تر) مشاهده شد. همچنین، در مورد اپی براسینولید و کادمیوم، کمترین میزان پراکسید هیدروژن در تیمار با غلظت ۰/۰۲ میکرومولار اپی براسینولید و صفر میکرومولار کادمیوم (۴۰/۶۸ میکرومول بر گرم وزن تر) در مقایسه با تنش کادمیوم به تنهایی به دست آمد (جدول ۲).

غلظت مالون دی‌آلدئید (MDA) و سایر آلدئیدها: نتایج بررسی مقایسه میانگین اثرات اصلی تیمین، اپی براسینولید و کادمیوم بر مقدار مالون دی‌آلدئید و سایر آلدئیدهای برگ‌های گیاه کلزا نشان داد که کمترین مقدار مالون دی‌آلدئید به ترتیب در تیمار با غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار تیمین (۰/۳۹ میکرومول بر گرم وزن تر) و ۱۰۰ میکرومولار تیمین (۴/۷۰ میکرومول بر گرم وزن تر) مشاهده شد. در مورد اپی براسینولید، کمترین مقدار مالون دی‌آلدئید و سایر آلدئیدها به ترتیب در تیمار با غلظت ۰/۰۲ میکرومولار اپی براسینولید (۰/۳۷ میکرومول بر گرم وزن تر) و ۰/۰۲ میکرومولار اپی

حساب می‌آیند که نشان می‌دهد نقش سیگنالینگ H₂O₂ در فعال‌سازی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی ممکن است در گیاهان تحت تنش فلز محدود شده باشد (Fitzpatrick and Chapman, 2020).

نتایج این پژوهش نشان داد تنش کادمیوم در مقایسه با کنترل منجر به افزایش نشت یونی، H₂O₂ و MDA در گیاهان کلزا شد. همچنین با افزایش غلظت کادمیوم از ۲۵۰ میکرومولار به ۵۰۰ میکرومولار محتوای این ترکیبات نیز افزایش معنی‌دار یافت (جدول ۲ و ۳). به نظر می‌رسد افزایش پراکسیداسیون لیپید یا نشت یونی و مقدار H₂O₂ در شرایط تنش فلزی ناشی از افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن در شرایط تنش اکسیداتیو ناشی از کادمیوم است که حذف آنها خارج از توان گیاه بوده و نشان می‌دهد که مکانیسم‌های دفاعی ایجادشده در گیاه در مقابل تنش اکسیداتیو کافی نبوده است.

طی گزارش Wang و همکاران (۲۰۰۹) آمده است در گیاهان ذرت در معرض غلظت بالای منگنز که تحت تیمار با براسینواستروئید قرار گرفتند تولید ROS پایین‌تر و محتوای MDA کمتری را نشان می‌دهند. همچنین خشکی فیزیولوژیکی ایجادشده توسط غلظت بالای فلزات با کاربرد براسینواستروئیدها کاهش می‌یابد که نشان‌دهنده کاهش مسمومیت ناشی از فلز توسط این هورمون است (Fu et al., 2023; Lohani et al., 2020).

کاربرد تیمین در کاهش اثرات نامطلوب تنش در گیاهان مفید است. Kaya و همکاران (۲۰۱۵) نشان داد که تیمار تیمین در برگ‌های گیاهان ذرت تحت تنش شوری باعث کاهش محتوای H₂O₂ و MDA می‌شود که با نتایج Tunc-Ozdemir و همکاران در گیاهان آرابیدوپسیس تحت تنش اکسیداتیو مطابقت دارد (Hafeez et al., 2021; Jia et al., 2023).

داده‌های به دست آمده در مطالعه حاضر نشان داد محتوای MDA، H₂O₂ و نشت یونی تحت اثر متقابل بین EBL و تیمین کاهش یافت. بهترین اثر هم زمان این تیمارها در غلظت تیمین ۲۰۰ میکرومولار و EBL ۰/۰۲ میکرومولار دیده شد که می‌توان این احتمال را داد که EBL و تیمین با تأثیر بر

سمیت فلزات بهبود بخشند. درمان با EBR محتوای MDA و EL را کاهش داد، با کاهش پراکسیداسیون لیپیدها و نشت الکترولیت‌ها در گیاهانی که تحت استرس Cd قرار داشتند (Santos *et al.*, 2018; Kuo *et al.*, 2020). نتایج مطالعه بر روی اسفناج نیز حاکی از این موضوع دارد (Wang *et al.*, 2009; Kheyri *et al.*, 2022).

پرویلین اندام هوایی: نتایج نشان داد که بیشترین مقدار پرویلین مربوط به غلظت ۲۰۰ میکرومولار تیمامین (۷/۷۱ میلی‌گرم بر گرم وزن تر)، ۰/۰۲ میکرومولار اپی براسینولید (۸/۲۳ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) و ۵۰۰ میکرومولار کادمیوم (۹/۴۹ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) بود. در رابطه با اثرات متقابل تیمامین و کادمیوم، بیشترین مقدار پرویلین مربوط به غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار تیمامین و ۵۰۰ میکرومولار کادمیوم (۹/۵۱ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) در مقایسه با تنش کادمیوم به تنهایی بود. در رابطه با اثرات متقابل اپی براسینولید و کادمیوم نیز بیشترین میزان این اسیدآمین به مربوط به غلظت ۰/۰۲ میکرومولار اپی براسینولید و ۵۰۰ میکرومولار کادمیوم (۱۰/۰۰ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) در مقایسه با تنش کادمیوم تنها بود. هر چند این تیمار با تیمار ۰/۵ میکرومولار اپی براسینولید و ۵۰۰ میکرومولار کادمیوم (۹/۵۳ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول ۲).

برای تحمل استرس فلزی، گیاهان انواع مختلفی از متابولیت‌ها را انباشته می‌کنند. پرویلین یک متابولیت مهم اسید آمینه است که نقش مهمی در تحمل گیاه به شرایط استرس‌زا دارد و می‌تواند به عنوان یک ماده تنظیم‌کننده اسمزی گیاه، کلاتور فلزی و خاموش‌کننده ROS عمل کند (Kour *et al.*, 2021; Song *et al.*, 2021). پرویلین می‌تواند عملکردهای مختلف آنزیم‌ها را تثبیت و محافظت کند، رشد گیاه را تنظیم کند و نقش مهمی در کاهش سمیت فلزات سنگین ایفا کند (Haider *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2021). در مطالعه‌ای، استرس کادمیوم باعث افزایش مقدار پرویلین در کاهو تحت تنش کادمیوم شد (Kour *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2020).

محتوای ترکیبات فنلی: نتایج مقایسه میانگین اثرات اصلی

براسینولید (۴/۷۰ میکرومول بر گرم وزن تر) مشاهده شد. در مورد اثر کادمیوم، کمترین مقدار مالون دی‌آلدئید و سایر آلدئیدها به ترتیب در تیمار با غلظت صفر میکرومولار کادمیوم (۰/۳۱ میکرومول بر گرم وزن تر) و صفر میکرومولار کادمیوم (۴/۶۷ میکرومول بر گرم وزن تر) مشاهده شد. در رابطه با اثرات متقابل تیمامین و کادمیوم، هیچ کدام از غلظت‌های تیمامین نتوانستند به طور معنی‌داری مقدار مالون دی‌آلدئید را کاهش دهند. کمترین مقدار آلدئیدها در تیمار با غلظت ۱۰۰ میکرومولار تیمامین و صفر میکرومولار کادمیوم (۴/۶۶ میکرومول بر گرم وزن تر) مشاهده شد (جدول ۲ و ۳). همچنین، در مورد اثرات متقابل اپی براسینولید و کادمیوم، کمترین میزان مالون دی‌آلدئید در تیمار با غلظت صفر میکرومولار اپی براسینولید و صفر میکرومولار کادمیوم (۰/۳۰ میکرومول بر گرم وزن تر) مشاهده شد. کمترین میزان آلدئیدها نیز در تیمار با هر دو غلظت صفر و ۰/۰۲ میکرومولار اپی براسینولید و صفر میکرومولار کادمیوم (۴/۶۶ میکرومول بر گرم وزن تر) مشاهده شد (جدول ۲).

در این پژوهش، تنش کادمیوم باعث افزایش غلظت MDA و سایر آلدئیدها و نشت یونی در گیاه کلزا شد. که با نتایج Izadi و همکاران بر روی تربچه (۲۰۲۱) و Maghsoudi و همکاران بر روی اسفناج (۲۰۲۱) مطابقت دارد. اما این اثر با استفاده از EBL-۲۴ قابل برگشت است که محتوای MDA را تحت تنش Cd کاهش می‌دهد. نتایج Jia و همکاران (۲۰۲۳) نشان داد که تیمار کادمیوم به طور قابل توجهی تولید MDA، پرویلین و نشت الکترولیت در بافت برگ را نسبت به شاهد افزایش داد.

در مطالعه حاضر، کاربرد تیمامین و EBL به صورت جداگانه، پراکسیداسیون لیپیدها، H₂O₂ و EL را در گیاهان کلزا در معرض استرس فلزی کاهش داد. یکی از مکانیسم‌های بهبود پراکسیداسیون لیپیدها و ROS توسط EBL می‌تواند به افزایش هورمون‌های درون‌زا گیاه که رشد گیاه را تنظیم می‌کنند، مانند اسید سالیسیلیک و اتیلن، و تعامل بین آنها نسبت داده شود. این مکانیسم‌ها می‌توانند تحمل گیاه را در برابر

تیمین، اپی براسینولید و کادمیوم بر محتوای ترکیبات فنلی برگ گیاه کلزا نشان داد که بیشترین محتوای ترکیبات فنلی مربوط به غلظت ۱۰۰ میکرومولار تیمین (۳/۲۲ میلی گرم بر گرم وزن تر)، صفر میکرومولار اپی براسینولید (۲/۸۱ میلی گرم بر گرم وزن تر) و ۵۰۰ میکرومولار کادمیوم (۳/۲۶ میلی گرم بر گرم وزن تر) بود. در رابطه با اثرات متقابل تیمین و کادمیوم، بیشترین محتوای ترکیبات فنلی مربوط به غلظت ۱۰۰ میکرومولار تیمین و ۵۰۰ میکرومولار کادمیوم (۳/۹۹ میلی گرم بر گرم وزن تر) در مقایسه با تیمار کادمیوم به تنهایی بود. در رابطه با اثرات متقابل اپی براسینولید و کادمیوم نیز بیشترین محتوای ترکیبات فنلی مربوط به غلظت ۰/۵ میکرومولار اپی براسینولید و ۵۰۰ میکرومولار کادمیوم (۳/۴۱ میلی گرم بر گرم وزن تر) در مقایسه با تیمار کادمیوم به تنهایی بود (جدول ۲).

محتوای فلاونوئیدها: بررسی فلاونوئیدهای برگ گیاه

کلزا نشان داد که بیشترین محتوای فلاونوئیدها مربوط به غلظت ۱۰۰ میکرومولار تیمین (۴/۷۶ میلی گرم بر گرم وزن تر)، ۰/۰۲ میکرومولار اپی براسینولید (۴/۶۸ میلی گرم بر گرم وزن تر) و ۵۰۰ میکرومولار کادمیوم (۴/۷۵ میلی گرم بر گرم وزن تر) بود. در رابطه با اثرات متقابل تیمین و کادمیوم، بیشترین محتوای فلاونوئیدها مربوط به غلظت ۱۰۰ میکرومولار تیمین و غلظت ۵۰۰ میکرومولار کادمیوم (۵/۰۱ میلی گرم بر گرم وزن تر) در مقایسه با کادمیوم به تنهایی بود. در رابطه با اثرات متقابل اپی براسینولید و کادمیوم نیز بیشترین محتوای فلاونوئیدها مربوط به غلظت ۰/۰۲ میکرومولار اپی براسینولید و ۵۰۰ میکرومولار کادمیوم (۴/۹۸ میلی گرم بر گرم وزن تر) نسبت به تنش کادمیوم تنها بود (جدول ۲). این موضوع نشان می‌دهد که فلاونوئیدها نقش اساسی در مقاومت *B. juncea* در معرض استرس Cd دارند (Ren et al., 2023; Rezaie et al., 2020).

محتوای آنتوسیانین‌ها: بررسی محتوای آنتوسیانین برگ

گیاه کلزا نشان داد که بیشترین محتوای آنتوسیانین مربوط به غلظت ۱۰۰ میکرومولار تیمین (۰/۶۳ میکرومول بر گرم وزن تر)، ۰/۵ میکرومولار اپی براسینولید (۰/۶۷ میکرومول بر گرم

وزن تر) و ۵۰۰ میکرومولار کادمیوم (۰/۷۴ میکرومول بر گرم وزن تر) بود. در رابطه با اثرات متقابل تیمین و کادمیوم، بیشترین محتوای آنتوسیانین مربوط به غلظت ۱۰۰ میکرومولار تیمین و ۵۰۰ میکرومولار کادمیوم (۰/۸۳ میکرومول بر گرم وزن تر) نسبت به کادمیوم به تنهایی بود. در رابطه با اثرات متقابل اپی براسینولید و کادمیوم نیز بیشترین محتوای آنتوسیانین‌ها مربوط به غلظت ۰/۰۲ میکرومولار اپی براسینولید و ۵۰۰ میکرومولار کادمیوم (۰/۷۲ میکرومول بر گرم وزن تر) در مقایسه با تنش کادمیوم تنها بود (جدول ۲). نتایج این مطالعه نشان داد که فلاونوئیدها، فلاونول‌ها و ترکیبات فنولی در شرایط استرس کادمیوم به طور قابل توجهی افزایش یافتند. به نظر می‌رسد که این گیاه تحت استرس کادمیوم، ترکیبات فنولی را برای داشتن واکنش‌های دفاعی مناسب در برابر استرس افزایش داده است (Nie et al., 2023; Raihan et al., 2022).

میزان فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH تحت اثر

تیمارها: بررسی فعالیت مهار رادیکال DPPH گیاه کلزا نشان داد که بیشترین فعالیت مهار رادیکال DPPH مربوط به غلظت ۱۰۰ میکرومولار تیمین (۵۴/۵۷ درصد)، صفر میکرومولار اپی براسینولید (۵۰/۳۳ درصد) و ۵۰۰ میکرومولار کادمیوم (۶۲/۰۲ درصد) بود. در رابطه با اثرات متقابل تیمین و کادمیوم، بیشترین فعالیت مهار رادیکال DPPH مربوط به غلظت ۱۰۰ میکرومولار تیمین و ۵۰۰ میکرومولار کادمیوم (۷۱/۸۵ درصد) نسبت به تنش کادمیوم تنها بود. همچنین اثرات متقابل اپی براسینولید و کادمیوم بیشترین فعالیت مهار رادیکال DPPH را در غلظت ۰/۰۲ میکرومولار اپی براسینولید و ۵۰۰ میکرومولار کادمیوم (۵۹/۶۴ درصد) در مقایسه با تنش کادمیوم تنها بود (جدول ۲). DPPH یک رادیکال آزاد پایدار است که به عنوان یک سوپرا برای ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی استفاده می‌شود (Gharib et al., 2023; Liu et al., 2023).

در این مطالعه، فعالیت مهارکنندگی DPPH در نمونه‌های تیمار شده با کادمیوم بیشتر از نمونه‌های کنترل بود. این نتایج با گزارش‌های قبلی توسط Afzal و همکاران (۲۰۲۱)

جدول ۴- مقایسه تأثیر ساده، دوگانه و سه‌گانه فاکتورهای آزمایش بر مقایسه میانگین برخی پارامترهای رشد، آنتی‌اکسیدانی و بیوشیمیایی در گیاه کلزا تحت تیمارهای حاوی تیمین (B)، اپی‌براسینولید (E) و تنش کادمیوم (C)

اثر ساده							تیمارهای آزمایش
دی‌هیدروآسکوربات	آسکوربات	آنتوسیانین	فنل‌ها	پروتئین کل	کربوهیدرات محلول	DPPH	
۶/۳۲ ^c	۷/۱۴ ^a	۰/۶۰ ^b	۲/۵۵ ^c	۴/۵۶ ^b	۰/۷۲ ^b	۴۷/۱۲ ^c	Control
۷/۰۰ ^b	۷/۱۵ ^a	۰/۶۳ ^a	۳/۲۲ ^a	۶/۵۷ ^a	۰/۹۷ ^a	۲۴/۵۷ ^a	C2
۸/۸۵ ^a	۵/۴۶ ^b	۱/۵۶ ^c	۴/۷۳ ^a	۶/۵۷ ^a	۱/۷۲ ^b	۲۱/۳۳ ^b	C3
۹/۷۴ ^a	۴/۱۶ ^b	۱/۵۷ ^c	۴/۸۱ ^a	۴/۵۷ ^b	۰/۷۳ ^b	۵۰/۳۳ ^a	E2
۵/۱۴ ^c	۸/۲۰ ^a	۰/۴۵ ^c	۲/۲۱ ^c	۵/۲۲ ^a	۰/۹۴ ^a	۳۵/۸۱ ^c	E3
۴/۷۷ ^h	۷/۵۹ ^c	۰/۳۴ ^e	۱/۷۷ ^d	۵/۲۵ ^b	۰/۸۶ ^b	۳۴/۲۳ ^g	B2
۴/۷۷ ^f	۷/۵۹ ^b	۰/۳۴ ^g	۱/۷۷ ^e	۵/۲۵ ^b	۰/۸۶ ^b	۳۴/۲۳ ^g	B3
اثر دوگانه							
۶/۳۲ ^c	۷/۱۴ ^a	۰/۶۰ ^b	۲/۵۵ ^c	۴/۵۶ ^b	۰/۷۲ ^b	۴۷/۱۲ ^c	Control
۶/۴۵ ^b	۷/۸۴ ^a	۰/۶۱ ^b	۲/۴۰ ^c	۴/۶۲ ^a	۰/۸۱ ^a	۴۸/۹۲ ^b	E2×C2
۶/۱۶ ^c	۶/۷۱ ^c	۰/۶۷ ^a	۲/۷۶ ^c	۴/۴۷ ^c	۰/۶۶ ^c	۴۷/۳۵ ^c	E2×C3
۶/۵۹ ^b	۷/۲۳ ^b	۰/۶۱ ^b	۲/۶۸ ^c	۴/۹۶ ^b	۰/۷۵ ^b	۵۰/۵۲ ^b	E3×C2
۷/۹۶ ^a	۶/۱۹ ^c	۰/۷۴ ^a	۳/۲۶ ^{ab}	۳/۵۰ ^c	۰/۵۰ ^c	۶۲/۰۲ ^a	E3×C3
۶/۸۳ ^e	۷/۰۸ ^e	۰/۵۰ ^c	۲/۷۰ ^d	۴/۹۶ ^d	۰/۷۱ ^c	۴۳/۵۹ ^e	B2×C2
۷/۴۷ ^c	۵/۹۱ ^g	۰/۷۲ ^b	۲/۹۷ ^b	۳/۵۰ ^f	۰/۴۹ ^d	۵۷/۳۹ ^c	B2×C3
۵/۲۰ ^f	۷/۸۹ ^b	۰/۳۵ ^e	۲/۷۱ ^d	۵/۲۵ ^a	۰/۹۴ ^a	۳۴/۲۰ ^g	B2×E2
۵/۱۹ ^g	۹/۰۱ ^a	۰/۴۶ ^d	۲/۴۲ ^e	۵/۲۵ ^a	۰/۹۴ ^a	۳۶/۸۸ ^f	B2×E3
۶/۸۳ ^c	۷/۰۸ ^c	۰/۵۰ ^e	۲/۷۰ ^d	۴/۹۶ ^d	۰/۷۱ ^d	۴۳/۵۹ ^e	B3×C2
۷/۴۷ ^b	۵/۹۱ ^e	۰/۷۲ ^a	۲/۹۷ ^b	۳/۵۰ ^f	۰/۴۹ ^g	۵۷/۳۹ ^b	B3×C3
۵/۲۱ ^e	۸/۹۲ ^a	۰/۴۶ ^f	۱/۷۷ ^f	۵/۴۲ ^a	۱/۰۷ ^a	۳۹/۹۵ ^f	B3×E2
۵/۳۱ ^e	۷/۵۷ ^b	۰/۶۴ ^d	۲/۳۹ ^d	۴/۹۶ ^c	۰/۸۶ ^c	۳۶/۸۰ ^f	B3×E3
اثر سه‌گانه							
۶/۳۲ ^c	۷/۱۴ ^a	۰/۶۰ ^b	۲/۵۵ ^c	۴/۵۶ ^b	۰/۷۲ ^b	۴۷/۱۲ ^c	Control
۶/۸۴ ^e	۷/۲۶ ^{de}	۰/۷۲ ^b	۲/۹۷ ^d	۴/۹۶ ^c	۰/۸۶ ^b	۵۷/۶۷ ^c	B2×C2×C2
۸/۹۸ ^a	۶/۳۰ ^f	۰/۸۳ ^a	۳/۹۹ ^b	۳/۵۰ ^e	۰/۵۱ ^d	۷۱/۸۵ ^a	B2×E2×C3
۷/۳۲ ^d	۷/۴۱ ^{cd}	۰/۵۰ ^c	۲/۸۰ ^d	۴/۹۶ ^{cd}	۰/۷۱ ^c	۵۳/۴۷ ^d	B2×E3×C2
۸/۰۲ ^b	۵/۹۷ ^g	۰/۷۳ ^b	۲/۹۷ ^d	۳/۵۰ ^f	۰/۵۱ ^d	۶۳/۶۵ ^b	B2×E3×C3
۶/۰۶ ^d	۷/۷۲ ^b	۰/۶۴ ^d	۲/۴۷ ^d	۴/۹۶ ^{cd}	۰/۸۶ ^c	۵۰/۱۸ ^c	B3×E2×C2
۸/۰۹ ^a	۶/۸۶ ^{cd}	۰/۷۲ ^b	۲/۹۷ ^d	۳/۵۰ ^e	۰/۵۱ ^f	۵۹/۶۴ ^a	B3×E2×C3
۵/۹۱ ^d	۶/۶۶ ^d	۰/۶۹ ^c	۲/۴۷ ^d	۴/۹۶ ^c	۰/۶۲ ^c	۴۷/۶۶ ^d	B3×E3×C2
۷/۲۶ ^b	۵/۹۱ ^e	۰/۶۹ ^c	۳/۴۱ ^c	۳/۵۰ ^g	۰/۴۹ ^g	۵۷/۵۹ ^b	B3×E3×C3

حروف مختلف لاتین در یک ستون، بیانگر معنی‌دار بودن بین دو میانگین در همان پارامتر سنجش شده در سطح معنی‌دار ۵ درصد است. سطوح غلظتی C1, B1, E1 مربوط به شاهد بوده و دارای غلظت صفر هستند.

(ASC) به دلیل توانایی اش در اهدا الکترون و کمک به حذف پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، به طور مستقیم در حذف رادیکال‌ها (مانند رادیکال‌های توکوفرکسیل، پراکسیدهای لیپیدی یا یون‌های فلزی اکسیدشده) دخیل است (Okla et al., 2023; Nazir et al., 2024).

تغییرات پروتئین کل تحت تیمارهای پژوهش: سنجش
محتوای پروتئین برگ گیاه کلزا نشان داد که بیشترین محتوای پروتئین مربوط به غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار (۴/۵۷ میلی گرم بر گرم وزن تر) تیمین بود. در رابطه با اپی براسینولید نیز بیشترین محتوای پروتئین مربوط به غلظت ۰/۰۲ میکرومولار (۴/۶۲ میلی گرم بر گرم وزن تر) اپی براسینولید بود. در رابطه با کادمیوم بیشترین محتوای پروتئین مربوط به غلظت صفر میکرومولار (۵/۲۲ میلی گرم بر گرم وزن تر) کادمیوم بود. در رابطه با اثرات متقابل تیمین و کادمیوم، بیشترین محتوای پروتئین (۵/۲۵ میلی گرم بر گرم وزن تر) گزارش شد که مربوط به هر دو غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار تیمین و صفر میکرومولار کادمیوم بود هر چند اختلاف معنی‌داری بین این دو غلظت تیمین دیده نشد. بیشترین محتوای پروتئین مربوط به غلظت ۰/۰۲ میکرومولار اپی براسینولید و صفر میکرومولار کادمیوم (۵/۴۲ میلی گرم بر گرم وزن تر) بود (جدول ۲).

نتیجه‌گیری

بطورکلی از نتایج این پژوهش می‌توان گفت؛ تأثیر جداگانه تیمین و اپی براسینولید بر بهبود شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی گیاهان کلزا تحت تنش کادمیوم معنی‌دار بوده، اما تأثیر همزمان و توأم این دو الیستور برونزا جهت این موضوع چندان چشمگیر و معنی‌دار نبود. به هر حال کاربرد ۱۰۰ میکرومولار تیمین (B2) یا کاربرد ۵۰ میکرومولار اپی براسینولید (E2) دارای بهترین تأثیر جهت بهبود شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی مانند پراکسیداسیون غشاء و یا آلدئیدها و رشد بهتر کلزا تحت تنش ۲۵۰ میکرومولار کادمیوم (C2) در این تحقیق بنیادی علمی بود. هر چند سایر تیمارهای حاوی تیمین یا اپی

در گیاهان تحت تنش ناشی از کادمیوم که نشان‌دهنده افزایش مهار رادیکال‌های DPPH در گیاهان تیمارشده با فلزات مس، روی و جیوه در مقایسه با کنترل بود، مطابقت دارد. نتایج Ahmad و همکاران (۲۰۱۵) حاکی از افزایش رادیکال DPPH توسط گیاهان تیمارشده با فلز Cd در مقایسه با شاهد بود.

بنابراین در پژوهش حاضر احتمال داده می‌شود غلظت ۰/۰۲ میکرومولار اپی براسینولید و ۲۰۰ میکرومولار تیمین تحت تنش ۵۰۰ میکرومولار کادمیوم باعث افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و در نتیجه افزایش مهار فعالیت رادیکال‌های آزاد گردیده است. با توجه به اینکه غلظت ۰/۰۲ میکرومولار اپی براسینولید و ۲۰۰ میکرومولار تیمین از یک طرف میزان ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی، آنتوسیانین و از طرف دیگر ظرفیت مهار رادیکال‌های آزاد را افزایش داده است. به نظر می‌رسد اپی براسینولید و تیمین از طریق افزایش این ترکیبات موجب افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه کلزا گردیده است (جدول ۲ و ۴).

آسکوربیک اسید و دی هیدروآسکوربیک اسید: بررسی

مقدار آسکوربیک اسید و دی هیدروآسکوربیک اسید نشان داد که بیشترین محتوای آسکوربیک اسید و دی هیدروآسکوربیک اسید به ترتیب مربوط به غلظت ۲۰۰ میکرومولار تیمین (۷/۴۶ میلی گرم بر گرم وزن تر) و ۱۰۰ میکرومولار تیمین (۷/۰۰ میلی گرم بر گرم وزن تر) بود. در رابطه با اپی براسینولید نیز بیشترین مقدار آسکوربیک اسید و دی هیدروآسکوربیک اسید به ترتیب مربوط به غلظت ۰/۰۲ میکرومولار اپی براسینولید (۷/۸۴ میلی گرم بر گرم وزن تر) و صفر میکرومولار اپی براسینولید (۶/۷۴ میلی گرم بر گرم وزن تر) بود.

در رابطه با اثرات متقابل اپی براسینولید و کادمیوم نیز بیشترین مقدار آسکوربیک اسید و دی هیدروآسکوربیک اسید به ترتیب مربوط به غلظت ۰/۰۲ میکرومولار اپی براسینولید و صفر میکرومولار کادمیوم (۸/۹۲ میلی گرم بر گرم وزن تر) و غلظت ۰/۰۲ میکرومولار اپی براسینولید و ۵۰۰ میکرومولار کادمیوم (۸/۰۹ میلی گرم بر گرم وزن تر) نسبت به تیمار کادمیوم به تنهایی بود (جدول ۲). در واقع، اسید آسکوربیک

تشکر و قدردانی

این پژوهش بخشی از رساله دکتری بوده، که مراحل تحقیقاتی آن در آزمایشگاه تحقیقاتی و گلخانه بخش زیست‌شناسی دانشگاه شهید باهنر کرمان انجام شده است و بدین وسیله از مساعدت و حمایت مسئولین مربوطه دانشگاه و بخش زیست‌شناسی، کمال تشکر را داریم.

براسینولید نیز دارای تأثیر نسبی در هردو سطح تنش کادمیوم بودند، اما تأثیر جداگانه این دو الیستور ویتامینی و هورمونی در تنش ۲۵۰ میکرومولار کادمیوم کاملاً تأثیرگذار و چشمگیرتر بود و مقاومت اکسیدانی گیاهان کلزا تحت تنش کادمیوم را در این پژوهش بهبود بخشید. پیشنهاد می‌گردد جهت تکمیل تحقیقات آتی، برخی مسیرهای متابولیکی و ژنی در این رابطه و حتی در شرایط مزرعه مورد تحقیق و پژوهش قرار گیرد.

منابع

- Afzal, S., Chaudhary, N., & Singh, N. K. (2021). Role of soluble sugars in metabolism and sensing under abiotic stress. *Plant growth regulators: Signalling under stress conditions. Plant Physiology and Biochemistry*, 305-334. Doi: 10.1007/978-3-030-61153-8_14
- Ahmad, P., Castagna, A., & Salem, E. (2015). Alleviation of cadmium toxicity in *Brassica juncea* L. (Czern. & Coss.) by calcium application involves various physiological and biochemical strategies. *PLoS One*, 10(1), 0114571.
- Akram, W., Khan, W. U., Shah, A. A., Yasin, N. A., & Li, G. (2021). Liquiritoside alleviated Pb induced stress in *Brassica rapa* subsp. *Parachinensis*: modulations in glucosinolate content and some physiochemical attributes. *Frontiers in Plant Science*, 12, 722498. doi: 10.3389/fpls.2021.722498
- Alam, P., Balawi, T. A., Ashraf, M., & Ahmad, P. (2021). 24-Epibrassinolide (EBR) reduces oxidative stress damage induced by cadmium toxicity by restricting cd uptake and modulating some key antioxidant enzymes in maize plants. *Pakistan Journal Botany*, 53(1), 59-66. DOI: <http://dx.doi.org/10.30848/PJB2021-127>
- Alam, P., Kaur Kohli, S., Al Balawi, T., Altalayan, F. H., Alam, P., Ashraf, M., ... & Ahmad, P. (2020). Foliar application of 24-Epibrassinolide improves growth, ascorbate-glutathione cycle, and glyoxalase system in brown mustard (*Brassica juncea* (L.) Czern.) under cadmium toxicity. *Plants*, 9(11), 1487. do: 10.3390/plants9111487
- Ali, E., Hassan, Z., Irfan, M., Hussain, S., Rehman, H. U., Shah, J. M., ... & Ali, S. (2020). Indigenous tocopherol improves tolerance of oilseed rape to cadmium stress. *Frontiers in Plant Science*, 11, 547133. doi.org/10.3389/fpls.2020.547133
- Amiri, Z., Asgharipour, M. R., Campbell, D. E., & Sabaghi, M. A. (2020). Comparison of the sustainability of mechanized and traditional rapeseed production systems using an emergy-based production function: A case study in Lorestan Province, Iran. *Journal of Cleaner Production*, 258, 120891. Doi: 10.1016/j.jclepro.2020.120891
- Atif, M., Perveen, S., Parveen, A., Mahmood, S., Saeed, M., & Zafar, S. (2022). Thiamine and indole-3-acetic acid induced modulations in physiological and biochemical characteristics of maize (*Zea mays* L.) under arsenic stress. *Sustainability*, 14(20), 13288. Doi: 10.3390/su142013288
- Basit, F., Liu, J., An, J., Chen, M., He, C., Zhu, X., & Guan, Y. (2021). Brassinosteroids as a multidimensional regulator of plant physiological and molecular responses under various environmental stresses. *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 44768-44779. Doi:10.1007/s11356-021-15087-8
- Bates, L. S., Waldren, R. P., & Teares, I. D. (1973). Rapid determination of free proline in water stress studies. *Plant and Soil*, 39, 205-207. Doi: 10.3390/su142013288
- Ben Hamed, K., Castagna, A., & Salem, E. (2007). Sea fennel (*Crithmum maritimum* L.) under salinity conditions: A comparison of leaf and root antioxidant responses. *Plant Growth Regulation*, 53, 185-194. Doi: 10.1016/j.ecoenv.2007.112650
- 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(1-2), 248-254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
- El Rasafi, T., Ouakroum, A., Haddioui, A., Song, H., Kwon, E. E., Bolan, N., ... & Rinklebe, J. (2022). Cadmium stress in plants: A critical review of the effects, mechanisms, and tolerance strategies. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 52(5), 675-726. Doi:10.1080/10643389.2020.1835435
- Elahi, N. N., Farrukh, N. U. A., Jalaluddin, S., Ahmed, H. M., Saima, S., Mustafa, S., ... & Danish, S. (2023). Comparing the positive impacts and stress induction by polyethylene glycol (PEG 6000) variable levels on canola (*Brassica napus* L.) growth, yield, and oil contents. *ACS Omega*, 8(32), 29046-29059. doi: 10.1021/acsomega.3c02066
- Fales, F. (1951). The assimilation and degradation of carbohydrates by yeast cells. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 113-124. Doi: 10.1016/S0021-9258(19)52433-4

- Farhat, F., Arfan, M., Wang, X., Tariq, A., Kamran, M., Tabassum, H. N., ... & Elansary, H. O. (2022). The impact of bio-stimulants on Cd-stressed wheat (*Triticum aestivum* L.): Insights into growth, chlorophyll fluorescence, Cd accumulation, and osmolyte regulation. *Frontiers in Plant Science*, 13, 850567. doi: 10.3389/fpls.2022.850567
- Fitzpatrick, T. B., & Chapman, L. M. (2020). The importance of thiamine (vitamin B1) in plant health: From crop yield to biofortification. *Journal of Biological Chemistry*, 295(34), 12002-12013. doi: 10.1074/jbc.REV120.010918
- Fu, X., Mehmood, S., Ahmed, W., Ou, W., Suo, P., Zhang, Q., ... & Li, W. (2023). Reducing chromium toxicity in Chinese cabbage through synergistic effects of silicon and selenium: A study of plant growth, chromium content, and biochemical parameters. *Sustainability*, 15(6), 5361. Doi:10.3390/su15065361
- Gharib, F. A. E. L., & Ahmed, E. Z. (2023). Spirulina platensis improves growth, oil content, and antioxidant activity of rosemary plant under cadmium and lead stress. *Scientific Reports*, 13(1), 8008. Doi:10.1038/s41598-023-35063-1
- Ghasemi-Omran, V. O., Ghorbani, A., & Sajjadi-Otaghsara, S. A. (2021). Melatonin alleviates NaCl-induced damage by regulating ionic homeostasis, antioxidant system, redox homeostasis, and expression of steviol glycosides-related biosynthetic genes in in vitro cultured *Stevia rebaudiana* Bertoni. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 57, 319-331. Doi:10.1007/s11627-021-10161-9
- Hafeez, M. B., Zahra, N., Zahra, K., Raza, A., Batool, A., Shaukat, K., & Khan, S. (2021). Brassinosteroids: Molecular and physiological responses in plant growth and abiotic stresses. *Plant Stress*, 2, 100029. Doi: 10.1016/j.stress.2021.100029
- Haider, F. U., Liqun, C., Coulter, J. A., Cheema, S. A., Wu, J., Zhang, R., ... & Farooq, M. (2021). Cadmium toxicity in plants: Impacts and remediation strategies. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 211, 111887. Doi: 10.1016/j.ecoenv.2020.111887
- Hajbagheri, S., Abbaspour, H., Enteshari, S., Habibollahi, S., & Iranbakhsh, A. (2017). The effect of mycorrhizal inoculation (*Glomus mosseae*) and brassinosteroid on the amount of antioxidants in *Pimpinella anisum* L. under cadmium stress. *Journal of Research in Ecology*, 5(2), 1033-1051.
- Heath, R. L., & Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125(1), 189-198. doi: 10.1016/0003-9861(68)90654-1
- Huang, Q., Zhang, Y., Liu, S., Wang, H., Gao, F., & Shao, G. (2024). 24-epibrassinolide mitigates cadmium toxicity in rice plants by activating the plant detoxification system and regulating genes expression involved in Cd/Fe uptake and translocation. *Plant Stress*, 12, 100485. Doi:10.1016/j.stress.2024.100485
- Ings, J., Mur, L. A., Robson, P. R., & Bosch, M. (2013). Physiological and growth responses to water deficit in the bioenergy crop *Miscanthus × giganteus*. *Frontiers in Plant Science*, 4, 468. doi: 10.3389/fpls.2013.00468
- Izadi, F., Ghabooli, M., Rostami, M., & Movahedi, Z. (2021). Evaluation of fungus *Piriformospora indica* effects on some morphophysiological traits of radish under heavy metal stress. *Journal of Agricultural Science and Sustainable Production*, 31(3), 117-129. Doi: 10.22034/saps.2021.13694
- Jabeen, M., Akram, N. A., Ashraf, M., Alyemeni, M. N., & Ahmad, P. (2021). Thiamin stimulates growth and secondary metabolites in turnip (*Brassica rapa* L.) leaf and root under drought stress. *Physiologia Plantarum*, 172(2), 1399-1411. Doi: 10.1111/ppl.13215
- Jafarhaddadian, E., Zoufan, P., & Shafiei, M. (2021). Effect of NaCl on Cd stress modulation, antioxidant system and Cd uptake and accumulation in *Malva parviflora* L. *Journal of Plant Biological Sciences*, 12(4), 59-76. DOI: 10.22108/IJPB.2021.122156.1204
- Jan, S., Noman, A., Kaya, C., Ashraf, M., Alyemeni, M. N., & Ahmad, P. (2020). 24-Epibrassinolide alleviates the injurious effects of Cr (VI) toxicity in tomato plants: Insights into growth, physio-biochemical attributes, antioxidant activity and regulation of Ascorbate–glutathione and Glyoxalase cycles. *Journal of Plant Growth Regulation*, 39, 1587-1604. Doi:10.1007/s00344-020-10169-2
- Jia, K., Zhan, Z., Wang, B., Wang, W., Wei, W., Li, D., & Xu, Z. (2023). Exogenous selenium enhances cadmium stress tolerance by improving physiological characteristics of cabbage (*Brassica oleracea* L. var. Capitata) seedlings. *Horticulturae*, 9(9), 1016. Doi:10.3390/horticulturae9091016
- Kamal, M. A., Perveen, K., Khan, F., Sayyed, R. Z., Hock, O. G., Bhatt, S. C., & Qamar, M. O. (2023). Effect of different levels of EDTA on phytoextraction of heavy metal and growth of *Brassica juncea* L. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1228117. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1228117
- Kaya, C., Khan, F., Sayyed, R. Z., & Hock, O. G. (2015). Exogenous application of thiamin promotes growth and antioxidative defense system at initial phases of development in salt-stressed plants of two maize cultivars differing in salinity tolerance. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37(1), 1741. doi: 10.3344/app.2015.00469
- Khadem Moghadam, N., Motesharezaadeh, B., Maali-Amiri, R., Asgari Lajayer, B., & Astatkie, T. (2020). Effects of potassium and zinc on physiology and chlorophyll fluorescence of two cultivars of canola grown under salinity stress. *Arabian Journal of Geosciences*, 13, 1-8. Doi: 10.1007/s12517-020-05776-y
- Khan, R., Sarwar, M. J., Shabaan, M., Asghar, H. N., Zulfikar, U., Iftikhar, I., & Soufan, W. (2024). Exploring the synergistic effects of indole acetic acid (IAA) and compost in the phytostabilization of nickel (Ni) in cauliflower rhizosphere. *BMC Plant Biology*, 24(1), 275. Doi:10.1186/s12870-024-04920-0

- Kheyri, F., Taheri, P., & Jafarinejad-Farsangi, S. (2022). Thiamine and Piriformospora indica induce bean resistance against *Rhizoctonia solani*: The role of polyamines in association with iron and reactive oxygen species. *Biological Control*, 172, 104955. doi: 10.1016/j.biocontrol.2022.104955
- Kour, J., Kohli, S. K., Khanna, K., Bakshi, P., Sharma, P., Singh, A. D., ... & Sharma, A. (2021). Brassinosteroid signaling, crosstalk and, physiological functions in plants under heavy metal stress. *Frontiers in Plant Science*, 12, 608061. Doi:10.3389/fpls.2021.608061
- Kuo, E. Y., Cai, M. S., & Lee, T. M. (2020). Ascorbate peroxidase 4 plays a role in the tolerance of *Chlamydomonas reinhardtii* to photo-oxidative stress. *Scientific Reports*, 10(1), 13287. Doi:10.1038/s41598-020-70247-z
- Li, G., Shah, A. A., Khan, W. U., Yasin, N. A., Ahmad, A., Abbas, M., & Safdar, N. (2021). Hydrogen sulfide mitigates cadmium induced toxicity in *Brassica rapa* by modulating physiochemical attributes, osmolyte metabolism and antioxidative machinery. *Chemosphere*, 263, 127999. Doi:10.1016/j.chemosphere.2020.127999
- Li, S., Le, S., Wang, X., Bai, J., Wang, R., & Zhao, Y. (2020). Functional analysis of organic acids on different oilseed rape species in phytoremediation of cadmium pollution. *Plants*, 9(7), 884. doi: 10.3390/plants9070884
- Liao, Y., Tang, Y., Wang, S., Su, H., Chen, J., Zhang, D., & Liu, L. (2023). Abscisic acid modulates differential physiological and biochemical responses to cadmium stress in *Brassica napus*. *Environmental Pollutants and Bioavailability*, 35(1), 2168216. doi:10.1080/26395940.2023.2168216
- Liu, X., Gong, D., Ke, Q., Yin, L., Wang, S., & Gao, T. (2023). Meta-analysis of the effect of nitric oxide application on heavy metal stress tolerance in plants. *Plants*, 12(7), 1494. Doi:10.3390/plants12071494
- Lohani, N., Jain, D., Singh, M. B., & Bhalla, P. L. (2020). Engineering multiple abiotic stress tolerance in canola, *Brassica napus*. *Frontiers in Plant Science*, 11, 3. doi: 10.3389/fpls.2020.00003
- Loi, M., De Leonardis, S., Mule, G., Logrieco, A. F., & Paciolla, C. (2020). A novel and potentially multifaceted dehydroascorbate reductase increasing the antioxidant systems is induced by beauvericin in tomato. *Antioxidants*, 9(5), 435. doi:10.3390/antiox9050435
- Ma, J., Saleem, M. H., Alsafran, M., Al Jabri, H., Rizwan, M., Nawaz, M., ... & Usman, K. (2022). Response of cauliflower (*Brassica oleracea* L.) to nitric oxide application under cadmium stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 243, 113969. Doi: 10.1016/j.ecoenv.2022.113969
- 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(2), 15-33. DOI: 10.22034/iuvs.2021.139084.1125
- Mostofa, M. G., Rahman, M. M., Siddiqui, M. N., Fujita, M., & Tran, L. S. (2020). Salicylic acid antagonizes selenium phytotoxicity in rice: Selenium homeostasis, oxidative stress metabolism and methylglyoxal detoxification. *Journal of Hazardous Materials*, 394, 122572. Doi:10.1016/j.jhazmat.2020.122572
- Nazir, S., Arif, Y., Mir, A. R., Siddiqui, H., Faizan, M., Alam, P., & Shamsul, H. (2024). Comparative and interactive response of salicylic acid, 24-epibrassinolide or sodium nitroprusside against cadmium stress in *Linum usitatissimum*. *Journal of Umm Al-Qura University for Applied Sciences*, 1-13. Doi: 10.1007/s43994-024-00145-x
- Nie, L., Zhou, B., Hong, B., Wang, X., Chang, T., Guan, C., & Guan, M. (2023). Application of selenium can alleviate the stress of cadmium on rapeseed at different growth stages in soil. *Agronomy*, 13(9), 2228. Doi:10.3390/agronomy13092228
- Noctor, G., Reichheld, J. P., & Foyer, C. H. (2018). ROS-related redox regulation and signaling in plants. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 80, 3-12. Doi: 10.1016/j.semcd.2017.07.013
- Nolan, T. M., Vukasinovic, N., Liu, D., Russinova, E., & Yin, Y. (2020). Brassinosteroids: Multidimensional regulators of plant growth, development, and stress responses. *The Plant Cell*, 32(2), 295-318. doi: 10.1105/tpc.19.00335
- Okla, M. K., Saleem, M. H., Saleh, I. A., Zomot, N., Perveen, S., Parveen, A., & Hamed, M. H. (2023). Foliar application of iron-lysine to boost growth attributes, photosynthetic pigments and biochemical defense system in canola (*Brassica napus* L.) under cadmium stress. *BMC Plant Biology*, 23(1), 648. Doi: 10.1186/s12870-023-04672-3
- Raihan, M. R. H., Rahman, M., Mahmud, N. U., Adak, M. K., Islam, T., Fujita, M., & Hasanuzzaman, M. (2022). Application of rhizobacteria, *Paraburkholderia fungorum* and *Delftia* sp. confer cadmium tolerance in rapeseed (*Brassica campestris*) through modulating antioxidant defense and glyoxalase systems. *Plants*, 11(20), 2738. Doi:10.3390/plants11202738
- Ren, Y., Li, X., Liang, J., Wang, S., Wang, Z., Chen, H., & Tang, M. (2023). Brassinosteroids and gibberellic acid actively regulate the zinc detoxification mechanism of *Medicago sativa* L. seedlings. *BMC Plant Biology*, 23(1), 75. Doi: 10.1186/s12870-023-04091-4
- Rezaie, R., Abdollahi Mandoulakani, B., & Fattahi, M. (2020). Cold stress changes antioxidant defense system, phenylpropanoid contents and expression of genes involved in their biosynthesis in *Ocimum basilicum* L. *Scientific Reports*, 10(1), 5290. Doi:10.1038/s41598-020-62090-z
- Rosado-Souza, L., Fernie, A. R., & Aarabi, F. (2020). Ascorbate and thiamin: Metabolic modulators in plant acclimation responses. *Plants*, 9(1), 101. doi:10.3390/plants9010101

- Santos, L. R., Batista, B. L., & Lobato, A. K. S. (2018). Brassinosteroids mitigate cadmium toxicity in cowpea plants. *Photosynthetica*, 56(2), 591-605. Doi:10.1007/s11099-017-0700-9
- Shah, A. A., Ahmed, S., Abbas, M., & Yasin, N. A. (2020). Seed priming with 3-epibrassinolide alleviates cadmium stress in *Cucumis sativus* through modulation of antioxidative system and gene expression. *Scientia Horticulturae*, 265, 109203. doi: 10.1016/j.scienta.2020.109203
- Shah, A. A., Khan, W. U., Yasin, N. A., Akram, W., Ahmad, A., Abbas, M., & Safdar, M. N. (2020). Butanolide alleviated cadmium stress by improving plant growth, photosynthetic parameters and antioxidant defense system of *Brassica oleracea*. *Chemosphere*, 261, 127728. Doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.127728
- Siddiqi, K. S., & Husen, A. (2021). Significance of brassinosteroids and their derivatives in the development and protection of plants under abiotic stress. *Biologia*, 76(10), 2837-2857. Doi:10.1007/s11756-021-00853-3
- Soares, T. F., dos Santos Dias, D. C., Oliveira, A. M. S., Ribeiro, D. M., & dos Santos Dias, L. A. (2020). Exogenous brassinosteroids increase lead stress tolerance in seed germination and seedling growth of *Brassica juncea* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 193, 110296. Doi: 10.1016/j.ecoenv.2020.110296
- Soland, S. F., & Laima, S. K. (1999). Phenolics and cold tolerance of *Brassica napus*. *Plant Agriculture*, 1, 1-5. doi:10.31390/plant agriculture. 8901.85011401
- Song, Y. J., Li, Y., Leng, Y., & Li, S. W. (2021). 24-epibrassinolide improves differential cadmium tolerance of mung bean roots, stems, and leaves via amending antioxidative systems similar to that of abscisic acid. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(37), 52032-52045. Doi: 10.1007/s11356-021-14404-5
- Sun, J. Y., Guo, R., Jiang, Q., Chen, C. Z., Gao, Y. Q., Jiang, M. M., & Huang, J. (2024). Brassinosteroid decreases cadmium accumulation via regulating gibberellic acid accumulation and Cd fixation capacity of root cell wall in rice (*Oryza sativa*). *Journal of Hazardous Materials*, 469, 133862. Doi:10.1016/j.jhazmat.2024.133862
- Tunc-Ozdemir, M., Abbas, M., & Yasin, N. A. (2009). Thiamin confers enhanced tolerance to oxidative stress in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 151(1), 421-432.
- Verma, T., Bhardwaj, S., Raza, A., Djalovic, I., Prasad, P. V., & Kapoor, D. (2023). Mitigation of salt stress in Indian mustard (*Brassica juncea* L.) by the application of triacontanol and hydrogen sulfide. *Plant Signaling and Behavior*, 18(1), 2189371. Doi:10.1080/15592324.2023.2189371
- Viana, V. E., Aranha, B. C., Busanello, C., Maltzahn, L. E., Panozzo, L. E., de Oliveira, A. C., ... & Pegoraro, C. (2022). Metabolic profile of canola (*Brassica napus* L.) seedlings under hydric, osmotic and temperature stresses. *Plant Stress*, 3, 100059. doi: 10.1016/j.stress.2022.100059
- Wagner, G. J. (1979). Content and vacuole/extravacuole distribution of neutral sugars, free amino acids, and anthocyanin in protoplasts. *Plant Physiology*, 64(1), 88-93. Doi:10.1016/plant ph. 1979.200368
- Wang, W., Aranha, B. C., Busanello, C., Maltzahn, L. E., & Panozzo, L. E. (2009). Analysis of antioxidant enzyme activity during germination of alfalfa under salt and drought stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(7), 570-577. Doi: 10.1007/s101356-045-1558-7
- Wu, C., Li, F., Xu, H., Zeng, W., Yu, R., Wu, X., ... & Li, J. (2019). The potential role of brassinosteroids (BRs) in alleviating antimony (Sb) stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 141, 51-59. doi: 10.1016/j.plaphy.2019.05.011
- Wu, X., Li, L., Hannan, F., Qin, T., Ayyaz, A., Ma, J., & Zhou, W. (2024). Brassinosteroid-induced transcriptomic rearrangements unveiled the physiological mechanism of chromium stress tolerance in *Brassica napus*. *Current Plant Biology*, 100360. Doi:10.1016/j.cpb.2024.100360
- Yang, L., Wu, Y., Wang, X., Lv, J., Tang, Z., Hu, L., & Yu, J. (2022). Physiological mechanism of exogenous 5-aminolevulinic acid improved the tolerance of Chinese cabbage (*Brassica pekinensis* L.) to cadmium stress. *Frontiers in Plant Science*, 13, 845396. doi: 10.3389/fpls.2022.845396
- Zhang, Q., Liang, M., Song, R., Song, Z., Song, H., & Qiao, X. (2022). Brassinosteroids enhance resistance to manganese toxicity in *Malus robusta* Rehd. via modulating polyamines profile. *Journal of Plant Physiology*, 277, 153808. doi: 10.1016/j.jplph.2022.153808
- Zhao, G., Cheng, P., Zhang, T., Abdalmegeed, D., Xu, S., & Shen, W. (2021). Hydrogen-rich water prepared by ammonia borane can enhance rapeseed (*Brassica napus* L.) seedlings tolerance against salinity, drought or cadmium. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 224, 112640. Doi: 10.1016/j.ecoenv.2021.112640
- Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64(4), 555-559. Doi: 10.1007/s113561-021-144104-5
- Zhou, H. Y., Nian, F. Z., Chen, B. D., Zhu, Y. G., Yue, X. R., Zhang, N. M., & Xia, Y. S. (2023). Synergistic reduction of arsenic uptake and alleviation of leaf arsenic toxicity in maize (*Zea mays* L.) by arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and exogenous iron through antioxidant activity. *Journal of Fungi*, 9(6), 677. Doi:10.3390/jof9060677
- Zhu, K., Zhou, H., & Qian, H. (2006). Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. *Process Biochemistry*, 41(6) 1296-1302. Doi: 10.1009/s 344561-021-144454-5

Physiological comparison of the separate or interaction effects of thiamine and epibrassinolide on modulating or intensifying some oxidative stress indices in oilseed rape, cultivar Hyola 401, under cadmium stress

Shima Sanjari¹, Hossein Mozafari^{2*}, Batool Keramat¹ and Nazi Nadernejad¹

¹Department of Biology, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

²Department of Ecology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran

Abstract

Cadmium stress induces oxidative stress in plants such as rapeseed. The use of plant growth regulators (PGR) or vitamins (such as thiamine) can help increase resistance to cadmium stresses. In this study, an attempt was made to study the comparative and reciprocal effects of thiamine and 24-epibrassinolide (EBL) on improving growth parameters and antioxidant resistance of rapeseed cultivar Hyola 401 under toxic levels of 250 and 500 micromolar cadmium chloride in the form of 27 treatment codes in a greenhouse environment. The overall results showed that the separate application of thiamine or 24-epibrassinolide had a significant effect compared to other separate elicitors used in most of the measured parameters and improved the antioxidant resistance of the plant under cadmium stress according to the measured indicators, and even reduced the accumulation of cadmium in the shoot. The results obtained from measuring various growth, biochemical, enzymatic and elemental parameters showed that the separate application of thiamine and 24-epibrassinolide improved the growth and antioxidant resistance of plants under toxic treatment, especially 250 micromolar cadmium and it was able to alleviate the toxic effects of cadmium stress on rapeseed. For example, the level of membrane peroxidation (MDA and aldehydes) was well reduced by approximately 50% under 250 micromolar cadmium treatment. Although in some parameters such as magnesium nutrition, the combined treatment of thiamine and 24-epibrassinolide had a better effect, in some other parameters such as water content and leaf area, the application of treatments improved plant growth under cadmium stress.

Keywords: Catalase enzyme, Lipid peroxidation, Magnesium nutrition, Growth regulators, Antioxidant resistance

Received: Jul. 17, 2025; Revised: Oct. 23, 2025; Accepted: Oct. 29, 2025; Published Online: ??

*Corresponding Author: Mozafari.hossein@gmail.com



Copyright © 2025 Iranian Society of Plant Physiology, Published by Isfahan University of Technology press. This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Noncommercial 4.0 International license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.