Archive of SID

دوماهنامه علمی- پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۲، شماره ۴، صفحه ۷۱۵-۶۹۸ (۱۳۹۵)

تأثیر سلنیوم بر برخی ویژگی‌های فیزیولوژیک گیاه دارویی بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.)

قادر حبیبی[1*]، پروین قربانزاده[2] و معصومه عابدینی[3]

۱*- نویسنده مسئول، استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، ایران، پست الکترونیک: gader.habibi@gmail.com

۲- کارشناس ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، ایران

۳- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، ایران

تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۹۳ تاریخ اصلاح نهایی: آبان ۱۳۹۴ تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۹۴

چکیده

در این تحقیق، تأثیر کاربرد غلظت‌های مختلف سلنات سدیم (۰/۱، ۱ و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر) در محیط کشت هیدروپونیک و کاربرد برگی ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر این عنصر در شرایط مزرعه بر روی برخی از ویژگی‌های فیزیولوژیک گیاه بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.) مورد مطالعه قرار گرفت. کاربرد سلنیوم در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر باعث کاهش وزن خشک شاخساره و ریشه در شرایط کشت هیدروپونیک شد. مهار رشد در این غلظت از سلنیوم نشان داد که افزایش غلظت کلروفیل *a* و *b* و فعالیت آنزیم کاتالاز در تیمار ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر سلنیوم نتوانستند مانع از افزایش مالون دی‌آلدئید به‌عنوان شاخص پراکسیداسیون غشاها در این گیاه شوند. ولی کاربرد غلظت‌های ۰/۱ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر سلنیوم در کشت هیدروپونیک نه تنها باعث اُفت رشد بادرنجبویه نشد، بلکه منجر به افزایش ذخیره سلنیوم در شاخساره شد. در مقایسه، نتایج آزمایش مزرعه نشان داد که همان غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر که در کاربرد ریشه‌ای در کشت هیدروپونیک باعث مهار رشد گردید، در کاربرد برگی توانست مقدار سلنیوم دانه و شاخساره و بیومس شاخساره را افزایش دهد. همچنین کاربرد برگی سلنیوم توانست باعث افزایش فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز و افزایش غلظت فنل‌ها به‌عنوان ترکیب‌های آنتی‌اکسیدان، در برگها شود. نتایج این تحقیق نشان داد که محلول‌پاشی برگی سلنیوم در مقایسه با تغذیه ریشه‌ای آن از طریق کشت هیدروپونیک، رشد اندام هوایی، مقدار سلنیوم و فنل را در گیاه دارویی بادرنجبویه بیشتر بهبود می‌بخشد.

واژه‌های کلیدی: بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.)، پراکسیداسیون لیپیدها، سلنات سدیم، فنیل‌آلانین آمونیالیاز، کاتالاز.

مقدمه

هر چند سلنیوم (Se) یک عنصر ضروری برای گیاهان به حساب نمی‌آید ولی در بیشتر گیاهان در غلظت‌های مناسب، باعث بهبود رشد می‌شود (Turakainen *et al.*, 2004؛ Djanaguiraman *et al.*, 2005). گیاهان سلنیوم را در زنجیره غذایی بازیافت می‌کنند. بنابراین، غنی‌سازی زیستی محصولات کشاورزی با سلنیوم با استفاده از اضافه کردن سلنیوم همراه با کود، یک تکنیک مفید برای افزایش مصرف سلنیوم است (Broadley *et al.*, 2010). شکل‌های غیرآلی سلنیوم از نظر جذب و تحرک در گیاهان با هم تفاوت دارد. سلنات بیشتر به شاخه‌ها منتقل می‌شود، در حالی‌که سلنیت تمایل به تجمع در ریشه‌های گیاه دارد. بنابراین، در برنامه‌های غنی‌سازی زیستی سلنیوم، استفاده از سلنات بیش از سلنیت توصیه می‌شود (Rios *et al.*, 2009).

www.SID.ir

Archive of SID

البته میزان جذب سلنیوم توسط گیاهان به عواملی همانند غلظت و شکل مواد شیمیایی خاک، pH، شوری، میزان $CaCO_3$، مقدار یون‌های رقیب و توانایی گیاه برای جذب و متابولیسم سلنیوم بستگی دارد (de Souza *et al.*, 2002؛ Wu, 2004). با افزایش غلظت یون کلسیم در خاک، جذب سلنیوم افزایش می‌یابد، در حالی‌که افزایش سولفات باعث مهار جذب سلنات خواهد شد. از طرف دیگر برخی گیاهان با تولید ترکیب‌های فرّار سلنیوم‌دار باعث حذف سلنیوم از محیط می‌شوند. گیاهان از نظر میزان ذخیره عنصر سلنیوم به دو گروه انباشته‌گر و غیرانباشته‌گر تقسیم می‌شوند. بیشتر گیاهان خانواده Brassicaceae سلنیوم را در مقادیر بالا در اندام‌های خود ذخیره می‌کنند (Łabanowska *et al.*, 2012). برای افزایش جذب سلنیوم در گیاهان غیرانباشته‌گر مثل کاهو استفاده از سلنات در غلظت‌های کم مناسب‌تر است، زیرا باعث افزایش مقدار سلنیوم بافت‌ها شده و منجر به تحریک رشد می‌شوند (Ramos *et al.*, 2010). در این گیاه سلنیوم در غلظت‌های پایین به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان عمل می‌کند و رشد گیاه را افزایش می‌دهد. ولی در سطوح بالاتر بازده گیاه را کاهش می‌دهد.

سلنیوم در سیستم‌های زیستی در سه سطح عمل می‌کند؛ در غلظت‌های اندک برای رشد و نمو طبیعی لازم است، در غلظت‌های متوسط در جهت حفظ عملکرد هومئوستازیک مورد نیاز می‌باشد و سرانجام در غلظت‌های زیاد اثرات سمّی دارد. تأثیر کاربرد سلنیوم در غلظت‌های پایین در تخفیف تنش‌های محیطی شامل تنش فلزات سنگین (Cartes *et al.*, 2010؛ Djanaguiraman *et al.*, 2010)، تنش شوری و خشکی (Hasanuzzaman & Fujita, 2011؛ Habibi, 2013;2014) و پرتو فرابنفش (Yao *et al.*, 2010;2011) به اثبات رسیده است. ولی کاربرد سلنیوم در غلظت‌های بالاتر باعث تحریک تنش اکسیداتیو و تجزیه غشاها شده و منجر به اُفت رشد می‌شود (Freeman *et al.*, 2010). به اعتقاد Paciolla و همکاران (۲۰۱۱) شکل سلنیوم، نحوه کاربرد و نوع گونه گیاهی در بروز علائم سمّیت حاصل از سلنیوم مؤثر می‌باشند. یکی از سازوکارهای سمّیت سلنیوم در گیاهان این است که غلظت‌های بالای سلنیوم، بیشتر گروه تیول احیاء موجود در سلول‌های گیاهی را در جهت جذب و تحلیل سلنیوم مصرف می‌کنند، در نتیجه تیول کافی برای جاروب کردن رادیکال‌های آزاد اکسیژن در دسترس گیاه نخواهد بود. در این شرایط گونه‌های فعال اکسیژن باعث تخریب غشاها می‌شوند (Mroczek-Zdyrska & Wójcik, 2012). درباره غلظت‌های بکاررفته به‌منظور افزایش سلنیوم در شاخساره گیاهان غیرانباشته‌گر تحقیقات زیادی انجام شده است. البته غلظت‌های بکاررفته سلنیوم برای تخفیف تنش‌های مختلف در محدوه ۱ میلی‌گرم بر لیتر (Feng *et al.*, 2013) تا ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر (Diao *et al.*, 2014) نیز گزارش شده است. حتی زمانی که هدف افزایش سلنیوم در شاخساره گیاهان غیرانباشته‌گر باشد، غلظت‌های بالاتر نیز توصیه می‌شوند (Feng *et al.*, 2013). در یک تحقیق، Nawaz و همکاران (۲۰۱۵) به‌منظور تخفیف تنش خشکی غلظت ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر سلنیوم را به‌صورت اسپری برگی بکار برده‌اند. در نتیجه محدوده غلظت بکاررفته در گونه‌های مختلف غیرانباشته‌گر سلنیوم دارای انعطاف بالایی می‌باشد.

با توجه به اینکه تحقیقات درباره اثرات سلنیوم بر روی گیاهان تیره نعناع که گیاهان غیرانباشته‌گر سلنیوم می‌باشند، اندک است، از این‌رو گیاه بادرنجبویه به‌عنوان گونه گیاه دارویی مهم (Moradkhani *et al.*, 2010) از خانواده نعناع و نسبتاً حساس به سلنیوم برای این تحقیق انتخاب شد. در این تحقیق فرض می‌شود که کاربرد سلنیوم به شکل سلنات در غلظت‌های اندک بتواند علاوه بر بهبود رشد باعث تقویت ظرفیت آنتی‌اکسیدانت و غلظت فنل و افزایش مقدار سلنیوم در مرحله رویشی و زایشی بادرنجبویه شود. برای این منظور از دو شکل کاربرد سلنیوم شامل کاربرد ریشه‌ای از طریق افزودن غلظت‌های مختلف سلنیوم به محیط کشت هیدروپونیک و کاربرد برگی از طریق محلول‌پاشی اندام هوایی در محیط مزرعه، استفاده شد. هدف این تحقیق، آزمون فرضیه‌های ذکرشده از طریق سنجش شاخص‌های رشد، رنگیزه‌های فتوسنتزی، آنزیم‌ها و متابولیت‌های سیستم آنتی‌اکسیدانت و فنل کل می‌باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

مواد و روش‌ها

کشت گیاهان و اعمال تیمارها در آزمایش هیدروپونیک

بذرهای گیاه بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.) به مدت ۵ تا ۷ دقیقه با استفاده از هیپوکلریت سدیم تجاری ۱۰٪ ضدعفونی شده و بعد به دفعات با آب‌مقطر شستشو داده شدند. بذرهای ضدعفونی شده بر روی کاغذ صافی مرطوب و در تاریکی برای جوانه‌زنی قرار گرفتند. دانه‌رست‌های سه روزه به روشنایی منتقل شدند و آبیاری آنها با آب‌مقطر انجام شد. پس از یک هفته پیش کشت، گیاهان به گلدان‌های سه لیتری حاوی محلول غذایی هوگلند ۲۵٪ تغییر یافته منتقل شدند (Johnson *et al.*, 1957). پس از گذشت ۴ هفته و رسیدن به مرحله ۳ جفت برگی، دانه‌رست‌ها با غلظت‌های ۰/۱، ۱ و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر سلنیوم تیمار شدند. سه هفته پس از آغاز تیمارها، گیاهان برداشت شدند.

کشت گیاهان و اعمال تیمارها در آزمایش مزرعه

بذرهای بادرنجبویه پس از ضدعفونی در مزرعه‌ای در منطقه شمال‌غرب ایران (طول جغرافیایی ۴۶ درجه و ۶ دقیقه شرقی و در عرض ۳۶ درجه و ۵۸ دقیقه شمالی در یکی از جلگه‌های منتهی به دریاچه ارومیه با ارتفاع ۱۳۱۴ متر از سطح دریا) در نزدیکی شهر ملکان در بهار سال ۱۳۹۳ کشت شدند. در هر کرت، ۵ ردیف از بذرها با فاصله ۲۰ سانتی‌متر از همدیگر کاشته شدند و فاصله دانه‌رستها در هر ردیف از همدیگر ۵ سانتی‌متر بود. قبل از شخم‌زنی برای افزایش حاصلخیزی خاک، کودهای نیتروژن به‌صورت NH_4NO_3 (۱۰۰kg ha^{-1})، فسفر و پتاسیم به‌صورت KH_2PO_4 (۵۰kg ha^{-1}) اضافه شدند. خاک مزرعه ماسه‌ای لومی با EC=۱/۰۳±۰/۲۸ dS m^{-1} در عمق ۳۰ سانتی‌متر بود. برخی ویژگی‌های خاک مورد استفاده در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱- مشخصات فیزیکی و شیمیایی خاک محل اجرای آزمایش

عمق خاک	بافت خاک	ظرفیت مزرعه	اسیدیته	هدایت الکتریکی
Depth (cm)	Soil texture	FC (%)	pH	EC (dS. m^{-1})
۰-۳۰	لوم سیلتی	۲۲/۳	۷/۸	۱/۱۵
۳۰-۶۰	لوم سیلتی	۲۱/۸	۷/۷	۱/۰۳

گیاهان در شرایط مزرعه ای در شدت نور ۵۰±۸۵۰ میکرومول/مترمربع در ثانیه، دوره ۲±۱۴ ساعت روشنایی و ۲±۱۰ ساعت تاریکی، رطوبت روز ۵±۷۰ و شب ۳±۷۵٪ و دمای روز ۴/۴±۲۴ و شب ۳±۱۸ درجه سانتی‌گراد رشد داده شدند. متوسط بارندگی در این منطقه ۲۷۵ میلی‌متر بود. بذرها پس از کشت هر ۷ روز یک‌بار تا ۸۰٪ ظرفیت مزرعه آبیاری شدند. آزمایش‌های بهینه سازی قبلاً با استفاده از غلظت‌های ۰/۱، ۱، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر سلنات در مزرعه انجام شد و پس از سنجش توده ساقه و مقدار سلنیوم مشخص گردید که غلظت‌های ۰/۱، ۱ و ۱۰ به‌صورت مشابه باعث افزایش توده ساقه و مقدار سلنیوم ساقه می شوند، ولی اعمال غلظت ۲۰ میلی‌گرم در لیتر سلنات در مزرعه اثر مهارکنندگی بر رشد ساقه دارد. به همین دلیل غلظت بهینه ۱۰ میلی‌گرم در لیتر سلنات انتخاب شد. برای انجام آزمایش اصلی در مرحله آغاز تطویل ساقه (۳۵ روز پس از کشت بذرها)، سلنیوم در شکل سلنات سدیم (Na_2SeO_4) و در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر و همزمان نمونه‌های شاهد با آب محلول‌پاشی شدند. کاربرد برگی سلنیوم یک هفته بعد دوباره تکرار شد و در نهایت پس از گذشت یک ماه از اولین کاربرد برگی سلنیوم (۶۵ روز پس از کشت بذرها)، نمونه های برگ و ساقه برای اندازه‌گیری پارامترهای رشد و مقدار سلنیوم اندام هوایی برداشت شدند و برای سنجش فعالیت آنزیم‌ها و

www.SID.ir

Archive of SID

متابولیت‌ها بلافاصله به ازت مایع انتقال یافتند. در پایان آزمایش، بذرها جمع‌آوری و سلنیوم کل آنها تعیین شد.

سنجش سلنیوم کل

برای سنجش سلنیوم کل، ابتدا پنج گرم از نمونه‌های گیاهی خشک شده در ۲۵ml مخلوط اسید نیتریک و اسید پرکلریک غلیظ (با نسبت حجمی ۴:۱) و در دمای ۱۳۰°C به‌مدت یک ساعت هضم شدند. پس از خنک شدن، 5ml اسید کلریدریک غلیظ اضافه شده و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۱۵°C حرارت داده شد. پس از هضم نمونه‌ها و خنک‌سازی در دمای آزمایشگاه، عصاره‌ها به لوله‌های ۵۰ میلی‌لیتری انتقال و با آب مقطر دوبار تقطیر به حجم رسانده شدند و محلول‌های بدست‌آمده برای تعیین سلنیوم کل با استفاده از اسپکترومتر نشر اتمی (ICP OES spectrometer Integra XL_2, GBC Australia) مورد استفاده قرار گرفتند (Liu & Gu, 2009).

سنجش رنگیزه‌های برگ

برای سنجش مقدار رنگیزه‌ها نمونه‌های گیاهی با آب دوبار تقطیر شستشو شده و بر روی کاغذ صافی خشک شدند. پس از اندازه‌گیری وزن تر (تقریباً ۲۰۰ میلی‌گرم)، نمونه‌ها در داخل ورقه آلومینیومی قرار گرفته و در ازت مایع تا زمان سنجش نگهداری شدند. استخراج ماده مورد نظر با استفاده از حلال مربوطه بر روی یخ و با هاون چینی سرد انجام شد. غلظت کلروفیل و کاروتنوئیدها به‌وسیله اسپکتروفتومتر، بعد از ۲۴ ساعت استخراج در استن ۱۰۰٪ تعیین شد. جذب در ۶۶۲، ۶۴۵ و ۴۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شده و غلظت کلروفیل a، b و کاروتنوئیدها طبق فرمول‌های مربوطه محاسبه شد (Lichtenthaler & Wellburn 1985).

$$C_a = 11.75\ A_{662} - 2.350\ A_{645}$$

$$C_b = 18.61\ A_{645} - 3.960\ A_{662}$$

$$C_{x+c} = 1000\ A_{470} - 2.270\ C_a - 81.4\ C_b/22$$

C_a = Chlorophyll a, C_b = Chlorophyll b, C_{x+c} = Total carotene

برای سنجش فلاونوئیدها نمونه‌های برگ در متانول حاوی آلومینیوم کلرید ۲٪ استخراج شده و پس از سانتریفوژ، روشناور برداشت و جذب آن در طول موج ۴۱۵ نانومتر قرائت شد. از غلظت‌های مختلف کوئرستین (صفر تا ۱۶ میلی‌گرم در لیتر) به‌عنوان استاندارد استفاده گردید و مقدار فلاونوئیدها براساس mg quercetin g^{-1} FW محاسبه شد (Sarikurkcu *et al.*, 2008).

سنجش اسیدآمینه‌های آزاد

برای سنجش غلظت کل اسیدآمینه‌های آزاد، نمونه‌ها در بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH=۶/۸) همگن و استخراج شده و بعد از سانتریفوژ بر روی نمونه‌های روشناور معرف نین‌هیدرین (محلول ۵:۱ رقیق شده از ۳۵۰ میلی‌گرم نین‌هیدرین در ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانل) اضافه گردید و ۷-۴ دقیقه در دمای ۱۰۰-۷۰ درجه سانتی‌گراد در حمام آب قرار گرفت. پس از سرد شدن در حمام آب سرد، جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد. از غلظت‌های مختلف گلیسین برای ترسیم منحنی استاندارد استفاده گردید (Hwang & Ederer, 1975).

سنجش فعالیت آنزیم‌های سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانت و غلظت مالون دی‌آلدئید

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیس‌موتاز (SOD) مطابق روش Giannapolitis و Ries (۱۹۷۷) و براساس درصد ممانعت از احیاء NBT به ترکیب ارغوانی رنگ دی‌فورمازان به‌وسیله رادیکال سوپراکسید (O_2^-) حاصل از فتولیز

www.SID.ir

Archive of SID

ریبوفلاوین، توسط آنزیم موجود در عصاره مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. نمونه‌های برگ بلافاصله پس از برداشت در ازت مایع پودر شده و عصاره آنزیمی در بافر ۲۵ mM از HEPES با pH=۷/۸ و حاوی EDTA با غلظت ۰/۱mM استخراج شد. عصاره‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۵۰۰۰g سانتریفوژ شده و روشناور برای سنجش فعالیت مورد استفاده قرار گرفت. ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره به یک میلی‌لیتر از محلول واکنشی شامل HEPES ۲۵mM با pH=۷/۶، EDTA ۰/۱mM، Na_2CO_3 ۵۰mM (pH=۱۰/۲)، L–متیونین ۱۲mM، NBT ۷۵µM و ۱µM ریبوفلاوین اضافه شده و مخلوط حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در شدت نور تقریباً ۸۰۰۰ لوکس به‌منظور انجام واکنش قرار گرفت. برای تهیه نمونه‌های شاهد مخلوط فوق بدون افزودن عصاره آنزیمی تهیه گردید و جذب نمونه‌ها در ۵۶۰nm توسط اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. یک واحد فعالیت آنزیم براساس مقدار پروتئین آنزیمی لازم برای القاء ۵۰٪ ممانعت از احیاء NBT در مقایسه با نمونه‌های شاهد بدون عصاره آنزیمی محاسبه شده و به‌صورت Unit mg^{-1} protein بیان گردید.

فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) مطابق روش Simon و همکاران (۱۹۷۴) و براساس کاهش جذب پراکسید هیدروژن (H_2O_2) در ۲۴۰nm مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. عصاره آنزیمی پس از پودر شدن نمونه‌ها در ازت مایع، در بافر فسفات با غلظت ۵۰mM و pH=۷ استخراج شده و به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰g سانتریفوژ شد. برای سنجش فعالیت آنزیم مقدار مناسبی از عصاره به محلول واکنش شامل بافر فسفات ۵۰mM (pH=۷) و ۱۰mM از H_2O_2 افزوده شده و تغییرات جذب به مدت دو دقیقه توسط اسپکتروفتومتر مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. در نهایت فعالیت آنزیم براساس ضریب خاموشی H_2O_2 (۰/۰۴۱mM^{-1} cm^{-1}) برحسب µM H_2O_2 mg^{-1} protein min^{-1} محاسبه شد.

سنجش مالون دی‌آلدئید (MDA) به‌عنوان معیاری برای بررسی میزان پراکسیداسیون لیپیدها بر اساس روش Boominathan و Doran (۲۰۰۲) انجام شد. عصاره گیاهی در محلول ۰/۱٪ (w/v) تری‌کلرو استیک‌اسید (TCA) استخراج شده و به مدت پنج دقیقه در ۱۰۰۰۰g سانتریفوژ گردید. نسبت ۱ به ۴ از روشناور با محلول ۲۰٪ از TCA حاوی ۰/۵٪ تیوباربیوریک اسید در لوله آزمایش با هم مخلوط شده و به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس لوله‌ها به‌سرعت در یخ سرد شده و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰g سانتریفوژ شدند. همزمان با عصاره‌های گیاهی محلول‌های استاندارد در محدوده صفر تا ۱۰۰ نانومول از ۱،۱،۳،۳–تترا اتوکسی‌پروپان تهیه شده و جذب نمونه‌ها در ۵۳۲nm توسط اسپکتروفتومتر مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. در نهایت مقدار MDA نمونه‌ها برحسب واحد nmol g^{-1} FW محاسبه شد.

سنجش فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز

فعالیت فنیل‌آلانین آمونیالیاز (PAL) مطابق روش Zucker (۱۹۶۵) مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. ابتدا عصاره آنزیمی در بافر ۵۰mM بافر سدیم فسفات با pH=۷/۸ و حاوی اتیلن دی‌آمین تترااستیک‌اسید (EDTA) با غلظت ۲mM، ۱۸mM مرکاپتواتانول و ۰/۱ درصد تریتون X-100 استخراج شد. عصاره‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۵۰۰۰g سانتریفوژ شده و روشناور برای سنجش فعالیت مورد استفاده قرار گرفت. ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره به یک میلی‌لیتر از محلول واکنشی شامل ۵۰mM بافر سدیم بورات (pH=۸/۸) و ۵mM L–فنیل‌آلانین اضافه شده و مخلوط حاصل به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه به‌منظور انجام واکنش قرار گرفت. جذب نمونه‌ها در ۲۹۰nm توسط اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. یک واحد فعالیت آنزیم براساس غلظت پروتئین آنزیمی لازم برای تولید یک نانومول سینامیک اسید محاسبه شد.

سنجش فنل کل

از آنجایی که بیشترین ترکیب‌های فنلی گیاهان از نوع پلی‌فنل‌ها می‌باشد، از روش معرف فنلی فولین‌سیوکالتو

www.SID.ir

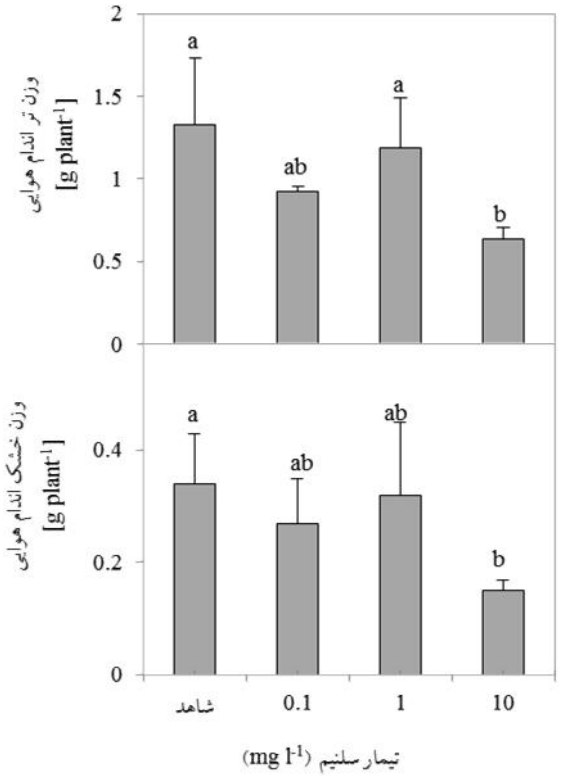
Archive of SID

(Mavi *et al.*, 2004) برای سنجش فنل کل استفاده شد. برای این منظور ۵ گرم برگ پس از پودر شدن توسط هاون در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب‌مقطر به مدت ۳۰ دقیقه جوشانده شد و با استفاده از کاغذ واتمن شماره ۴۲ صاف گردید. غلظت ۲۵۰ میکرولیتر معرف فولین با ۲۵ میکرولیتر عصاره و ۵۰۰ میکرولیتر محلول آبی کربنات سدیم ۲۰٪ مخلوط شد. نمونه‌های شاهد فاقد عصاره بودند. پس از قرار دادن نمونه‌ها در دمای آزمایشگاه به مدت ۳۰ دقیقه جذب آنها در طول موج ۷۶۵ نانومتر اندازه‌گیری شد و غلظت فنل کل براساس منحنی استاندارد اسید گالیک بدست آمد. برای هر عصاره این سنجش ۴ بار تکرار شد و میانگین فنل کل موجود در عصاره تیمارها به‌صورت میلی‌گرم اسید گالیک در گرم بافت بیان شد.

برای اندازه‌گیری پروتئین کل، عصاره پروتئینی در بافر فسفات سدیم با غلظت ۵۰mM و pH=۶/۸ استخراج شده و به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۵۰۰۰g سانتریفوژ شد. از روشناور حاصل برای سنجش پروتئین کل به روش Bradford (۱۹۷۶) استفاده گردید.

بررسی آماری نتایج

آزمایش‌ها به‌صورت طرح کاملاً تصادفی طرح‌ریزی و اجرا شد. هر تیمار دارای ۴ تکرار مستقل بود. میانگین و انحراف‌معیار (SD) داده‌ها و همچنین رسم نمودارها به‌وسیله نرم‌افزار Excel 2007 انجام شد. برای گروه‌بندی میانگین‌ها نیز از نرم‌افزار Sigma stat 3.5 با آزمون Tukey در سطح احتمال $P\leq ۰/۰۵$ استفاده گردید.



شکل ۱- میزان وزن تر و خشک اندام هوایی بادرنجبویه در محیط کشت هیدروپونیک پس از چهار هفته رشد

میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک باشند در سطح ۹۵٪ با آزمون توکی با یکدیگر اختلاف معنی‌داری ندارند (n=۱۰).

www.SID.ir

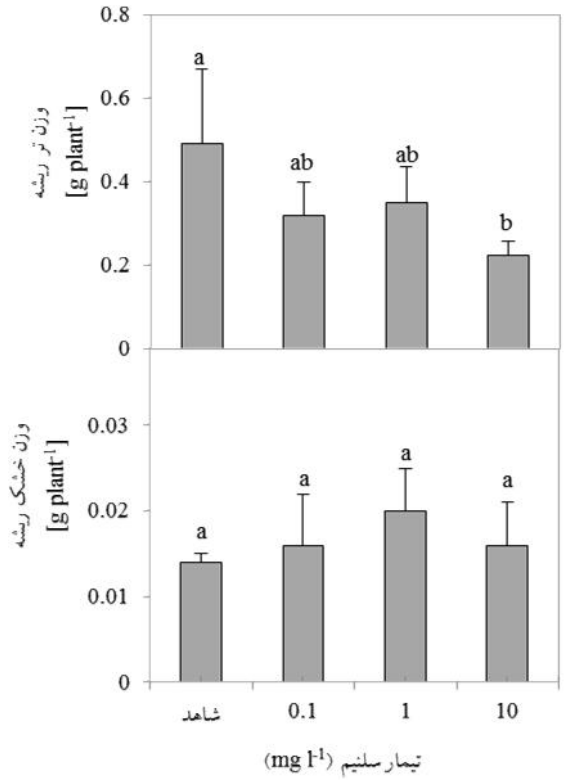
Archive of SID

نتایج

آزمایش هیدروپونیک

در آزمایش هیدروپونیک، سلنیوم در غلظت‌های اندک تغییر معنی‌داری در وزن تر و خشک اندام هوایی ایجاد نکرد ولی کاربرد ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر سلنیوم باعث کاهش معنی‌دار وزن تر و خشک اندام هوایی شد (شکل ۱). البته کاهش وزن تر و خشک اندام هوایی پس از کاربرد ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر سلنیوم در مقایسه با تیمار شاهد معنی‌دار نبود.

غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر سلنیوم باعث کاهش معنی‌دار وزن تر ریشه گردید ولی بر وزن خشک اثر نداشت (شکل ۲). البته کاهش میزان وزن تر ریشه پس از کاربرد ۰/۱ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر سلنیوم در مقایسه با تیمار شاهد معنی‌دار نبود.



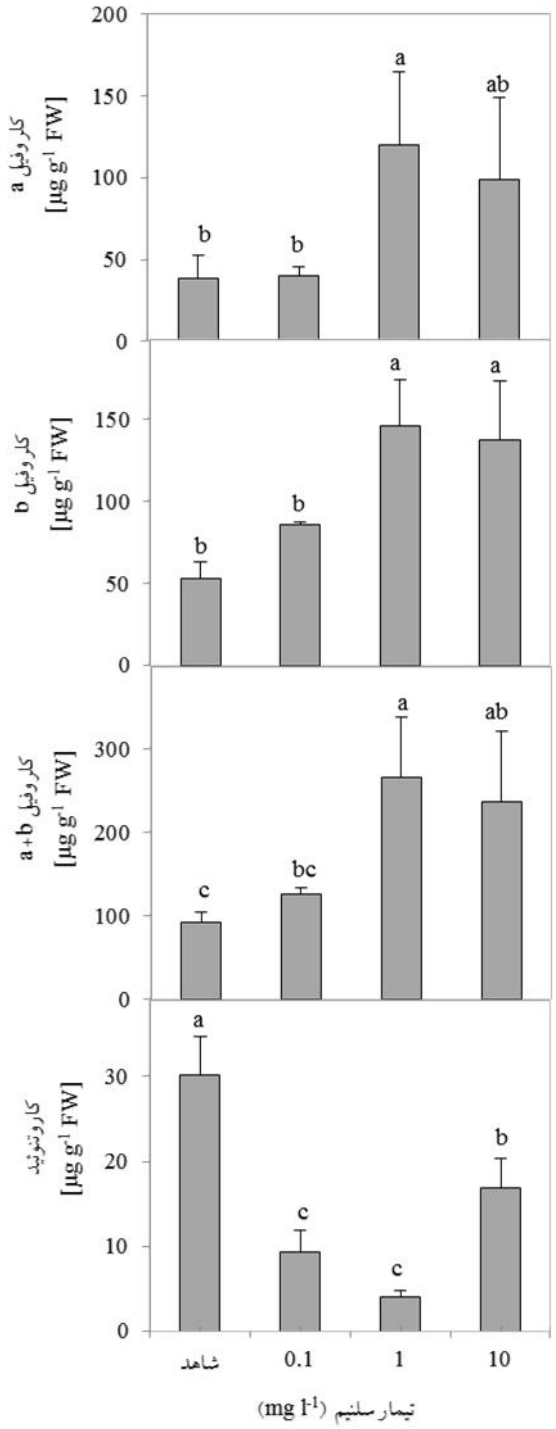
شکل ۲- میزان وزن تر و خشک ریشه بادرنجبویه در محیط کشت هیدروپونیک پس از چهار هفته رشد

میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک باشند در سطح ۹۵٪ با آزمون توکی با یکدیگر اختلاف معنی‌داری ندارند (n=۱۰).

تیمار ۰/۱ میلی گرم بر لیتر سلنیوم نتوانست باعث افزایش معنی‌دار غلظت کلروفیل a و b نسبت به تیمار شاهد شود. با افزایش غلظت سلنیوم بکار رفته، غلظت کلروفیل a و b و کلروفیل کل افزایش معنی‌دار نشان داد (شکل ۳). کاربرد سلنیوم در غلظت‌های مختلف در محیط ریشه باعث کاهش معنی دار غلظت رنگیزه کاروتنوئید برگها شد (شکل ۳).

www.SID.ir

Archive of SID

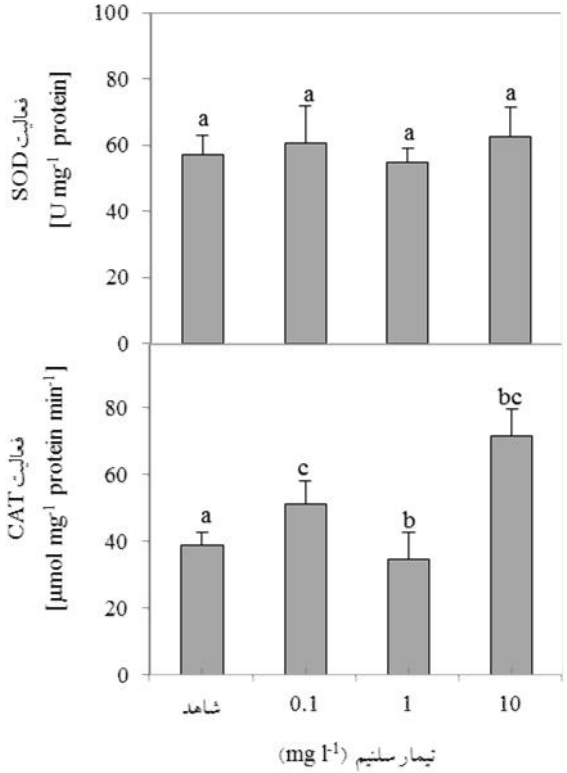


شکل ۳- غلظت کلروفیل *a* و *b*، کلروفیل کل و کاروتنوئید گیاه بادرنجبویه در محیط کشت هیدروپونیک پس از چهار هفته رشد

میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک باشند در سطح ۹۵٪ با آزمون توکی با یکدیگر اختلاف معنی‌داری ندارند (n=۴).

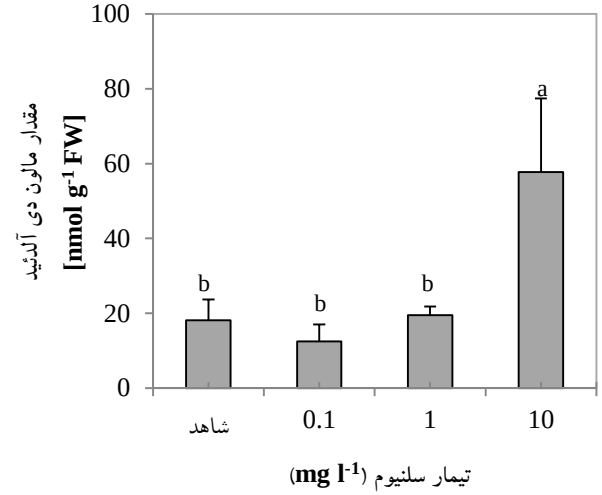
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۴- فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در برگهای بادرنجبویه در محیط کشت هیدروپونیک پس از چهار هفته رشد

میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک باشند در سطح ۹۵٪ با آزمون توکی با یکدیگر اختلاف معنی‌داری ندارند (n=۴).



شکل ۵- غلظت مالون دی آلدئید در برگهای بادرنجبویه در محیط کشت هیدروپونیک پس از چهار هفته رشد

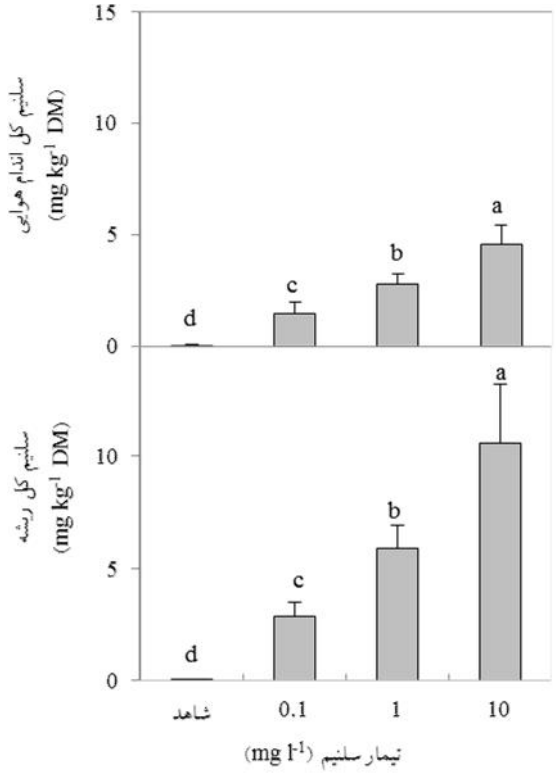
میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک باشند در سطح ۹۵٪ با آزمون توکی با یکدیگر اختلاف معنی‌داری ندارند (n=۴).

www.SID.ir

Archive of SID

کاربرد سلنیوم تغییری در فعالیت آنزیم سوپراکسید دیس‌موتاز ایجاد نکرد. فعالیت آنزیم کاتالاز تنها در تیمار ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر سلنیوم افزایش معنی‌دار نشان داد (شکل ۴). بررسی غلظت مالون دی‌آلدئید به‌عنوان شاخص پراکسیداسیون غشاها در آزمایش هیدروپونیک نشان داد که تنها کاربرد ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر سلنیوم در محیط کشت باعث افزایش معنی‌دار این متابولیت شده و سایر غلظت‌های سلنیوم، شاخص پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء را تغییر نداده‌اند (شکل ۵).

افزودن سلنیوم به محیط ریشه باعث افزایش معنی‌دار غلظت این عنصر در ساختار ریشه شد. با افزایش غلظت سلنیوم در محیط ریشه، جذب و انباشت سلنیوم در اندام ریشه نیز افزایش یافت، به‌طوری که بیشترین غلظت سلنیوم بافت ریشه در تیمار ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر سلنیوم بدست آمد (شکل ۶). البته افزایش غلظت سلنیوم در بافت اندام هوایی بادرنجبویه از الگوی انباشت سلنیوم در اندام ریشه تبعیت کرد. افزایش قابل توجه غلظت سلنیوم در اندام هوایی در تیمارهای سلنیومی نشان داد که سلنات سدیم به خوبی در ریشه جذب و به اندام هوایی انتقال یافته است.



شکل ۶- غلظت سلنیوم کل در اندام هوایی و ریشه بادرنجبویه در محیط کشت هیدروپونیک پس از چهار هفته رشد

میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک باشند در سطح ۹۵٪ با آزمون توکی با یکدیگر اختلاف معنی‌داری ندارند (n=۱۰).

آزمایش مزرعه

بررسی نتایج آزمایش کاربرد برگی سلنیوم در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر در محیط مزرعه در گیاه بادرنجبویه نشان داد که کاربرد سلنیوم باعث افزایش معنی‌دار وزن خشک اندام هوایی شد. رشد ریشه تحت تأثیر تیمار سلنیوم قرار نگرفت. تیمار سلنیوم نتوانست تغییر معنی‌داری در غلظت رنگیزه‌های

www.SID.ir

Archive of SID

فتوسنتزی شامل کلروفیل a و b، کلروفیل کل (a+b) و کاروتنوئید ایجاد کند. البته افزایش غلظت اسیدآمینه کل در تیمار سلنیومی نسبت به شاهد معنی‌دار بود (جدول ۲). نتایج آزمایش مزرعه نشان داد که محلول‌پاشی اندام هوایی بادرنجبویه با سلنیوم نتوانست تغییر معنی‌داری در فعالیت آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز و غلظت مالون دی‌آلدئید ایجاد کند.

جدول ۲- شاخص‌های مختلف گیاه بادرنجبویه در مزرعه در شرایط کنترل و تیمار سلنیوم پس از ۷۵ روز رشد

شاخص	شاهد	سلنیوم (۱۰ میلی‌گرم)
وزن تر ساقه ($g\ plant^{-1}$)	۱۴/۷۸±۴/۵۰ a	۱۶/۶۳±۱/۳۰ a
وزن خشک ساقه ($g\ plant^{-1}$)	۳/۱۲±۰/۵۰ b	۴/۱۰±۰/۴۴ a
وزن تر ریشه ($g\ plant^{-1}$)	۱/۲۶±۰/۵۱ a	۱/۰۸±۰/۱۹ a
وزن خشک ریشه ($g\ plant^{-1}$)	۰/۴۱±/۱۴ a	۰/۴۹±۰/۰۲ a
کلروفیل a ($\mu g\ g^{-1}\ FW$)	۲۹۹±۱۰/۶ a	۳۰۱±۱۰/۴ a
کلروفیل b ($\mu g\ g^{-1}\ FW$)	۱۷۶±۲۰/۵ a	۱۷۰±۲۹/۵ a
کلروفیل a+b ($\mu g\ g^{-1}\ FW$)	۴۷۶±۲۹/۰ a	۴۶۰±۲۹/۰ a
کاروتنوئید ($\mu g\ g^{-1}\ FW$)	۱۹/۵±۳/۶۰ a	۲۱/۶±۴/۱۳ a
اسید آمینه کل ($\mu mol\ g^{-1}\ FW$)	۲۲/۵±۴/۵۰ b	۴۱/۲±۸/۵۰ a
فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز ($U\ mg^{-1}\ protein$)	۳۴/۱±۴/۳۰ a	۳۸/۹±۵/۶۳ a
فعالیت آنزیم کاتالاز ($\mu mol\ mg^{-1}\ protein\ min^{-1}$)	۱۷/۰۸±۲/۸۰ a	۲۰/۷±۷/۲۳ a
مالون دی آلدئید ($nmol\ g^{-1}\ FW$)	۸۹/۱±۱۷/۹۰ a	۸۳/۳±۱۳/۳ a

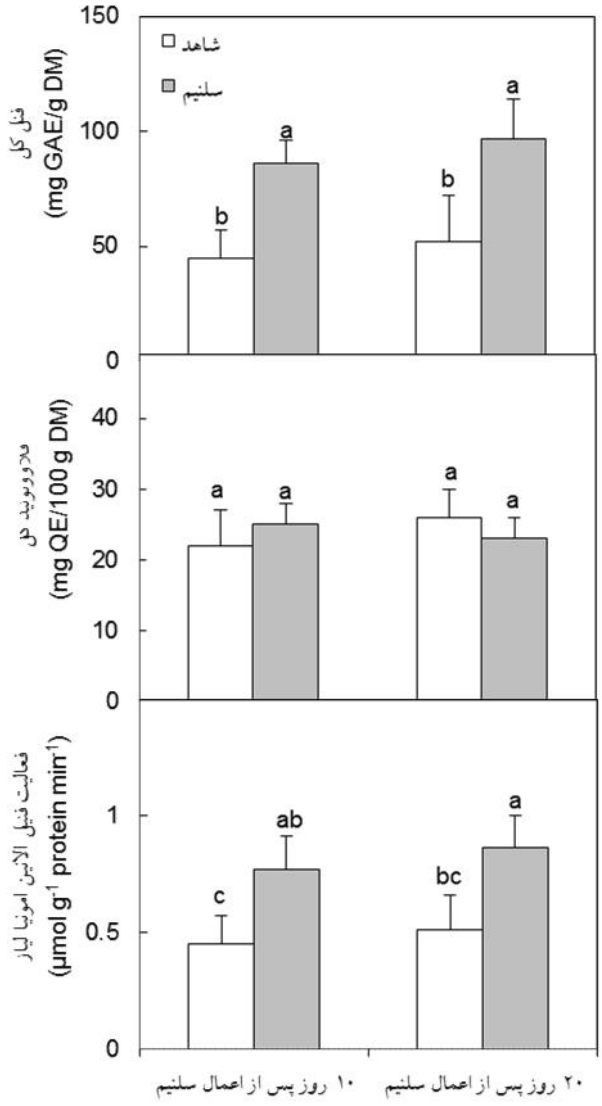
میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک باشند در سطح ۹۵٪ با آزمون توکی با یکدیگر اختلاف معنی‌داری ندارند (n=۱۰).

در فاصله‌های زمانی ۱۰ و ۲۰ روز پس از کاربرد برگی سلنیوم، یک افزایش معنی‌دار در فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز ملاحظه شد که با افزایش غلظت فنل کل در برگها همراه بود (شکل ۷). پس از کاربرد برگی سلنیوم، تغییر معنی‌داری در غلظت فلاوونوئید برگها مشاهد نشد.

کاربرد برگی سلنیوم در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر باعث انباشت معنی‌دار عنصر سلنیوم در ساقه شد. برداشت‌هایی که ۱۰ و ۲۰ روز پس از محلول‌پاشی انجام شد نشان داد که سلنیوم به‌سرعت توسط برگها جذب و در آنها انباشته شده است. برداشت‌هایی که ۱۰ و ۲۰ روز پس از محلول‌پاشی انجام شدند، نشان دادند که سلنیوم به‌تدریج توسط ساقه جذب و در آنها انباشته شده‌است، به‌طوری که افزایش مقدار انباشت عنصر در روز ۲۰ نسبت به روز ۱۰ معنی‌دار بود (شکل ۸). سنجش مقدار سلنیوم دانه نشان داد که سلنیوم توسط دانه‌ها جذب و در آنها انباشته شده‌است، به‌طوری که افزایش مقدار انباشت عنصر در تیمار سلنیوم بیش از سه برابر شاهد بود (شکل ۹).

www.SID.ir

Archive of SID

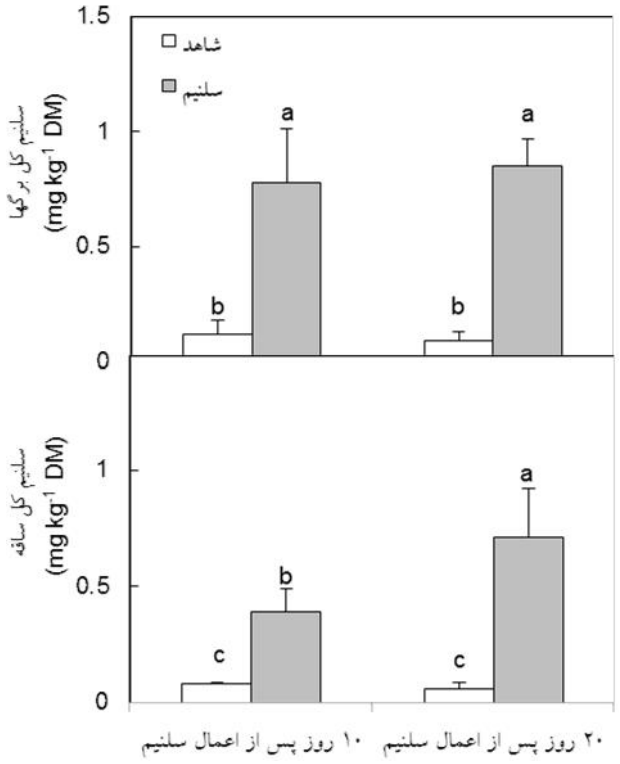


شکل ۷- فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز، غلظت فلاوونوئید و فنل کل بادرنجبویه در محیط مزرعه پس از ۷۵ روز رشد

میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک باشند در سطح ۹۵٪ با آزمون توکی با یکدیگر اختلاف معنی‌داری ندارند (n=۴).

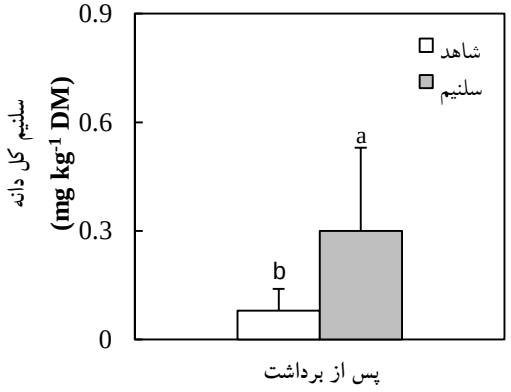
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۸- غلظت سلنیوم کل در برگ و ساقه بادرنجبویه در محیط مزرعه پس از ۷۵ روز رشد

میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک باشند در سطح ۹۵٪ با آزمون توکی با یکدیگر اختلاف معنی‌داری ندارند (n=۱۰).



شکل ۹- غلظت سلنیوم کل در بذرهای بادرنجبویه در محیط مزرعه پس از ۹۰ روز رشد

میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک باشند در سطح ۹۵٪ با آزمون توکی با یکدیگر اختلاف معنی‌داری ندارند (n=۱۰).

بحث

در این تحقیق، مهار رشد در تیمار ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر سلنیوم نشان داد که کاربرد این غلظت از سلنیوم در محیط کشت هیدروپونیک برای گیاه بادرنجبویه قابل تحمل نمی‌باشد. در بیشتر گیاهانی که شبیه بادرنجبویه نمی‌توانند سلنیوم را در مقادیر بالا انباشته کنند (گیاهان غیرانباشته‌گر)،

www.SID.ir

Archive of SID

غلظت‌های بالای سلنیوم باعث بروز سمّیت و مهار رشد و در عوض غلظت‌های پایین این عنصر باعث تحریک رشد و افزایش مقاومت این گیاهان در برابر تنش‌های مختلف زیستی و غیرزیستی می‌گردد (Feng *et al.*, 2013). با توجه به اینکه غلظت‌های ۰/۱ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر بکار رفته در این بررسی در همان محدوده‌ای بود که در مورد سایر گیاهان غیرانباشته‌گر مثل گیاه *Vicia faba* (Mroczek-Zdyrska & Wójcik, 2012)، گیاه گوجه‌فرنگی (Diao *et al.*, 2014) و گندم (Nawaz *et al.*, 2015) کمترین غلظت بکار رفته محسوب می‌شود، سلنیوم در این غلظت‌های اندک تغییر معنی‌داری در وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه ایجاد نکرد (Hayat *et al.*, 2010). ولی غلظت‌های بالاتر (۱۰ میلی‌گرم بر لیتر) بکار رفته در این بررسی در همان محدوده‌ای بود که در مورد گیاه *Vicia faba* باعث افزایش رادیکال‌های آزاد و کاهش رشد شد (Mroczek-Zdyrska & Wójcik, 2012). در نتیجه کاهش معنی‌دار وزن تر و خشک اندام هوایی در این آزمایش را می‌توان به غلظت‌های بالای سلنیوم نسبت داد.

اگرچه در تطابق با تحقیق انجام شده روی کلم، غلظت رنگیزه‌های فتوسنتزی در تیمارهای سلنیومی بادرنجبویه افزایش نشان داد ولی غلظت کاروتنوئیدهای برگ در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر سلنیوم، دچار کاهش معنی‌دار شد. البته کاهش کاروتنوئیدها می‌تواند باعث آسیب رسیدن به فتوسیستم II شود. بنابراین کاهش غلظت کاروتنوئید در تیمار ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر سلنیوم، احتمالاً با افزایش آسیب به فتوسیستم فتوسنتزی و ایجاد تنش اکسیداتیو حاصل از مهار نوری مرتبط است.

هر چند سازوکار تأثیر سلنیوم بر رشد گیاه به‌طور کامل مشخص نیست ولی افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن در غلظت‌های بالای سلنیوم در گیاهان مختلف نشان داده شده‌است (Malik *et al.*, 2012). یکی از عوامل اُفت رشد در تیمار ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر سلنیوم در محیط هیدرپونیک در این تحقیق، افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن بود که از طریق افزایش مالون دی‌آلدئید مشخص گردید. نتایج این تحقیق نشان داد که کاربرد برگی سلنیوم در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر باعث تحریک فعالیت آنزیم کاتالاز شد. افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز همراه با افزایش مقادیر مالون دی‌آلدئید (به‌عنوان شاخص مهم نشان‌دهنده افزایش پراکسیداسیون غشاها) در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر نشان داد که کاربرد این غلظت از سلنیوم از طریق ریشه، برای بادرنجبویه سمّی بوده و باعث تحریک فعالیت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانت شده و فعالیت آنزیم کاتالاز افزایش یافته است. ولی این افزایش فعالیت برای مقابله با تنش اکسیداتیو حاصل از سمّیت سلنیوم کافی نبوده است، درنتیجه غشاها دچار پراکسیداسیون شده و مقدار زیادی مالون دی‌آلدئید تولید شده‌است.

بررسی سلنیوم کل برگ و ریشه در این تحقیق نشان داد که مقدار بیشتری از سلنیوم جذب شده توسط ریشه به اندام هوایی منتقل شده و در شاخساره انباشته شده است. این نتایج با یافته‌های Li و همکاران (۲۰۰۸) که نشان داده‌اند در گیاهان تغذیه شده با سلنات مقدار بیشتری از سلنیوم جذب شده در ریشه به ساقه منتقل می‌شود، مطابقت دارد. انباشت سلنیوم در بافت‌های بادرنجبویه پس از کاربرد سلنیوم در غلظت‌های اندک در محیط هیدروپونیک نشان داد که استفاده از غلظت‌های اندک سلنیوم برای غنی‌سازی مناسب‌اند. این نتیجه با یافته‌های Ramos و همکاران (۲۰۱۰) در گیاه کاهو که انباشت مناسب سلنیوم در بافت‌های گیاهان تغذیه شده با غلظت‌های اندک سلنیوم را نشان داده‌اند، همخوانی دارد.

مقایسه نتایج آزمایش مزرعه با یافته‌های دیگران مشخص کرد که کاربرد برگی در غلظت‌های بالا حتی در غیرانباشته‌گرها، نه تنها باعث توقف رشد نمی‌شود بلکه منجر به بهبود رشد و افزایش مقاومت به تنش‌های اکسیداتیو محیطی نیز می‌گردد. در سازگاری با یافته‌های Proietti و همکاران (۲۰۱۳) که تأثیر مثبت کاربرد برگی در بهبود رشد زیتون و افزایش مقاومت به تنش‌های محیطی را نشان داده‌اند، یافته‌های حاصل از آزمایش مزرعه در این پژوهش نیز تأثیر مثبت کاربرد ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر سلنیوم بر بهبود

www.SID.ir

Archive of SID

رشد اندام هوایی و افزایش توان آنتی‌اکسیدانت از طریق افزایش فنل‌ها را به وضوح نشان داد. هر چند این غلظت در کاربرد هیدروپونیک بازدارنده رشد بود. مقایسه نتایج این آزمایش با آزمایش کشت هیدروپونیک نشان داد که نحوه کاربرد سلنیوم (کاربرد برگی یا از طریق ریشه) تأثیر زیادی در نحوه اثرگذاری سلنیوم دارد. در تحقیقات اخیر نیز مشخص شده است که تأثیر سلنیوم بستگی زیادی به گونه، شرایط کاربرد و غلظت کاربرد دارد (Feng *et al*., 2013).

بررسی فعالیت آنزیم کلیدی سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در تیمار سلنیومی نشان داد که اعمال تیمار سلنیومی نتوانست باعث تغییر در فعالیت این آنزیم‌ها شود. به‌طوری که مشخص شد که محلول‌پاشی ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر برای گیاه بادرنجبویه عامل تنش اکسیداتیو نمی‌باشد که مهمترین نشانه آن عدم افزایش مقدار مالون دی‌آلدئید به‌عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء بود.

در آزمایش انجام شده بر روی گیاه بادرنجبویه در مزرعه مشخص شد که اعمال سلنیوم در مقایسه با گروه شاهد بعد از گذشت ۱۰ روز باعث افزایش معنی‌دار مقدار فنل کل گردید که این افزایش با افزایش فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز همبستگی داشت. اخیرا تأثیر اعمال سلنیوم بر متابولیسم فنلی توسط Elguera و همکاران (۲۰۱۳) مورد مطالعه قرار گرفته است. در بررسی این گروه مشخص شده است که اعمال سلنیوم می‌تواند باعث تحریک انباشت ترکیب‌های فنلی گردد. در انطباق با یافته بالا، نتایج این تحقیق نشان داد که اعمال سلنیوم خارجی در شرایط مزرعه باعث افزایش فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز و در نتیجه مقدار فنل‌ها شد.

به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی می‌توان گفت که در این تحقیق نتایج آزمایش کشت هیدروپونیک نشان داد که همراه با افزایش غلظت رنگیزه‌های کلروفیلی در تیمارهای سلنیومی و ازجمله در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر، تیمار ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر سلنیوم باعث کاهش رشد شد. دلیل این امر می‌تواند به کاهش غلظت کاروتنوئید در تیمار ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر سلنیوم و در نتیجه احتمال افزایش آسیب به فتوسیستم‌ها و ایجاد تنش اکسیداتیو حاصل از مهار نوری مربوط باشد. افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز همراه با افزایش غلظت مالون دی‌آلدئید (به‌عنوان شاخص مهم نشان‌دهنده افزایش پراکسیداسیون غشاها) در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر نشان داد که کاربرد این غلظت از سلنیوم از طریق ریشه، برای بادرنجبویه سمّی بوده و باعث تحریک فعالیت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانت شده و فعالیت آنزیم کاتالاز افزایش یافته است. ولی این افزایش فعالیت آنزیم برای مقابله با تنش اکسیداتیو حاصل از سمّیت سلنیوم کافی نبوده، در نتیجه غشاها دچار پراکسیداسیون شده و مقدار زیادی مالون دی‌آلدئید تولید شده‌است.

آزمایش مزرعه نتایج متفاوتی را نمایان کرد. در این آزمایش کاربرد برگی ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر باعث تحریک رشد اندام هوایی بادرنجبویه در مزرعه شد. محلول‌پاشی سلنیوم در مزرعه با افزایش فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز، مقدار فنل کل را افزایش داد. کاربرد برگی سلنیوم در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر در شرایط مزرعه باعث افزایش مقدار آنتی‌اکسیدان‌های برگی ازجمله فنل‌ها و افزایش مقدار سلنیوم شاخساره و دانه شد. بنابراین توصیه می‌شود در تحقیقات بعدی مقدار سلنیوم موجود در عصاره و اسانس این گیاه دارویی مورد توجه قرار گیرد.

منابع مورد استفاده

- Boominathan, R. and Doran, P.M., 2002. Ni induced oxidative stress in roots of the Ni hyperaccumlator, *Alyssum bertoloni*. New Phytologist, 156: 202-205.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72: 248-254.
- Broadley, M.R., Alcock, J., Alford, J., Cartwright, P., Foot, I., Fairweather-Tait, S.J., Hart, D.J., Hurst, R., Knott, P., McGrath, S.P., Meacham, M.C., Norman, K., Mowat, H., Scott, P., Stroud, J.L., Tovey, M., Tucker, M., White, P.J., Young, S.D. and Zhao, F.J., 2010. Selenium biofortification of high-yielding winter wheat (*Triticum aestivum* L.) by liquid or granular Se fertilisation. Plant and Soil, 332: 5-18.
- Cartes, P., Jara, A.A., Pinilla, L., Rosas, A. and Mora, M.L., 2010. Selenium improves the antioxidant

www.SID.ir

Archive of SID

seedlings. Biological Trace Element Research, 143: 1758-1776.
- Hayat, Q., Hayat, S., Irfan, M. and Ahmad, A., 2010. Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: a review. Environmental and Experimental Botany, 68: 14-25.
- Hwang, M. and Ederer, G.M., 1975. Rapid hippurate hydrolysis method for presumptive identification of group streptococci. Journal of Clinical Microbiology, 1: 114-115.
- Johnson, C.M., Stout, P.R., Broyer, T.C. and Carlton, A.B., 1957. Comparative chlorine reguirements of different plant species. Plant Soil, 8: 337-353.
- Łabanowska, M., Filek, M., Ko´scielniak, J., Kurdziel, M., Kuli´s, E. and Hartikainen, H., 2012. The effects of short-term selenium stress on Polish and Finnish wheat seedlings, enzymatic and fluorescence studies. Journal of Plant Physiology, 169: 275-284.
- Lichtenthaler, H.K. and Wellburn, A.R., 1985. Determination of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf in different solvents. Biochemical Society Transactions, 11: 591-592.
- Li, H.F., McGrath, S.P. and Zhao, F.J., 2008. Selenium uptake, translocation and speciation in wheat supplied with selenate or selenite. New Phytologist, 178: 92-102.
- Liu, K.L. and Gu, Z.X., 2009. Selenium accumulation in different brown rice cultivars and its distribution in fractions. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57: 695-700.
- Malik, J.A., Goel, S., Kaur, N., Sharma, S., Singh, I. and Nayyar, H., 2012. Selenium antag-onises the toxic effects of arsenic on mungbean (*Phaseolus aureus* Roxb.) plants by restricting its uptake and enhancing the antioxidative and detoxification mechanisms. Environmental and Experimental Botany, 77: 242-248.
- Mavi, A., Terzi, Z. and Ozgen, U., 2004. Antioxidant properties of some medicinal plants: *Prangos ferulacea* (Apiaceae), *Sedum sempervivoides* (Crassulaceae), *Malva neglecta* (Malvaceae), *Cruciata taurica* (Rubiaceae), *Rosa pimpinellifolia* (Rosaceae), *Galium verum* subsp. Verum (Rubiaceae), *Urtica dioica* (Urticaceae). Biological and Pharmaceutical Bulletin, 27: 702-705.
- Moradkhani, H., Sargsyan, E., Bibak, H., Naseri, B., Sadat-Hosseini, M., Fayazi-Barjin, A. and Meftahizade, H., 2010. *Melissa officinalis* L., a valuable medicine plant: A review. Journal of Medicinal Plants Research, 4(25): 2753-2759.
- Mroczek-Zdyrska, M. and Wójcik, M., 2012. The influence of selenium on root growth and oxidative stress induced by lead in *Vicia faba* L. minor plants. ability against aluminium-induced oxidative stress in ryegrass roots. Annals of Applied Biology, 156: 297-307.
- de Souza, M.P., Pickering, I.J., Walla, M. and Terry, N., 2002. Selenium assimilation and volatilization from selenocyanate-treated Indian mustard and muskgrass. Plant Physiology, 128: 625-633.
- Diao, M., Ma, L., Wang, J.W., Cui, J.X., Fu, A.F. and Liu, H.Y., 2014. Selenium promotes the growth and photosynthesis of tomato seedlings under salt stress by enhancing chloroplast antioxidant defense system. Journal of Plant Growth Regulation, 33: 671-682.
- Djanaguiraman, M., Devi, D.D, Shanker, A.K, Sheeba, J.A. and Bangarusamy, U., 2005. Selenium an antioxidative protectant in soybean during senescence. Plant Soil, 272: 77-86.
- Djanaguiraman, M., Prasad, P.V.V. and Seppänen, M., 2010. Selenium protects sorghum leaves from oxidative damage under high temperature stress by enhancing antioxidant defense system. Plant Physiology and Biochemistry, 48: 999-1007.
- Elguera, J.C.T., Barrientos, E.Y. and Wrobel, K., 2013. Effect of cadmium (Cd (II)), selenium (Se (IV)) and their mixtures on phenolic compounds and antioxidant capacity in *Lepidium sativum*. Acta Physiologiae Plantarum, 35: 431-441.
- Feng, R., Weic, C. and Tu, S., 2013. The roles of selenium in protecting plants against abiotic stresses. Environmental and Experimental Botany, 87: 58-68.
- Freeman, J.L., Tamaoki, M., Stushnoff, C., Quinn, C.F., Cappa, J.J., Devonshire, J., Fakra, S.C., Marcus, M.A., McGrath, S.P., Hoewyk, D.V. and Pilon-Smits, E.A.H., 2010. Molec-ular mechanisms of selenium tolerance and hyperaccumulation in *Stanleya pinnata*. Plant Physiology, 153(4): 1630-1652.
- Giannopolitis, C.N. and Ries, S.K., 1977. Superoxide dismutase. I. occurrence in higher plants. Plant Physiology, 59: 309-314.
- Habibi, G., 2013. Effect of drought stress and selenium spraying on photosynthesis and antioxidant activity of spring barley. Acta Agriculturae Slovenica, 101: 167-177.
- Habibi, G., 2014. Role of trace elements in alleviating environmental stress: 313-331. In: Ahmad, P. and Rasool, S., (Eds.). Emerging Technologies and Management of Crop Stress Tolerance Biological Techniques. USA, Elsevier, 586p.
- Hasanuzzaman, M. and Fujita, M., 2011. Selenium pretreatment upregulates the antioxidant defense and methylglyoxal detoxification system and confers enhanced tolerance to drought stress in rapeseed

www.SID.ir

Archive of SID

Turkey: *Lactarius deterrimus*, *Suillus collitinus*, *Boletus edulis*, *Xerocomus chrysenteron*. Bioresource Technology, 99: 6651-6655.
- Simon, L.M., Fatrai, Z., Jonas, D.E. and Matkovics, B., 1974. Study of peroxide metabolism enzymes during the development of *Phaseolus vulgaris*. Biochem Physiol Pflanzen, 166: 387-392.
- Turakainen, M., Hartikainen, H. and Seppänen, M.M., 2004. Effects of selenium treatments on potato (*Solanum tuberosum* L.) growth and concentrations of soluble sugars and starch. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52: 5378-5382.
- Wu, L., 2004. Review of 15 years of research on ecotoxicology and remediation of land contaminated by agricultural drainage sediment rich in selenium. Ecotoxicology and Environmental Safety, 57: 257-269.
- Yao, X., Chu, J., He, X. and Ba, C., 2011. Protective role of selenium in wheat seedlings subjected to enhanced UV-B radiation. Russian Journal of Plant Physiology, 58(2): 283-289.
- Yao, X.Q., Chu, J.Z. and Ba, C.J., 2010. Responses of wheat roots to exogenous selenium supply under enhanced ultraviolet-B. Biological Trace Element Research, 137(2): 244-252.
- Zucker, M., 1965. Induction of phenylalanine deaminase by light, its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue. Physiologia Plantarum, 40: 779-784.

Biological Trace Element Research, 147(1): 320-328.
- Nawaz, F., Ahmad, R., Ashraf, M.Y., Waraich, E.A. and Khan, S.Z., 2015. Effect of selenium foliar spray on physiological and biochemical processes and chemical constituents of wheat under drought stress. Ecotoxicology and Environmental Safety, 113: 191-200.
- Paciolla, C., De Leonardis, S. and Dipierro, S., 2011. Effects of selenite and selenate on the antioxidant systems in *Senecio scandens* L. Plant Biosystems, 145(1): 253-259.
- Proietti, P., Nasini, L., Buono, D.D., Amato, R. and Daniela T.E., 2013. Selenium protects olive (*Olea europaea* L.) from drought stress. Scientia Horticulturae, 164: 165-171.
- Ramos, S.J., Faquin, V., Guilherme, L.R.G., Castro, E.M., Ávila, F.W., Carvalho, G.S., Bastos, C.E.A. and Oliveira, C., 2010. Selenium biofortification and antioxidant activity in lettuce plants fed with selenate and selenite. Plant, Soil and Environment, 56(12): 584-588.
- Rios, J.J., Blasco, B., Cervilla, L.M., Rosales, M.A., Sanchez-Rodriguez, E., Romero, L. and Ruiz, J.M., 2009. Production and detoxification of H_2O_2 in lettuce plants exposed to selenium. Annals of Applied Biology, 154: 107-116.
- Sarikurkcu, C., Tepe, B. and Yamac, M., 2008. Evaluation of the antioxidant activity of four edible mushrooms from the Central Anatolia, Eskisehir-

www.SID.ir

Archive of SID

Effects of selenium application on physiological parameters of *Melissa officinalis* L. plants

Gh. Habibi[1*], P. Ghorbanzade[2] and M. Abedini[2]

1*- Corresponding author, Department of Biology, Payame Noor University, Iran, E-mail: gader.habibi@gmail.com
2- Department of Biology, Payame Noor University (PNU), Iran

April: January 2015 Revised: November 2015 Accepted: November 2015

Abstract

In this study, the influence of hydroponically applied (0.1, 1 and 10mg l^{-1}) and foliar-applied (10mg l^{-1}) Na_2SeO_3 on the some physiological characteristics of *Melissa officinalis* L. was investigated. The results indicated that the root application of 10mg l^{-1} Se could decrease shoot fresh and dry mass, and caused an improved lipid peroxidation in hydroponically grown lemon balm. Se supply at 10mg l^{-1} in lemon balm exhibited a significantly positive effect on accumulation of total chlorophyll, and raised the activity of catalase, but these mechanisms could not ameliorate the negative effect of Se toxicity on productivity, as was indicated by a higher malondialdehyde concentration. Our results indicated that for biofortification program with lemon balm, the application of Se as selenate at low concentrations (0.1 and 1mg l^{-1}) would be more beneficial because it favored shoot biomass growth. In contrast, the results from field experiment indicated that foliar-applied Se (10mg l^{-1}) was favorable for biomass accumulation in lemon balm. In this work, the foliar application of selenium induced higher activity of phenylalanine ammonia-lyase as well as the higher total phenol content, which appear to act as protective compounds. It was concluded that foliar applications to lemon balm at 10mg Se l^{-1} can effectively cause a significantly higher growth rate, improve Se content and phenolic compounds.

Keywords: Lemon balm (*Melissa officinalis* L.), lipid peroxidation, sodium selenate, phenylalanine ammonia-lyase, Catalase.

www.SID.ir