

تأثیر کاربرد برگی سلنیم بر رشد، فعالیت سیستم آنتی‌اکسیداتیو و غلظت سلنیم دانه در دو رقم از گندم بهاره

قادر حبیبی

تهران، دانشگاه پیام نور، گروه زیست‌شناسی

تاریخ دریافت: ۹۱/۹/۲۴ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۰/۲

چکیده

در این تحقیق، تأثیر کاربرد برگی غلظت‌های مختلف سلنیم (۱/۵، ۱۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) بر روی برخی از ویژگی‌های فیزیولوژیکی گندم (*Triticum aestivum* L.) بهاره مورد مطالعه قرار گرفت. کاربرد سلنیم باعث افزایش وزن خشک اندام هوایی رقم‌های زاگرس و چمران شد. بیشترین مقدار انباشت سلنیم در دانه‌های گندم ($1/01 \text{ mg kg}^{-1} \text{ DW}$) در زاگرس و $0/465$ (در چمران) مربوط به تیمار 10 mg Se l^{-1} بود. بدلیل فعالیت مؤثر آنزیم‌های سوپر اکسید دیس موتاز (SOD) و گلوتاتیون پراکسیداز (GSH-Px) در گیاهان تیمار شده با سلنیم، از انباشت مالون دی‌آلدئید (MDA) و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) در بافت‌های گندم ممانعت شد. نتایج فوق‌نشان دادند که اسپری برگی سلنیم در غلظت 10 mg l^{-1} از یک طرف باعث تخفیف تنش اکسیداتیو و در نتیجه افزایش معنی‌دار رشد می‌شود و از طرف دیگر می‌تواند باعث بهبود غنی‌سازی گندم با سلنیم شده و گندم را به بسته‌ غذایی سرشار از سلنیم تبدیل کند.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت، کاربرد برگی سلنیم، گلوتاتیون پراکسیداز، گندم

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۴۸۲۳۲۲۲۷۰۲، پست الکترونیکی: gader.habibi@gmail.com

مقدمه

مه‌ار خطر سرطان و ظهور اثرات مفید سلنیم مورد نیاز می‌باشد (۱۳).

مناسب‌ترین روش برای تعیین کمبود سلنیم در انسان در یک منطقه، تعیین مقدار سلنیم قابل دسترس برای گیاهان در آن منطقه است (۱۳ و ۳۸). از طرف دیگر بیشترین مقدار سلنیم خوراکی انسان و حیوانات معمولاً از خاک و آنهم از طریق گیاهان به دست می‌آید. کمبود سلنیم معمولاً در نواحی از چین، سیبری، آفریقای مرکزی، اروپای شرقی و نیوزیلند مشهود است (۱۳). ولی باید توجه داشت که در اکثر مناطق دنیا میزان سلنیم خاک‌ها سنجش نشده‌اند و در نتیجه بسیاری از افراد از مقادیر اندک سلنیم بهره می‌برند و نمی‌توانند مقادیر بالایی از سلنوآنزیم‌ها را در بدن خود بسازند (۳۸). بسیار از کشورهای اروپایی از کمبود

سلنیم یک عنصر ضروری برای گیاهان به حساب نمی‌آید ولی مقادیر اندک آن برای رشد و نمو طبیعی پستانداران لازم است (۱۲). سلنیم یک آنتی‌اکسیدانت مناسب برای انسان به حساب می‌آید و در محیط‌هایی که سلنیم کافی وجود دارد میزان مرگ و میر حاصل از انواع سرطان‌ها و بیماری‌های قلبی کاهش می‌یابد. احتمالاً بیشتر اثرات مفید سلنیم مربوط به فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز می‌باشد (۴). میزان سلنیمی که هر انسان در یک روز نیاز دارد حدود ۷۵ میکروگرم است. مقدار سلنیمی که توسط افراد مصرف می‌شود کمتر از این مقدار بوده و ۳۰-۴۰ میکروگرم در روز است (۱۸). از طرف دیگر وجود مقادیر بالایی از سلنیم در بدن (۲۳۰ میکروگرم در روز برای مردان و ۱۳۰ میکروگرم برای زنان) برای بیشینه‌سازی

های مناسب اعمال می‌شود باعث بالا رفتن توان سیستم آنتی‌اکسیدانت گیاه از طریق فعال کردن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت از جمله سوپر اکسید دیس موتاز و کاتالاز می‌شود (۲۹، ۳۹، ۴۵ و ۴۷) و باعث کاهش مقدار مالون دی‌آلدئید حاصل از تخریب غشا شده و مقاومت گیاه به تنش‌های اکسیداتیو را افزایش می‌دهد (۸ و ۹). در گیاه علف چاودار (*Lolium perenne*) اعمال سلنیم در غلظت‌های بالاتر از یک میلی‌گرم بر کیلوگرم، منجر به کاهش پراکسیداسیون لیپیدها می‌شود که با افزایش فعالیت آنزیم گلوکاتیون پراکسیداز (GSH-Px) مرتبط است (۲۶).

با توجه به کمبود سلنیم خاک در شمال غرب ایران، غنی‌سازی سلنیمی محصولات زراعی برای مصارف غذایی انسان در این مناطق ضروری به نظر می‌رسد. این مسئله در تعدادی از کشورهای غربی مورد توجه قرار گرفته و با وارد کردن سلنیم به گیاهان بومی خود، موفقیت‌هایی نیز کسب کرده‌اند، ولی در کشور ما کمتر به این مشکل پرداخته شده و تقریباً هیچ اقدام عملی در این زمینه انجام نشده است.

از آنجایی که جزییات فیزیولوژیکی تأثیر کاربرد برگی سلنیم بر روی ارقام گندم مورد مطالعه قرار نگرفته است، در این تحقیق سعی بر آن است تا با تعیین وزن خشک، مقدار سلنیم کل، مقدار نسبی آب، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و مقادیر متابولیت‌های پراکسید هیدروژن و مالون دی‌آلدئید، بتوان تأثیر کاربرد برگی سلنیم بر رشد، فعالیت سیستم آنتی‌اکسیداتیو و غلظت سلنیم دانه در دو رقم گندم زراعی را مورد مطالعه قرار داد. از طرف دیگر در تحقیق حاضر تلاش می‌شود غلظت بهینه سلنیم برای افزایش ذخیره سلنیم دانه‌های ارقام گندم را تعیین کرد تا از نتایج به دست آمده در جهت کشت گندم غنی شده از سلنیم بهره‌برداری نمود.

مواد و روشها

سلنیم قابل دسترس برای گیاهان رنج می‌برند (۳۰). نتایج تحقیقی که اخیراً درباره تعیین مقادیر سلنیم خاک‌های مناطق مختلف ایران انجام شده است (۳۷) نشان می‌دهد که مناطق جنوبی و مرکزی ایران دارای مقادیر متوسطی از سلنیم هستند ولی خاک مناطق شمالی ایران با کمبود سلنیم مواجه است.

یکی از روشهایی که برای رفع کمبود سلنیم در غذاها توصیه می‌شود، تولید گیاهان غنی از سلنیم می‌باشد. روش‌های مختلفی برای افزایش سلنیم در گیاهان وجود دارد که از آن جمله می‌توان به روش افزودن سلنیم به خاک، اسپری سلنیم به برگ‌ها و افزودن سلنیم به دانه‌ها اشاره کرد (۲۱). در فنلاند برای رفع مشکل کمبود سلنیم و افزایش غلظت سلنیم غلات اقدام به افزودن سدیم سلنات به خاک در غلظت $16-6 \text{ mg kg}^{-1}$ کرده‌اند (۲۸). در استرالیا برای جلوگیری از کمبود سلنیم در یونجه و شبدر از کودهای سلنیمی که بتدریج عنصر سلنیم را در خاک آزاد می‌کنند، استفاده شده است. در بین محصولات زراعی، گندم به عنوان منبع زیستی قابل دسترس سلنیم محسوب می‌شود و در برخی کشورها از جمله استرالیا حدود نیمی از نیازهای سلنیمی مردم از طریق این محصول برطرف می‌شود (۳۶). با کاربرد مقادیر کم سلنیم در خاک به راحتی می‌توان میزان سلنیم دانه‌های گندم را افزایش داد (۳۴، ۳۵ و ۳۶). با همین استراتژی محققان توانسته‌اند مقادیر سلنیم دانه‌های غلات دیگر را نیز افزایش دهند. برای مثال می‌توان به برنج اشاره کرد که اعمال سلنیت و سلنات باعث افزایش معنی‌دار و چند برابری سلنیم در دانه‌ها گردیده است که البته سلنات بهتر از سلنیت عمل کرده است (۱۱).

نقطه قابل توجه آن است که سلنیم در سیستم آنتی‌اکسیداتیو گیاهان نیز درگیر است (۲۳ و ۴۸) و افزودن مقادیر مناسبی از سلنیم به گیاهان باعث تأخیر پیری گیاه و تسریع رشد آنها می‌شود (۱۹ و ۴۴). وقتی سلنیم در غلظت

دریاچه ارومیه با ارتفاع ۱۳۱۴ متر از سطح دریا قرار دارد. متوسط بارندگی در این منطقه ۲۷۵ میلی متر و رطوبت نسبی ۶۱/۴ درصد بود. بافت خاک مزرعه لوم سیلتی بود. برخی از خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک محل آزمایش در جدول ۱ آورده شده است.

کشت گیاهان و اعمال تیمارها: بذرهای گندم (*Triticum aestivum* L. cv Zagros, Chamran) پس از ضدعفونی در مزرعه ای در اطراف شهرستان میاندوآب (استان آذربایجان غربی) در بهار سال ۱۳۸۹ کشت شدند. این منطقه در طول جغرافیایی ۴۶ درجه و ۶ دقیقه شرقی و در عرض ۳۶ درجه و ۵۸ دقیقه شمالی در وسط جلگه‌های منتهی به

جدول ۱- مشخصات فیزیکی و شیمیایی خاک محل اجرای آزمایش

عمق خاک	بافت خاک	ظرفیت مزرعه	اسیدیته	هدایت الکتریکی	آهن	منگنز	روی
Depth (cm)	Soil texture	FC (%)	pH	EC (dS. m ⁻¹)	Fe (mg kg ⁻¹)	Mn (mg kg ⁻¹)	Zn (mg kg ⁻¹)
0-30	لوم سیلتی	22.3	7.8	1.15	8.26	7.81	0.89
30-60	لوم سیلتی	21.8	7.7	1.30	5.98	5.66	0.92

ازت مایع انتقال یافتند. اندازه گیری مقدار سلنیم کل دانه و وزن هزار دانه در پایان مرحله زایشی انجام شد.

اندازه‌گیری مقدار نسبی آب (RWC): مقدار نسبی آب برگ‌ها با استفاده از وزن تر (Fw)، وزن خشک (Dw) و وزن اشباع (Sw) و بر اساس رابطه $RWC=100 \times (Fw - Dw) / (Sw - Dw)$ (۳۲) ارائه شده است، بدست آمد.

سنجش سلنیم کل: برای سنجش سلنیم کل ابتدا یک گرم از نمونه های خشک شده در ۵ ml مخلوط اسید نیتریک و اسید پرکلریک غلیظ (با نسبت حجمی ۴:۱) و در دمای ۱۳۰°C بمدت یک ساعت هضم شدند. پس از خنک شدن، ۵ ml اسید کلریدریک غلیظ اضافه شده و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۱۵°C حرارت داده شد. پس از هضم نمونه‌ها و خنک سازی در دمای آزمایشگاه، عصاره ها به لوله های ۵۰ میلی لیتری انتقال و با آب مقطر دوبار تقطیر به حجم رسانده شدند و محلول های بدست آمده برای تعیین سلنیم کل با استفاده از اسپکترومتر نشر اتمی (ICP-OES spectrometer Integra XL₂, GBC Australia) مورد استفاده قرار گرفتند (۳۳).

در هر کرت، ۵ ردیف از بذرها با فاصله ۲۰ سانتی متر کاشته شدند و فاصله دانه رستها در هر ردیف ۵ سانتی متر بود (۳). قبل از شخم زنی برای افزایش حاصلخیزی خاک، کودهای نیتروژن بصورت NH_4NO_3 (۱۰۰ kg ha⁻¹)، فسفر و پتاسیم بصورت KH_2PO_4 (۵۰ kg ha⁻¹) اضافه شدند (۲۲ و ۳۵). با توجه به فواصل مناسب بوته ها از هم، وجین علف های هرز با دست انجام شد. آبیاری گیاه بر اساس نیاز آبی از بدو کشت و تا یک هفته قبل از برداشت به شیوه آبیاری سطحی و بطور مرتب و یکسان برای همه کرت ها انجام شد. خاک مزرعه هر ۷ روز یکبار با آب سطحی تا حدود ۷۰ درصد ظرفیت زراعی آبیاری شد. در مرحله آغاز تطویل ساقه، سلنیم در شکل سلنات سدیم (Na_2SeO_4) و در غلظت های $1/5 mg l^{-1}$ (در تیمار Se-1.5)، $10 mg l^{-1}$ (در تیمار Se-10) و $100 mg l^{-1}$ (در تیمار Se-100) اسپری شد و همزمان نمونه های شاهد با آب اسپری شدند. اسپری برگی سلنیم دو هفته بعد دوباره تکرار شد و در نهایت پس از گذشت یک ماه از اولین کاربرد برگی سلنیم، نمونه های برگ و ساقه برای اندازه گیری پارامترهای رشد، مقدار سلنیم اندام هوایی، مقدار نسبی آب و فعالیت آنزیم ها برداشت شدند و بلافاصله به

گیری قرار گرفت. فعالیت آنزیم پراکسیداز (POD) بر اساس روش Chance و Maehly (۱۹۵۵) و از طریق تست گایاکول و تبدیل آن به تتراگایاکول به انجام رسید. فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز مطابق روش Boominathan و Doran (۵) و بر اساس اکسیداسیون اسید آسکوربیک و کاهش جذب در ۲۹۰ nm مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. فعالیت آنزیم با استفاده از ضریب خاموشی اسید آسکوربیک ($2/6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) بر حسب واحد μM آسکوربیک $\text{ascorbic acid mg}^{-1} \text{ protein min}^{-1}$ محاسبه گردید.

اندازه‌گیری متابولیتها: سنجنش مالون دی‌آلدئید (MDA) به عنوان معیاری برای بررسی میزان پراکسیداسیون لیپیدها بر اساس روش Boominathan و Doran (۵) انجام گردید. سنجنش پراکسید هیدروژن (H_2O_2) مطابق روش توصیف شده توسط Habibi و Hajiboland (۲۵) انجام شد.

اندازه‌گیری پروتئین کل: عصاره پروتئینی در بافر فسفات سدیم با غلظت ۵۰ mM و $\text{pH}=6/8$ استخراج شده و به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۵۰۰۰g سانتریفوژ شد. از روشناور حاصل برای سنجنش پروتئین کل به روش برادفورد (۶) استفاده گردید.

بررسی آماری نتایج: آزمایشها به صورت طرح کاملا تصادفی طرح ریزی و به اجرا درآمد. هر تیمار دارای ۴ تکرار مستقل بود. میانگین و انحراف معیار (SD) داده‌ها و همچنین رسم نمودارها بوسیله نرم افزار Excel 2007 به انجام رسید. برای گروه‌بندی میانگینها نیز از نرم افزار Sigma stat 3.5 با آزمون Tukey در سطح احتمال $p \leq 0/05$ استفاده شد. مقایسه میانگین رقم‌های گندم جداگانه انجام شد.

نتایج

سلنیم کل خاک: بررسی سلنیم کل خاک محل انجام آزمایش نشان داد که سلنیم کل خاک در محدوده ۰/۱ تا

سنجنش فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز (GSH-Px): سنجنش فعالیت این آنزیم بر اساس روش Flohé و Günzler (۱۷) و با استفاده از H_2O_2 به عنوان سوبسترا انجام شد. آنزیم با استفاده از بافر فسفات با غلظت mM ۵۰ و $\text{pH}=7$ استخراج شد و بعد ۰/۲ ml از روشناور به محلول واکنش حاوی ۰/۴ ml گلوتاتیون (۰/۱ mM) و ۰/۲ ml بافر KNaHPO_4 با غلظت ۶۷ mM اضافه شد. همزمان محلول‌های بدون عصاره آنزیمی تهیه شدند. محلول‌ها در حمام آب گرم به مدت ۵ دقیقه در دمای 25°C قرار گرفته و بعد ۰/۲ ml پراکسید هیدروژن (۱/۳ mM) اضافه شد تا واکنش آغاز گردد. واکنش با افزودن یک میلی لیتر اسید تری کلرواستیک یک درصد و قرار گرفتن نمونه‌ها در حمام آب یخ به مدت ۳۰ دقیقه متوقف گردید. مخلوط حاصل در ۱۱۰۰g بمدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ و ۰/۴۸ میلی لیتر از روشناور به لوله‌ها انتقال و روی آن ۲/۲ میلی لیتر Na_2HPO_4 (۰/۳۲ mM) و ۰/۳۲ میلی لیتر DNTB (۱ mM) اضافه شد تا رنگ ظاهر شود. پس از ۵ دقیقه جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۱۲ nm خوانده شد و فعالیت آنزیم بر اساس میزان کاهش گلوتاتیون (GSH) در طی گذشت زمان واکنش در مقایسه با نمونه فاقد عصاره آنزیمی محاسبه گردید ($\text{nmol GSH mg}^{-1} \text{ protein min}^{-1}$).

سنجنش فعالیت سایر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت: فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت با استفاده از روشهای توصیف شده پیشین ما (۲۴) سنجنش شدند. فعالیت آنزیم سوپراکسید دیس موتاز (SOD) مطابق روش Giannopolitis و Ries (۲۰) و بر اساس درصد ممانعت از احیاء NBT به ترکیب ارغوانی رنگ دی فورمازان بوسیله رادیکال سوپراکسید ($\text{O}_2^{\cdot-}$) حاصل از فتولیز ریوفلاوین، توسط آنزیم موجود در عصاره مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) مطابق روش Simon و همکارانش (۴۰) و بر اساس کاهش جذب پراکسید هیدروژن (H_2O_2) در ۲۴۰ nm مورد اندازه

۰/۲ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم خاک خشک می‌باشد (جدول ۲).

جدول ۲- سلنیم کل خاک محل اجرای آزمایش (n = ۴)

عمق خاک Depth (cm)	سلنیم کل (mg kg ⁻¹ soil)
0-30	0.19 ± 0.02
30-60	0.18 ± 0.03

با توجه به اینکه متوسط سلنیم خاک های مناطق مختلف ایران در محدوده ۰/۴۰-۰/۱۷۵ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم خاک می باشد، خاک مورد مطالعه در این طرح جزو خاکهای فقیر از نظر مقدار سلنیم محسوب می شود.

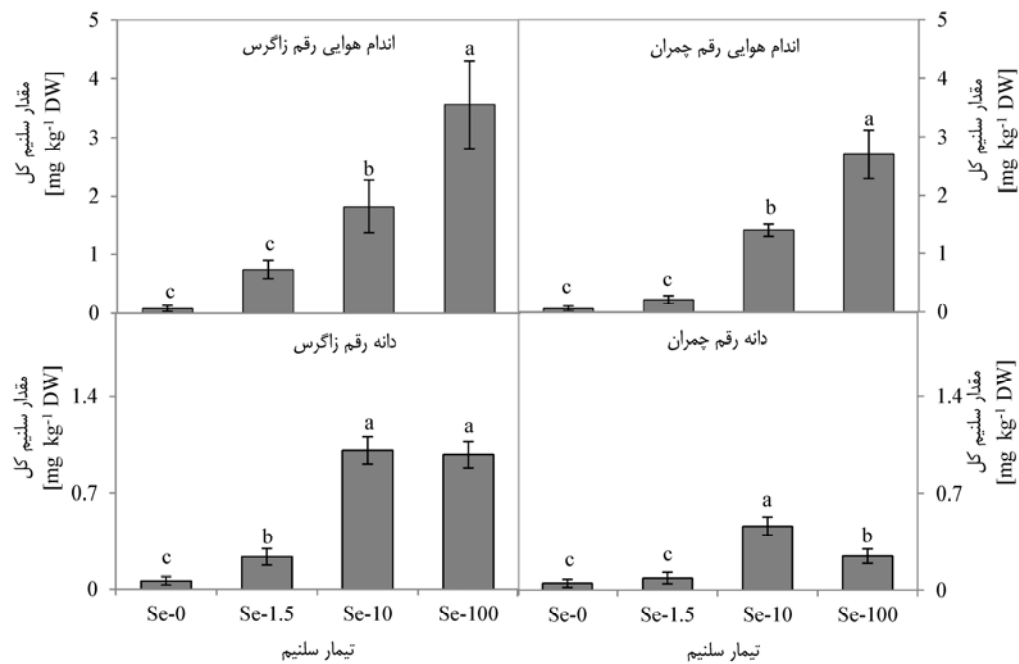
پارامترهای رشد: مطالعه اثر غلظت های مختلف سلنیم بر رشد رقم زاگرس نشان داد که اعمال ۱/۵ mg I⁻¹ Se باعث افزایش معنی دار وزن خشک اندام هوایی در مقایسه با شاهد و سایر تیمارهای سلنیمی گردید (جدول ۳). در حالیکه سلنیم در این غلظت نتوانست وزن خشک رقم چمران را ارتقاء دهد. اعمال ۱۰ mg I⁻¹ Se نتوانست وزن خشک اندام هوایی رقم چمران را بصورت معنی داری بهبود بخشد. بررسی وزن هزار دانه و مقدار نسبی آب اندام هوایی در ارقام زاگرس و چمران حکایت از عدم تغییر

معنی دار این پارامترها تحت تأثیر تیمارهای سلنیمی داشت.

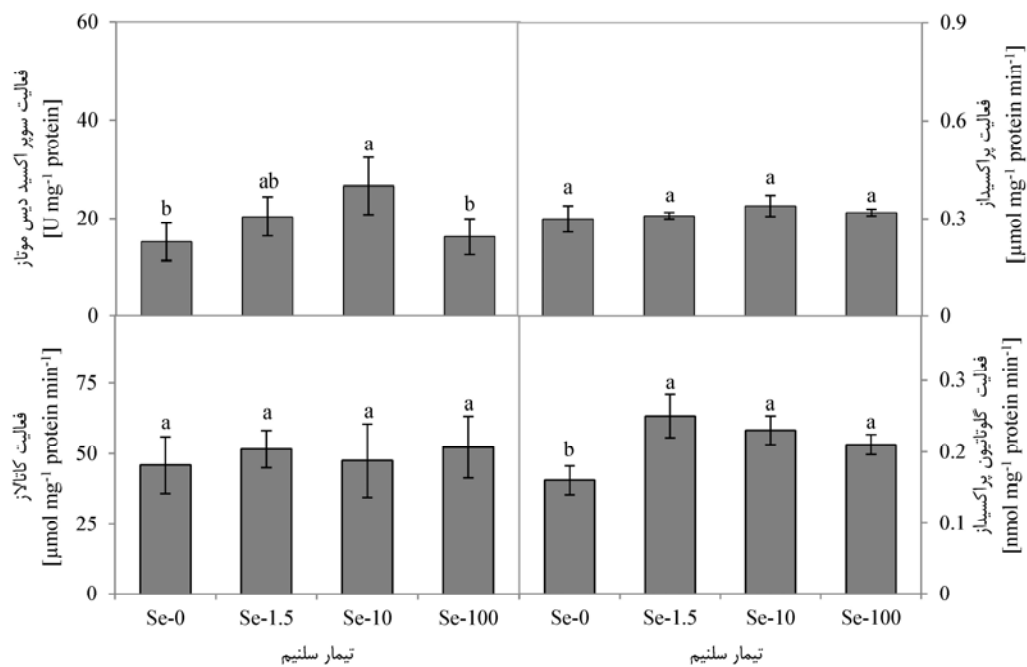
میزان انباشت سلنیم: مطالعه تأثیر کاربرد غلظت های مختلف سلنیم بر میزان انباشت این عنصر در اندام های هوایی رقم های زاگرس و چمران نشان داد که کاربرد ۱/۵ I⁻¹ Se نتوانست باعث افزایش معنی دار انباشت سلنیم در این بخشها شود ولی با افزایش غلظت سلنیم اعمال شده، مقدار انباشت این عنصر در اندام های هوایی بصورت معنی داری افزایش یافت و در تیمار ۱۰۰ mg I⁻¹ Se به بیشینه مقدار خود رسید (شکل ۱). الگوی میزان انباشت عنصر سلنیم در دانه های زاگرس با الگوی انباشت این عنصر در دانه های رقم چمران متفاوت بود. در رقم زاگرس در هر سه تیمار سلنیمی نسبت به شاهد، افزایش مقدار سلنیم در دانه ها قابل ملاحظه و معنی دار بود. ولی بیشترین انباشت سلنیم در دانه ها در تیمارهای ۱۰۰ mg I⁻¹ Se و ۱۰ به دست آمد (شکل ۱). اعمال ۱/۵ mg I⁻¹ Se در رقم چمران نتوانست مقدار سلنیم ذخیره شده در دانه ها را بهبود بخشد ولی غلظت های بالاتر باعث افزایش معنی دار سلنیم در مقایسه با شاهد شدند. هرچند بیشترین انباشت سلنیم در دانه های چمران بر خلاف رقم زاگرس در ۱۰ mg I⁻¹ Se بدست آمد.

جدول ۳- تأثیر اعمال برگی غلظت های مختلف سلنیم بر وزن خشک اندام هوایی (g plant⁻¹)، وزن هزار دانه (g) و مقدار نسبی آب اندام هوایی (%). رقم های گندم (تفاوت بین اعداد مربوط به هر پارامتر در هر رقم که با حروف متفاوت نشان داده شده اند معنی دار می باشد) (p ≤ ۰/۰۵).

رقم	تیمار سلنیم	وزن خشک	وزن هزار دانه	مقدار نسبی آب
زاگرس	شاهد	2.2 ± 0.14 ^b	38.3 ± 2.69 ^a	75 ± 2.2 ^a
	1.5 mg I ⁻¹	2.9 ± 0.12 ^a	40.9 ± 2.97 ^a	82 ± 4.5 ^a
	10 mg I ⁻¹	2.4 ± 0.17 ^b	42.6 ± 2.52 ^a	79 ± 5.3 ^a
چمران	100 mg I ⁻¹	2.3 ± 0.23 ^b	39.3 ± 2.43 ^a	74 ± 4.4 ^a
	شاهد	2.3 ± 0.23 ^b	37.4 ± 2.30 ^a	78 ± 4.1 ^a
	1.5 mg I ⁻¹	2.4 ± 0.17 ^{ab}	39.7 ± 2.72 ^a	80 ± 4.8 ^a
	10 mg I ⁻¹	2.7 ± 0.21 ^a	38.1 ± 2.02 ^a	76 ± 7.0 ^a
	100 mg I ⁻¹	2.2 ± 0.18 ^b	36.7 ± 2.43 ^a	77 ± 3.9 ^a



شکل ۱- تأثیر کاربرد غلظت‌های مختلف سلنیم بر میزان انباشت این عنصر در اندام هوایی و دانه رقم‌های زاگرس و چمران (تفاوت بین اعداد مربوط به ستونها که با حروف متفاوت نشان داده شده‌اند معنی‌دار می‌باشد) ($p \leq 0.05$).



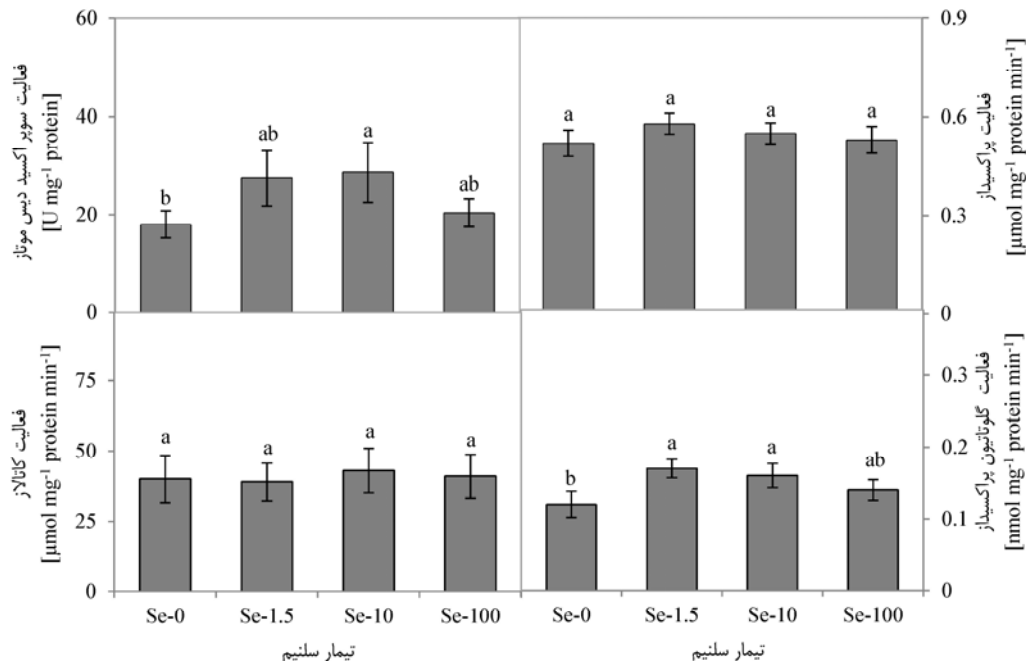
شکل ۲- تأثیر کاربرد غلظت‌های مختلف سلنیم بر فعالیت آنزیم‌های سوپر اکسید دیس موتاز (SOD)، پراکسیداز (POD)، کاتالاز (CAT) و گلوتاتیون پراکسیداز (GSH-Px) در رقم زاگرس (تفاوت بین اعداد مربوط به ستونها که با حروف متفاوت نشان داده شده‌اند معنی‌دار می‌باشد) ($p \leq 0.05$).

توسط آنزیم SOD بطور مؤثری توسط آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز حذف شده است. در نتیجه می‌توان گفت که آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز نسبت به سایر آنزیم‌های سیستم آنتی‌اکسیداتیو در حذف اثرات سمی H_2O_2 نقش بیشتری داشته است.

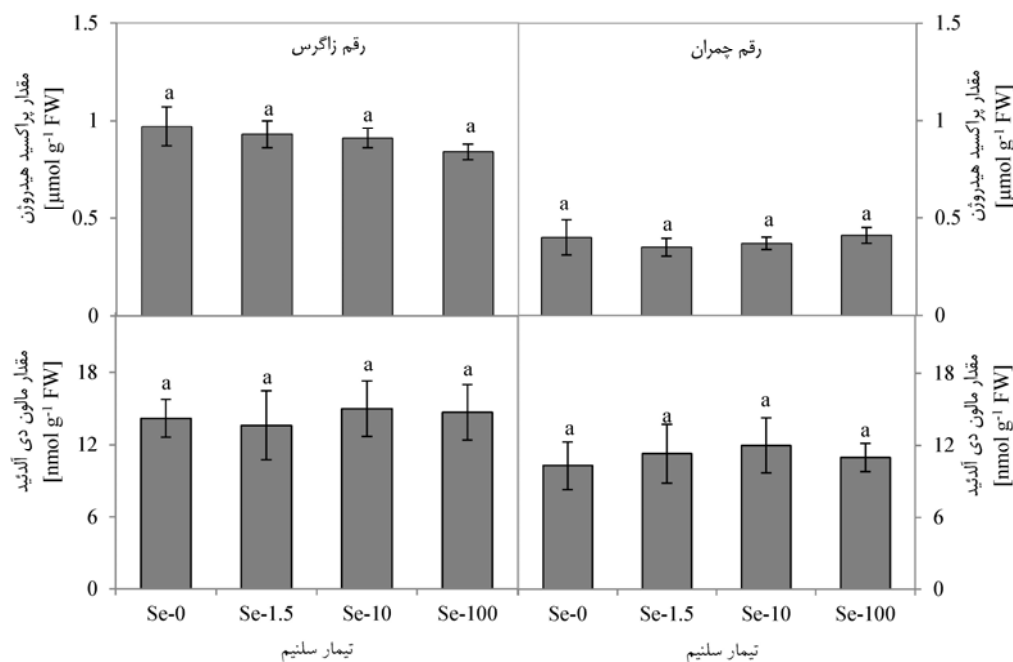
بحث

هرچند تعیین مقدار متوسط سلنیم در خاک مناطق شمال غرب ایران نیازمند مطالعات بیشتری است ولی مقدار کم سلنیم بدست آمده در این پژوهش در انطباق با مقادیر بدست آمده برای خاک شمال غرب در بررسی Nazemi و همکارانش (۳۷) می‌باشد که نشان دادند کمترین مقادیر سلنیم خاک مربوط به مناطق شمالی و شمال غرب کشور است. گیاهانی که در خاکهای فقیر از سلنیم رشد می‌کنند، دچار کمبود سلنیم خواهند شد.

فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانت: بررسی فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز در تیمارهای مختلف رقم زاگرس نشان داد که اعمال تیمارهای سلنیمی در غلظت‌های مختلف نتوانست باعث تغییر در فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز گردد (شکل ۲). یک افزایش معنی‌دار در فعالیت آنزیم کلیدی سوپر اکسید دیس موتاز پس از اعمال 10 mg Se l^{-1} در اندام‌های هوایی رقم زاگرس مشاهده گردید. همین الگوی فعالیت در آنزیم‌های پراکسیداز، کاتالاز و سوپر اکسید دیس موتاز رقم چمران نیز مشاهده شد (شکل ۳) و نشان داد که الگوی فعالیت آنزیم‌های فوق در غلظت‌های مختلف سلنیم در هر دو رقم مورد مطالعه یکسان می‌باشد. بررسی میزان انباشت H_2O_2 در تیمارهای مختلف هر دو رقم (شکل ۴) نشان داد که با وجود افزایش فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیس موتاز مقدار H_2O_2 متأثر نشده است. به عبارت دیگر H_2O_2 تولید شده



شکل ۳- تأثیر کاربرد غلظت‌های مختلف سلنیم بر فعالیت آنزیم‌های سوپر اکسید دیس موتاز (SOD)، پراکسیداز (POD)، کاتالاز (CAT) و گلوکاتایون پراکسیداز (GSH-Px) در رقم چمران (تفاوت بین اعداد مربوط به ستونها که با حروف متفاوت نشان داده شده‌اند معنی‌دار می‌باشد) ($p \leq 0.05$).



شکل ۴- تأثیر کاربرد غلظت‌های مختلف سلنیم بر مقدار پراکسید هیدروژن (H₂O₂) و مالون دی آلدئید (MDA) در رقم زاگرس و چمران (تفاوت بین اعداد مربوط به ستونها که با حروف متفاوت نشان داده شده‌اند معنی‌دار می‌باشد) ($p \leq 0.05$).

شده‌اند. یافته‌های این آزمایش نشان دادند که غلظت بهینه برای تحریک رشد توسط سلنیم در ارقام گندم با همدیگر متفاوت است. اعمال سلنیم باعث افزایش گشودگی روزنه‌ها و میزان تعرق در گیاهان می‌شود (۳۱). البته کاربرد سلنیم در این آزمایش تغییر معنی‌داری در مقدار نسبی آب (RWC) که معیاری از روابط آبی گیاه محسوب می‌گردد، ایجاد نکرد.

بررسی مطالعات پیشین نشان می‌دهد که بیشترین تلاشها برای افزایش سلنیم گندم از طریق کاربرد سلنیم در خاک انجام شده است. بررسی‌های Dhillon و همکارانش (۱۴) نشان می‌دهد که کاربرد خاکی سلنیم در غلظت 1 mg kg^{-1} باعث انباشت چند برابری سلنیم در دانه ($2/4 \text{ mg DW}$) و در کاه ($19/6 \text{ kg}^{-1}$) می‌گردد. البته کاربرد مقادیر کمی از سلنیم در خاک ($0/2 \text{ mg kg}^{-1}$)، انباشت مقدار کمی از این عنصر را در دانه (1 mg kg^{-1})

از آنجایی که بیشترین سلنیم مورد نیاز انسان و حیوانات از طریق مصرف گیاهان جذب‌کننده سلنیم از خاک تأمین می‌شود (۷)، بنابراین تغذیه از گیاهان کاشته شده در این منطقه نمی‌تواند سلنیم مورد نیاز انسان را فراهم کند.

اولین بار Singh و همکارانش (۴۱) به اثرات مثبت سلنیم بر روی رشد گیاهان پی بردند و نشان دادند که کاربرد سلنیم بخوبی باعث تحریک رشد و افزایش وزن خشک گیاه *Brassica juncea* می‌شود. تحریک رشد تحت تأثیر کاربرد برگی سلنیم در علف چاودار (۲۶)، سیب زمینی (۴۳)، لوبیا (۱۵) و برگهای چای سبز (۲۷) به خوبی مورد مطالعه قرار گرفته است. همانطور که Yao و همکارانش (۴۶) نشان داده‌اند میزان بهبود رشد گندم توسط تغذیه سلنیمی به غلظت سلنیم اعمال شده بستگی دارد، در این پژوهش نیز مشخص گردید که غلظت $1/5$ و 10 میلی‌گرم سلنیم بترتیب در رقم زاگرس و چمران باعث بهبود رشد

نشان داد که اعمال غلظت‌های مختلف سلنیم باعث افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز در هر دو رقم مورد مطالعه شد. در گیاهان تنش‌های مختلف باعث افزایش تولید مولکول‌های ROS (Reactive oxygen species) از جمله H_2O_2 شده و این مولکول‌ها منجر به پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء می‌شوند و باعث ظهور اثرات منفی بر رشد و ساختار گیاه می‌گردند (۱) و (۳۹). نتایج این تحقیق نشان داد که در هیچ یک از تیمارهای سلنیمی مقدار \pm افزایش نیافته است (شکل ۴). به‌طوری‌که بررسی سیستم آنتی‌اکسیداتیو ارقام گندم در این تحقیق باعث حصول دو نتیجه مهم گردید: (۱) افزایش فعالیت سوپراکسید دیس موتاز و همزمان گلوکاتایون پراکسیداز با ممانعت از انباشت MDA شرایط را برای بهبود رشد گندم فراهم کردند و (۲) کاربرد سلنیم توان سیستم آنتی‌اکسیداتیو گندم را افزایش داد و در نتیجه می‌تواند در جهت بهبود مقاومت در برابر تنش‌های محیطی مورد استفاده قرار گیرد.

در یک نتیجه‌گیری کلی می‌توان عنوان کرد که با توجه به کمبود سلنیم خاک در شمال غرب ایران، غنی‌سازی سلنیمی محصولات زراعی برای مصارف غذایی انسان در این مناطق ضروری به نظر می‌رسد و از آنجایی که کاربرد برگی سلنیم نسبت به کاربرد خاکی سلنیم در مقادیر پایین‌تر مؤثرتری برای افزایش ذخیره سلنیم گندم محسوب می‌شود، از این روش می‌توان برای غنی‌سازی سلنیم غذاها استفاده کرد. همچنین به دلیل نقش کاربرد برگی سلنیم در افزایش توان سیستم آنتی‌اکسیدانت گیاه می‌توان به کشت گندم غنی شده از سلنیم و مقاوم به تنش‌ها در مناطق خشک و یا شور کشور مبادرت ورزید.

۰/۷۳۲)، کاه ($0/227 \text{ mg kg}^{-1} \text{ DW}$) و ریشه (mg DW) $1/375 \text{ kg}^{-1}$) به دنبال دارد (۱۶). نتایج این تحقیق نشان داد که کاربرد برگی غلظت‌های بالایی از سلنیم باعث انباشت این عنصر در مقادیر بالا در رقم زاگرس ($\text{mg kg}^{-1} \text{ DW}$) ۳/۵۶ در اندام هوایی و $1 \text{ mg kg}^{-1} \text{ DW}$ در دانه) و در رقم چمران ($2/70 \text{ mg kg}^{-1} \text{ DW}$) در اندام هوایی و $0/465$ در دانه) گردیده است. نتایج آزمایش نشان دادند که کاربرد برگی سلنیم در مقایسه با کاربرد مقادیر کمی از سلنیم در خاک ($0/2 \text{ mg kg}^{-1}$) باعث انباشت سلنیم بیشتر ولی در مقایسه با کاربرد مقادیر بیشتری از سلنیم در خاک (mg kg^{-1}) ۲/۴ باعث انباشت سلنیم کمتر شده است. به عبارت دیگر می‌توان بجای کاربرد خاکی سلنیم $0/2 \text{ mg kg}^{-1}$ از کاربرد برگی آن که روشی آسان و کم‌هزینه است، بهره برد. ولی برای رسیدن به مقادیر بالایی از انباشت سلنیم شبیه آنچه که در کاربرد خاکی $2/4 \text{ mg kg}^{-1}$ دیده می‌شود، روش کاربرد خاکی سلنیم مناسب‌تر است، برای اینکه کاربرد برگی حتی در غلظت‌های بالا نیز نمی‌تواند انباشت بیشتر از $4 \text{ mg kg}^{-1} \text{ DW}$ را موجب شود.

نتایج بررسی فعالیت آنزیم سوپراکسید دیس موتاز تحت تاثیر تیمار سلنیم در این تحقیق با یافته‌های Hartikainen و همکارانش (۲۶) و Djanaguiraman و همکارانش (۱۵) سازگار می‌باشد که افزایش فعالیت آنزیم SOD را پس از اعمال سلنیم در علف چاودار و لوبیا نشان دادند. کاتالاز یکی از آنزیم‌های مهم جاروکننده H_2O_2 محسوب می‌شود (۲). در گیاهان تیمار شده با سلنات، فعالیت آنزیم‌های مؤثر در حذف اثرات سمی H_2O_2 از جمله آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) و گلوکاتایون پراکسیداز (GSH-Px) افزایش می‌یابد ولی فعالیت کاتالاز متأثر نمی‌شود (۲۹ و ۳۹). در انطباق با یافته‌های فوق، نتایج ما

منابع

L. tinctorius) در شرایط تنش کم آبی. مجله زیست‌شناسی ایران. جلد ۲۶ شماره ۳ صفحات ۳۶۵-۳۵۲.

۱- بتول مهدوی، ب. مدرس ثانوی، س.ع. م. مجید آقا علیخانی، م. آ. و شریفی م. ۱۳۹۲. اثر غلظت‌های مختلف کیتوزان بر جوانه زنی بذر و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت گلرنگ (*Carthamus*).

شناسی ایران. جلد ۲۶ شماره ۲ صفحات ۱۶۷-۱۵۴.

- 3- Alam MZ, Haider SA, Paul NK (2006) Growth attributes of barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars in relation to sowing time. Bangladesh J. Bot. 35(2): 185-187.
- 4- Behne D, Kyriakopoulos A (2001) Mammalian selenium-containing proteins. Annu. Rev. Nutr. 21: 453-473.
- 5- Boominathan R, Doran PM (2002) Ni induced oxidative stress in roots of the Ni hyperaccumulator, *Alyssum bertoloni*. New Phytol. 156: 202-205.
- 6- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.
- 7- Broadley MR, Whit PJ, Bryson RJ, Meacham MC, Bowen HC, Johnson SE, Hawkesford MJ McGrath SP, Zhao FJ, Breward N, Harriman M, Tucker M (2006) Biofortification of UK food crops with selenium. P Nutr Soc. 65: 169-181.
- 8- Cartes P, Gianfreda L, Mora ML (2005) Uptake of selenium and its antioxidant activity in ryegrass when applied as selenate and selenite forms. Plant Soil. 276: 359-367.
- 9- Cartes P, Jara AA, Pinilla L, Rosas A, Mora ML (2010) Selenium improves the antioxidant ability against aluminium-induced oxidative stress in ryegrass roots. Ann. Appl. Biol. 156: 297-307.
- 10- Chance B, Maehly AC (1995) Assays of catalases and peroxidases. Methods Enzymol. 2: 764-775.
- 11- Chen L, Yang F, Xu J, Hu Y, Hu Q, Zhang Y, Pan G (2002) Determination of selenium concentration of rice in China and effect of fertilization of selenite and selenate on selenium content of rice. J Agr Food Chem. 50: 5128-5130.
- 12- Clark LC, Dalkin B, Krongrad A, Combs GF, Trunbull BW, Slate EH, Witherington R, Herlong JH, Janosko E, Carpenter D, Borosso C, Falk S, Rounder J (1998) Decreased incidence of prostate cancer with selenium supplementation: results of a double-blind cancer prevention trial. Br. J. Urol. 81: 730-734.
- 13- Combs GF (2001) Selenium in global food systems. Br J Nutr. 85: 517-547.
- 14- Dhillon KS, Dhillon SK (2000) Selenium accumulation by sequentially grown wheat and rice as influenced by gypsum application in a seleniferous soil. Plant Soil. 227: 243-248.
- 15- Djanaguiraman M, Devi DD, Shanker AK, Sheeba A, Bangarusamy U (2005) Selenium-an antioxidative protectant in soybean during senescence. Plant Soil. 272: 77-86.
- 16- Ducsay L, Ložek O, Varga L (2009) The influence of selenium soil application on its content in spring wheat. Plant Soil Environ. 55: 80-84.
- 17- Flohé L, Günzler WA (1984) Methods in Enzymology. In: Packer L (ed), Assays of glutathione peroxidase, Academic Press, New York, pp 114-121.
- 18- Fordyce F (2005) Selenium deficiency and toxicity in the environment. In: Essentials of Medical Geology, London: Elsevier, pp 373-415.
- 19- Germ M, Stibilj V, Osvald J, Kreft I (2007) Effect of selenium foliar application on chicory (*Cichorium intybus* L.). J Agr Food Chem. 55: 795-798.
- 20- Giannopolitis CN, Ries SK (1977) Superoxide dismutase: occurrence in higher plants. Plant Physiol. 59: 309-314.
- 21- Gissel-Nielsen G, Gupta UC, Lamand M, Westermarck T (1984) Selenium in soils and plants and its importance in livestock and human nutrition. Adv. Agron. 37: 397-461.
- 22- Gunez A, Inal A, Bagci EG, Pilbeam DJ (2007) Silicon-mediated changes of some physiological and enzymatic parameters symptomatic for oxidative stress in spinach and tomato grown in sodic-B toxic soil. Plant Soil. 290: 103-114.
- 23- Habibi G (2013) Effect of drought stress and selenium spraying on photosynthesis and antioxidant activity of spring barley. Acta Agric. Sloven. 101(1): 167-177.
- 24- Habibi G, Hajiboland R (2011) Comparison of water stress and UV radiation effects on the induction of CAM and antioxidative defense in the succulent *Rosularia elymaitica* (Crassulaceae). Acta Biol Cracov Bot. 53: 7-15.
- 25- Habibi G, Hajiboland R (2012) Comparison of photosynthesis and antioxidative protection in *Sedum album* and *Sedum stoloniferum* (Crassulaceae) under water stress. Photosynthetica. 50 (4): 508-518.

- 26- Hartikainen H, Xue T, Piironen V (2000) Selenium as an antioxidant and prooxidant in ryegrass. *Plant Soil*. 225: 193-200.
- 27- Hu QH, Xu J, Pang GX (2003) Effect of selenium on the yield and quality of green tea leaves harvested in early spring. *J. Agric. Food Chem*. 51: 3379-3381.
- 28- Koivistoinen P, Huttunen JK (1986) Selenium in food and nutrition in Finland. An overview on research and action. *Ann. Clin. Res.* 18: 13-17.
- 29- Kong L, Wang M, Bi D (2005) Selenium modulates the activities of antioxidant enzymes, osmotic homeostasis and promotes the growth of sorrel seedlings under salt stress. *Plant Growth Regul.* 45: 155-163.
- 30- Kosar F, Sahin I, Taskapan C, Kucukbay Z, Gullu H, Taskapan H, Cehreli S (2006) Trace element status (Se, Zn, Cu) in heart failure. *Anadolu Kardiol Derg.* 6: 216-220.
- 31- Kuznetsov VV, Kholodova VP, Kuznetsov VIV, Yagodin BA (2003) Selenium regulates the water status of plants exposed to drought. *Dokl Biol Sci.* 390: 266-268.
- 32- Lara MV, Disante KB, Podesta FE, Andreo C, Drincovich MF (2003) Induction of a Crassulacean acid like metabolism in the C₄ succulent plant, *Portulaca oleracea* L.: physiological and morphological changes are accompanied by specific modifications in phosphoenolpyruvate carboxylase. *Photosynth Res.* 77: 241-254.
- 33- Liu KL, Gu ZX (2009). Selenium accumulation in different brown rice cultivars and its distribution in fractions. *J. Agri. Food Chem.* 57: 695-700.
- 34- Lyons GH, Stangoulis JCR, Graham RD (2004) Exploiting micronutrient interaction to optimize biofortification programs: The case for inclusion of selenium and iodine in the Harvest-Plus program. *Nutr Rev.* 62: 247-252.
- 35- Lyons G, Ortiz-Monasterio I, Stangoulis J, Graham R (2005) Selenium concentration in wheat grain: Is there sufficient genotypic variation to use in breeding? *Plant Soil.* 269: 269-380.
- 36- Lyons G, Stangoulis J, Graham R (2003) High-selenium wheat: biofortification for better health. *Nutr Res Rev.* 16: 45-60.
- 37- Nazemi L, Nazmara Sh, Eshraghyan MR, Younesian M, Sereshti H, Moameni A, Shahtaheri J, Nasserli S (2010) Selenium concentration in soil of Iran. 19th World congress of soil science, soil solutions for a changing world, Brisbane, Australia.
- 38- Rayman MP (1997) Dietary selenium: time to act - low bioavailability in Britain and Europe could be contributing to cancers, cardiovascular disease, and subfertility. *Brit Med J.* 314: 387-388.
- 39- Rios JJ, Blasco B, Cervilla LM, Rosales MA, Sanchez-Rodriguez E, Romero L, Ruiz JM (2009) Production and detoxification of H₂O₂ in lettuce plants exposed to selenium. *Ann. Appl. Biol.* 154: 107-116.
- 40- Simon LM, Fatrai Z, Jonas DE, Matkovic B (1974) Study of peroxide metabolism enzymes during the development of *Phaseolus vulgaris*. *Biochem. Physiol. Pflanzen (BPP).* 166: 387-392.
- 41- Singh M, Singh H, Bhandari DK (1980) Interaction of selenium and sulphur on the growth and chemical composition of raya. *Soil Sci.* 129: 238-244.
- 42- Tamaoki M, Freeman JL, Pilon-Smits EAH (2008) Cooperative ethylene and jasmonic acid signaling regulates selenite resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 146: 1219-1230.
- 43- Turakainen M, Hartikainen H, Seppänen MM (2004) Effects of selenium treatments on potato (*Solanum tuberosum* L.) growth and concentrations of soluble sugars and starch. *J Agr Food Chem.* 52: 5378-5382.
- 44- Xue T, Hartikainen H, Piironen V (2001) Antioxidative and growth-promoting effect of selenium in senescing lettuce. *Plant Soil.* 237: 55-61.
- 45- Walaa AE, Shatlah MA, Atteia MH, Srour HAM (2010) Selenium induces antioxidant defensive enzymes and promotes tolerance against salinity stress in cucumber seedlings (*Cucumis sativus*). *Arab Univ. J. Agric. Sci.* 18: 65-76.
- 46- Yao X, Chu J, Wang G (2009) Effects of selenium on wheat seedlings under drought stress. *Biol. Trace Elem. Res.* 130: 283-290.
- 47- Yao X, Chu J, He X, Ba C (2011) Protective role of selenium in wheat seedlings subjected to enhanced UV-B radiation. *Russ. J. Plant Physiol.* 58(2): 283-289.
- 48- Yao XQ, Chu JZ, Ba CJ (2010) Antioxidant responses of wheat seedlings to exogenous selenium supply under enhanced ultraviolet-B. *Biol. Trace Element Res.* 136(1): 96-105.

The effect of foliar application of Se on growth, antioxidant defense and grain concentration of Se in two cultivars of spring wheat plants

Habibi G.

Biology Dept., Payame Noor University, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

In this study, the influence of foliar application of different concentration of Na_2SeO_3 (1.5, 10 and 100 mg l^{-1}) on some physiological parameters in *Triticum aestivum* L. was investigated in two cultivars of spring wheat. The results indicated that application of selenium (Se) increased biomass accumulation in *Zagros* and *Chamran* cultivars. The highest content of Se accumulation in grain (1.01 mg kg^{-1} DW in *Zagros* and 0.465 mg kg^{-1} DW in *Chamran*) was detected under application of 10 mg Se l^{-1} . Concentrations of malondialdehyde (MDA) and hydrogen peroxide (H_2O_2) remained unchanged in Se-supplemented plants obviously because of an efficient scavenging following significant enhancement of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) activities. These results suggest that foliar application of 10 mg l^{-1} Se alleviates oxidative stress and causes a significantly higher growth rate in both cultivars. In addition, our results indicated that Se can be used for biofortification of wheat grains which thus, leads to increasing dietary Se intake in human.

Key words: Antioxidant enzymes, selenium foliar application, glutathione peroxidase, wheat