

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

قادر حبیبی^{۱*}، پروین قربانزاده^۲ و معصومه عابدینی^۳

* 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 پذیرش: آذر ۱۳۹۴

تاریخ اصلاح نهایی: آبان ۱۳۹۴

تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۹۳

چکیده

در این تحقیق، تأثیر کاربرد غلظت‌های مختلف سلنات سدیم (۰/۱، ۱ و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر) در محیط کشت هیدروپونیک و کاربرد برگ‌گی 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 افت 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 برگ‌گی توانست مقدار سلنیوم دانه و شاخساره و بیومس شاخساره را افزایش دهد. همچنین کاربرد برگ‌گی سلنیوم توانست باعث افزایش فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیا لیاز و افزایش غلظت فنل‌ها به‌عنوان ترکیب‌های آنتی‌اکسیدان، در برگ‌ها شود. نتایج این تحقیق نشان داد که محلول‌پاشی برگ‌گی 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 آمونیا لیاز، کاتالاز.

مقدمه

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).

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

است که غلظت‌های بالای سلیوم، بیشتر گروه تیول احیاء موجود در سلول‌های گیاهی را در جهت جذب و تحلیل سلیوم 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 سلیوم در شاخساره گیاهان غیرانباشته‌گر تحقیقات زیادی انجام شده است. البته غلظت‌های بکاررفته سلیوم برای تخفیف تنش‌های مختلف در محدوده 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 سلیوم 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 سلیوم را به‌صورت اسپری برگ‌ها بکار برده‌اند. در نتیجه محدوده غلظت بکاررفته در گونه‌های مختلف غیرانباشته‌گر سلیوم دارای انعطاف بالایی می‌باشد.

با توجه به اینکه تحقیقات درباره اثرات سلیوم بر روی گیاهان تیره نعناع که گیاهان غیرانباشته‌گر سلیوم می‌باشند، اندک است، از این‌رو گیاه بادرنجبویه به‌عنوان گونه گیاه دارویی مهم (Moradkhani *et al.*, 2010) از خانواده نعناع و نسبتاً حساس به سلیوم برای این تحقیق انتخاب شد. در این تحقیق فرض می‌شود که کاربرد سلیوم به شکل سلتات در غلظت‌های اندک بتواند علاوه بر بهبود رشد باعث تقویت ظرفیت آنتی‌اکسیدانت و غلظت فنل و افزایش مقدار سلیوم در مرحله رویشی و زایشی بادرنجبویه شود. برای این منظور از دو شکل کاربرد سلیوم شامل کاربرد ریشه‌ای از طریق افزودن غلظت‌های مختلف سلیوم به محیط کشت هیدروپونیک و کاربرد برگ‌ها 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.

البته میزان جذب سلیوم 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 سلیوم بستگی دارد (de Souza *et al.*, 2002; Wu, 2004). با افزایش غلظت یون کلسیم در خاک، جذب سلیوم افزایش می‌یابد، در حالی‌که افزایش سولفات باعث مهار جذب سلتات خواهد شد. از طرف دیگر برخی گیاهان با تولید ترکیب‌های فرار سلیوم‌دار باعث حذف سلیوم از محیط می‌شوند. گیاهان از نظر میزان ذخیره عنصر سلیوم به دو گروه انباشته‌گر و غیرانباشته‌گر تقسیم می‌شوند. بیشتر گیاهان خانواده Brassicaceae سلیوم را در مقادیر بالا در اندام‌های خود ذخیره می‌کنند (Łabanowska *et al.*, 2012). برای افزایش جذب سلیوم در گیاهان غیرانباشته‌گر مثل کاهو استفاده از سلتات در غلظت‌های کم مناسب‌تر است، زیرا باعث افزایش مقدار سلیوم بافت‌ها شده و منجر به تحریک رشد می‌شوند (Ramos *et al.*, 2010). در این گیاه سلیوم در غلظت‌های پایین به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان عمل می‌کند و رشد گیاه را افزایش می‌دهد. ولی در سطوح بالاتر بازده گیاه را کاهش می‌دهد.

سلیوم 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 سمی دارد. تأثیر کاربرد سلیوم در غلظت‌های پایین در تخفیف تنش‌های محیطی شامل تنش فلزات سنگین (Cartes *et al.*, 2010؛ Djanaguiraman *et al.*, 2010)، تنش شوری و خشکی (Habibi, Hasanuzzaman & Fujita, 2011) و پرتو فرابنفش (Yao *et al.*, 2010; 2011) به اثبات رسیده است. ولی کاربرد سلیوم 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 سلیوم، نحوه کاربرد و نوع گونه گیاهی در بروز علائم سمیت حاصل از سلیوم مؤثر می‌باشند. یکی از سازوکارهای سمیت سلیوم در گیاهان این

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 آب مقطر 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 آب مقطر 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 شمال غرب 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 به صورت NH_4NO_3 (100 kg ha^{-1})، فسفر و پتاسیم به صورت KH_2PO_4 (50 kg ha^{-1}) اضافه شدند. خاک مزرعه ماسه‌ای لومی با $\text{EC} = 1/0.3 \pm 0/28 \text{ dS m}^{-1}$ 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 850 ± 50 میکرومول/مترمربع در ثانیه، دوره 14 ± 2 ساعت روشنایی و 10 ± 2 ساعت تاریکی، رطوبت روز 70 ± 5 و شب 75 ± 3 ٪ و دمای روز $24 \pm 4/4$ و شب 18 ± 3 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 به صورت مشابه باعث افزایش توده ساقه و مقدار سلنیوم ساقه می‌شوند، 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 محلول پاشی 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)، نمونه‌های برگ و ساقه برای اندازه‌گیری پارامترهای رشد و مقدار سلنیوم اندام هوایی برداشت شدند و برای سنجش فعالیت آنزیم‌ها و

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 130°C به مدت یک ساعت هضم شدند. پس از خنک شدن، ۵ml اسید کلریدریک غلیظ اضافه شده و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای 115°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 XL₂, 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 به وسیله 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

نین‌هیدرین در ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانل) اضافه گردید و ۷-۴ دقیقه در دمای ۷۰-۱۰۰ 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).

برای سنجش فلاونوئیدها نمونه‌های برگ در متانول حاوی آلومینیوم کلرید ۲٪ استخراج شده و پس از سانتریفوژ، روشن‌آور 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 $\text{mg quercetin g}^{-1} \text{FW}$ محاسبه شد (Sarikurkcü *et al.*, 2008).

سنجش اسیدآمینوهای آزاد

برای سنجش غلظت کل اسیدآمینوهای آزاد، نمونه‌ها در بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار ($\text{pH}=6/8$) همگن و استخراج شده و بعد از سانتریفوژ بر روی نمونه‌های روشن‌آور معرف نین‌هیدرین (محلول ۱:۵ رقیق شده از ۳۵۰ میلی‌گرم

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

Doran و Boominathan (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٪ تیوباربتیوریک 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 به سرعت 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 $\text{nmol g}^{-1} \text{FW}$ محاسبه شد.

سنجش فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیاپاز

فعالیت فنیل‌آلانین آمونیاپاز (PAL) مطابق روش Zucker (۱۹۶۵) مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. ابتدا عصاره آنزیمی در بافر ۵۰mM بافر سدیم فسفات با $\text{pH}=7/8$ 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 ($\text{pH}=8/8$) و ۵mM L-فنیل‌آلانین اضافه شده و مخلوط حاصل به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه به منظور 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

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 HEPES با $\text{pH}=7/8$ 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 $\text{pH}=7/6$ ، EDTA ۰/۱mM، Na_2CO_3 ۵۰mM، L-متیونین، ۱۲mM ($\text{pH}=10/2$)، NBT ۷۵ μM و ۱ μM ریبوفلاوین اضافه شده و مخلوط حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در شدت نور تقریباً ۸۰۰۰ لوکس به منظور 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 به صورت $\text{Unit mg}^{-1} \text{protein}$ 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 $\text{pH}=7$ 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 ($\text{pH}=7$) و ۱۰mM 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 ($\text{cm}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein min}^{-1}$) برحسب $0/04 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ محاسبه شد.

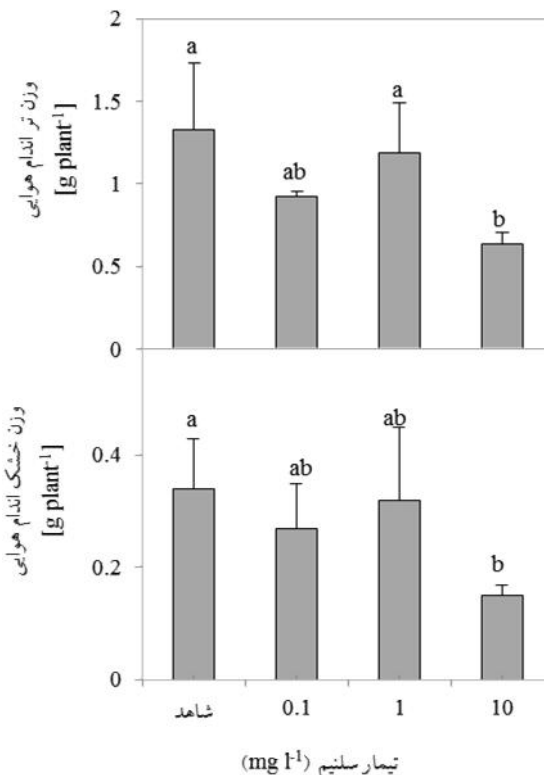
سنجش مالون دی‌آلدئید (MDA) به‌عنوان معیاری برای بررسی میزان پراکسیداسیون لیپیدها بر اساس روش

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 روش Bradford (۱۹۷۶) استفاده گردید.

بررسی آماری نتایج

آزمایش‌ها به صورت طرح کاملاً تصادفی طرح‌ریزی و اجرا شد. هر تیمار دارای ۴ تکرار مستقل بود. میانگین و انحراف معیار (SD) داده‌ها و همچنین رسم نمودارها به وسیله نرم‌افزار Excel 2007 انجام شد. برای گروه‌بندی میانگین‌ها نیز از نرم‌افزار Sigma stat 3.5 با آزمون Tukey در سطح احتمال $P = 0/05$ استفاده گردید.

(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 آب مقطر 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 به صورت میلی‌گرم اسید گالیک در گرم بافت بیان شد.



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).

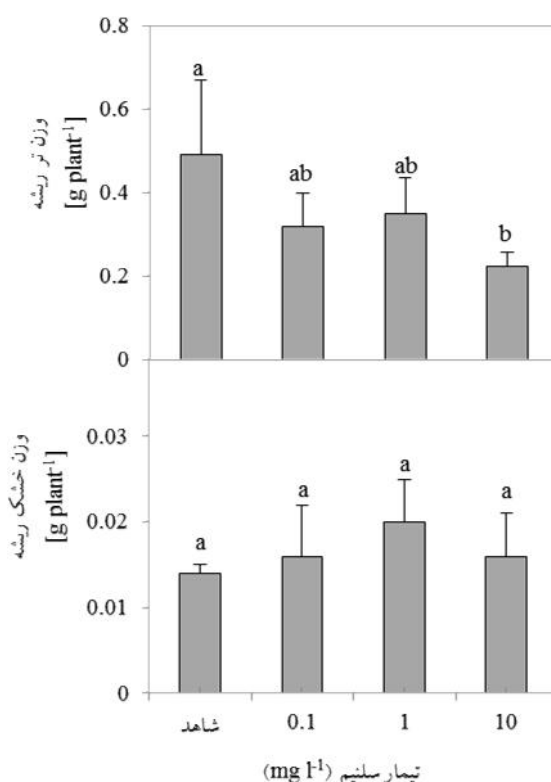
نتایج

آزمایش هیدروپونیک

در آزمایش هیدروپونیک، سلینیوم در غلظت‌های اندک تغییر معنی‌داری در وزن تر و خشک اندام هوایی ایجاد نکرد ولی کاربرد ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر سلینیوم 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 سلینیوم در مقایسه با تیمار شاهد معنی‌دار نبود.

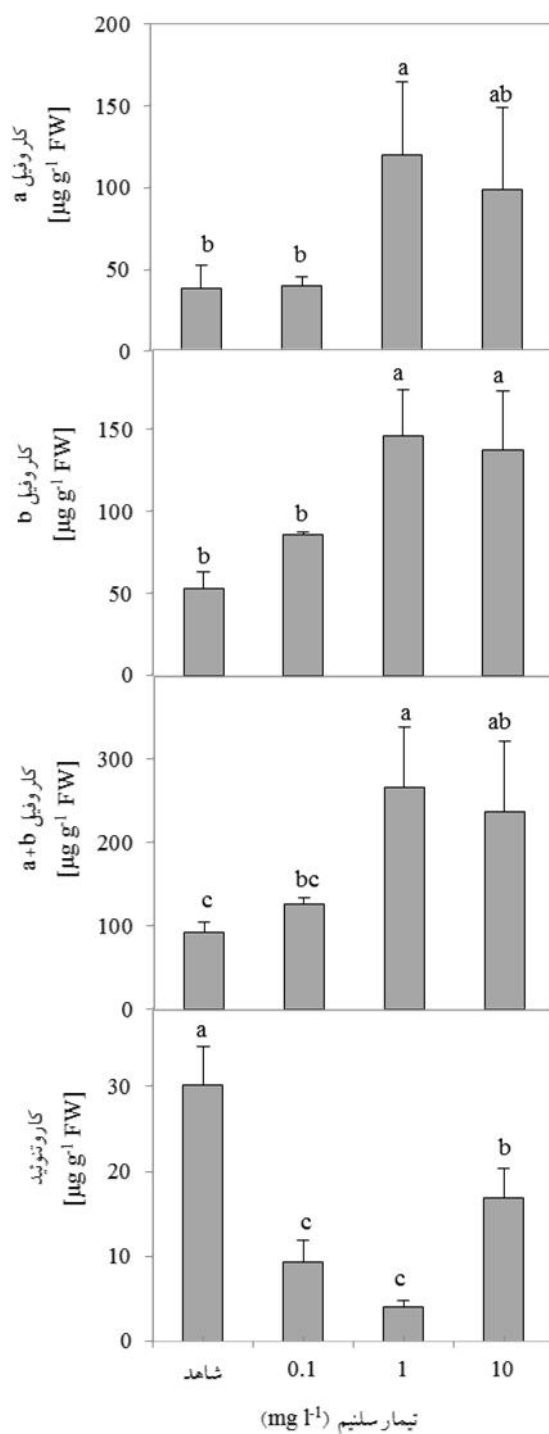
غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر سلینیوم باعث کاهش معنی‌دار وزن تر ریشه گردید ولی بر وزن خشک اثر نداشت (شکل ۲). البته کاهش میزان وزن تر ریشه پس از کاربرد ۰/۱ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر سلینیوم در مقایسه با تیمار شاهد معنی‌دار نبود.



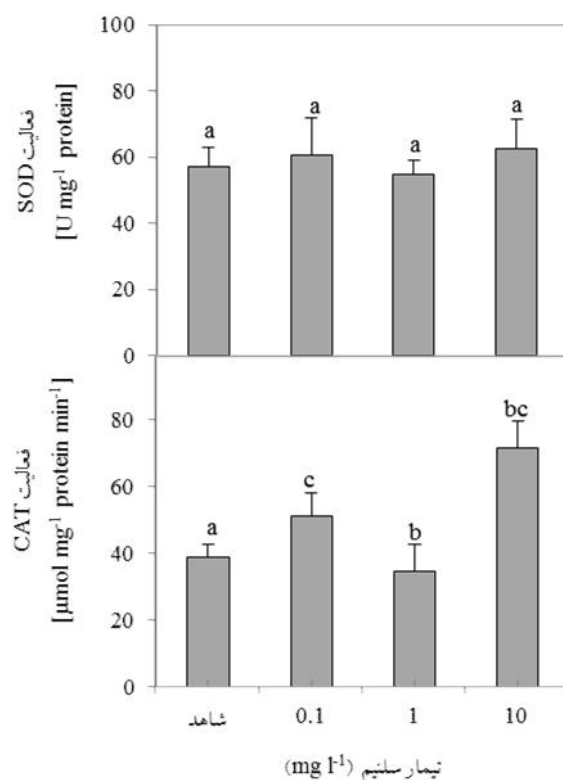
شکل ۲- میزان وزن تر و خشک ریشه بادرنجبویه در محیط کشت هیدروپونیک پس از چهار هفته رشد میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک باشند در سطح ۹۵٪ با آزمون توکی با یکدیگر اختلاف معنی‌داری ندارند (n=۱۰).

(شکل ۳). کاربرد سلینیوم در غلظت‌های مختلف در محیط ریشه باعث کاهش معنی‌دار غلظت رنگیزه کاروتنوئید برگها شد (شکل ۳).

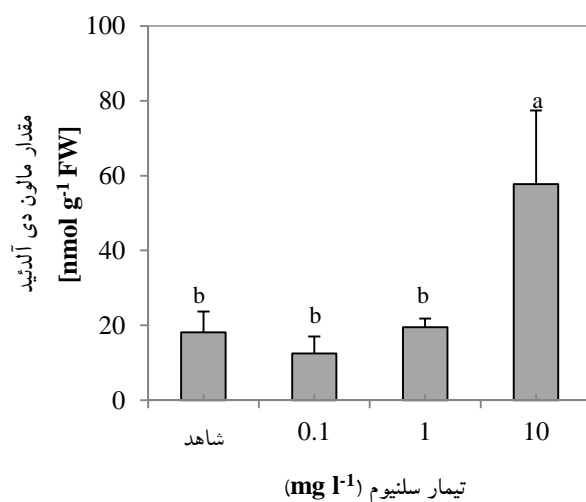
تیمار ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر سلینیوم نتوانست باعث افزایش معنی‌دار غلظت کلروفیل *a* و *b* نسبت به تیمار شاهد شود. با افزایش غلظت سلینیوم بکار رفته، غلظت کلروفیل *a* و *b* و کلروفیل کل افزایش معنی‌دار نشان داد



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).



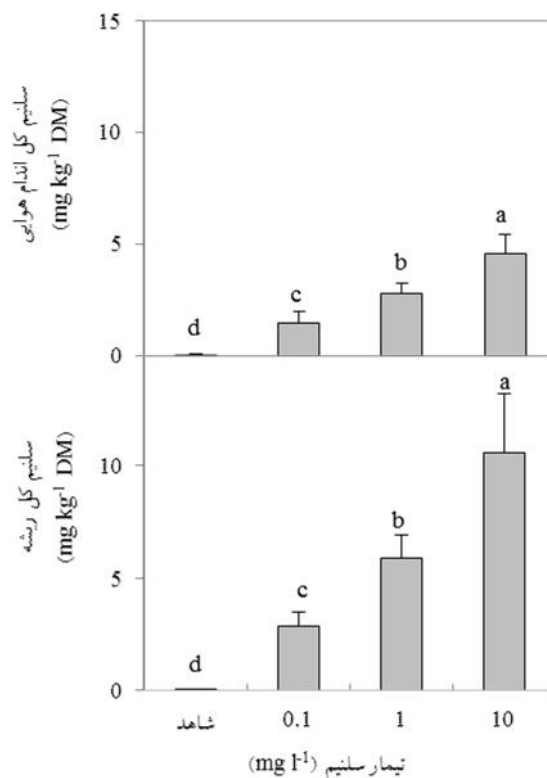
شکل ۴- فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در برگهای بادرنجبویه در محیط کشت هیدروپونیک پس از چهار هفته رشد میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک باشند در سطح ۹۵٪ با آزمون توکی با یکدیگر اختلاف معنی‌داری ندارند (n=۴).



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).

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

کاربرد سلیوم تغییری در فعالیت آنزیم سوپراکسید دیس موتاز ایجاد نکرد. فعالیت آنزیم کاتالاز تنها در تیمار ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر سلیوم 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 سلیوم در محیط کشت باعث افزایش معنی‌دار این متابولیت شده و سایر غلظت‌های سلیوم، شاخص پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء را تغییر نداده‌اند (شکل ۵). افزودن سلیوم به محیط ریشه باعث افزایش معنی‌دار



شکل ۶- غلظت سلیوم 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).

که کاربرد سلیوم باعث افزایش معنی‌دار وزن خشک اندام هوایی شد. رشد ریشه تحت تأثیر تیمار سلیوم قرار نگرفت. تیمار سلیوم نتوانست تغییر معنی‌داری در غلظت رنگیزه‌های

آزمایش مزرعه
بررسی نتایج آزمایش کاربرد برگی سلیوم در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر در محیط مزرعه در گیاه بادرنجبویه نشان داد

بادرنجبویه با سلنیوم نتوانست تغییر معنی‌داری در فعالیت آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز و غلظت مالون دی‌آلدئید ایجاد کند.

فتوستنتزی 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

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

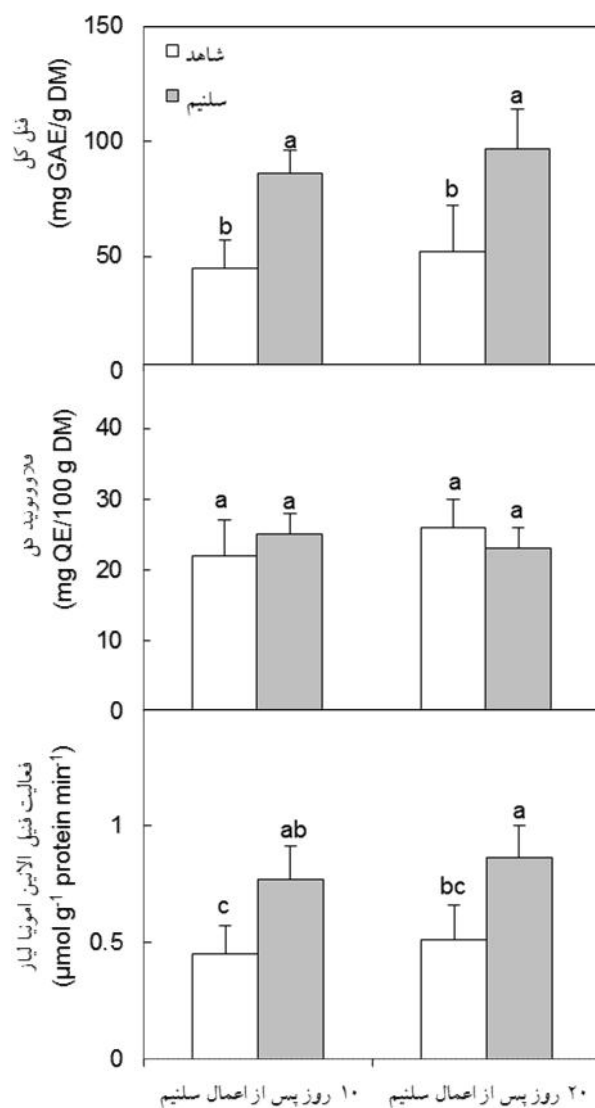
شاخص	شاهد	سلنیوم (۱۰ میلی‌گرم)
وزن تر ساقه (g plant^{-1})	۱۴/۷۸±۴/۵۰ a	۱۶/۶۳±۱/۳۰ a
وزن خشک ساقه (g plant^{-1})	۳/۱۲±۰/۵۰ b	۴/۱۰±۰/۴۴ a
وزن تر ریشه (g plant^{-1})	۱/۲۶±۰/۵۱ a	۱/۰۸±۰/۱۹ a
وزن خشک ریشه (g plant^{-1})	۰/۴۱±۰/۱۴ a	۰/۴۹±۰/۰۲ a
کلروفیل a ($\mu\text{g g}^{-1} \text{FW}$)	۲۹۹±۱۰/۶ a	۳۰۱±۱۰/۴ a
کلروفیل b ($\mu\text{g g}^{-1} \text{FW}$)	۱۷۶±۲۰/۵ a	۱۷۰±۲۹/۵ a
کلروفیل $(a+b)$ ($\mu\text{g g}^{-1} \text{FW}$)	۴۷۶±۲۹/۰ a	۴۶۰±۲۹/۰ a
کاروتنوئید ($\mu\text{g g}^{-1} \text{FW}$)	۱۹/۵±۳/۶۰ a	۲۱/۶±۴/۱۳ a
اسید آمینه کل ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{FW}$)	۲۲/۵±۴/۵۰ b	۴۱/۲±۸/۵۰ a
فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز ($\text{U mg}^{-1} \text{protein}$)	۳۴/۱±۴/۳۰ a	۳۸/۹±۵/۶۳ a
فعالیت آنزیم کاتالاز ($\mu\text{mol mg}^{-1} \text{protein min}^{-1}$)	۱۷/۰۸±۲/۸۰ a	۲۰/۷±۷/۲۳ a
مالون دی‌آلدئید ($\text{nmol g}^{-1} \text{FW}$)	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 ($n=10$).

آنها انباشته شده است. برداشت‌هایی که ۱۰ و ۲۰ روز پس از محلول‌پاشی انجام شدند، نشان دادند که سلنیوم به تدریج توسط ساقه جذب و در آنها انباشته شده است، به طوری 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 شده است، به طوری که افزایش مقدار انباشت عنصر در تیمار سلنیوم بیش از سه برابر شاهد بود (شکل ۹).

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

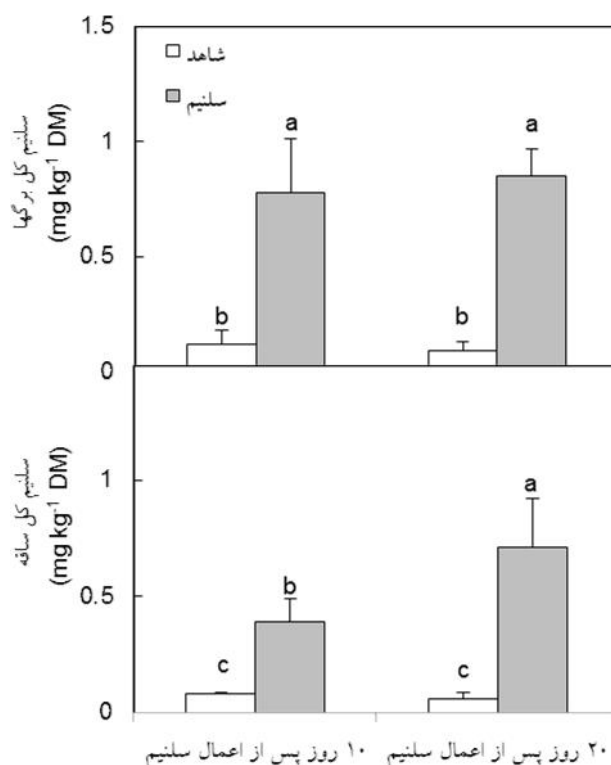
کاربرد برگ‌گی سلنیوم در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر باعث انباشت معنی‌دار عنصر سلنیوم در ساقه شد. برداشت‌هایی که ۱۰ و ۲۰ روز پس از محلول‌پاشی انجام شد نشان داد که سلنیوم به سرعت توسط برگ‌ها جذب و در



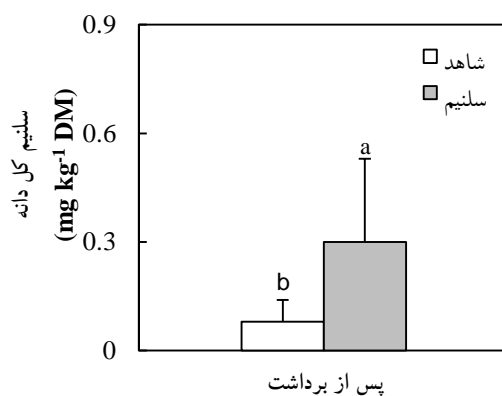
شکل ۷- فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز، غلظت فلاونوئید و فنل کل بادرنجبویه

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).



شکل ۸- غلظت سلیوم 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 سلیوم کل در بذره‌های 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

کشت هیدروپونیک برای گیاه بادرنجبویه قابل تحمل نمی‌باشد. در بیشتر گیاهانی که شبیه بادرنجبویه نمی‌توانند سلیوم را در مقادیر بالا انباشته کنند (گیاهان غیرانباشته‌گر)،

در این تحقیق، مهار رشد در تیمار ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر سلیوم نشان داد که کاربرد این غلظت از سلیوم در محیط

این تحقیق نشان داد که کاربرد برگی سلیوم 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 سلیوم از طریق ریشه، برای بادرنجبویه سمی 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 سمیت سلیوم کافی نبوده است، در نتیجه غشاها دچار پراکسیداسیون شده و مقدار زیادی مالون دی‌آلدئید تولید شده است.

بررسی سلیوم کل برگ و ریشه در این تحقیق نشان داد که مقدار بیشتری از سلیوم 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 سلیوم جذب شده در ریشه به ساقه منتقل می‌شود، مطابقت دارد. انباشت سلیوم در بافت‌های بادرنجبویه پس از کاربرد سلیوم در غلظت‌های اندک در محیط هیدروپونیک نشان داد که استفاده از غلظت‌های اندک سلیوم برای غنی‌سازی مناسب‌اند. این نتیجه با یافته‌های Ramos و همکاران (۲۰۱۰) در گیاه کاهو که انباشت مناسب سلیوم در بافت‌های گیاهان تغذیه شده با غلظت‌های اندک سلیوم 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 سلیوم بر بهبود

غلظت‌های بالای سلیوم باعث بروز سمیت 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-Diao et al., 2014) و گندم (Nawaz et al., 2015) کمترین غلظت بکار رفته محسوب می‌شود، سلیوم 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 سلیوم نسبت داد.

اگرچه در تطابق با تحقیق انجام شده روی کلم، غلظت رنگیزه‌های فتوسنتزی در تیمارهای سلیومی بادرنجبویه افزایش نشان داد ولی غلظت کاروتنوئیدهای برگ در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر سلیوم، 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 سلیوم، احتمالاً با افزایش آسیب به فتوسیستم فتوسنتزی و ایجاد تنش اکسیداتیو حاصل از مهار نوری مرتبط است.

هر چند سازوکار تأثیر سلیوم بر رشد گیاه به‌طور کامل مشخص نیست ولی افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن در غلظت‌های بالای سلیوم در گیاهان مختلف نشان داده شده است (Malik et al., 2012). یکی از عوامل افت رشد در تیمار ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر سلیوم در محیط هیدروپونیک در این تحقیق، افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن بود که از طریق افزایش مالون دی‌آلدئید مشخص گردید. نتایج

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 سلیوم از طریق ریشه، برای بادرنجبویه سمی 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 سمیت سلیوم 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 سلیوم در مزرعه با افزایش فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیا‌لیاز، مقدار فنل کل را افزایش داد. کاربرد برگی سلیوم در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر در شرایط مزرعه باعث افزایش مقدار آنتی‌اکسیدان‌های برگی از جمله فنل‌ها و افزایش مقدار سلیوم شاخساره و دانه شد. بنابراین توصیه می‌شود در تحقیقات بعدی مقدار سلیوم 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 hyperaccumulator, *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

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 سلیوم (کاربرد برگی یا از طریق ریشه) تأثیر زیادی در نحوه اثرگذاری سلیوم دارد. در تحقیقات اخیر نیز مشخص شده است که تأثیر سلیوم بستگی زیادی به گونه، شرایط کاربرد و غلظت کاربرد دارد (Feng et al., 2013).

بررسی فعالیت آنزیم کلیدی سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در تیمار سلیومی نشان داد که اعمال تیمار سلیومی نتوانست باعث تغییر در فعالیت این آنزیم‌ها شود. به طوری 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 سلیوم 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. اخیراً تأثیر اعمال سلیوم بر متابولیسم فنلی توسط Elguera و همکاران (۲۰۱۳) مورد مطالعه قرار گرفته است. در بررسی این گروه مشخص شده است که اعمال سلیوم می‌تواند باعث تحریک انباشت ترکیب‌های فنلی گردد. در انطباق با یافته بالا، نتایج این تحقیق نشان داد که اعمال سلیوم 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 سلیومی و از جمله در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر، تیمار ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر سلیوم باعث کاهش رشد شد. دلیل این امر می‌تواند به کاهش غلظت کاروتنوئید در تیمار ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر سلیوم و در نتیجه احتمال افزایش آسیب به فتوسنتزها و

- 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 requirements of different plant species. *Plant Soil*, 8: 337-353.
 - Łabanowska, M., Filek, M., Kościelniak, J., Kurdziel, M., Kuliś, 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 antagonizes 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), *Crucifera 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. Molecular 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

- Turkey: *Lactarius deterrimus*, *Suillus collitinus*, *Boletus edulis*, *Xerocomus chrysenteron*. *Bioresource Technology*, 99: 6651-6655.
- Simon, L.M., Fatrai, Z., Jonas, D.E. and Matkovic, 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 H₂O₂ 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-

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

Gh. Habibi^{1*}, P. Ghorbanzade² and M. Abedini²

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) Na₂SeO₃ 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.