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 غلظت های مختلف سلنات سدیم (۱/۵، ۱۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر) بر روی برخی از ویژگی های فیزیولوژیکی گندم (*Triticum aestivum* L.) بهاره مورد مطالعه قرار گرفت. کاربرد سلنیم باعث افزایش وزن خشک اندام هوایی رقم های زاگرس و چمران شد. بیشترین مقدار انباشت سلنیم در دانه های گندم (۱/۰۱ $mg\ kg^{-1}$ DW در زاگرس و ۰/۴۶۵ در چمران) مربوط به تیمار ۱۰ $mg\ Se\ l^{-1}$ بود. بدلیل فعالیت مؤثر آنزیم‌های سوپر اکسید دیس موتاز (SOD) و گلوتاتیون پراکسیداز (GSH-Px) در گیاهان تیمار شده با سلنیم، از انباشت مالون دی آلدئید (MDA) و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) در بافت های گندم ممانعت شد. نتایج فوق نشان دادند که اسپری برگی سلنیم در غلظت ۱۰ $mg\ l^{-1}$ از یک طرف باعث تخفیف تنش اکسیداتیو و در نتیجه افزایش معنی دار رشد می شود و از طرف دیگر می تواند باعث بهبود غنی سازی گندم با سلنیم شده و گندم را به بسته غذایی سرشار از سلنیم تبدیل کند.

واژه‌های کلیدی: آنزیم های آنتی اکسیدانت، کاربرد برگی سلنیم، گلوتاتیون پراکسیداز، گندم

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

مقدمه

سلنیم یک عنصر ضروری برای گیاهان به حساب نمی آید ولی مقادیر اندک آن برای رشد و نمو طبیعی پستانداران لازم است (۱۲). سلنیم یک آنتی اکسیدانت مناسب برای انسان به حساب می آید و در محیط هایی که سلنیم کافی وجود دارد میزان مرگ و میر حاصل از انواع سرطان ها و بیماریهای قلبی کاهش می یابد. احتمالا بیشتر اثرات مفید سلنیم مربوط به فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز می باشد (۴). میزان سلنیمی که هر انسان در یک روز نیاز دارد حدود ۷۵ میکروگرم است. مقدار سلنیمی که توسط افراد مصرف می شود کمتر از این مقدار بوده و ۴۰-۳۰ 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 بیشینه سازی مهار خطر سرطان و ظهور اثرات مفید سلنیم مورد نیاز می باشد (۱۳).

مناسب ترین 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 می آید. 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 خاک ها سنجش نشده اند و در نتیجه بسیاری از افراد از مقادیر اندک سلنیم بهره می برند و نمی توانند مقادیر بالایی از سلنوآنزیم ها را در بدن خود بسازند (۳۸). بسیار از کشورهای اروپایی از کمبود

سلنیم قابل دسترس برای گیاهان رنج می برند (۳۰). نتایج تحقیقی که اخیراً درباره تعیین مقادیر سلنیم خاک های مناطق مختلف ایران انجام شده است (۳۷) نشان می دهد 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 می شود، تولید گیاهان غنی از سلنیم می باشد. روش های مختلفی برای افزایش سلنیم در گیاهان وجود دارد که از آن جمله می توان به روش افزودن سلنیم به خاک، اسپری سلنیم به برگ ها و افزودن سلنیم به دانه ها اشاره کرد (۲۱). در فنلاند برای رفع مشکل کمبود سلنیم و افزایش غلظت سلنیم غلات اقدام به افزودن سدیم سلنات به خاک در غلظت $mg\ kg^{-1}$ ۱۶-۶ کرده اند (۲۸). در استرالیا برای جلوگیری از کمبود سلنیم در یونجه و شبدر از کود های سلنیمی که بتدریج عنصر سلنیم را در خاک آزاد می کنند، استفاده شده است. در بین محصولات زراعی، گندم به عنوان منبع زیستی قابل دسترس سلنیم محسوب می شود و در برخی کشورها ازجمله استرالیا حدود نیمی از نیازهای سلنیمی مردم از طریق این محصول برطرف می‌شود (۳۶). با کاربرد مقادیر کم سلنیم در خاک به راحتی می توان میزان سلنیم دانه های گندم را افزایش داد (۳۴، ۳۵ و ۳۶). با همین استراتژی محققان توانسته‌اند مقادیر سلنیم دانه های غلات دیگر را نیز افزایش دهند. برای مثال می توان به برنج اشاره کرد که اعمال سلنیت و سلنات باعث افزایش معنی دار و چند برابری سلنیم در دانه ها گردیده است که البته سلنات بهتر از سلنیت عمل کرده است (۱۱).

نقطه قابل توجه آن است که سلنیم در سیستم آنتی اکسیداتیو 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 های مناسب اعمال می شود باعث بالا رفتن توان سیستم آنتی اکسیدانت گیاه از طریق فعال کردن آنزیم های آنتی اکسیدانت ازجمله سوپر اکسید دیس موتاز و کاتالاز می شود (۲۹، ۳۹، ۴۵ و ۴۷) و باعث کاهش مقدار مالون دی آلدئید حاصل از تخریب غشا شده و مقاومت گیاه به تنشهای اکسیداتیو را افزایش می دهد (۸ و ۹). در گیاه علف چاودار (*Lolium perenne*) اعمال سلنیم در غلظت های بالاتر از یک میلیگرم بر کیلوگرم، منجر به کاهش پراکسیداسیون لیپیدها می شود که با افزایش فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز (GSH-Px) مرتبط است (۲۶).

با توجه به کمبود سلنیم خاک در شمال غرب ایران، غنی سازی سلنیمی محصولات زراعی برای مصارف غذایی انسان در این مناطق ضروری به نظر می رسد. این مسئله در تعدادی از کشورهای غربی مورد توجه قرار گرفته و با وارد کردن سلنیم به گیاهان بومی خود، موفقیتهایی نیز کسب کرده اند، ولی در کشور ما کمتر به این مشکل پرداخته شده و تقریبا 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 آنتی اکسیدانت و مقادیر متابولیت های پراکسید هیدروژن و مالون دی آلدئید، بتوان تأثیر کاربرد برگی سلنیم بر رشد، فعالیت سیستم آنتی اکسیداتیو 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 دانه های ارقام گندم را تعیین کرد تا از نتایج به دست آمده در جهت کشت گندم غنی شده از سلنیم بهره برداری نمود.

مواد و روشها

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 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.

جدول ۱- مشخصات فیزیکی و شیمیایی خاک محل اجرای آزمایش

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

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 ۱/۵ mg l^{-1} (در تیمار Se-1.5)، ۱۰ mg l^{-1} (در تیمار Se-10) و ۱۰۰ 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 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×(Fw-Dw)/(Sw-Dw) که توسط Lara و همکارانش (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 XL$_2$, GBC Australia) مورد استفاده قرار گرفتند (۳۳).

سنجش فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز (GSH-Px): سنجش 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 pH=۷ استخراج شد و بعد ml ۰/۲ از روشناور به محلول واکنش حاوی ml ۰/۴ گلوتاتیون (mM ۰/۱) و ml ۰/۲ بافر $KNaHPO_4$ با غلظت mM ۶۷ اضافه شد. همزمان محلول های بدون عصاره آنزیمی تهیه شدند. محلول ها در حمام آب گرم به مدت ۵ دقیقه در دمای ^{o}C ۲۵ قرار گرفته و بعد ml ۰/۲ پراکسید هیدروژن (mM ۱/۳) اضافه شد تا واکنش آغاز گردد. واکنش با افزودن یک میلی لیتر اسید تری کلرواستیک یک درصد و قرار گرفتن نمونه ها 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 لوله ها انتقال و روی آن ۲/۲ میلی لیتر Na_2HPO_4 (mM ۰/۳۲) و ۰/۳۲ میلی لیتر DNTB (mM ۱) اضافه شد تا رنگ ظاهر شود. پس از ۵ دقیقه جذب نمونه ها در طول موج nm ۴۱۲ 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 ($nmol\ GSH\ mg^{-1}\ protein\ min^{-1}$).

سنجش فعالیت سایر آنزیم های آنتی اکسیدانت: فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت با استفاده از روشهای توصیف شده پیشین ما (۲۴) سنجش شدند. فعالیت آنزیم سوپراکسید دیس موتاز (SOD) مطابق روش Giannapolitis و Ries (۲۰) و بر اساس درصد ممانعت از احیاء NBT به ترکیب ارغوانی رنگ دی فورمازان بوسیلهٔ رادیکال سوپراکسید ($O_2^{\bullet-}$) حاصل از فتولیز ریبوفلاوین، توسط آنزیم موجود در عصاره مورد اندازه گیری قرار گرفت. فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) مطابق روش Simon و همکارانش (۴۰) و بر اساس کاهش جذب پراکسید هیدروژن (H_2O_2) در nm ۲۴۰ مورد اندازه 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 nm ۲۹۰ مورد اندازه گیری قرار گرفت. فعالیت آنزیم با استفاده از ضریب خاموشی اسید آسکوربیک ($۲/۶\ mM^{-1}\ cm^{-1}$) بر حسب واحد µM $ascorbic\ acid\ mg^{-1}\ protein\ min^{-1}$ محاسبه گردید.

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

اندازه گیری پروتئین کل: عصارهٔ پروتئینی در بافر فسفات سدیم با غلظت mM ۵۰ و pH=۶/۸ استخراج شده و به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۵۰۰۰g سانتریفوژ شد. از روشناور حاصل برای سنجش 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) داده ها و همچنین رسم نمودارها بوسیلهٔ نرم افزار Excel 2007 به انجام رسید. برای گروه‌بندی میانگینها نیز از نرم افزار Sigma stat 3.5 با آزمون Tukey در سطح احتمال $p \leq ۰/۰۵$ 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

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

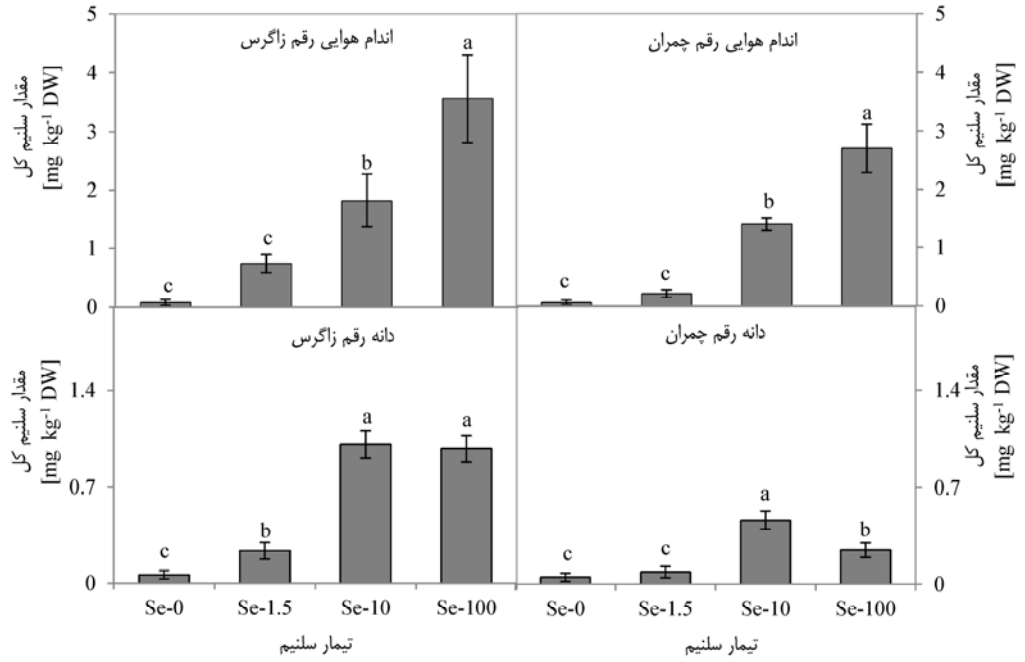
با توجه به اینکه متوسط سلنیم خاک های مناطق مختلف ایران در محدوده ۰/۴۰-۰/۱۷۵ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم خاک می باشد، خاک مورد مطالعه در این طرح جزو خاکهای فقیر از نظر مقدار سلنیم محسوب می شود.

پارامترهای رشد: مطالعه اثر غلظت های مختلف سلنیم بر رشد رقم زاگرس نشان داد که اعمال ۱/۵ mg l^{-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 l^{-1} Se توانست 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.

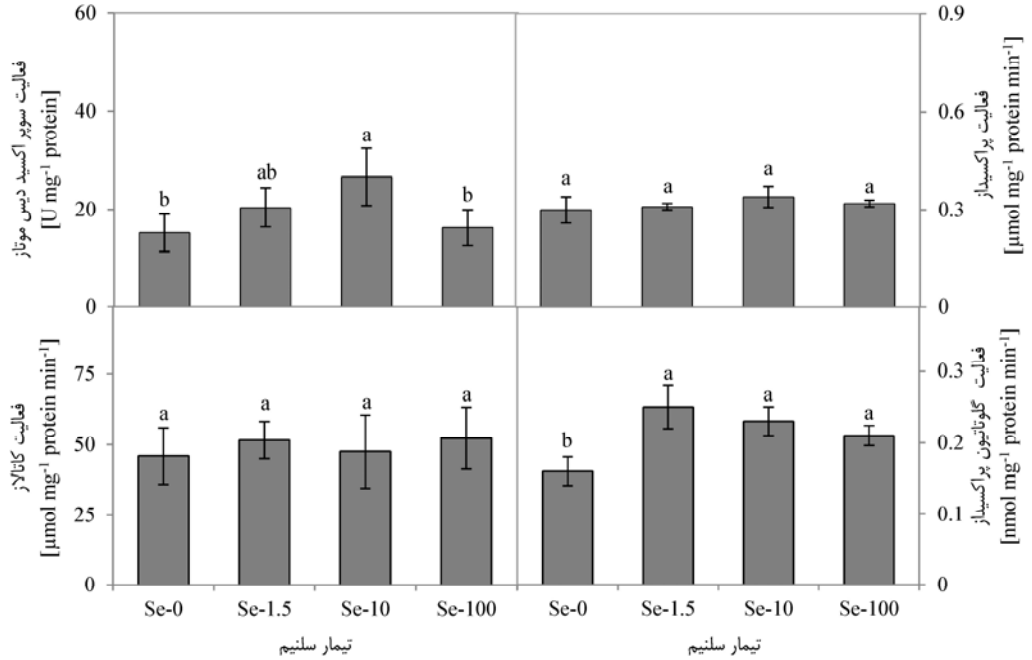
میزان انباشت سلنیم: مطالعه تأثیر کاربرد غلظت های مختلف سلنیم بر میزان انباشت این عنصر در اندام های هوایی رقم های زاگرس و چمران نشان داد که کاربرد mg ۱/۵ l^{-1} نتوانست باعث افزایش معنی دار انباشت سلنیم در این بخشها شود ولی با افزایش غلظت سلنیم اعمال شده، مقدار انباشت این عنصر در اندام های هوایی بصورت معنی‌داری افزایش یافت و در تیمار ۱۰۰ mg l^{-1} به بیشینه مقدار خود رسید (شکل ۱). الگوی میزان انباشت عنصر سلنیم در دانه‌های 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 l^{-1} Se و ۱۰ به‌دست آمد (شکل ۱). اعمال ۱/۵ mg l^{-1} 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 l^{-1} Se بدست آمد.

جدول ۳- تأثیر اعمال برگی غلظت‌های مختلف سلنیم بر وزن خشک اندام هوایی (g plant^{-1})، وزن هزار دانه (g) و مقدار نسبی آب اندام هوایی (%) رقم‌های گندم (تفاوت بین اعداد مربوط به هر پارامتر در هر رقم که با حروف متفاوت نشان داده شده‌اند معنی‌دار می‌باشد) ($p \leq$ 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 l^{-1}	2.9 ± 0.12 ^{a}	40.9 ± 2.97 ^{a}	82 ± 4.5 ^{a}
	10 mg l^{-1}	2.4 ± 0.17 ^{b}	42.6 ± 2.52 ^{a}	79 ± 5.3 ^{a}
	100 mg l^{-1}	2.3 ± 0.23 ^{b}	39.3 ± 2.43 ^{a}	74 ± 4.4 ^{a}
چمران	شاهد	2.3 ± 0.23 ^{b}	37.4 ± 2.30 ^{a}	78 ± 4.1 ^{a}
	1.5 mg l^{-1}	2.4 ± 0.17 ^{ab}	39.7 ± 2.72 ^{a}	80 ± 4.8 ^{a}
	10 mg l^{-1}	2.7 ± 0.21 ^{a}	38.1 ± 2.02 ^{a}	76 ± 7.0 ^{a}
	100 mg l^{-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) ($p \leq ۰/۰۵$).

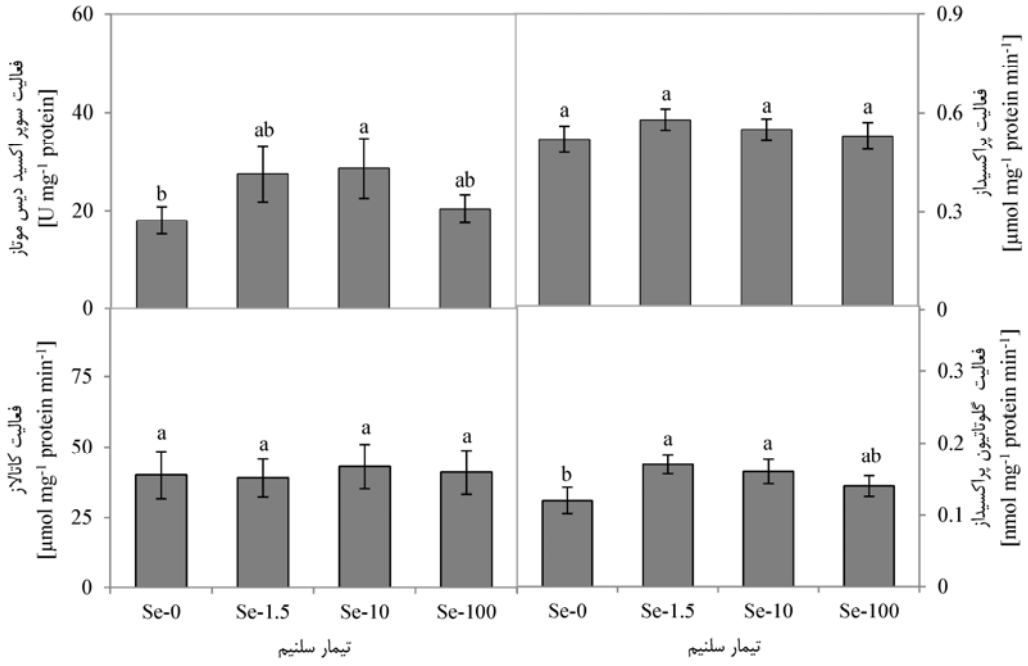


شکل ۲- تأثیر کاربرد غلظت‌های مختلف سلنیم بر فعالیت آنزیم‌های سوپر اکسید دیس موتاز (SOD)، پراکسیداز (POD)، کاتالاز (CAT) و گلوتاتیون پراکسیداز (GSH-Px) در رقم زاگرس (تفاوت بین اعداد مربوط به ستونها که با حروف متفاوت نشان داده شده‌اند معنی‌دار می‌باشد) ($p \leq ۰/۰۵$).

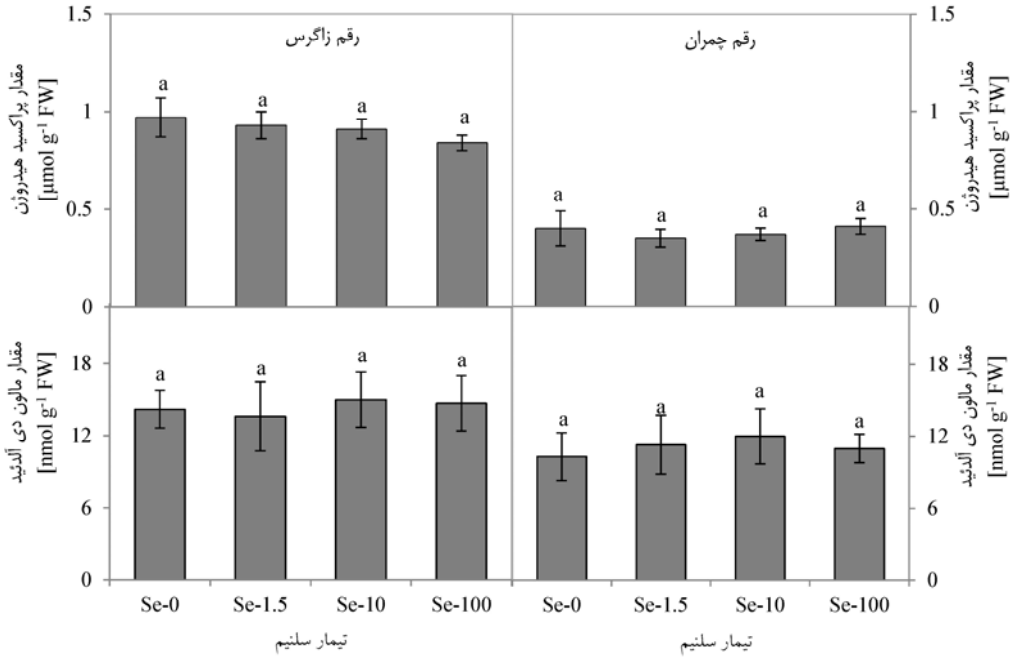
فعالیت سیستم آنتی اکسیدانت: بررسی فعالیت آنزیم های پراکسیداز و کاتالاز در تیمارهای مختلف رقم زاگرس نشان داد که اعمال تیمارهای سلنیمی در غلظت های مختلف نتوانست باعث تغییر در فعالیت آنزیم های پراکسیداز و کاتالاز گردد (شکل۲). یک افزایش معنی دار در فعالیت آنزیم کلیدی سوپر اکسید دیس موتاز پس از اعمال ۱۰ mg Se l^{-1} در اندام های هوایی رقم زاگرس مشاهده گردید. همین الگوی فعالیت در آنزیم های پراکسیداز، کاتالاز و سوپر اکسید دیس موتاز رقم چمران نیز مشاهده شد (شکل ۳) و نشان داد که الگوی فعالیت آنزیم های فوق در غلظت های 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 سوپراکسید دیس موتاز مقدار H_2O_2 متأثر نشده است. به عبارت دیگر H_2O_2 تولید شده توسط آنزیم SOD بطور مؤثری توسط آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز حذف شده است. در نتیجه می توان گفت که آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز نسبت به سایر آنزیم های سیستم آنتی اکسیداتیو 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) می باشد که نشان دادند کمترین مقادیر سلنیم خاک مربوط به مناطق شمالی و شمال غرب کشور است. گیاهانی که در خاکهای فقیر از سلنیم رشد می کنند، دچار کمبود سلنیم خواهند شد.



شکل ۳- تأثیر کاربرد غلظت‌های مختلف سلنیم بر فعالیت آنزیم‌های سوپر اکسید دیس موتاز (SOD)، پراکسیداز (POD)، کاتالاز (CAT) و گلوتاتیون پراکسیداز (GSH-Px) در رقم چمران (تفاوت بین اعداد مربوط به ستونها که با حروف متفاوت نشان داده شده‌اند معنی‌دار می‌باشد) ($p \leq ۰/۰۵$).



شکل ۴- تأثیر کاربرد غلظت‌های مختلف سلنیم بر مقدار پراکسید هیدروژن (H_2O_2) 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) ($p \leq$ ۰/۰۵).

از آنجایی که بیشترین سلنیم مورد نیاز انسان و حیوانات از طریق مصرف گیاهان جذب کننده سلنیم از خاک تأمین می شود (۷)، بنابراین تغذیه از گیاهان کاشته شده در این منطقه نمی تواند 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* می شود. 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 داده اند میزان بهبود رشد گندم توسط تغذیه سلنیمی به غلظت سلنیم اعمال شده بستگی دارد، در این پژوهش نیز مشخص گردید که غلظت ۱/۵ و ۱۰ میلی گرم سلنیم بترتیب در رقم زاگرس و چمران باعث بهبود رشد شده اند. یافته های 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 می شود (۳۱). البته کاربرد سلنیم در این آزمایش تغییر معنی داری در مقدار نسبی آب (RWC) که معیاری از روابط آبی گیاه محسوب می گردد، ایجاد نکرد.

بررسی مطالعات پیشین نشان می دهد که بیشترین تلاشها برای افزایش سلنیم گندم از طریق کاربرد سلنیم در خاک انجام شده است. بررسی های Dhillon و همکارانش (۱۴) نشان می دهد که کاربرد خاکی سلنیم در غلظت $mg\ kg^{-1}$ ۲/۴ باعث انباشت چند برابری سلنیم در دانه ($mg\ kg^{-1}$ DW ۱۹/۶) و در کاه ($mg\ kg^{-1}$ DW ۱۶/۶) می گردد. البته کاربرد مقادیر کمی از سلنیم در خاک ($mg\ kg^{-1}$ ۰/۲)، انباشت مقدار کمی از این عنصر را در دانه ($mg\ kg^{-1}$ DW

۰/۷۳۲)، کاه (۰/۲۲۷ mg kg^{-1} DW) و ریشه (mg DW kg^{-1} ۱/۳۷۵) به دنبال دارد (۱۶). نتایج این تحقیق نشان داد که کاربرد برگی غلظت های بالایی از سلنیم باعث انباشت این عنصر در مقادیر بالا در رقم زاگرس (mg kg^{-1} DW ۳/۵۶ در اندام هوایی و ۱ mg kg^{-1} DW در دانه) و در رقم چمران (۲/۷۰ mg kg^{-1} DW در اندام هوایی و ۰/۴۶۵ در دانه) گردیده است. نتایج آزمایش نشان دادند که کاربرد برگی سلنیم در مقایسه با کاربرد مقادیر کمی از سلنیم در خاک (۰/۲ mg kg^{-1}) باعث انباشت سلنیم بیشتر ولی در مقایسه با کاربرد مقادیر بیشتری از سلنیم در خاک (mg ۲/۴kg^{-1}) باعث انباشت سلنیم کمتر شده است. به عبارت دیگر می توان بجای کاربرد خاکی سلنیم ۰/۲ mg kg^{-1} از کاربرد برگی آن که روشی آسان و کم هزینه است، بهره برد. ولی برای رسیدن به مقادیر بالایی از انباشت سلنیم شبیه آنچه که در کاربرد خاکی ۲/۴ mg kg^{-1} دیده می شود، روش کاربرد خاکی سلنیم مناسب تر است، برای اینکه کاربرد برگی حتی در غلظت های بالا نیز نمی تواند انباشت بیشتر از ۴ mg kg^{-1} DW را موجب شود.

نتایج بررسی فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیس موتاز تحت تاثیر تیمار سلنیم در این تحقیق با یافته های Hartikainen و همکارانش (۲۶) و Djanaguiraman و همکارانش (۱۵) سازگار می باشد که افزایش فعالیت آنزیم SOD را پس از اعمال سلنیم در علف چاودار و لوبیا نشان دادند. کاتالاز یکی از آنزیم های مهم جارو کننده H_2O_2 محسوب می شود (۲). در گیاهان تیمار شده با سلنات، فعالیت آنزیم های مؤثر در حذف اثرات سمی H_2O_2 ازجمله آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) و گلوتاتیون پراکسیداز (GSH-Px) افزایش می یابد ولی فعالیت کاتالاز متأثر نمی شود (۲۹ و ۳۹). در انطباق با یافته های فوق، نتایج ما نشان داد که اعمال غلظت های مختلف سلنیم باعث افزایش معنی دار فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز در هر دو رقم مورد مطالعه شد. در گیاهان تنش های مختلف باعث افزایش تولید مولکول های ROS (Reactive oxygen species) ازجمله H_2O_2 شده و این مولکول ها منجر به پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء می شوند و باعث ظهور اثرات منفی بر رشد و ساختار گیاه می گردند (۱ و ۳۹). نتایج این تحقیق نشان داد که در هیچ یک از تیمارهای سلنیمی مقدار ÷ افزایش نیافته است (شکل ۴). به‌طوری‌که بررسی سیستم آنتی اکسیداتیو ارقام گندم در این تحقیق باعث حصول دو نتیجه مهم گردید: (۱) افزایش فعالیت سوپراکسید دیس موتاز و همزمان گلوتاتیون پراکسیداز با ممانعت از انباشت MDA شرایط را برای بهبود رشد گندم فراهم کردند و (۲) کاربرد سلنیم توان سیستم آنتی اکسیداتیو گندم را افزایش داد و در نتیجه می تواند در جهت بهبود مقاومت در برابر تنش های محیطی مورد استفاده قرار گیرد.

در یک نتیجه‌گیری کلی می توان عنوان کرد که با توجه به کمبود سلنیم خاک در شمال غرب ایران، غنی سازی سلنیمی محصولات زراعی برای مصارف غذایی انسان در این مناطق ضروری به نظر می رسد و از آنجایی که کاربرد برگی سلنیم نسبت به کاربرد خاکی سلنیم در مقادیر پایین روش مؤثرتری برای افزایش ذخیره سلنیم گندم محسوب می شود، از این روش می توان برای غنی سازی سلنیم غذاها استفاده کرد. همچنین به دلیل نقش کاربرد برگی سلنیم در افزایش توان سیستم آنتی اکسیدانت گیاه می توان به کشت گندم غنی شده از سلنیم و مقاوم به تنش ها در مناطق خشک و یا شور کشور مبادرت ورزید.

منابع

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 آنتی اکسیدانت گلرنگ (*Carthamus tinctorius* L.) در شرایط تنش کم آبی. مجله زیست شناسی ایران. جلد ۲۶ شماره ۳ صفحات ۳۶۵-۳۵۲.

۲- ابراهیم زاده، م. و ابراهیم زاده ح. ۱۳۹۲. رویانزایی بدنی و آنزیمهای پاداکساینده در بنگ سیاه (*H. niger* L.). مجله زیست 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 hyperaccumlator, *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 Soill 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 C_4 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, Nasseri 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 H_2O_2 in lettuce plants exposed to selenium. Ann. Appl. Biol. 154: 107-116.

40- Simon LM, Fatrai Z, Jonas DE, Matkovics 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, Sror 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

Absract

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