Research Article

Plant Prod., 2020, 43(3), 443-454
DOI: 10.22055/ppd.2019.28539.1722

ISSN (P): 2588-543X
ISSN (E): 2588-5979

Evaluation of the Biochemical Reaction of Sunflower Seedlings to Selenium Levels in Saline Conditions

Masoumeh Abedini[1]*, Ghader Habibi[2] and Samad Arezomand[3]

1- ***Corresponding Author:** Assistant Professor, Department of Biology, Payame Noor University, Iran (ms_abedini@pnu.ac.ir)
2- Associate Professor, Department of Biology, Payame Noor University, Iran
3- M.Sc. Graduate of Plant Physiology, Department of Biology, Payame Noor University, Iran

Received: 09 February, 2019 Accepted: 22 June, 2019

Abstract

Background and Objectives

Salinity is one of the detrimental environmental factors that limit the productivity of crop plants worldwide. Most of the crop plants are sensitive to salinity. Selenium (Se) has not been classified as a plant essential element, but its role as a beneficial element and its ability in amelioration of different environmental stresses has been reported in different plant species. The aim of this study was to investigate the effects of Se on sunflower plants under salt stress conditions.

Materials and Methods

The experiment was conducted as factorial in a completely randomized design by three replications in a hydroponic system with a temperature regime of 25/18$^{\circ C}$, photoperiod of 14 h, and relative humidity of 70% in a growth chamber. Seeds were germinated in petri-dishes and then uniform 3-day old seedlings were transferred to 50% Hoagland solution. One week after pretreatment, plants were transferred to 100% Hoagland solution and treated with selenium (sodium selenate; 0, 5, and 10 µM) and salinity (sodium chloride; 50 and 100 mM) for two weeks. Plant's shoots were harvested 15 days after treatments, and frozen in liquid nitrogen until assays.

Results

The results indicated that salinity at both levels significantly increased the MDA as well as free phenol and decreased the flavonoids contents of plants. The anthocyanin, soluble sugars, and total protein contents and the activity of APX increased significantly in response to 50 mM of NaCl, while the proline, tannins, and lignin contents increased, but dry weight and height of shoot decreased significantly in response to 100 mM of NaCl. In non-saline condition, Se application at 5 µM decreased the flavonoids and lignin contents and increased the free phenols, shoot height, and POD activity significantly. Application of Se at 10 µM in non-saline conditions significantly increased the lignin and MDA contents and APX activity. In saline condition with 50 mM of NaCl, Se application at both two levels decreased the soluble sugars and APX activity, and at 10 µM decreased the lignin and increased the tannin contents significantly. In saline condition with 100 mM of NaCl, Se application at both two concentrations considerably

© 2020 The Author(s). Published by Shahid Chamran University of Ahvaz. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

decreased the proline, lignin, and tannin contents but increased the APX activity. Furthermore, a reduction in soluble sugars by application of 5 µM of Se was seen in plants that were in saline conditions with 100 mM of NaCl.

Discussion

According to the results of this study, salinity induced oxidative stress in sunflower, especially at 100 mM that was obvious by elevated level of MDA. Even though the Se application in saline condition could induce the notable changes in the phenolic compounds and promoted the activity of APX, it could not inhibit the MDA formation and dry weight falling in plants. Selenium application in non-saline conditions also could not result to the considerable benefits in sunflower plants.

Keywords: Antioxidant system, Growth, Phenolics, Proline, Salinity

مقاله پژوهشی

Plant Prod., 2020, 43(3), 443-454
DOI: 10.22055/ppd.2019.28539.1722

ISSN (P): 2588-543X
ISSN (E): 2588-5979

ارزیابی عکس‌العمل بیوشیمایی گیاهچه‌های آفتابگردان به سطوح سلنیوم در شرایط شور

معصومه عابدینی[1]*، قادر حبیبی[2] و صمد آرزومند[3]

۱-*نویسنده مسئول: استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور، ایران (ms_abedini@pnu.ac.ir)
۲- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور، ایران
۳- دانش‌آموخته فیزیولوژی گیاهی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۱/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۴/۰۱

چکیده

در این پژوهش تأثیر سلنیوم (صفر، ۵ و ۱۰ میکرومولار) بر روی آفتابگردان در شرایط شور (۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار) و در محیط هیدروپونیک به‌صورت فاکتوریل و در قالب یک طرح تصادفی در دانشگاه پیام نور مرکز تبریز در سال ۱۳۹۴ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که شوری، در هر دو سطح، باعث افزایش معنی‌دار مقدار مالون‌دی‌آلدئید و فنل آزاد و کاهش فلاونوئید شد. همچنین، شوری ۵۰ mM افزایش مقدار آنتوسیانین، پروتئین کل، قند محلول و فعالیت آسکوربات پراکسیداز و شوری ۱۰۰mM کاهش وزن خشک و ارتفاع اندام هوایی و افزایش مقدار پرولین، تانن و لیگنین را به‌طور معنی‌دار موجب شد. کاربرد سلنیوم ۵ میکرومولار در محیط‌های فاقد نمک موجب کاهش مقدار فلاونوئیدها و لیگنین، ولی افزایش فعالیت پراکسیداز، مقدار فنل آزاد و ارتفاع اندام هوایی شد. درحالی‌که کاربرد سلنیوم ۱۰ میکرومولار در محیط‌های فاقد نمک افزایش غلظت لیگنین و مالون‌دی‌آلدئید و فعالیت آسکوربات پراکسیداز را باعث شد. در محیط‌های حاوی نمک ۵۰ mM، کاربرد سلنیوم در هر دو غلظت، باعث کاهش معنی‌دار مقدار قند محلول و فعالیت آسکوربات پراکسیداز و در ۱۰ میکرومولار باعث افزایش تانن و کاهش لیگنین شد. در محیط‌های حاوی نمک ۱۰۰ mM، کاربرد سلنیوم در هر دو غلظت باعث کاهش معنی‌دار پرولین، تانن و لیگنین و افزایش فعالیت آسکوربات پراکسیداز شد. طبق نتایج حاصل، سلنیوم اگرچه باعث تغییرات قابل‌توجهی در مقدار ترکیبات فنلی و قند محلول و افزایش آنزیم آسکوربات پراکسیداز شد ولی نتوانست باعث کاهش مقدار مالون‌دی‌آلدئید شود و ازکاهش وزن خشک در شرایط شور ممانعت کند.

کلیدواژه‌ها: پرولین، رشد، ترکیبات فنلی، سیستم آنتی‌اکسیدان، شوری

مقدمه

شوری آب و خاک تهدیدی جدی برای کشاورزی در مناطق خشک و نیمه‌خشک مانند ایران محسوب می‌شود. تنش شوری، به‌عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل کاهش تولیدات کشاورزی در ۱۰۰ سال گذشته موضوع بسیاری از تحقیقات جهانی بوده است. نقش محافظ‌های اسمزی سلول (مانند پرولین، گلایسین بتائین، ترهالوز)، هورمون‌های گیاهی (جیبرلیک اسید، جاسمونیک اسید، براسینواستروئیدها و سالیسیلیک اسید)، آنتی‌اکسیدان‌ها (آسکوربیک اسید، گلوتاتیون و توکوفرول)، مولکول‌های

علامت‌دهنده (نیتریک اکسید و پراکسیدهیدروژن)، پلی‌آمین‌ها (اسپرمیدین، اسپرمین و پوترسین) و عناصر مفید (سلنیم، سیلیس و ید) در کاهش آسیب‌های ناشی از شوری در گیاهان اخیراً مورد توجه گسترده‌ای قرار گرفته است (Hassanuzzaman et al., 2011). اگرچه سلنیوم یک عنصر ضروری برای گیاهان به حساب نمی‌آید، ولی مطالعات حاکی از تأثیر مثبت آن بر فرآیندهای مختلف گیاهی از جمله رشد (Djanaguiraman et al., 2005) و افزایش مقاومت در برابر تنش‌های محیطی شامل خشکی و شوری (Hawrylak-Nowak, 2009) و فلزات سنگین (Cartes et al., 2010) می‌باشد. سلنیوم می‌تواند باعث تأخیر پیری و تحریک جوانه‌زنی گردد. تیمار دانه‌رست‌های چاودار تحت تنش خشکی با سلنیوم باعث افزایش گشودگی روزنه‌ها، بیشینه کارایی فتوسیستم II و بهره‌وری آب می‌شود (Jiang et al., 2017). همچنین نشان داده شده است کاربرد سلنیوم تأثیر قابل ملاحضه‌ای در افزایش فعالیت آنزیم‌های تجزیه‌کننده H_2O_2 از قبیل اسکوربات پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز دارد (Kong et al., 2005; Rios et al., 2009). مطالعات نشان داده‌اند که سلنیوم از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و پراکسیدازها، افزایش غلظت رنگیزه‌های برگ، افزایش فتوسنتز خالص و جذب پتاسیم، کاهش جذب سدیم و تحریک متابولیسم فنل‌ها موجب افزایش تحمل تنش شوری می‌شود (Diao et al., 2014; Hassanuzzaman et al., 2011). برای مثال کاربرد سلنیوم در گیاه شوید با تحریک سیستم دفاع آنتی‌اکسیدان و کاهش پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی باعث بهبود رشد گیاه تحت تنش شوری شد (Shekari et al., 2017).

آفتابگردان مهم‌ترین منبع روغن خوراکی در جهان محسوب می‌شود و دارای درصد بالایی از اسیدهای چرب اشباع نشده و فاقد کلسترول می‌باشد. اگرچه گیاه آفتابگردان در برابر خشکی (Umar and Siddiqui, 2018) و شوری تا حدودی مقاوم است و آستانه تحمل شوری آن ۴/۸ دسی‌زیمنس بر متر گزارش شده است (Francois, 1996)، ولی تولید و بازده آن در شرایط تنش‌زا کاهش می‌یابد (Shahbaz et al., 2011). استفاده از منابع آب‌های سطحی به دلیل افزایش بی‌رویه مصرف آن در بخش‌های کشاورزی، صنعت و غیره باعث کاهش دسترسی به منابع آب‌های مرغوب گردیده است. لذا شناخت روش‌های مدیریتی و زراعی-اصلاحی که بتوان از آب‌هایی با کیفیت پایین‌تر (شور و لب‌شور) استفاده نمود روز به روز نمایان‌تر می‌شود. هدف از این تحقیق بررسی تأثیر کاربرد سلنیوم در تخفیف اثرات منفی ناشی از تنش شوری در گیاه آفتابگردان می‌باشد.

مواد و روش‌ها

شرایط کشت گیاهان

این تحقیق در بهار سال ۱۳۹۵ در آزمایشگاه زیست شناسی گیاهی دانشگاه پیام نور (مرکز تبریز) انجام گرفت. تیمارهای بکار رفته شامل سلنیوم (به شکل سلنات سدیم، ساخت شرکت سیگما) در غلظت‌های صفر، ۵ و ۱۰ میکرومولار و شوری (کلرید سدیم) در سه سطح صفر، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار (EC~10 ds m^{-1}) بود. بذور گیاه آفتابگردان (*Helianthus annuus* L.) پس از ضدعفونی و شستشو، در داخل پتری-دیش بر روی کاغذ صافی مرطوب و در محیط تاریک جهت جوانه‌زنی قرار گرفتند. پس از جوانه‌زنی دانه‌رست‌های سه روزه به تشتک‌های دو لیتری حاوی محلول هوگلند با غلظت ۵۰ درصد و اسیدیته ۵/۸ منتقل و در یک اتاقک کشت با شدت نور ۱۰ کیلولوکس، فتوپریود ۱۴ ساعت، رژیم دمایی ۱۸/۲۵ °C و رطوبت ۷۰ درصد قرار گرفتند. پس از یک هفته پیش تیمار، گیاهان به محیط حاوی محلول غذائی هوگلند کامل منتقل و تیمارهای مورد نظر اعمال شد. دو هفته پس از اعمال تیمارها که از طریق ریشه انجام گرفت، اندام هوایی گیاهان برداشت و تا زمان سنجش‌ها در دمای ۷۵ °C- نگهداری شدند.

سنجش آنتوسیانین

برای سنجش آنتوسیانین، ۰/۱ گرم برگ تر با ۱۰ میلی‌لیتر محلول متانول: HCl (۹۹ :۱) استخراج شد و پس

از ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ با ۴۵۰۰ گرم، جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۵۰ nm اندازه‌گیری شد. برای محاسبه غلظت آنتوسیانین از ضریب خاموشی $cm^{-1}.M^{-1}$ ۳۳۰۰۰ استفاده شد (Chaovanalikit and Wrolstad, 2004).

سنجش فنل کل

برای استخراج فنل کل از متانول ۸۰ درصد استفاده شد. نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در ۱۴۰۰۰ گرم سانتریفیوژ شدند و از عصاره حاصل علاوه‌بر فنل کل، برای سنجش فلاونوئیدها و فنل آزاد نیز استفاده شد (Sonobe et al., 2009). برای انجام آزمایش، ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره به همراه ۲ میلی‌لیتر آب‌مقطر، ۰/۵ میلی‌لیتر فولین سیوکالچئو ۱۰ درصد و ۲ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۷ درصد در یک لوله آزمایش ریخته شد و به‌مدت ۹۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار گرفت. سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۵۰ nm اندازه‌گیری و غلظت ترکیبات فنلی کل با استفاده از منحنی استاندارد گالیک اسید محاسبه شد.

سنجش فلاونوئید

غلظت فلاونوئیدها با روش رنگ‌سنجی کلرید آلومینیوم مورد اندازه‌گیری قرار گرفت (Treutter, 2006). ابتدا در هر لوله آزمایش ۰/۳ میلی‌لیتر نیتریت سدیم ۵ درصد، ۶ میلی‌لیتر آب‌مقطر و ۱ میلی‌لیتر عصاره ریخته شد. بعد از ۵ دقیقه به محتویات لوله‌ها ۰/۳ میلی‌لیتر کلرید آلومینیوم ۱۰ درصد و پس از ۵ دقیقه بعدی، ۲ میلی‌لیتر سود ۱ مولار افزوده شد و جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۰nm قرائت شد. منحنی استاندارد کوئرسیتین برای محاسبه غلظت فلاونوئید مورد استفاده قرار گرفت.

سنجش فنل آزاد و تانن

به هر سل ۲۰۰ میکرولیتر عصاره، ۱۰ میلی‌گرم پودر پلی‌ویدون، ۲ میلی‌لیتر آب‌مقطر و ۰/۵ میلی‌لیتر فولین سیوکالچئو ۱۰ درصد اضافه شد. بعد از ۵ دقیقه روی نمونه‌ها، ۲ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۷ درصد اضافه شد و به مدّت ۹۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار گرفت، سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۵۰ nm قرائت شد. برای محاسبه غلظت فنل آزاد از منحنی استاندارد گالیک اسید استفاده شد. غلظت تانن از اختلاف غلظت فنل آزاد و فنل کل محاسبه شد (Makkar et al., 1993).

سنجش لیگنین

برای سنجش لیگنین، ۰/۱ گرم ماده خشک گیاهی با ۲ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد همگن شد و ۵ دقیقه در ۱۰۰۰ گرم سانتریفوژ شد. رسوبات دو بار با اتانول ۹۵ درصد روی کاغذ صافی شستشو شدند. به رسوبات روی کاغذ صافی فرصت داده شد تا در هوا خشک شوند. رسوبات با کارد از روی کاغذ جدا شده و به لوله حاوی ۱ میلی‌لیتر محلول استیل بروماید: استیک اسید گلاسیال (۱: ۳) منتقل شدند و لوله‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری ۷۰ °C قرار گرفتند. بعد از سرد شدن به لوله‌ها ۴۵۰ میکرولیتر سود ۲ نرمال و ۵۰ میکرولیتر هیدروکسیل‌آمین‌هیدروکلراید ۷/۵ مولار اضافه و با استیک اسید به حجم ۵ میلی‌لیتر رسانده شد. نمونه‌ها به مدّت ۵ دقیقه در ۵۰۰۰ گرم سانتریفوژ شدند و جذب رو شناور در طول موج ۲۸۰ nm سنجیده شد. غلظت لیگنین با استفاده از ضریب خاموشی $cm^{-1}.g^{-1}$ ۲۰ محاسبه شد (Cao et al., 2013).

سنجش پرولین

برای اندازه‌گیری پرولین، ۰/۱گرم مادهٔ تر گیاهی با ۵ میلی‌لیتر سولفوسالیسیلیک اسید ۳ درصد همگن و ۱۵ دقیقه د ۱۵۰۰۰ گرم سانتریفوژ شد. ۲ میلی‌لیتر از عصاره حاصل درون لوله آزمایش ریخته شد و ۱ میلی‌لیتر معرّف نین‌هیدرین و ۱ میلی‌لیتر اسیداستیک ۱۰۰ درصد به آن افزوده شد. نمونه‌ها به مدّت ۱ ساعت در حمّام آب جوش ۹۰ °C قرار گرفتند. پس از متوقّف کردن واکنش در حمّام یخ، ۳ میلی‌لیتر تولوئن به محلول اضافه شد و به مدّت ۲۰ ثانیه نمونه‌ها به شدّت بهم زده شد. فاز رویی شامل تولوئن و پرولین بود که از فاز آبی جدا شد. جذب فاز رنگی تولوئنی بعد از جدا کردن آن از فاز آبی در طول موج ۵۱۵ nm تعیین گردید (Bates, 1973) و مقدار پرولین با استفاده از منحنی استاندارد پرولین محاسبه گردید.

سنجش قندهای محلول

مقدار ۰/۰۱ گرم ماده خشک گیاهی با ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد مخلوط و به مدّت یک هفته در یخچال نگه‌داری شد. سپس محلول لوله‌ها با کاغذ واتمن شماره یک صاف شدند که محلول حاصل حاوی قندهای محلول و کاغذ واتمن حاوی قندهای نامحلول می‌باشد. دو میلی‌لیتر از محلول حاصل به لوله‌های مجزا منتقل و ۱ میلی‌لیتر محلول فنل ۵ درصد و ۵ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک ۹۸ درصد به آن‌ها افزوده شد. پس از ۳۰ دقیقه جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۸۵ nm قرائت و غلظت قند نمونه‌ها با استفاده از منحنی استاندارد گلوکز محاسبه شد (DuBois et al., 1956).

سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و مالون‌دی‌آلدئید

فعالیت آنزیم (گایاکول) پراکسیداز (POD) بر اساس رو Chance and Maehly (1955) و براساس تبدیل گایاکول به تتراگایاکول انجام شد. برای این منظور افزایش جذب در ۴۷۰ nm مورد اندازه‌گیری قرار گرفت و فعالیت آنزیم با استفاده از ضریب خاموشی ۲۶/۶ $mM^{-1}.cm^{-1}$ محاسبه شد. فعالیت آنزیم اسکوربات پراکسیداز مطابق روش Nakano and Asada (1987) و بر اساس اکسیداسیون اسید آسکوربیک و کاهش جذب در ۲۹۰ nm مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. فعالیت آنزیم با استفاده از ضریب خاموشی آسکوربیک اسید (۲/۶ $mM^{-1}.cm^{-1}$) محاسبه گردید.

سنجش مالون‌دی‌آلدئید (MDA) به‌عنوان معیاری برای بررسی میزان پراکسیداسیون لیپیدها صورت گرفت. برای این منظور، عصاره برگ در محلول ۰/۱ درصد (w/v) تری کلرواستیک اسید (TCA) استخراج‌شده و به مدت پنج دقیقه در ۱۰۰۰۰ گرم سانتریفوژ گردید. نسبت ۱ به ۴ از روشناور با محلول ۲۰ درصد از TCA حاوی ۰/۵ درصد تیوباربیتوریک اسید در لوله آزمایش با هم مخلوط‌شده و به‌مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای جوش ۹۵ °C قرار گرفت. سپس لوله‌ها به‌سرعت در یخ سردشده و به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ گرم سانتریفوژ شدند. غلظت مالون‌دی‌آلدئید با استفاده از منحنی استاندارد ۱،۱،۳،۳- تترااتوکسی پروپان محاسبه شد (Boominathan and Doran, 2002).

اندازه‌گیری پروتئین کل

عصاره پروتئینی در بافر فسفات سدیم با غلظت ۵۰ mM و اسیدیته ۶/۸ استخراج و به‌مدت ۲۰ دقیقه در ۱۵۰۰۰ گرم سانتریفوژ شد. از روشناور حاصل برای سنجش پروتئین کل به روش برادفورد استفاده شد (Bradford, 1976).

طرح آزمایشی و تجزیه داده‌ها

آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار و ۹ تیمار (۴ تیمار مرکب) به اجرا در آمد. میانگین و انحراف معیار (SD) داده‌ها و همچنین رسم نمودارها به‌وسیله نرم‌افزار Excel 2010 به انجام رسید. برای گروه‌بندی میانگین‌ها نیز از نرم‌افزار Sigma stat 3.5 با آزمون Tukey در سطح احتمال $p<0/05$ استفاده شد.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس تأثیر سلنیوم و شوری و میان‌کنش متقابل آن‌ها روی اندام هوایی گیاه آفتابگردان در جدول (۱) ارائه شده است.

بررسی نتایج تأثیر شوری بر وزن خشک اندام هوایی نشان داد که شوری ۱۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم باعث کاهش معنی‌دار وزن خشک اندام هوایی شد. کاربرد سلنیوم در غلظت ۵ و ۱۰ میکرومولار تأثیر معنی‌داری بر وزن خشک در گیاهان در شرایط شور و غیرشور نداشت (شکل A-۱).

شوری در سطح ۱۰۰ میلی‌مولار باعث کاهش معنی‌دار ارتفاع اندام هوایی شد. کاربرد سلنیوم در شرایط غیرشور در هر دو غلظت باعث افزایش معنی‌دار طول اندام هوایی شد ولی در شرایط شور تأثیر افزایشی معنی‌داری روی این ویژگی نداشت (شکل B-۱).

Table 1. The analysis of variance studied features of sunflower plants under salinity and selenium

Parameter	Mean square		
	Salinity	Selenium	Selenium × Salinity
Shoot dry weight	2.087**	0.045ns	0.045ns
Shoot length	209.3**	182.3*	196.8**
Total protein	0.198**	0.026ns	0.010ns
Soluble sugar	4134**	1668ns	4889**
Proline	0.016*	0.008ns	0.02*
Free phenol	0.658**	0.273**	0.116ns
Total flavonoid	1.03**	0.845**	0.058ns
Anthocyanin	5426**	1106ns	1575ns
Tannin	0.583**	0.064ns	0.152**
Lignin	0.083**	0.204***	0.547***
Peroxidase	934ns	3738**	1006ns
Ascorbate peroxidase	6.43**	8.18***	9.28***
Malondialdehyde	103.0**	97.00**	13.00ns

ns: non-significant, *: significant at .05 level, **: significant at .01 level and ***: significant at .001 level.

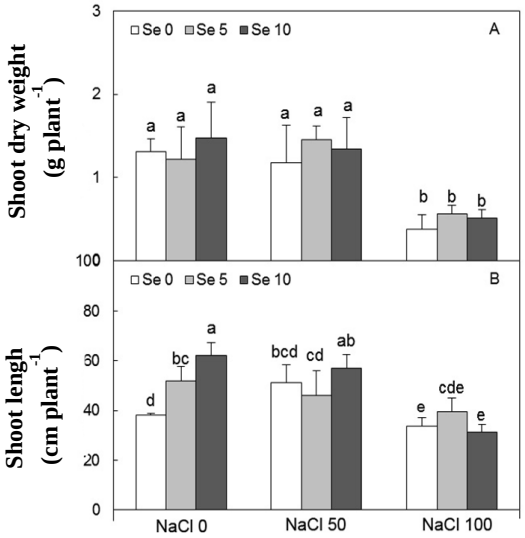

Figure 1. The effects of Se application on dry weight and shoot length of sunflower under salinity

گیاه آفتابگردان در مقایسه با غلات، مقاومت کمتری به شوری دارد. در این پژوهش با افزایش غلظت نمک در محیط از ۵۰ به ۱۰۰ میلی‌مولار، وزن خشک اندام هوایی گیاه کاهش یافت. کاهش رشد آفتابگردان در شوری ۱۰۰ میلی‌مولار و بالاتر توسط Shahbaz et al. (2011) گزارش شده است. گزارش شده است که علت اصلی افت رشد گیاهان در شرایط شور کاهش قطر روزنه‌ها و درنتیجه کاهش تثبیت CO_2 می‌باشد (Dubey, 2005). هر چند کاربرد سلنیوم در شرایط شور باعث کاهش اثرات منفی شوری بر رشد اندام هوایی در گیاه کلم (Hashem et al., 2013) و گوجه‌فرنگی (Diao et al., 2014) شده است. ولی در آزمایش حاضر کاربرد سلنیوم در غلظت ۵ و ۱۰ میکرومولار تأثیر قابل توجهی در بهبود رشد آفتابگردان در شرایط شور نشان نداد.

شوری ۵۰ میلی‌مولار باعث افزایش معنی‌دار مقدار پروتئین کل شد. کاربرد سلنیوم در غلظت‌های مختلف اثر معنی‌داری بر مقدار پروتئین کل در شرایط غیرشور و شور نداشت (شکل A-۲). بررسی اثر شوری بر غلظت قندهای محلول نشان داد که شوری ۵۰ میلی‌مولار باعث افزایش معنی‌دار غلظت قندهای محلول شد. تأثیر سلنیوم در محیط فاقد نمک بر غلظت قندهای محلول منفی ولی معنی‌دار نبود. ولی، در محیط حاوی نمک کاربرد سلنیوم به‌خصوص در غلظت ۵ میکرومولار باعث کاهش غلظت قندهای محلول به‌طور معنی‌دار شد (شکل B-۲).

اگرچه اثر افزایشی شوری ۵۰ میلی‌مولار بر مقدار پرولین معنی‌دار نبود ولی با افزایش غلظت شوری به ۱۰۰ میلی‌مولار، غلظت پرولین افزایش معنی‌دار نشان داد. اثر سلنیوم بر غلظت پرولین در محیط فاقد نمک و واجد نمک ۵۰ mM معنی‌دار نبود ولی در محیط حاوی نمک mM ۱۰۰ باعث کاهش معنی‌دار این اسید آمینه شد (شکل C-۲).

یکی از مهم‌ترین سازوکارهای گیاهان مقاوم به شوری در شرایط شور، انباشت ترکیبات فعال اسمزی از قبیل قندهای محلول، پرولین و پروتئین‌ها می‌باشد (Azimi et al., 2013; Shariat and Heidari-Sharifabad, 2012).

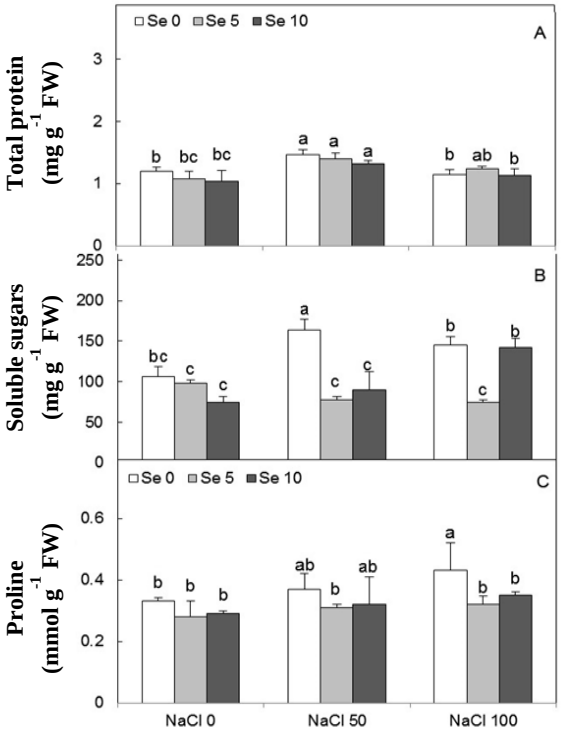

Figure 2. The effects of Se application on total protein, soluble sugars and proline of sunflower under salinity

انباشت این ترکیبات در سلول‌ها با کاهش پتانسیل اسمزی باعث حفظ پتانسیل آب سلول‌ها و در نتیجه تداوم فرآیندهای متابولیسمی گیاه می‌شود (Torabian, 2016). در این تحقیق شوری ۵۰ میلی‌مولار باعث افزایش پروتئین کل و قندهای محلول و شوری ۱۰۰ میلی‌مولار باعث انباشت پرولین در برگ‌ها به‌طور معنی‌دار شد. افزایش مقدار پرولین به‌صورت گسترده در گیاهان مختلف در پاسخ به تنش‌های مختلف در گیاهان دیده می‌شود. این اسید آمینه در زدایش رادیکال‌های آزاد، تنظیم پتانسیل اکسیداسیون سلولی، ذخیره ازت و حفظ فشار اسمزی نقش دارد که ویژگی اخیر برای تداوم فعالیت آنزیم‌های سیتوپلاسمی در شرایط شوری ضروری می‌باشد (Hoque et al., 2007). در این مطالعه، کاربرد سلنیوم در هر دو غلظت در محیط شور (۱۰۰ میلی‌مولار) باعث کاهش مقدار پرولین شد. بررسی تأثیر کاربرد سلنیوم روی پرولین در محیط‌های شور در گیاهان مختلف منجر به نتایج متفاوتی شده است. برای مثال افزایش مقدار پرولین با کاربرد سلنیوم در گیاه کدو (Hawrylak-Nowak, 2009) و عدم تغییر آن در کاهو (Hawrylak-Nowak, 2015) گزارش شده است. اگرچه تنش‌های محیطی اغلب باعث تخریب ساختار و از دست رفتن عملکرد پروتئین‌ها می‌شوند، ولی القاء مسیرهای ترارسانی علامت خاص و پاسخ‌های سلولی مانند سنتز پروتئین‌های تنشی و فراتنظیم شدن پروتئین‌های سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی در گیاهان مختلف مشاهده شده است که منجر به افزایش سطح پروتئین کل در پاسخ به تنش می‌شود (Kachout et al., 2013). مطالعات انجام گرفته روی قندها تحت تنش‌های محیطی مختلف نشان داده است که پاسخ این ترکیبات بسته به گونه گیاهی و نوع تنش متفاوت می‌باشد. برای مثال در تنش‌های خشکی، شوری، دمای پائین و غرقابی افغزایش غلظت قندهای محلول و در تنش‌هایی مانند عناصر سنگین، نور شدید و ازن کاهش آن‌هال مشاهده شده است. اگرچه نقش همه قندهای محلول شبیه نمی‌باشد، ولی عملکرد تعدادی از آن‌ها مانند گلوکز و ساکارز در تنظیم اسمزی در شرایط تنش شوری یا خشکی به اثبات رسیده است (Rosa et al., 2009).

تیمار شوری ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار و سلنیوم ۵ میکرومولار در محیط غیرشور باعث افزایش معنی‌دار فنل آزاد نسبت به شاهد گردید. ولی کاربرد سلنیوم تغییری در غلظت فنل آزاد در شرایط شور نسبت به شاهد ایجاد نکرد (شکل A-۳). شوری به‌تنهایی باعث کاهش معنی‌دار فلاونوئید کل شد. کاربرد سلنیوم ۵ میکرومولار باعث کاهش معنی‌دار فلاونوئید در شرایط غیر شور شد ولی در شرایط شور اثر تأثیر معنی‌داری بر آن نداشت (شکل B-۳).

شوری ۱۰۰ میلی‌مولار تغییر معنی‌دار در مقدار آنتوسیانین کل ایجاد نکرد، هرچند شوری ملایم (۵۰ میلی‌مولار) باعث افزایش آنتوسیانین شد. تأثیر سلنیوم بر آنتوسیانین برگ‌ها در شرایط شور و غیر شور معنی‌دار نبود (شکل A-۴). شوری ۱۰۰ میلی‌مولار باعث افزایش معنی‌دار مقدار تانن در برگ‌های گیاه آفتابگردان شد. کاربرد سلنیوم در غلظت ۵ و ۱۰ میکرومولار تأثیر معنی‌داری روی تانن در شرایط غیرشور نداشت. در شوری خفیف کاربرد سلنیوم ۱۰ میکرومولار باعث افزایش و در شوری زیاد کاربرد هر دو سطح سلنیوم باعث کاهش معنی‌دار تانن‌ها شد (شکل B-۴).

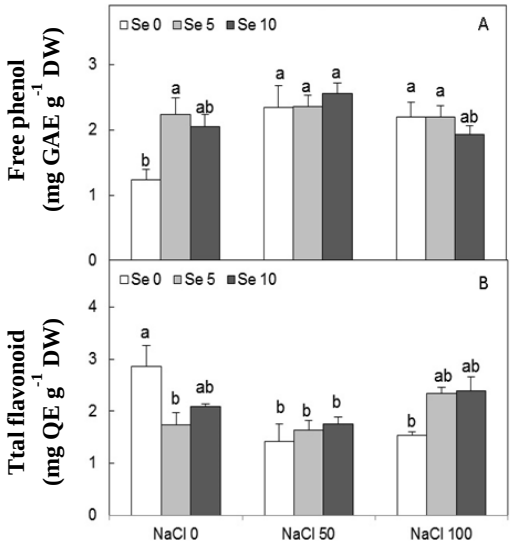

Figure 3. The effects of Se application on free phenols and flavonoids of sunflower under salinity

تیمار شوری ۱۰۰ میلی‌مولار تأثیر معنی‌داری بر انباشت لیگنین در برگ‌ها داشت. کاربرد سلنیوم ۵ میکرومولار باعث کاهش و سلنیوم ۱۰ میکرومولار باعث انباشت لیگنین در شرایط غیرشور شد. در شرایط شوری ۵۰ mM کاربرد سلنیوم در سطح ۱۰ میکرومولار و در شوری ۱۰۰ mM کاربرد سلنیوم در هر دو سطح باعث کاهش معنی‌دار لیگنین شد (شکل C-۴).

گیاهان در پاسخ به تنش‌های محیطی مقادیر زیادی از متابولیت‌های ثانویه فنلی مانند تانن‌ها، آنتوسیانین‌ها و سایر ترکیبات فنلی را سنتز می‌کنند که این ترکیبات به‌عنوان ترکیبات فعال اسمزی و آنتی‌اکسیدان عمل می‌کنند. در این پژوهش، گیاه آفتابگردان در پاسخ به شوری ملایم (۵۰ میلی‌مولار) تولید آنتوسیانین و فنل آزاد و در پاسخ به شوری بالا (۱۰۰ میلی‌مولار) علاوه بر فنل آزاد، تانن و لیگنین برگ‌ها را نیز افزایش داد. اعمال سلنیوم در غلظت‌های ۵ و ۱۰ میکرومولار تغییری در مقدار آنتوسیانین ایجاد نکرد، هر چند که افزایش تولید آنتوسیانین در غلظت‌های بسیار پایین سلنیوم در گیاهان دیگر گزارش شده است (Liu et al., 2017). ولی باعث افزایش تانن در شوری خفیف و کاهش لیگنین و تانن در شوری بالا گردید. فنل‌های آزاد از یک طرف در افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه مؤثر می‌باشند (Elguera et al., 2013) و از طرف دیگر در سنتز لیگنین نقش دارند که به‌عنوان یک سد دفاعی در تنش‌ها عمل می‌کند، چرا که فنل‌های آزاد پیش‌ساز سنتز لیگنین می‌باشند (Gill and Tuteya, 2010). تأثیر سلنیوم بر سنتز لیگنین در این پژوهش در شرایط غیرشور کاملاً وابسته به غلظت سلنیوم بکار رفته بود. به‌طوری‌که سلنیوم در غلظت پائین (۵ میکرومولار) باعث کاهش سنتز لیگنین ولی در غلظت بالا باعث افزایش آن گردید. ولی در شرایط شور (۱۰۰ میلی‌مولار) کاربرد سلنیوم باعث کاهش مقدار لیگنین و تانن شد.

فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در شرایط شور تغییر معنی‌داری نسبت به شاهد نشان نداد. کاربرد سلنیوم فقط در غلظت ۵ میکرومولار و در شرایط غیر شور باعث افزایش معنی‌دار فعالیت این آنزیم شد و در سایر تیمارها تأثیر معنی‌داری بر روی فعالیت این آنزیم نداشت (شکل A-۵). شوری ۵۰ میلی‌مولار باعث افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز به‌طور معنی‌دار شد. کاربرد سلنیوم ۱۰ میکرومولار در شرایط غیرشور باعث افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز شد. کاربرد سلنیوم در شوری ۵۰ میلی‌مولار باعث کاهش و در شوری ۱۰۰ میلی‌مولار باعث افزایش معنی‌دار فعالیت این آنزیم گردید (شکل B-۵). شوری در هر دو سطح (۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار) باعث افزایش معنی‌دار شاخص پراکسیداسیون لیپیدها (مالون‌دی‌آلدئید) شد. کاربرد سلنیوم با غلظت ۱۰ میکرومولار باعث افزایش معنی‌دار این متابولیت در شرایط غیر شور گردید (شکل C-۵).

در شرایط شور نیز کاربرد سلنیوم نتوانست باعث کاهش مالون‌دی‌آلدئید شود. اگرچه در تعدادی از تحقیقات نشان داده شده است که کاربرد سلنیوم در شرایط شور باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان جاروب‌کننده H_2O_2 می‌شود و درنهایت اثر شوری بر پراکسیداسیون لیپیدها را تخفیف می‌دهد (Filek et al., 2009; Kumar et al., 2012)، ولی در این تحقیق، کاربرد سلنیوم نتوانست از افزایش مقدار MDA ممانعت کند. بررسی اثر سلنیوم ۱۰ میکرومولار در شرایط غیرشور نیز نشان داد که این غلظت نه تنها نمی‌تواند باعث کاهش MDA

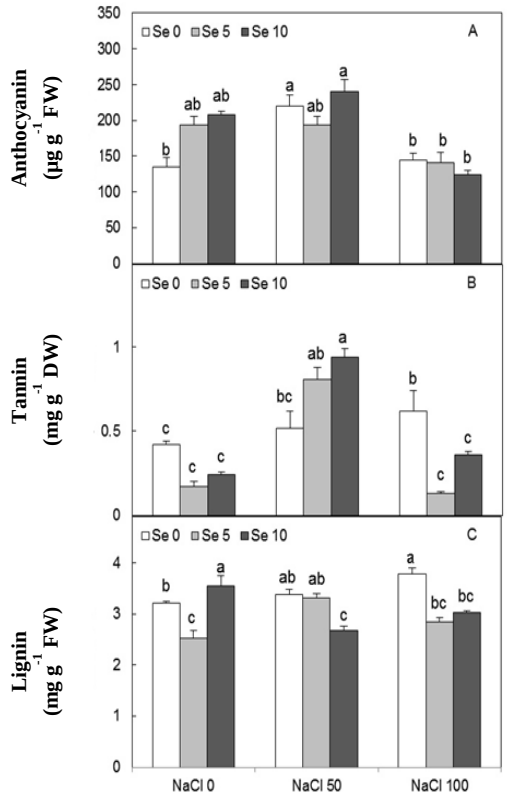

Figure 4. The effects of Se application on anthocyanin, tannins and lignin of sunflower under salinity

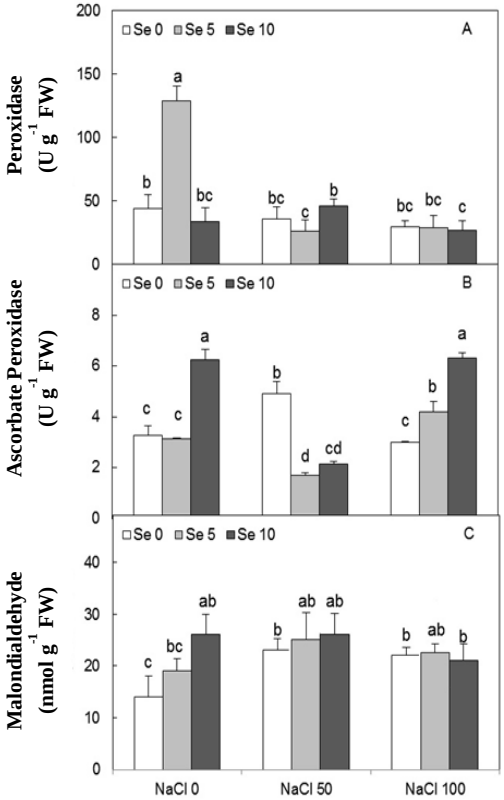

Figure 5. The effects of Se application on (guaiacol) peroxidase and ascorbate peroxidase and MDA content of sunflower under salinity

شود، بلکه باعث بروز سمیت در گیاه و افزایش معنی‌دار پر اکسیداسیون لیپیدها نیز می گردد.

نتیجه‌گیری

شوری ۱۰۰ میلی‌مولار از طریق افزایش رادیکال‌های پراکسیداسیون لیپیدها باعث افت معنی‌دار وزن خشک گیاه آفتابگردان شد. اعمال سلنیوم در غلظت‌های ۵ و ۱۰ ترکیبات فعال اسمزی مورد مطالعه و کاهش MDA میکرومولار هر چند باعث افزایش ترکیبات آنتی‌اکسیدان (مانند فنل‌های آزاد) و فعالیت بعضی از آنزیم‌های سیستم آنتی‌اکسیدان گردید ولی نتوانست باعث افزایش مؤثر تمام شود و اثر منفی شوری بر رشد را تخفیف دهد. براساس نتایج به‌دست‌آمده، کاربرد سلنیوم در غلظت‌های بکار رفته در این مطالعه، در تخفیف تنش شوری در گیاه آفتابگردان فاقد کارآیی کافی می‌باشد و توصیه می‌شود که غلظت‌های پائین‌تر از ۵ میکرومولار آن مورد بررسی قرار گیرد.

سپاس‌گزاری

مؤلفین از دانشگاه پیام نور مرکز تبریز به دلیل حمایت مالی و تأمین هزینه‌ها نهایت تشکر و قدردانی را دارند.

References

Azimi-Gandomani, M., Dehdari, A., Faraji, H., Movahedi-Dehanavi, M. and AliNaghizadeh, M. (2013). Evaluation of chlorophyll fluorescence and physiological characteristics of spring rapeseed (*Brassica rapa* L.) cultivars under salt stress. *Plant Productions*, 35(4), 1-16 [In Farsi]

Bates, L. S., Waldren, R. P. and Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39, 205-207.

Boominathan, R. and Doran, P. M. (2002). Ni induced oxidative stress in roots of the Ni hyperaccumlator, Alyssum bertoloni. *New Phytologist, 156*(24), 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(1-2), 248-254.

Cao, S., Yang, Z. and Zheng, Y. (2013). Sugar metabolism in relation to chilling tolerance of loquat fruit. *Food Chemistry,* 136(1), 139-143.

Cartes, P., Jara, A. A., Pinilla, L., Rosas, A. and Mora, M. L. (2010). Selenium improves the antioxidant ability against aluminum-induced oxidative stress in ryegrass roots. *Annals of Applied Biology*, 156(2), 297-307.

Chance, B. and Maehly, A. C. (1995). Assays of catalases and peroxidases. *Methods in Enzymology,* 2, 764-775.

Chaovanalikit, A. and Wrolstad, R. E. (2004). Total anthocyanins and total phenolics of fresh and processed cherries and their antioxidant properties. *Journal of Food Science*, 69(1), 67-72.

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*(*3), 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 and Soil,* 272(1-2), 77-86.

Dubey, R. S. (2005). Photosynthesis in plants under stress full conditions. In M. Pessarakli (ed), *Photosynthesis* (pp. 717-718). New York, USA :CRC Press .

DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. (1956). Colorometric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry,* 28(3), 350-356.

Elguera, J. C. T., Barrientos, E. Y., Wrobel, K. 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(2), 431-441.

Filek, M., Zembala, M., Hartikainen, H., Miszalski, Z., Kornas, A., Wietecka-Posłuszny, R. and Walas, P. (2009). Changes in wheat plastid membrane properties induced by cadmium and selenium in presence/absence of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture,* 96(1), 19-28.

Francois, L. E. (1996). Salinity effects on four sunflower hybrids. *Agronomy Journal,* 88(2), 215-219.

Gill, S. S. and Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry,* 48(12), 909-930.

Hashem, H. A., Hassanein, R. A., Bekheta, M. A. and El-Kady, F. A. (2013). Protective role of selenium in canola *Brassica napus* L. plant subjected to salt stress. *The Egyptian Journal of Experimental Biology Botany,* 9(2), 199-211.

Hassanuzzaman, M., Hossain, M. A. and Fujita, M. (2011). Selenium-induced up-regulation of the antioxidant defense and methylglyoxal detoxification system reduces salinity-induced damage in rapeseed seedlings. *Biological Trace Element Research,* 143(3), 1704-1721.

Hawrylak-Nowak, B. (2009). Beneficial effects of exogenous selenium in cucumber seedlings subjected to salt stress. *Biological Trace Element Research,* 132(1-3), 259-269.

Hawrylak-Nowak, B. (2015). Selenite is more efficient than selenate in alleviation of salt stress in lettuce plants. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica,* 57(2), 49-54.

Hoque, M. A., Okuma, E., Banu, M. N. A., Nakamura, Y., Shimoishi, Y. and Murata, Y. (2007). Exogenous proline mitigates the detrimental effects of salt stress more than exogenous betaine by increasing antioxidant enzyme activities. *Journal of Plant Physiology,* 164(5), 553-561.

Jiang, C., Zu, C., Lu, D., Zheng, Q., Shen, J., Wang, H. and Li, D. (2017). Effect of exogenous selenium supply on photosynthesis, Na^+ accumulation and antioxidative capacity of maize (*Zea mays* L.) under salinity stress. *Scientific Reports,* 7, 42039.

Kachout, S. S., Hamza, K. J., Bouraoui1, N. K., Leclerc, J. C. and Ouerghi, Z. (2013). Salt-induced changes in antioxidative enzyme activities in shoot tissues of two atriplex varieties. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca,* 41(1), 115-121.

Kong, L., Wang, M. and Bi, D. (2005). Selenium modulates the activities of antioxidant enzymes, osmotic homeostasis and promotes the growth of sorrel seedlings under salt stress. *Plant Growth Regulation,* 45(2), 155-163.

Kumar, M., Bijo, A. J., Baghel, R. S., Reddy, C. R. K. and Jha, B. (2012). Selenium and spermine alleviate cadmium induced toxicity in the red seaweed Gracilaria dura by regulating antioxidants and DNA methylation. *Plant Physiology and Biochemistry,* 51, 129-138.

Liu, D., Li, H., Wang, Y., Ying, Z., Bian, Z., Zhu, W. and Jiang, D. (2017). How exogenous selenium affects anthocyanin accumulation and biosynthesis-related gene expression in purple lettuce. *Polish Journal of Environmental Studies,* 26(2), 717-722.

Makkar, H. P. S., Blummolel, M., Borrowy, N. K. and Becker, K. (1993). Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. *Journal of Science and Food Agriculture,* 61(2), 161-165.

Nakano, Y. and Asada, K. (1987). Purification of ascorbate peroxidase from spinach chloroplasts: it's activation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydro-ascorbate radical. *Plant Cell Physiology,* 28(1), 131-140.

Rios, J. J., Blasco, B., Cervilla, L. M., Rosales, M. A., Sanchez- Rodriguez, E., Romero, L. and Ruiz, J.M. (2009). Production and detoxification of H_2O_2 in lettuce plants exposed to selenium. *Annals of Applied Biology,* 154(1), 107-116.

Rosa, R., Prado, C., Podazza, G., Interdonato, R., Gonzalez, J. A., Hilal, M. and E. Prado, F. (2009). Soluble sugars-metabolism, sensing and abiotic stress. *Plant Signaling and Behavior,* 4(5), 388-393.

Shahbaz, M., Ashraf, M., Akram, N.A., Hanif, A., Hameed, S., Joham, S. and Rehman, R. (2011). Salt-induced modulation in growth, photosynthetic capacity, proline content and ion accumulation in sunflower *Helianthus annuus* L. *Acta Physiologiae Plantarum,* 33(4), 1113-1122.

Shariat, A. and Heidari-Sharifabad, H. (2012). Study of salinity tolerance in salad burnet (*Poterium sanguisorba*) through physiological characteristics. *Plant Productions,* 34(2), 1-14 [In Persian]

Shekari, F., Abbasi, A. and Mustafavi, S. H. (2017). Effect of silicon and selenium on enzymatic changes and productivity of dill in saline condition. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences,* 16(4), 367-374.

Sonobe, K., Hattori, T., An, P., Tsuji, W., Eneji, E., Tanaka, K. and Inanaga, S. (2009). Diurnal variations in photosynthesis, stomatal conductance and leaf water relation in sorghum grown with or without silicon under water stress. *Journal of Plant Nutrition,* 32(3), 433-442.

Torabian, S., Zahedi, M. and Khoshgoftarmanesh, A. (2016). Effect of foliar spray of zinc oxide on some antioxidant enzymes activity of sunflower under salt stress. *Journal of Agricultural Science and Technology,* 18(4), 1013-1025.

Treutter, D. (2006). Significance of flavonoids in plant resistance: A review. Environmental Chemistry Letters, *4*(3): 147-157.

Umar, M. and Siddiqui, Z. S. (2018). Physiological performance of sunflower genotypes under combined salt and drought stress environment. *Acta Botanica Croatica,* 77(1), 36-44.