Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Journal of Plant Production Research

Print ISSN: 2322-2050
Online ISSN: 2322-2778

(OPEN ACCESS)

Effect of selenium and melatonin on growth and nitrate accumulation in spinach (*Spinacea oleracea* L.)

Khwaja Wahedullah Moqadas[1], Farshad Dashti[*2]

1. M.Sc. Graduate of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran and Assistant Prof., Dept. of Horticulture, Faculty of Agriculture, Alberoni University, Kapisa, Afghanistan. E-mail: moqadas@au.edu.af
2. Corresponding Author, Associate Prof., Dept. of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran. E-mail: fdashti@basu.ac.ir

Article Info

Article type:
Full Length Research Paper

Article history:
Received: 02.17.2025
Revised: 04.05.2025
Accepted: 05.18.2025

Keywords:
Growth traits,
Nitrate reductase,
Sodium selenite,
Total biomass

ABSTRACT

Background and Objectives: Spinach (*Spinacia oleracea* L.) is very important in the diet due to its high nutritional value, so it is consumed in large quantities in most countries of the world. But this vegetable has a high ability to accumulate nitrates, and if we don't pay attention to its nitrates, it can pose risk to human health. This has led to extensive research on the possibility of reducing nitrate accumulation in this vegetable. Some of these researches are focused on the application of nutritional elements and plant hormones. It has been reported that the application of selenium and melatonin hormone is effective in reducing nitrate accumulation in various plants. This research aims to investigate the effect of selenium nutrition and melatonin spraying, as well as the interaction between the two, on the growth and nitrate accumulation in spinach.

Materials and Methods: This study was conducted as a factorial experiment in a complete randomized design, including selenium as sodium selenite (0, 5, and 10 µM) and melatonin (0, 50, and 100 µM) in hydroponic cultivation and in a substrate of coco peat and perlite. The melatonin treatment was applied as a foliar spray at the three-leaf stage and after sunset, twice with a one-week interval. Selenium treatment was given to the plants in combination with the Hoagland nutrient solution. Growth indices, chlorophyll, leaf antioxidant capacity, total flavonoid concentration, total phenol concentration, vitamin C content, nitrate, and nitrate reductase enzyme activity were measured after harvesting the plants.

Results: The results of this research showed that the use of selenium and melatonin increased the growth traits such as total fresh weight biomass, shoot fresh weight, leaf fresh weight, and total dry weight biomass compared to the control. Application of selenium and melatonin increased some biochemical traits such as total phenol and flavonoid, antioxidant capacity and selenium of leaves. Data analysis showed that selenium and melatonin are effective in reducing nitrate accumulation in leaves and stems, and their effectiveness depends on their concentration. The findings of this research showed that selenium and melatonin have a better effect in reducing nitrate accumulation in leaves compared to stem. One reason for

the effectiveness of melatonin in leaves compared to stems may be due to the larger surface area of the leaves being exposed to the melatonin spray. It seems that selenium has a negative effect on the plant at a concentration of 10 mM, although it has reduced nitrate accumulation; however, it was not as effective as at the level of 5 mM. The application of 50 mM melatonin resulted in a decrease in nitrate levels, but the concentration of 100 mM melatonin was more effective than 50 mM. It is possible that higher levels of melatonin are more effective in the expression of genes related to nitrate and nitrite reductase enzymes and thereby reduce nitrate levels. The highest amount of nitrate was found in the leaves and stems and the lowest amount of nitrate reductase enzyme activity was found in the leaves and stems of control plants, while the lowest amount of nitrate in leaves and stems was obtained in the treatment combination of 5 µM selenium and 100 µM melatonin, which decreased the amount of nitrate in the leaf to 65% and in the stem to 52%, And nitrate reductase enzyme activity showed a 32% increase in the leaf and a 65% increase in the stem compared to the control.

Conclusion: Present research show that, the treatment combination of 5 µM selenium and 100 µM melatonin had the best effect in increasing total biomass (wet and dry) and reducing nitrate accumulation in spinach.

Cite this article: Moqadas, Khwaja Wahedullah, Dashti, Farshad. 2026. Effect of selenium and melatonin on growth and nitrate accumulation in spinach (*Spinacea oleracea* L.). *Journal of Plant Production Research*, 32 (4), 147-163.

© The Author(s).
DOI: 10.22069/jopp.2025.23340.3235
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی

شاپا چاپی: ۲۳۲۲-۲۰۵۰
شاپا آنلاین: ۲۳۲۲-۲۷۷۸

اثر سلنیوم و ملاتونین بر رشد و تجمع نیترات در اسفناج (*Spinacea oleracea* L.)

خواجه واحدالله مقدس[۱]، فرشاد دشتی[*۲]

۱. دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان، ایران و استادیار گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه البیرونی، کاپیسا، افغانستان. رایانامه: moqadas@au.edu.af

۲. نویسنده مسئول، دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان، ایران. رایانامه: fdashti@basu.ac.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی- پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۱/۲۹
تاریخ ویرایش: ۱۴۰۴/۰۱/۱۶
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۲/۲۸

واژه‌های کلیدی:
زیست‌توده کل،
سلنات سدیم،
صفات رشدی،
نیترات ردوکتاز

چکیده

سابقه و هدف: اسفناج (*Spinacia oleracea* L.) به دلیل ارزش تغذیه‌ای بالا از اهمیت بسیاری در رژیم غذایی برخوردار است، به‌طوری‌که در اکثر کشورهای دنیا به مقدار زیاد مصرف می‌شود؛ اما این سبزی قابلیت بالایی در تجمع نیترات داشته و در صورت عدم توجه به نیترات موجود در آن، می‌تواند برای سلامتی انسان خطرآفرین باشد. این امر باعث شده است که پژوهش‌های گسترده‌ای در رابطه با امکان کاهش تجمع نیترات در این سبزی انجام شود. برخی از این پژوهش‌ها بر کاربرد عناصر تغذیه‌ای و هورمون‌های گیاهی متمرکز شده‌اند. گزارش شده است که کاربرد عنصر سلنیوم و هورمون ملاتونین در کاهش تجمع نیترات در گیاهان مختلف مؤثر است. این پژوهش بر آن است تا اثر تغذیه اسفناج با سلنیوم و هم‌چنین محلول‌پاشی ملاتونین و به‌خصوص اثرمتقابل این دو را بر رشد و تجمع نیترات در اسفناج بررسی کند.

مواد و روش‌ها: این پژوهش به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی شامل سلنیوم از منبع سلنات سدیم (۰، ۵ و ۱۰ میکرومولار) و ملاتونین (۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار) درکشت هیدروپونیک و در بستر کوکوپیت و پرلیت انجام شد. تیمار ملاتونین به‌صورت محلول‌پاشی برگی در مرحله ۳ برگی و پس از غروب آفتاب، دوبار و بافاصله یک هفته انجام شد. تیمار سلنیوم در ترکیب با محلول غذایی هوگلند به گیاهان داده شد. شاخص‌های رشد، کلروفیل، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی برگ، غلظت فلاونوئید کل، غلظت فنل کل، میزان ویتامین ث، نیترات و فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز پس از برداشت گیاهان اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: نتایج این پژوهش نشان داد که کاربرد سلنوم و ملاتونین سبب افزایش صفات رشدی مانند، زیست‌توده کل (وزن‌تر و خشک)، وزن‌تر اندام هوایی و وزن‌تر برگ نسبت به شاهد شد. کاربرد سلنیوم و ملاتونین سبب افزایش بعضی از صفات کیفی مانند محتوای فنل کل، ظرفیت

آنتی‌اکسیدانی و میزان سلنیوم برگ شد. تجزیه‌وتحلیل داده‌ها نشان داد که سلنیوم و ملاتونین در کاهش تجمع نیترات در برگ و ساقه مؤثر هستند که اثربخشیبستگی به غلظت آن‌ها دارد. یافته‌های این پژوهش نشان داد که سلنیوم و ملاتونین اثر بهتری در کاهش تجمع نیترات در برگ نسبت اثربخشی‌شان به ساقه داشتند. سلنیوم در سطح ۱۰ میکرومولار اثر منفی روی رشد گیاه داشت چراکه باعث کاهش زیست‌توده کل و وزن‌تر اندام هوایی نسبت به شاهد شد. اگرچه غلظت ۱۰ میکرومولار سلنیوم تجمع نیترات در گیاه را کاهش داد ولی تأثیر تیمار ۵ میکرومولار به‌مراتب بیش‌تر بود. به‌کارگیری ۵۰ میکرومولار ملاتونین منجر به کاهش میزان نیترات برگ شد اما سطح ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین تأثیر بیش‌تری نسبت به ۵۰ میکرومولار داشت. در ترکیب تیمارها، بیش‌ترین میزان نیترات در برگ و ساقه و کم‌ترین میزان فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در برگ و ساقه مربوط به گیاهان شاهد بود درحالی‌که کم‌ترین میزان نیترات در برگ و ساقه در ترکیب تیماری ۵ میکرومولار سلنیوم و ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین به‌دست آمد، به‌طوری‌که میزان نیترات در برگ و ساقه به ترتیب ٦۵ و ۵۲ درصد نسبت به شاهد کاهش یافت، در همین تیمار میزان فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در برگ و ساقه به ترتیب ۳۲ و ٦۵ درصد نسبت به شاهد افزایش نشان داد. احتمال می‌رود که کاربرد سلنیوم و ملاتونین با افزایش بیان ژن‌های مرتبط به آنزیم نیترات ردوکتاز بر کاهش تجمع نیترات در اسفناج مؤثر بوده است.

نتیجه‌گیری: پژوهش حاضر نشان داد که ترکیب تیماری ۵ میکرومولار سلنیوم و ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین بهترین اثر در افزایش زیست‌توده کل (تر و خشک) و کاهش تجمع نیترات در اسفناج داشت.

استناد: مقدس، خواجه واحدالله، دشتی، فرشاد (۱۴۰۴). اثر سلنیوم و ملاتونین بر رشد و تجمع نیترات در اسفناج (*Spinacea oleracea* L.). *نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی*، ۳۲ (۴)، ۱۶۳-۱۴۷.
DOI: 10.22069/jopp.2025.23340.3235

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
© نویسندگان.

مقدمه

اسفناج (*Spinacia oleracea* L.) ازجمله سبزی‌های برگی باارزش غذایی بالا بوده که حاوی ویتامین‌ها، مواد معدنی، ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و عناصر ضروری می‌باشد (۱). این گیاه یک محصول مهم تجاری است که در سراسر دنیا کشت و مصرف می‌شود (۲). اسفناج به هدف مصرف تازه، یخزده و کنسروسازی کشت می‌شود اگرچه مصرف تازه بیش‌تر مدنظر است به‌طوری‌که بیش از ۹۰ درصد اسفناج کشت‌شده در ایالات‌متحده امریکا به مصرف تازه خوری می‌رسد (۳).

به‌دلیل خوراکی بودن بخش‌های رویشی سبزی‌های برگی و تأثیر زیاد کودهای نیتروژن‌دار بر رشد رویشی و عملکرد این گیاهان، این کودها به‌صورت بی‌رویه در پرورش سبزی‌های یادشده استفاده می‌شوند که منجر به تجمع نیترات در اندام‌های مختلف این سبزی‌ها می‌شود. تجمع نیترات ازجمله عوامل نامطلوبی است که می‌تواند تأثیر منفی برکیفیت سبزی‌ها (مخصوصاً سبزی‌های برگی) داشته باشد (٤). در بین سبزی‌های برگی، کاهو و اسفناج به‌عنوان بیش‌ترین انباشت‌دهنده‌های نیترات محسوب می‌شوند و تقریباً ۷۲ تا ۹٤ درصد میانگین مصرف روزانه نیترات انسان‌ها را به خود اختصاص می‌دهند (۵).

عامل اصلی تجمع نیترات در گیاهان، کاربرد بیش‌ازحد کودهای نیتروژنی است. آمونیم و نیترات از فرم‌های قابل‌جذب نیتروژن در گیاه بوده که مقدار جذبشان بر اساس گونه گیاهی، میزان کاربرد و نوع خاک فرق می‌کند (٦). تجمع نیترات در گیاهان تحت‌تأثیر عوامل دیگری ازجمله اندام مصرفی گیاه، شدت نور، تراکم و زمان برداشت نیز قرار می‌گیرد. بررسی‌ها نشان می‌دهد که محتوای بالای نیترات با آسمیلاسیون ناکافی نیترات همراه است. سبزی‌های برگی مانند اسفناج، کاهو و آندیو ممکن است تا ۱۰ درصد وزن خشکشان دارای نیترات باشند که برای سلامتی مصرف‌کننده مضر است. هنگامی‌که این سبزی‌ها خورده می‌شوند نیترات می‌تواند باهموگلوبین خون ترکیب‌شده و باعث بروز کم‌خونی شود. از طرف دیگر نیترات ممکن است به نیتریت تبدیل‌شده و این ماده در ترکیب با اسیدهای آمینه، باعث تولید نیتروزآمین‌های سرطان‌زا شود (۷، ۸).

سلنیوم یک ریزمغذی ضروری برای انسان و حیوانات است. این عنصر مهم در عملکرد بهتر تیروئید مؤثر بوده و سامانه ایمنی را تقویت می‌کند. سلنیوم با داشتن خاصیت آنتی‌اکسیدانی خطر ابتلا به سرطان و بیماری‌های قلبی را کاهش می‌دهد (۹). نکته بسیار مهمی که باید به آن توجه داشت این‌که مرز بین سمیت و کمبود سلنیوم برای انسان و گیاه بسیار باریک بوده و بستگی زیادی به شکل شیمیایی سلنیوم دارد (۱۰). پژوهش‌های زیادی نشان می‌دهد که سلنیوم نقش مهمی در کاهش تجمع نیترات دارد. برنگی و ابوالساد (۲۰۱۹) با پژوهشی که روی اسفناج انجام دادند گزارش کردند که محلول‌پاشی برگی سلنیوم منجر به کاهش میزان نیترات در اسفناج شد (۱۱). سلنیوم با افزایش فعالیت چندین آنزیم مثل، نیترات و نیتریت ردوکتاز، گلوتامین سنتتاز و گلوتامید سنتز باعث کاهش غلظت نیترات در گیاه شاهی شد (۱۲).

ملاتونین (n- استیل- ۵- متوکسی ترپتامین) هورمونی از نوع ایندول آمین و مشتق از تریپتوفان است که در مهره‌داران نقش‌های فیزیولوژیک متعددی برعهده دارد. در گیاهان عالی ملاتونین ازنظر مسیر بیوسنتز و اعمال فیزیولوژیک دارای اشتراکاتی با هورمون ایندول استیک اسید است (۱۳). ملاتونین یک ترکیب ایندولی است که به‌طور طبیعی در گیاهان تولید می‌شود و در تنظیم رشد ریشه، شاخه، جوانه‌زنی و تأخیر در پیری برگ نقش دارد (١٤).

بررسی‌ها نشان می‌دهد که ملاتونین در کاهش تجمع نیترات مؤثر است. پیش تیمار دانهال‌های خیار با ملاتونین قبل از تنش نیترات، تجمع نیترات و آمونیم اضافی را متوقف کرده و فعالیت آنزیم‌ها و ژن‌های دخیل در سوخت‌وساز نیترات را افزایش داد (۱۵). استفاده از ملاتونین سبب کاهش محتوای نیترات در برگ و ریشه کاهو شد (١٦).

یکی از راهکارهای کاهش تجمع نیترات استفاده از عناصری غذایی مانند سلنیوم و هورمون‌هایی مانند ملاتونین است. از طرف دیگر درده شده است که این مواد بر رشد گیاه اثرگذار هستند؛ بنابراین این هدف از این پژوهش بررسی اثر کاربرد سلنیوم و ملاتونین بر رشد و کاهش تجمع نیترات در اسفناج می‌باشد.

مواد و روش‌ها

محل اجرای پژوهش و طرح آماری: این پژوهش در اواخر تابستان سال ١٤٠٠ در گلخانه‌ی پژوهشی و آزمایشگاه‌های گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی‌سینا واقع در همدان انجام شد. این پژوهش در قالب آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با دو عامل سلنیوم در سه سطح (۰، ۵ و ۱۰ میکرومولار از منبع سلنات سدیم) و ملاتونین در سه سطح (۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار) در سه تکرار انجام شد. بذر گیاه اسفناج رقم ویکنگ (کمپانی SUBA seed) در سینی نشا حاوی کوکوپیت و پرلیت (نسبت ۳ به ۱) کشت گردید. آبیاری بذور توسط آب مقطر تا مرحله جوانه‌زنی انجام شد. بعد از ظاهر شدن لپه‌ها، نشاها ابتدا با محلول یک‌چهارم غلظت هوگلند تغذیه شدند. گیاهان در مرحله دوبرگی به گلدان‌های چهار لیتری حاوی کوکوپیت پرلیت (۳ به ۱) انتقال داده شدند. در هر گلدان ٦ گیاه کشت شد و هر واحد آزمایشی شامل دو گلدان بود. پس از انتقال، گیاهان تا یک هفته با محلول نصف غلظت هوگلند تغذیه شدند و سپس با محلول کامل هوگلند تا مرحله برداشت تجاری (٦-۷ برگی در تیمار شاهد) تغذیه شدند. تیمار سلنیوم همراه با محلول هوگلند و تیمار ملاتونین به‌صورت محلول پاشی برگی صورت گرفت. محلول پاشی ملاتونین در مرحله ۳ برگی گیاهان انجام‌شده و یک هفته بعد تکرار شد. جهت جذب بهتر و جلوگیری از تجزیه ملاتونین، محلول پاشی پس از غروب آفتاب صورت گرفت. کل دوره رشدی گیاه از کشت بذر تا برداشت ۷۵ روز شد.

اندازه‌گیری صفات رشدی

زیست‌توده کل، وزن‌تر و خشک اندام‌های هوایی و ریشه، تعداد و سطح برگ: جهت اندازه‌گیری زیست‌توده کل، وزن‌تر و خشک اندام‌های هوایی و ریشه در پایان آزمایش، ابتدا گیاهان از گلدان خارج‌شده و پس از تمیز کردن، به‌وسیله ترازو با دقت ۰/۰۱ گرم وزن شدند. سپس اندام‌های مختلف گیاه جداشده و جداگانه توزین شدند. بخشی از نمونه‌ها جهت اندازه‌گیری وزن خشک به مدت ٤٨ ساعت در آون با دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و بخشی نیز در فریز ۸۰- قرار داده شدند. سطح برگ گیاهان نیز با استفاده از نرم‌افزار Image-J اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری صفات زیست‌شیمیایی: کلروفیل به روش پورا و همکاران (۱۷)، اندازه‌گیری شد. در ابتدا ۰/۲ گرم از بافت تازه برگ‌های سالم و کاملاً توسعه‌یافته توزین شده و با ۵ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد، در تاریکی، کاملاً کوبیده شد. محلول حاصل به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ٤۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شده و پس از جدا کردن عصاره رویی، مرحله بالا دو بار دیگر تکرار گردید. سپس میزان جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل کری، ۱۰۰ وریان، آمریکا) قرائت گردید.

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی برگ مطابق به روش لی و همکاران (۱۸) انجام شد. در این روش از ماده DPPH استفاده شد. بدین‌صورت که محلول ٦٠ میکرومولار DPPH به عصاره برگ اضافه‌شده و پس از ۳۰ دقیقه نگهداری در دمای اتاق و در تاریکی، میزان جذب در طول‌موج ۵۱۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل کری، ۱۰۰ وریان، آمریکا) قرائت گردید. فلاونوئید کل در طول‌موج ۵۱۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر در مقابل بلانک آب مقطر قرائت شد. غلظت فنل کل با استفاده از روش فولین-سیکالتو (۱۹) اندازه‌گیری شد. مقدار ۰/۳ میلی‌لیتر عصاره برگ در تاریکی توسط سمپلر جدا کرده و درون لوله‌آزمایش ریخته شد و سپس ۱/۵ میلی‌لیتر فولین ۱۰ درصد به آن اضافه گردید و بعد از گذشت ۵ دقیقه، ۱/۲ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۷ درصد به آن اضافه شد و به مدت ۹۰ دقیقه روی شیکر با ۱۱۰ دور در دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی قرار گرفت و در انتها ٦ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه شد که حجم نهایی به ۹ میلی‌لیتر رسید نهایتاً با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل کری ۱۰۰، آمریکا) میزان جذب نور نمونه‌ها در طول‌موج ٧٦٥ نانومتر، قرائت گردید با استفاده از اسید گالیک به‌عنوان استاندارد محتویات فنلی کل در بافت برگ به‌وسیله واکنش فولین سیوکالتو تعیین گردید با استفاده از منحنی استاندارد اسید گالیک، مجموع فنل به‌صورت میلی‌گرم اسید گالیک در ۱۰۰ گرم وزن تازه بیان شد. اندازه‌گیری ویتامین ث با تیتراسیون توسط ماده دیکلروفنل ایندول فنل انجام شد. پس از اضافه کردن چند قطره محلول اسید فسفریک به عصاره برگ، با محلول رنگی متافسفریک دیکلروفنل ایندول فنل تیتر گردید. زمانی که رنگ عصاره به رنگ تقریباً صورتی تغییر یافت و به مدت ۳۰ ثانیه ثابت ماند حجم ماده رنگی دیکلروفنل ایندول فنل مصرف‌شده قرائت و میزان ویتامین ث از طریق فرمول مربوطه محاسبه گردید.

غلظت نیترات برگ و ساقه: برای اندازه‌گیری نیترات از روش اسید سولفوسالیسیلیک - سود (۲۰) استفاده شد. عصاره گیری نیترات در آب داغ صورت گرفت. ابتدا ۰/۵ گرم ماده تر گیاهی توزین و در هاون چینی به همراه ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر کوبیده در لوله آزمایش ریخته شد، سپس ٤٠ دقیقه در بن‌ماری ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از صاف کردن با کاغذ واتمن، ۰/۲ میلی‌لیتر از عصاره رویی را برداشته و ۰/۸ میلی‌لیتر معرف سولفوسالیسیلیک ۵ درصد (w/v) که از حل شدن ۵ گرم اسید سالیسیلیک در ۱۰۰ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک غلیظ (٩٦ درصد) تهیه‌شده بود، اضافه گردیده و خوب هم زده شد. بعد از خنک شدن نمونه‌ها (۲۰ دقیقه) به آن‌ها ۱۹ میلی‌لیتر سود (NaOH) دو نرمال اضافه شد. پس‌ازآن که نمونه‌ها کاملاً سرد شدند، مقدار جذب آن‌ها در طول‌موج ٤١٠ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر (مدل شیماتسو، ژاپن) قرائت شد. فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز با روش ارائه‌شده توسط سیم (۲۱) اندازه‌گیری شد.

تجزیه آماری: نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش به کمک نرم‌افزار SAS-9.4 تجزیه آماری و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

اثر سلنیوم و ملاتونین بر صفات رشدی اسفناج: اثر سلنیوم، ملاتونین و اثر متقابل آن‌ها بر زیست‌توده کل (وزن‌تر و خشک)، وزن‌تر اندام هوایی و وزن‌تر برگ، وزن‌تر ساقه و زیست‌توده کل ماده خشک و سطح برگ اثر معنی‌دار داشت؛ اما اثر سلنیوم و ملاتونین و اثرات متقابل این دو بر وزن خشک اندام هوایی، ریشه و ساقه، وزن خشک برگ، تعداد برگ و طول و قطر ساقه معنی‌دار نبود.

در رابطه با زیست‌توده کل ماده‌تر همان‌گونه که در جدول ۱ مشخص است در اثرات ساده، تیمار سلنیوم ۵ میکرومولار باعث افزایش تولید ماده‌تر شد اما سلنیوم ۱۰ میکرومولار مقدار تولید ماده‌تر را نسبت به عدم کاربرد سلنیوم کاهش داد که نشان‌دهنده اثر منفی این عنصر بر رشد در غلظت بالاست. اثر ساده تیمار ملاتونین نشان داد که با افزایش غلظت ملاتونین میزان زیست‌توده کل افزایش‌یافته است.

جدول ۱- اثر سلنیوم و ملاتونین بر ویژگی‌های رشدی اسفناج.

Table 1. Effect of selenium and melatonin on growth parameters of spinach.

تیمار Treatment	زیست‌توده کل (ماده‌تر بوته) Total biomass (F/W) (g)	وزن‌تر اندام هوایی بوته Shoot fresh weight (g)	وزن‌تر ریشه Root fresh weight (g)	وزن‌تر ساقه Stem fresh weight (g)	وزن‌تر برگ Leaf fresh weight (g)	زیست‌توده کل (وزن ماده خشک بوته) Total biomass (D/W) (g)	وزن خشک اندام هوایی بوته Shot dry weight (g)	وزن خشک‌ریشه بوته Root dry weight (g)
S_0	13.88 b	12.06 b	1.78 a	1.25 ab	10.81 b	0.97 ab	0.33 a	0.25 a
S_5	15.28 a	13.67 a	1.65 a	1.37 a	12.27 a	1.04 a	0.36 a	0.23 a
S_{10}	13.30 c	11.47 c	1.8 a	0.98 b	10.50 b	0.89 b	0.31 a	0.23 a
M_0	13.25 c	11.55 c	1.67 a	1.17 a	10.39 c	0.88 b	0.33 a	0.22 a
M_{50}	13.91 b	12.25 b	1.67 a	1.17 a	11.07 b	0.99 a	0.34 a	0.25 a
M_{100}	15.31 a	13.41 a	1.88 a	1.27 a	12.14 a	1.03 a	0.34 a	0.24 a
S_0M_0	12.23 d	10.50 de	1.70 ab	1.09 ab	9.41 c	0.85 c	0.32 a	0.21 a
S_0M_{50}	14.90 b	13.06 bc	1.83 ab	1.42 a	11.64 b	1.15 b	0.34 a	0.31 a
S_0M_{100}	14.53 b	12.63 c	1.83 ab	1.25 a	11.39 b	0.90 c	0.34 a	0.22 a
S_5M_0	14.56 b	13.16 bc	1.43 b	1.24 a	11.89 ab	0.85 c	0.34 a	0.21 a
S_5M_{50}	15.00 b	13.63 ab	1.43 b	1.43 a	12.16 ab	0.90 c	0.38 a	0.21 a
S_5M_{100}	16.30 a	14.23 a	2.10 a	1.45 a	12.77 a	1.37 a	0.38 a	0.28 a
$S_{10}M_0$	12.96 c	11.00 d	1.90 ab	1.17 ab	9.86 c	0.94 c	0.34 a	0.25 a
$S_{10}M_{50}$	11.83 d	10.06 e	1.76 ab	0.66 b	9.40 c	0.93 c	0.30 a	0.23 a
$S_{10}M_{100}$	15.10 b	13.36 abc	1.73 ab	1.11 ab	12.25 ab	0.89 c	0.30 a	0.21 a

حروف مشابه تیمار و ترکیب تیماری نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد. S۰، S۵ و S۱۰ به ترتیب سلنیوم در سطوح ۰، ۵ و ۱۰ میکرومولار و M۰، M۵۰ و M۱۰۰ به ترتیب ملاتونین در سطوح ۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار می‌باشد

Similar letters for treatment and treatment combination indicate the absence of significant difference at the 5% probability level. S_0, S_5 and S_{10} are respectively selenium levels at 0, 5 and 10 mM and M_0, M_{50} and M_{100} are respectively melatonin levels at 0, 50 and 100 mM

با توجه به معنی‌دار شدن اثرات متقابل ترکیب تیمارها مشخص شد که در سطح صفر سلنیوم هر دو تیمار ۵۰ و ۱۰۰ ملاتونین بدون اختلاف معنی‌دار با یکدیگر میزان تولید زیست‌توده را نسبت به شاهد افزایش دادند. بین ترکیب تیماری ۵ سلنیوم و صفر ملاتونین و ترکیب تیماری ۵ سلنیوم و ۵۰ ملاتونین اختلاف معنی‌دار وجود ندارد اما در ترکیب تیماری ۵ سلنیوم و ۱۰۰ ملاتونین بالاترین میزان زیست‌توده در کل تیمارها مشاهده شد. نتیجه بسیار جالب در سطح ۱۰ سلنیوم مشاهده شد جایی که ملاتونین ۱۰۰

توانست اثرات منفی غلظت بالای سلنیوم را تعدیل کند و زیست‌توده قابل‌توجهی که به‌طور معنی‌داری از تیمار شاهد بیشتر بود را تولید کند. در رابطه با سطح برگ نیز همین روند مشاهده می‌شود، اگرچه در اثرات ساده تیمار ۵ میکرومولار سلنیوم باعث افزایش سطح برگ نسبت به شاهد شد اما تیمار ۱۰ میکرومولار سلنیوم اثر منفی روی سطح برگ نشان داد. از طرف دیگر کاربرد ملاتونین توانست سطح برگ را افزایش دهد و نکته جالب این‌که در ترکیب تیمارها ملاتونین توانست اثرات منفی سلنیوم ۱۰ را مرتفع کرده و سطح برگ گیاه را حتی بیش از گیاه شاهد افزایش دهد. با توجه به عدم تأثیر معنی‌دار تیمارها بر تعداد برگ و وزن ساقه، اثر تیمارها بر افزایش و یا کاهش صفات رشدی ناشی از اثر بر سطح و وزن برگ‌ها بود (جدول ۱).

استفاده از سلنیوم باعث افزایش ماده خشک گردید که با پژوهش‌های قبلی در رابطه با گندم و اسفناج همخوانی داشت (۲۵، ۲۶). استفاده از سلنات سدیم منجر به افزایش وزن‌تر اندام هوایی در گیاه شده که با یافته‌ها در مورد گیاه خردل (۱۲) مطابقت داشت. از این‌که ملاتونین یک هورمون زیستی بوده و فعالیت‌های فیزیولوژیکی گیاه را تحت‌تأثیر قرار می‌دهد، احتمال می‌رود که ملاتونین با تأثیرگزاری بالای رشد رویشی گیاه منجر به افزایش زیست‌توده کل می‌شود. ملاتونین در افزایش زیست‌توده کل (تر و خشک شد) مؤثر واقع شد که با یافته موسی و الگمال (۱) همخوانی داشت. گزارش‌شده است که ملاتونین در رشد اندام هوایی مؤثر است (۲۷) که نتایج پژوهش حاضر را تأیید می‌کند.

جدول ۲- اثر سلنیوم و ملاتونین بر ویژگی‌های رشدی اسفناج.

Table 2. Effect of selenium and melatonin on growth parameters of spinach.

قطر ساقه Diameter of stem (mm)	طول ساقه Length of stem (cm)	سطح برگ Leaf area (cm^2)	تعداد برگ Leaf number (n)	وزن خشک برگ Dry weight of leaf (g)	وزن خشک ساقه Stem dry weight (g)	تیمار Treatment
4.92 a	11.94 a	32.81 b	9.20 a	0.60 a	0.07 ab	S_0
4.80 a	12.55 a	37.70 a	9.90 a	0.65 a	0.09 a	S_5
4.22 a	10.27 a	28.05 c	9.31 a	0.56 a	0.06 b	S_{10}
4.87 ab	12.74 a	31.06 c	9.47 a	0.60 a	0.078 a	M_0
3.94 b	10.55 a	33.05 b	9.37 a	0.62 a	0.076 a	M_{50}
5.13 a	11.47 a	34.44 a	9.55 a	0.60 a	0.077 a	M_{100}
5.10 ab	12.36 a	32.7 c	8.80 a	0.60 a	0.066 ab	S_0M_0
3.33 b	12.20 a	34.40 ab	9.60 a	0.60 a	0.090 a	S_0M_{50}
6.33 a	11.26 ab	27.33 d	9.20 a	0.60 a	0.073 ab	S_0M_{100}
4.51 ab	13.20 a	36.00 b	9.93 a	0.60 a	0.090 a	S_5M_0
4.66 ab	12.30 a	39.10 a	10.10 a	0.70 a	0.096 a	S_5M_{50}
5.23 ab	12.16 a	38.00 ab	9.66 a	0.66 a	0.086 a	S_5M_{100}
5.00 ab	12.66 a	24.50 e	9.70 a	0.60 a	0.080 ab	$S_{10}M_0$
3.83 b	7.16 b	21.66 f	8.43 a	0.56 a	0.043 b	$S_{10}M_{50}$
3.83 b	11.00 ab	38.00 ab	9.80 a	0.53 a	0.073 ab	$S_{10}M_{100}$

حروف مشابه تیمار و ترکیب تیماری نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد. S۰، S۵ و S۱۰ به ترتیب سلنیوم در سطوح ۰، ۵ و ۱۰ میکرومولار و M۰، M۵۰ و M۱۰۰ به ترتیب ملاتونین در سطوح ۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار می‌باشد

Similar letters for treatment and treatment combination indicate the absence of significant difference at the 5% probability level. S_0, S_5 and S_{10} are respectively selenium levels at 0, 5 and 10 mM and M_0, M_{50} and M_{100} are respectively melatonin levels at 0, 50 and 100 mM

اثر سلنیوم و ملاتونین بر کلروفیل کل، فنل کل، فلاونوئید و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی اسفناج: نتایج نشان داد که سلنیوم و اثر متقابل سلنیوم و ملاتونین اثر معنی‌داری بر کلروفیل کل داشت. همان‌گونه که در جدول ۲ مشخص است، بیش‌ترین میزان کلروفیل کل در ترکیب تیماری ۱۰ میکرومولار سلنیوم به همراه ۵۰ میکرومولار ملاتونین حاصل شد.

از این پژوهش چنین نتیجه گرفته می‌شود که سلنیوم نقشی مهم در محتوای کلروفیل داشته و سلنیوم سبب افزایش کلروفیل کل در گیاه اسفناج شد. به نظر می‌رسد که سلنیوم از طریق تأثیرگذاری در بیان ژن‌های مرتبط به بیوسنتز کلروفیل (۲۲) سبب افزایش میزان این صفت می‌شود. استفاده از سلنات سدیم سبب افزایش میزان کلروفیل کل شد که با نتایج سلوا و همکاران (۲۳)، مطابقت دارد. آرناو و هرناندز- ریز (۲۰۰۹) در پژوهشی که روی جو انجام دادند گزارش کردند که با کاربرد ملاتونین محتوای کلروفیل افزایش یافت (٢٤) که با نتایج پژوهش حاضر مغایرت دارد.

ضمناً نتایج این بررسی نشان داد که کاربرد سلنیوم و ملاتونین اثر معنی‌داری روی فنل کل، فلاونوئید و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در اسفناج داشت. به‌طوری‌که در جدول ۲ مشخص است، در اثرات ساده؛ سلنیوم ۵ میکرومولار باعث افزایش فنل کل و فلاونوئید شده درحالی‌که بین کاربرد ۵ و ۱۰ میکرومولار سلنیوم روی میزان این صفات تفاوتی وجود نداشت. هم‌چنین دیده شد که کاربرد ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین سبب افزایش فنل کل، فلاونوئید و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی شد.

با توجه به این‌که اثرات متقابل معنی‌دار است دیده می‌شود که بیش‌ترین میزان فنل کل و فلاونوئید در گیاه مربوط به ترکیب تیماری ۵ میکرومولار سلنیوم و ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین بوده و بیش‌ترین میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی مربوط به ترکیب تیماری ۵ میکرومولار سلنیوم و ۵۰ میکرومولار ملاتونین است.

به نظر می‌رسد که سلنیوم در بیان ژن‌های مرتبط با تولید فنل و فلاونوئید مؤثر باشد. کودهای سلنیوم به شکل قابل‌ملاحظه‌ای پلی‌فنل کل را افزایش می‌دهد (۲۸). سلنیوم از طریق تحریک بیوسنتز فنل و فلاونویید تأثیر مثبتی در مهار رادیکال‌های آزاد دارند (۲۹). سلنیوم محتوای فنل کل را در اسفناج افزایش داد که با یافته‌های موسی و الگمال (۱) و صفار یزدی و همکاران (۲٦) مطابقت دارد. سلینوم سبب افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در کاهو (۳۰) و چای (۳۱) شد. سلنیوم در غلظت‌های کم به‌عنوان آنتی‌اکسیدانت عمل می‌کند (۳۲).

در نتایج صفات رشدی دیده شد که ملاتونین تأثیر زیادی بر شاخص‌های رشدی گیاه دارد. این امر باعث افزایش مقاومت گیاه می‌شود. از طرف دیگر ملاتونین از طریق فعال‌سازی میکانیزم‌های دخیل در تولید آنتی‌اکیسدانت‌ها سبب محافظت گیاه در برابر تنش‌ها می‌شود. ملاتونین به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدانت خوب عمل کرده و در تنظیم فعالیت‌های متعدد فیزیولوژیکی نقش دارد (۲۷). در پژوهش حاضر ملاتونین سبب افزاش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی شد که با یافته (۳۳) همخوانی دارد.

اثر سلنیوم و ملاتونین بر میزان ویتامین ث و سلنیوم برگ اسفناج: اثر ملاتونین بر میزان ویتامین ث معنی‌دار شد اما اثر سلنیوم و اثر متقابل سلنیوم و ملاتونین بر این صفت غیرمعنی‌دار بود. همان‌گونه که از جدول ۲ مشخص است کاربرد ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین منجر به افزایش معنی‌دار مقدار ویتامین ث نسبت به شاهد گردید که البته با تیمار ۵۰ میکرومولار اختلاف معنی‌داری نداشت.

بیش‌ترین میزان تجمع سلنیوم در برگ گیاه اسفناج در بالاترین سطح سلنیوم و ملاتونین (۱۰ میکرومولار سلنیوم و ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین) مشاهده شد. میزان سلنیوم در گیاه در تیمار ۵۰ میکرومولار ملاتونین تحت‌تأثیر این میزان قرار نگرفت اما در تیمار ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین در ترکیب ۱۰ میکرومولار سلنیوم بالاترین سطح را نشان داد. مسلماً کم‌ترین میزان سلنیوم در عدم کاربرد این عنصر مشاهده شد (جدول ۲).

ملاتونین در تعدیل اسید آسکوربیک مؤثر است که با یافته یانگ و همکاران (۳٤) مطابقت دارد. این پژوهش‌گران گزارش کردند که ملاتونین در کنار فعالیت‌های آنزیم‌های اصلی آنتی‌اکسیدانی مانند گلوتاتیون پراکسیداز و SOD، محتوای آنتی‌اکسیدانت‌های خاصی، مانند اسیدآسکوربیک را نیز به‌طور غیرمستقیم تعدیل می‌کند. استفاده از سلنیوم برون‌زا منجر به افزایش غلظت سلنیوم برگ در سیب‌زمینی، چای، شاهی و کاهو شد (۳۵) که با پژوهش حاضر مطابقت دارد.

جدول ۳- اثر سلنیوم و ملاتونین بر کلروفیل کل، فنل کل، فلاونوئید کل، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، ویتامین ث و سلنیوم برگ.

Table 3. Effect of selenium and melatonin on total chlorophyll, total phenol, total flavonoid, antioxidant capacity, vitamin C and leaf selenium of spinach.

سلنیوم برگ Leaf selenium (mg g^{-1} Fw)	ویتامین ث Vitamin C (mg g^{-1} Fw)	ظرفیت آنتی‌اکسیدانی Antioxidant capacity (% DPPH free-radical)	فلاونوئید کل Total flavonoid (mg g^{-1} Fw)	فنل کل Total phenol (mg g^{-1} Fw)	کلروفیل کل Total chlorophyll (mg g^{-1} Fw)	تیمار Treatment
1.44 ^{c}	10.34 ^{a}	27.55 ^{b}	3.92 ^{ab}	42.44 ^{c}	0.573 ^{b}	S_0
10.87 ^{b}	10.73 ^{a}	33.20 ^{a}	4.37 ^{a}	73.90 ^{a}	0.65 ^{a}	S_5
24.13 ^{a}	10.26 ^{a}	31.46 ^{a}	3.50 ^{b}	56.81 ^{b}	0.66 ^{a}	S_{10}
11.13 ^{b}	9.56 ^{b}	25.32 ^{b}	2.74 ^{c}	49.05 ^{c}	0.612 ^{a}	M_0
10.87 ^{b}	10.18 ^{ab}	32.61 ^{a}	3.70 ^{b}	54.37 ^{b}	0.667 ^{a}	M_{50}
14.43 ^{a}	11.58 ^{a}	34.28 ^{a}	5.35 ^{a}	69.74 ^{a}	0.617 ^{a}	M_{100}
1.33 ^{d}	6.30 ^{e}	19.66 ^{e}	2.93 ^{de}	43.34 ^{e}	0.593 ^{bc}	S_0M_0
1.38 ^{d}	8.86 ^{d}	27.10 ^{cd}	3.33 ^{d}	36.57 ^{f}	0.60 ^{bc}	S_0M_{50}
1.62 ^{d}	15.86 ^{a}	35.90 ^{ab}	5.30 ^{ab}	47.42 ^{de}	0.52 ^{c}	S_0M_{100}
12.42 ^{c}	12.60 ^{b}	29.50 ^{bcd}	3.13 ^{d}	59.93 ^{c}	0.66 ^{b}	S_5M_0
9.07 ^{c}	9.80 ^{cd}	36.33 ^{a}	4.10 ^{cd}	75.25 ^{b}	0.64 ^{b}	S_5M_{50}
11.12 ^{c}	9.80 ^{cd}	33.76 ^{ab}	5.90 ^{a}	86.54 ^{a}	0.66 ^{b}	S_5M_{100}
19.66 ^{b}	9.80 ^{cd}	26.80 ^{d}	2.16 ^{e}	43.88 ^{e}	0.58 ^{bc}	$S_{10}M_0$
22.17 ^{b}	11.90 ^{cd}	34.40 ^{ab}	3.66 ^{cd}	51.29 ^{d}	0.76 ^{a}	$S_{10}M_{50}$
30.56 ^{a}	9.10 ^{d}	33.20 ^{ab}	4.66 ^{bc}	75.26 ^{b}	0.66 ^{b}	$S_{10}M_{100}$

حروف مشابه تیمار و ترکیب تیماری نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد. S۰، S۵ و S۱۰ به ترتیب سلنیوم در سطوح ۰، ۵ و ۱۰ میکرومولار و M۰، M۵۰ و M۱۰۰ به ترتیب ملاتونین در سطوح ۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار می‌باشد

Similar letters for treatment and treatment combination indicate the absence of significant difference at the 5% probability level. S_0, S_5 and S_{10} are respectively selenium levels at 0, 5 and 10 mM and M_0, M_{50} and M_{100} are respectively melatonin levels at 0, 50 and 100 mM

میزان نیترات و فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در برگ و ساقه: نتایج نشان داد که اثر سلنیوم، ملاتونین و اثر متقابل این دو بر میزان نیترات و فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز برگ و ساقه اسفناج معنی‌دار شد. اثرات ساده تیمار سلنیوم نشان می‌دهد که کاربرد سلنیوم میزان نیترات برگ و ساقه را به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد کاهش داد که در این رابطه اثربخشی تیمار ۵ میکرومولار بیش‌تر بود. بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در برگ و ساقه مربوط به تیمار ۵ میکرومولار سلنیوم بوده درحالی‌که بین عدم کاربرد و سطح ۱۰ میکرومولار سلنیوم تفاوت معنی‌دار در رابطه به فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در برگ دیده نشد. از طرف دیگر کاربرد ملاتونین نیز باعث کاهش معنی‌دار میزان نیترات برگ اسفناج نسبت به شاهد شد که البته تیمار ۱۰۰ میکرومولار در این رابطه مؤثرتر بود. در رابطه با نیترات ساقه فقط تیمار ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین توانست میزان نیترات را نسبت به شاهد کاهش دهد و تیمار ۵۰ میکرومولار مؤثر نبود. همین روند در رابطه با افزایش فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز توسط ملاتونین در برگ و ساقه مشاهده شد (جدول ۳).

در ترکیب تیمارها دیده می‌شود که کم‌ترین میزان تجمع نیترات و بیش‌ترین فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز برگ اسفناج بدون اختلاف معنی‌دار باهم در ترکیب تیماری ۵ میکرومولار سلنیوم همراه با ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین مشاهده گردید. کم‌ترین میزان تجمع نیترات و بیش‌ترین فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در ساقه اسفناج نیز در ترکیب تیماری ۵ میکرومولار سلنیوم همراه با ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین دیده شد. با به‌کارگیری ۵ میکرومولار سلنیوم و ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین میزان نیترات در برگ به میزان ٦٥ درصد و در ساقه به میزان ۵۲ درصد نسبت به شاهد کاهش یافت و میزان فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در برگ ۳۲ درصد و در ساقه ٦٥ درصد نسبت به شاهد افزایش نشان داد (جدول ۳).

نتایج حاصله از این مطالعه نشان داد که کاربرد سلنیوم و ملاتونین در کاهش تجمع نیترات و افزایش فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در اسفناج مؤثر است که اثربخشی آن بستگی به غلظت داشت. به نظر می‌رسد که سلنیوم و ملاتونین احتمالاً در تحریک بیان ژن‌های مرتبط با میزان بیان آنزیم نیترات ردوکتاز مؤثر بوده که از این طریق سبب کاهش میزان نیترات می‌شود. یافته‌های این پژوهش نشان داد که سلنیوم و ملاتونین اثر بهتری در کاهش تجمع نیترات در برگ نسبت به ساقه دارند. یکی از دلایل اثربخشی ملاتونین در برگ نسبت به ساقه ممکن به‌خاطر قرار گرفتن سطح بیش‌تر برگ در معرض محلول پاشی ملاتونین باشد. به نظر می‌رسد که سلنیوم در سطح ۱۰ میکرومولار اثر منفی روی گیاه داشته اگرچه باعث کاهش تجمع نیترات شده است اما به‌اندازه سطح ۵ میکرومولار مؤثر نبوده است. به‌کارگیری ۵۰ میکرومولار ملاتونین منجر به کاهش میزان نیترات شد اما سطح ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین تأثیر بیش‌تری نسبت به ۵۰ میکرومولار داشت که احتمال می‌رود که سطوح بالاتر ملاتونین در بیان ژن‌های مرتبط به آنزیم نیترات و نیتریت ردوکتاز تأثیر بهتری داشته و از این طریق میزان نیترات را کاهش دهد. از طرف دیگر نشان داده شد که کاربرد هر دو غلظت ملاتونین و غلظت پایین سلنیوم باعث افزایش شاخص‌های رشدی اسفناج شد (جدول ۱) که این امر می‌تواند باتوجه با افزایش رشد و درنتیجه افزایش سوخت‌وساز نیترات باعث کاهش میزان نیترات به‌خصوص در برگ گیاه شود.

اسفناج ازجمله گروه سبزی‌هایی است که قابلیت بالای در تجمع نیترات دارد (۳٦). جلالی و صالحی چگینی (۲۰۲۰) در پژوهشی گزارش کردند که کاربرد سلنیوم باعث کاهش غلظت نیترات در کاهو و اسفناج شد و میزان این کاهش وابسته به غلظت بود. کم‌ترین غلظت نیترات در تیمار ۵ میکرومولار سلنیوم دیده شد که با پژوهش حاضر کاملاً همخوانی دارد (۳۷). اسکریپنک و همکاران (۲۰۲۱) گزارش کردند که کاربرد سلنیوم باعث تحریک سوخت‌وساز نیترات و کاهش تجمع آن در برگ‌های کاهو شد (۳۸). بو و همکاران (۲۰۱۸) گزارش کردند که سلنیوم برونزا منجر به کاهش محتوای نیترات شد و اثر آن بستگی به غلظت سلنیوم داشت و بیان نمودند که تجمع نیترات در گیاهان به عوامل محیطی مانند؛ نور، در دسترس بودن نیترات، سوخت‌وساز نیترات و فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز بستگی دارد (۳۹).

برنگی و ابولساد (۲۰۱۹) با پژوهشی که روی اسفناج انجام دادند گزارش کردند که محلول‌پاشی برگی سلنیوم، مولیبدن و ساکارز در غلظت‌های مختلف اثر معنی‌داری در کاهش میزان نیترات نسبت به شاهد داشت (۱۱).

ژانک و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند که استفاده از ۰/۱ میلی مولار ملاتونین سبب افزایش رشد گیاه شد و حساسیت ناشی از خطر نیترات بالا را کاهش داد که با مقادیر و نتایج به‌کاررفته با پژوهش حاضر هم‌خوانی دارد. ایشان با بررسی که روی خیار انجام داده بودند، گزارش کردند که ملاتونین نقش مهمی در تعدیل ترکیب عناصر معدنی و سوخت‌وساز نیتروژن دارد و درنتیجه اثر بازدارندگی بر رشد را که معمولاً با استرس نیترات مرتبط است کاهش می‌دهد. ضمناً بیان نمودند که ملاتونین برونزا به‌طور قابل‌توجهی سمیت NH_4+-N مرتبط به سمیت نیترات را کاهش می‌دهد (۱۵). ژو و همکاران (۲۰۱۹) گزارش کردند که استفاده ملاتونین برونزا می‌تواند محتوای نیترات را در بافت‌های کاهو کاهش داده و تأکید نمودند که ملاتونین برونزا منجر به کاهش محتوای نیترات برگ و ریشه کاهو شد (٤۰). شی و همکاران (۲۰۲۱) گزارش کردند که استفاده ملاتونین برونزا سبب افزایش رشد نهالی‌های گوجه‌فرنگی در شرایط تحت تنش نیترات کلسیم شد (٤۱). هانسی و تونسر (۲۰۲۰) با بررسی که روی کاهو انجام دادند گزارش کردند که استفاده از ملاتونین سبب کاهش محتوایی نیترات در برگ و ریشه کاهو شد (۱٦).

ادرال (۲۰۱۹) با بررسی که روی ذرت انجام داده گزارش کرد که غلظت‌های (۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار بر لیتر) ملاتونین به شکل قابل‌ملاحظه‌ای در فعالیت‌ها و بیان ژن‌های مرتبط به آنزیم‌های (نیترات ردوکتاز، نیتریت ردوکتاز، گلوتامین سنتاز، گلوتامات ۲- اکسوگلوتارات ترانسفراز و NADH- گلوتامات دهیدروژناز) که در پروسه سوخت‌وساز نیتروژن نقش دارند مؤثر واقع شد که حداکثر فعالیت این آنزیم‌ها مربوط به تیمار ۱۰۰ میکرومولار بر لیتر ملاتونین بود (٤۲) که با پژوهش حاضر مطابقت دارد.

جدول ٤- اثر سلنیوم و ملاتونین بر نیترات برگ، نیترات ساقه، فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز برگ و ساقه در اسفناج.

Table 4. Effect of selenium and melatonin on leaf nitrate, stem nitrate, leaf and stem nitrate reductase activity in spinach.

تیمار Treatment	نیترات برگ Leaf nitrate (mg kg^{-1} Fw)	فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در برگ Nitrate reductase enzyme activity in leaves (µmol $NO_2 g^{-1}$ FW h^{-1})	نیترات ساقه Stem nitrate (mg kg^{-1} Fw)	فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در ساقه Nitrate reductase enzyme activity in stem (µmol $NO_2 g^{-1}$ FW h^{-1})
S_0	2690.91 a	1219.39 b	3194.2 a	2032.0 b
S_5	1342.73 c	1533.14 a	2054.7 c	2907.6 a
S_{10}	1696.78 b	1162.94 b	2678.4 b	2740.5 a
M_0	2325.14 a	1219.37 b	2820.6 a	2456.6 b
M_{50}	1905.44 b	1254.32 b	2694.0 a	2283.4 b
M_{100}	1499.83 c	1441.79 a	2412.7 b	2940.0 a
S_0M_0	3341.2 a	1264.07 cd	3716.3 a	2303.5 c
S_0M_{50}	2750.3 b	1130.00 de	3106.7 b	1519.0 d
S_0M_{100}	1981.3 c	1264.10 cd	2759.7 bc	2273.4 c
S_5M_0	1643.6 cd	1414.93 bc	2225.1 d	2444.4 bc
S_5M_{50}	1223.9 e	1519.73 ab	2168.8 d	2474.5 bc
S_5M_{100}	1160.6 e	1664.77 a	1770.2 e	3803.9 a
$S_{10}M_0$	1990.6 c	979.10 e	2520.5 cd	2622.0 bc
$S_{10}M_{50}$	1742.1 c	1113.23 e	2806.6 bc	2856.7 b
$S_{10}M_{100}$	1357.6 d	1396.50 bc	2708/1 bc	2742.7 bc

حروف مشابه تیمار و ترکیب تیماری نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد. S۰، S۵ و S۱۰ به ترتیب سلنیوم در سطوح ۰، ۵ و ۱۰ میکرومولار و M۰، M۵۰ و M۱۰۰ به ترتیب ملاتونین در سطوح ۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار می‌باشد

Similar letters for treatment and treatment combination indicate the absence of significant difference at the 5% probability level. S_0, S_5 and S_{10} are respectively selenium levels at 0, 5 and 10 mM and M_0, M_{50} and M_{100} are respectively melatonin levels at 0, 50 and 100 mM

نتیجه‌گیری

تیمار سلنیوم در مقادیر پایین (۵ میکرومولار) توانست با تأثیر بر میزان رشد و افزایش فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز میزان تجمع نیترات اسفناج را کاهش دهد. تیمار ۱۰ میکرومولار سلنیوم نیز علی‌رغم کاهش میزان رشد توانست بر کاهش تجمع نیترات مؤثر باشد. تیمار ملاتونین در هر دو غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار اثر مثبت و معنی‌داری در افزایش شاخص‌های رشد، کاهش تجمع نیترات و افزایش فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز داشته که این اثر در غلظت بالا بیش‌تر بود. ملاتونین هم‌چنین توانست اثرات منفی غلظت بالای سلنیوم بر رشد گیاه را تعدیل کند. درنهایت بهترین شاخص‌های رشد همراه با کم‌ترین میزان نیترات در ترکیب تیماری ۵ میکرومولار سلنیوم و ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین حاصل شد.

منابع

1. Moussa, H. R., & Algamal, S. M. A. (2017). Does exogenous application of melatonin ameliorate boron toxicity in spinach plants?. *International Journal of Vegetable Science*, 23(3), 233-245.
2. Ribera, A., van Treuren, R., Kik, C., Bai, Y., & Wolters, A. M. A. (2021). On the origin and dispersal of cultivated spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 68(3), 1023-1032.
3. Chitwood, J., Shi, A., Evans, M., Rom, C., Gbur, E. E., Motes, D., & Hensley, D. (2016). Effect of temperature on seed germination in spinach (*Spinacia oleracea*). *HortScience*, 51(12), 1475-1478.
4. Santamaria, P., Elia, A., Serio, F., & Todaro, E. (1999). A survey of nitrate and oxalate content in fresh vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(13), 1882-1888.
5. Dejon, C. W., & Stekbaut, W. (1995). Nitrate in food commodities vegetable origin and the total diet in belgium, ghent university. *Faculties Bio-Ingenious Wetenschappen*, 15, 625-631.
6. Barber, S. A. (1995). Soil nutrient bioavailability: a mechanistic approach. John Wiley & Sons.
7. Blom-Zabdstra, M. H. A. (1989). Nitrate accumulation in vegetables and its relationship to quality. *Annals of Applied Biology*, 115(3), 553-561.
8. Dejonckheere, W., Steurbaut, W., Drieghe, S., Verstraeten, R., & Braeckman, H. (1994). Nitrate in food commodities of vegetable origin and the total diet in Belgium (1992-1993). *MAN Microbiologie, Aliments, Nutrition*, 12(4), 359-370.
9. De Silva, D. S. M., & Dayarathna, A. G. S. (2019). Determination of selenium content in selected edible green leaves. *Ceylon Journal of Science*, 48(1), 61-5.
10. Iserte, L. O., Roig-Navarro, A. F., & Hernandez, F. (2004). Simultaneous determination of arsenic and selenium species in phosphoric acid extracts of sediment samples by HPLC-ICP-MS. *Analytica Chimica Acta*, 527(1), 97-104.
11. Brengi, S. H., & Abouelsaad, I. A. (2019). The Role of Different Nitrogen Sources Combined with Foliar Applications of Molybdenum, Selenium or Sucrose in Improving Growth and Quality of Edible Parts of Spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Alexandria Science Exchange Journal*, 40, 156-168.
12. Golubkina, N., Kekina, H., & Caruso, G. (2018). Yield, quality and antioxidant properties of Indian mustard (*Brassica juncea* L.) in response to foliar biofortification with selenium and iodine. *Plants*, 7(4), 80
13. Li, X., Yu, B., Cui, Y., & Yin, Y. (2017). Melatonin application confers enhanced salt tolerance by regulating Na+ and Cl− accumulation in rice. *Plant Growth Regulation*, 83(3), 441-454.
14. Arnao, M. B., & Hernández-Ruiz, J. (2014). Melatonin: plant growth regulator and/or biostimulator during stress?. *Trends in Plant Science*, *19*(12), 789-797.
15. Zhang, R., Sun, Y., Liu, Z., Jin, W., & Sun, Y. (2017). Effects of melatonin on seedling growth, mineral nutrition, and nitrogen metabolism in cucumber under nitrate stress. *Journal of Pineal Research*, 62(4), e12403.
16. Hancı, F., & Tuncer, G. (2020). How do foliar application of melatonin and L-tryptophan affect lettuce growth parameters under salt stress?. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 8(4), 960-964.
17. Porra, R. J., Thompson, W. A., & Kriedemann, P. E. (1989). Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) *Bioenergetics*, 975(3), 384-394.

18.Li, J. W., Ding, S. D., & Ding, X. L. (2005). Comparison of antioxidant capacities of extracts from five cultivars of Chinese jujube. *Process Biochemistry*, 40(11), 3607-3613.
19.Tezcan, F., Gültekin-Özgüven, M., Diken, T., Özçelik, B., & Erim, F. B. (2009). Antioxidant activity and total phenolic, organic acid and sugar content in commercial pomegranate juices. *Food Chemistry*, 115(3), 873-877.
20.Cataldo, D. A., Maroon, M., Schrader, L. E., & Youngs, V. L. (1975). Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 6(1), 71-80.
21.Sym, G. J. (1984). Optimisation of the in-vivo assay conditions for nitrate reductase in barley (*Hordeum vulgare* L. cv. Igri). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 35(7), 725-730.
22.Sams, C. E., Panthee, D. R., Charron, C. S., Kopsell, D. A., & Yuan, J. S. (2011). Selenium regulates gene expression for glucosinolate and carotenoid biosynthesis in Arabidopsis. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 136(1), 23-34.
23.Silva, V. M., Tavanti, R. F. R., Gratão, P. L., Alcock, T. D., & Dos Reis, A. R. (2020). Selenate and selenite affect photosynthetic pigments and ROS scavenging through distinct mechanisms in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) walp) plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 201, 110777.
24.Arnao, M. B., & Hernández Ruiz, J. (2009). Protective effect of melatonin against chlorophyll degradation during the senescence of barley leaves. *Journal of Pineal Research*, 46(1), 58-63.
25.Qin, X., Nie, Z., Liu, H., Zhao, P., 2, S., & Shi, Z. (2018). Influence of selenium on root morphology and photosynthetic characteristics of winter wheat under cadmium stress. *Environmental and Experimental Botany*, 150, 232-239.
26.Saffaryazdi, A., Lahouti, M., Ganjeali, A., & Bayat, H. (2012). Impact of selenium supplementation on growth and selenium accumulation on spinach (*Spinacia oleracea* L.) plants. *Notulae Scientia Biologicae*, 4(4), 95-100.
27.Arnao, M. B. (2014). Phytomelatonin: discovery, content, and role in plants. Advances in Botany, 2014(1), 815769.
28.Kavalcová, P., Bystrická, J., Trebichalský, P., Volnová, B., & Kopernická, M. (2021). The influence of selenium on content of total polyphenols and antioxidant activity of onion (*Allium cepa* L.). *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2021, 238-240.
29.Gąsecka, M., Mleczek, M., Siwulski, M., Niedzielski, P., & Kozak, L. (2015). The effect of selenium on phenolics and flavonoids in selected edible white rot fungi. *LWT-Food Science and Technology*, 63(1), 726-731.
30.Xu, J., & Hu, Q. (2004). Effect of foliar application of selenium on the antioxidant activity of aqueous and ethanolic extracts of selenium-enriched rice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(6), 1759-1763.
31.Xu, J., Yang, F., Chen, L., Hu, Y., & Hu, Q. (2003). Effect of selenium on increasing the antioxidant activity of tea leaves harvested during the early spring tea producing season. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(4), 1081-1084.
32.Ramos, S. J., Faquin, V., Guilherme, L. R. G., Castro, E. M., Ávila, F. W., Carvalho, G. S., Bastos, C.E.A., & Oliveira, C. (2010). Selenium biofortification and antioxidant activity in lettuce plants fed with selenate and selenite. *Plant, Soil and Environment*, 56(12), 584-588.
33.Di, H., Li, Z., Wang, Y., Zhang, Y., Bian, J., Xu, J., Zheng, Y., Gong, R., Li, H., Zhang, F., & Sun, B. (2021). Melatonin Treatment Delays Senescence and Maintains the Postharvest Quality of Baby Mustard (*Brassica juncea* var. *gemmifera*). *Frontiers in Plant Science*, 12, 817861.

34. Yang, X., Chen, J., Ma, Y., Huang, M., Qiu, T., Bian, H., & Wang, J. (2022). Function, Mechanism, and Application of Plant Melatonin: An Update with a Focus on the Cereal Crop, Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Antioxidants*, 11(4), 634.
35. Khosravi, S., ValizadehKaji, B., & Abbasifar, A. (2022). Foliar Application of Selenium Affects Nitrate Accumulation and Morpho-physiochemical Responses of Garden Cress Plants. *International Journal of Horticultural Science*, 9(3), 329-338.
36. Santamaria, P. (2006). Nitrate in vegetables: toxicity, content, intake and EC regulation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(1), 10-17.
37. Jalali, M., & Chegeni, N. S. (2020). The positive effect of selenium on nitrate accumulation in spinach (*Spinacia oleracea* L.) and lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Journal of Horticulture Science*, 34(2), 321-334.
38. Skrypnik, L., Styran, T., Savina, T., & Golubkina, N. (2021). Effect of Selenium Application and Growth Stage at Harvest on Hydrophilic and Lipophilic Antioxidants in Lamb's Lettuce (*Valerianella locusta* L. Laterr.). *Plants*, 10(12), 2733.
39. Bo, L. E. I., Bian, Z. H., Yang, Q. C., Jun, W. A. G., Cheng, R. F., Kun, L. I., Wen-ke, L. I. U., Hui, F. G., & Yun-Xin, T. G. (2018). The positive function of selenium supplementation on reducing nitrate accumulation in hydroponic lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Journal of Integrative Agriculture*, 17(4), 837-846.
40. Zhou, X., Yang, T., Jiang, Z., He, Z., & Zou, Z. (2019). Regulation of melatonin on chlorophyll fluorescence and nitrate accumulation in lettuce seedlings under excess nitrate stress. *In IOP Conference Series*: *Earth and Environmental Science* (Vol. 330, No. 4, p. 042043). IOP Publishing.
41. Xie, Q., Luo, H., Cheng, X., Li, Z., Lu, W., He, Z., & Zhou, X. (2021). Effects of melatonin on growth, non-photochemical quenching and related components in tomato seedlings under calcium nitrate stress. *In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 621 (1), 012104.
42. Erdal, S. (2019). Melatonin promotes plant growth by maintaining integration and coordination between carbon and nitrogen metabolisms. *Plant Cell Reports*, 38(8), 1001-1012.