

اثر بکارگیری سلنیوم بر پارامترهای فیزیولوژیک گیاه سویا (*Glycine max L.*)

نرگس اوراقی اردبیلی* (نویسنده مسئول) naardebili@gmail.com، سارا سعادت‌مند^۱، وحید نیک‌نام^۲، رمضانعلی خاوری نژاد^۱

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران. ۲- گروه زیست‌شناسی، دانشگاه تهران

The effects of selenium utilization on metabolism of soybean plants (*Glycine max L.*)

Narges Oraghi Ardebili^{1*}, Sara Saadatmand¹, Vahid Niknam², Ramezani Khavari Nejad¹

1. Department of Biology, Islamic Azad University, Science and Research branch, Tehran, Iran.

2. School of Biology, Center of Excellence in Phylogeny of Living Organisms, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran

Abstract

Selenium has not been classified as an essential element for plants, in contrast to many other organisms. With the aim of evaluating the effects of different levels of selenium on metabolism in soybean plants (*Glycine max L.*), the present research was conducted. Selenium was foliarly applied in three levels (0, 25, 50mg l⁻¹), three times with week intervals. The results showed that the application of Se had significant enhancing impacts on antioxidant enzymes (ascorbate peroxidase and catalase) as well as protein in both root and leaf tissues, especially in the later one. The application of selenium resulted in the increased total chlorophyll contents with the highest amounts observed in Se50-treated plants. Similarly, the improved contents of reducing sugars were resulted from the foliar supplemented selenium. The obtained results from the current study indicated that the utilization of se at these levels had inducing effects on the activities of antioxidant enzymes, protein content and chlorophyll amounts, thereby improving the plant resistance against various abiotic stress conditions.

Keywords: Soybean, selenium, antioxidant enzymes, chlorophyll

فصلنامه گیاه و زیست فناوری ایران

سال ۱۳۹۲، دوره ۸، شماره ۱، صص ۷-۱

چکیده

بر خلاف اکثر موجودات زنده، سلنیوم به عنوان عنصر ضروری در گیاهان شناخته نشده است. هدف از این تحقیق بررسی اثرات غلظت های مختلف سلنیوم بر پارامترهای فیزیولوژیک گیاه سویا (*Glycine max L.*) است. سلنیوم در ۳ سطح (0, 25, 50mg l⁻¹) به صورت اسپری (۳ بار اسپری با فاصله ۷ روز) بکار برده شد. نتایج نشان داد که بکارگیری سلنیوم اثرات تحریکی معنی داری بر میزان فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان مانند کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در اندام های برگ داشته است. میزان پروتئین برگ و ریشه در غلظت های ۲۵ mg l⁻¹ و ۵۰ سلنیوم نسبت به شاهد به طور معنی داری افزایش یافت. میزان کلروفیل کل با افزایش میزان سلنیوم نسبت به شاهد افزایش یافت ولی این افزایش در غلظت ۲۵ mg l⁻¹ سلنیوم معنی دار نبود. همچنین بکارگیری سلنیوم در هر دو غلظت موجب افزایش معنی دار میزان قندهای احیا کننده در برگ شد. نتایج این تحقیق دلالت بر آن دارد که سلنیوم در غلظت های ۲۵ و ۵۰ میلی گرم در لیتر می تواند موجب افزایش میزان پروتئین و کلروفیل و نیز القا فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان شده و از این طریق موجب افزایش مقاومت گیاه در برابر تنش های مختلف محیطی شود.

کلمات کلیدی: سلنیوم، سویا، آنزیم های آنتی اکسیدان، کلروفیل.

فصلنامه گیاه و زیست فناوری ایران

سال ۱۳۹۲، دوره ۸، شماره ۱، صص ۷-۱

مقدمه

سلنیوم مدت‌های طولانی به عنوان عنصر سمی شناخته می‌شد تا اینکه در سال ۱۹۵۷ به عنوان عنصر ضروری برای انسان شناخته شد (۲۲). سلنیوم به عنوان عنصر ضروری برای گیاهان دسته بندی نشده است، اگرچه اثرات آن در برخی غلظت‌ها در تعدادی از گیاهان مفید گزارش شده است. گزارش شده است که سلنیوم در غلظت‌های کم به عنوان آنتی اکسیدان و ممانعت کننده پراکسیداسیون لیپید عمل می‌کند (۱۱). تحقیق درباره اثرات زیستی سلنیوم روی محیط و زنجیره غذایی به خاطر اینکه سلنیوم یک عنصر ضروری برای تعداد زیادی از موجودات مثل انسان است، بیشتر شده است (۲۶). در بعضی مناطق دنیا مثل چین، مصر و تایلند میزان سلنیوم خاک اندک است که باعث کمبود سلنیوم در رژیم غذایی انسان می‌شود (۲۴). تکنولوژی اخیر با استفاده از کود سلنیوم به صورت اسپری برگ یا استعمال به خاک برای افزایش محتوی سلنیوم در محصولات کشاورزی و همچنین برای کاهش آسیب‌های ایجاد شده از طریق تنش‌های مختلف محیطی استفاده می‌شود (۲۴ و ۲۲).
 Pezzarossa و همکاران (۲۰۱۲) مشاهده کردند که 1mg l^{-1} سلنیوم که به صورت برگ یا میوه‌ای اسپری شد به طور معنی داری سطوح سلنیوم را در هلو و گلابی افزایش داد (۲۱). سطوح مختلف سلنیوم اثرات مفیدی روی بعضی گیاهان داشته است (۱۴ و ۷). میزان بهینه سلنیوم سطح انواع اکسیژن فعال (ROS) را یا به صورت مستقیم یا غیر مستقیم از طریق تنظیم آنتی اکسیدانت‌ها کاهش می‌دهد، سلنیوم می‌تواند تولید و خاموشی ROS را کنترل کند و تنظیم سطوح ROS بوسیله سلنیوم می‌تواند مکانیسم کلیدی برای مقابله با تنش‌های محیطی در گیاهان باشد (۶ و ۲۸ و ۲۹ و ۳۰ و ۱۲ و ۱۶). بکارگیری سلنیوم موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان در گیاه *Petris Vittatal* شد (۷). در برخی از گیاهان گزارش شده است که سلنیوم می‌تواند با القا تغییرات متابولیسمی خاصی موجب افزایش مقاومت به برخی از تنش‌های

فیزیولوژیکی مثل تنش‌های خشکی، شوری و UV شود (۹). لذا مطالعه اثرات سلنیوم بر گیاهان از جنبه مختلف ۱- تغییر غلظت سلنیوم در گیاه به منظور تولید گیاهان غنی شده با سلنیوم و ۲- اثر بکارگیری سلنیوم بر رشد، نمو، کمیت و کیفیت محصول و افزایش مقاومت به تنش‌ها اهمیت دارد.

سویا یکی از مهمترین محصولات کشاورزی است. سویا تامین کننده جهانی پروتئین و روغن است. بنابراین با اضافه کردن سلنیوم می‌توان نیاز انسان به سلنیوم را تامین کرد (۱۵). هدف از این تحقیق بررسی اثرات احتمالی بکارگیری غلظت‌های مختلف سلنیوم بر پارامترهای فیزیولوژیک گیاه سویا است.

مواد و روش‌ها

کاشت بذرها و نحوه اعمال تیمارها و زمان برداشت:

بذرهای سویا (*Glycine max L.*) رقم L17 از موسسه اصلاح بذر و نهال کرج تهیه شد. بذرها با محلول هیپوکلریت سدیم ۱٪ به مدت ۱۵ دقیقه ضد عفونی شدند. به منظور کشت از خاک مزرعه استفاده شد و مورد آنالیز قرار گرفت (جدول ۱). باکتری ریزوبیوم از موسسه خاک و اب کرج تهیه شد. دانه‌ها با باکتری ریزوبیوم آغشته شدند و سپس به خاک منتقل شدند. پس از ۱ ماه که گیاهان به مرحله دو برگ رسیده‌اند، تیمارها اعمال شد. تیمارها شامل: (۱) تیمار شاهد (C)، (۲) تیمار سلنیوم 50g l^{-1} (Se2) 25g l^{-1} (Se1) (۳) تیمار سلنیوم 50g l^{-1} (Se2) 25g l^{-1} . محلول سلنیوم به برگ‌ها اسپری (۳ بار اسپری با فواصل ۷ روز) انجام شد. بعد از ۳۰ روز گیاهان برداشت شدند.

تهیه عصاره آنزیمی

یک گرم بافت تازه در ازت مایع پودر شد و با 4CC -۱ بافر استخراج در هاون روی یخ سائیده شد و سپس عمل سانتریفوژ در دمای 4°C به مدت ۲۰ دقیقه در 13000rpm صورت گرفت. محلول رویی جمع آوری و به عنوان عصاره آنزیمی استفاده شد. برای سنجش پروتئین از روش برادفورد استفاده شد (۲).

شد. پس از سرد شدن، ۲ میلی لیتر محلول اسید فسفومولبیدیک ریخته شد و لوله ها به شدت تکان داده شد تا آبی رنگ شود. با استفاده از اسپکتروفتومتر شدت جذب در طول موج ۶۰۰ نانومتر تعیین گردید و با استفاده از منحنی استاندارد غلظت قندهای احیاء کننده محاسبه گردید.

آنالیز آماری

آنالیز آماری اطلاعات به صورت آنالیز واریانس یک عاملی توسط نرم افزار SPSS انجام شد.

نتایج

نتایج حاصل از سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز برگ نشان داد که فعالیت این آنزیم در نمونه های گروه های Se1 (33.77 ± 35.40) و Se2 (38.0 ± 37.72) به مقدار معنی داری ($P > 0.05$) بیشتر از نمونه های گروه شاهد (12.39 ± 0.97) بود (شکل ۱). در صورتیکه در بررسی فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز ریشه نشان داد که فعالیت آسکوربات پراکسیداز در گروه Se1 (1.26 ± 48.65) به طور معنی داری از دیگر گروه ها بالاتر بود (شکل ۲). نتایج نشان داد که میزان فعالیت آنزیم کاتالاز برگ با افزایش مقدار سلیوم افزایش یافت (شکل ۳) در حالیکه فعالیت آنزیم کاتالاز ریشه با اضافه کردن سلیوم نسبت به شاهد بدون تغییر باقی ماند (شکل ۴). میزان پروتئین برگ و ریشه در غلظت های ۲۵ و 50 mg l^{-1} سلیوم نسبت به شاهد به طور معنی داری افزایش یافت (شکل ۵ و ۶). میزان کلروفیل کل با افزایش میزان سلیوم نسبت به شاهد افزایش یافت ولی این افزایش در غلظت 25 mg l^{-1} سلیوم معنی دار نبود (شکل ۷). همچنین میزان قندهای احیاء کننده برگ در نمونه های گروه های Se1 و Se2 به مقدار معنی داری بیشتر از نمونه های گروه C بود (شکل ۸).

سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (۱۷)

بررسی فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز بر اساس میزان اکسیداسیون آسکوربات در ۲۹۰ نانومتر انجام شد. مخلوط واکنش به شرح زیر است: بافر فسفات پتاسیم 50 mM (pH 7.0) + 0.5 mM آسکوربیک اسید + 0.1 mM Na_2EDTA + 1 mM H_2O_2 . واکنش با افزودن عصاره آنزیمی آغاز شد. کاهش میزان جذب در ۲۹۰ نانومتر در دقیقه ثبت شده و در نهایت فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز بر حسب تغییرات جذب نمونه ها در دقیقه به ازای هر گرم وزن تر گزارش شد.

سنجش فعالیت کاتالاز

به منظور سنجش فعالیت کاتالاز از روش Perreira (۲۰) استفاده شد. بررسی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز با مطالعه کاهش مقدار H_2O_2 در 240 nm به مدت یک دقیقه انجام می شود. مخلوط واکنش شامل بافر فسفات و 240 mM H_2O_2 می باشد. فرایند با افزودن 0.1 میلی لیتر عصاره آنزیمی در حجم نهایی 3 cc آغاز می گردد. میزان فعالیت آنزیم به صورت تغییرات جذب در دقیقه به ازای وزن تر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر سنجیده شد.

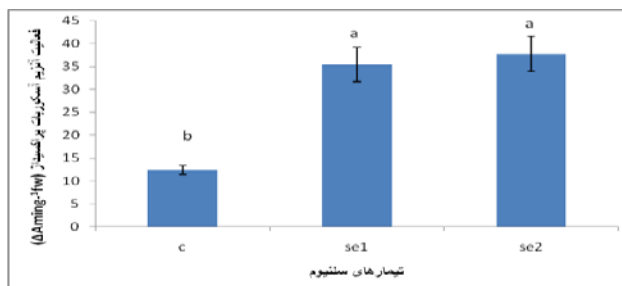
بررسی رنگدانه های فتوسنتزی

برای سنجش محتوای کلروفیل برگ ها از روش Arnon (۱) استفاده شد. استخراج از بافت های تازه با استفاده از استون 80% انجام شد. برای محاسبه میزان کلروفیل جذب محلول ها در طول موج های 645 ، 663 نانومتر با استفاده از شاهد استون 80% خوانده و از فرمول زیر محاسبه گردید.

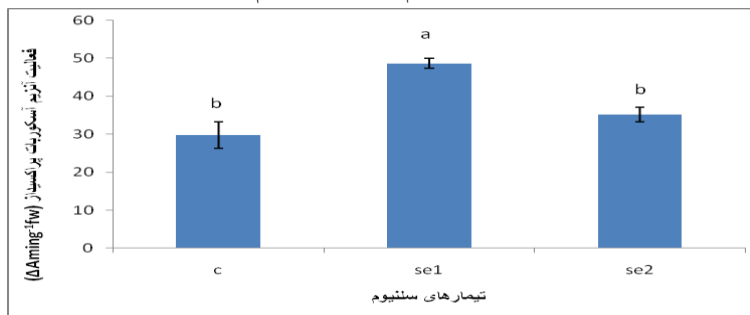
$$\text{Total Chl } \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right) = 20.2A_{645} + 8.02A_{663}$$

تعیین میزان قندهای احیا کننده (۲۳)

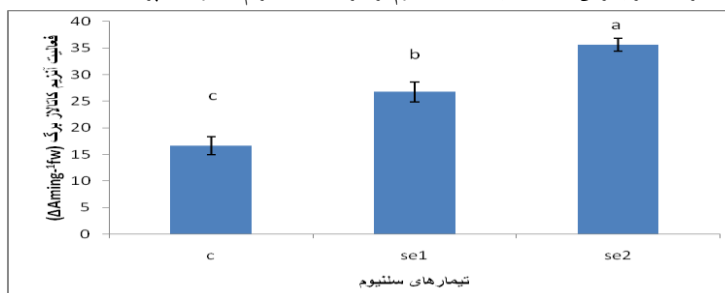
0.01 گرم وزن خشک گیاه را با 15 میلی لیتر آب مقطر حرارت داده و پس از جوشیدن صاف شد. معرف سولفات مس و محلول فسفومولبیدیک تهیه شد. به 2 میلی لیتر از هر یک از عصاره های تهیه شده، 2 میلی لیتر محلول سولفات مس افزوده شد. سپس به مدت 8 دقیقه در بن ماری با دمای 100 درجه سانتی گراد قرار گرفته



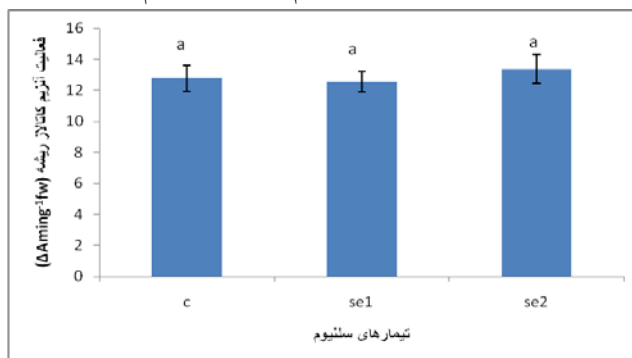
شکل ۱- اثر بکارگیری برگی غلظت های مختلف سeleniوم بر میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (X± SE) برگ.



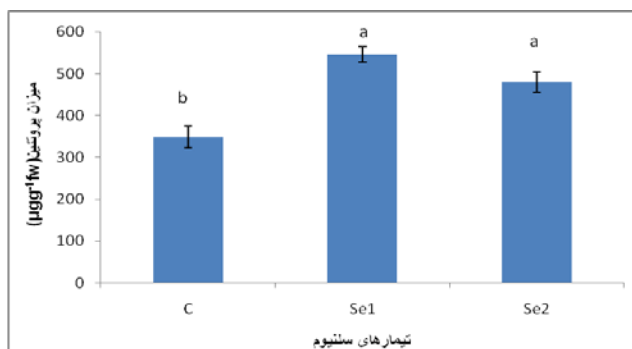
شکل ۲- اثر بکارگیری برگی غلظت های مختلف سeleniوم بر میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (X± SE) ریشه.



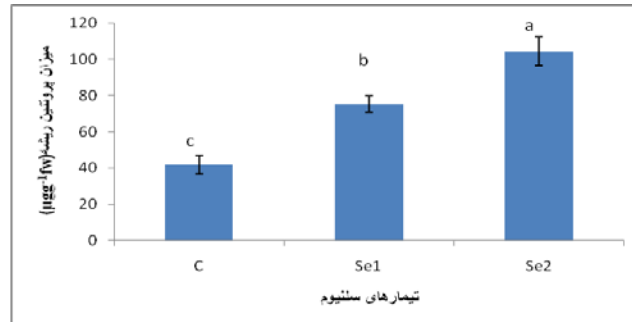
شکل ۳- اثر بکارگیری برگی غلظت های مختلف سeleniوم بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (X± SE) برگ.



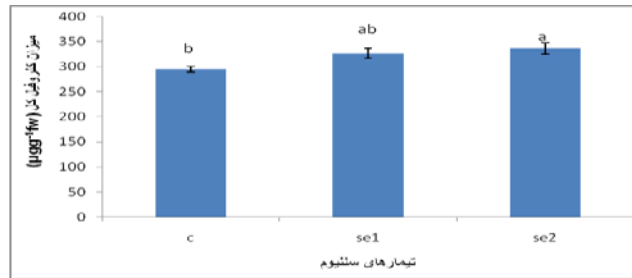
شکل ۴- اثر بکارگیری برگی غلظت های مختلف سeleniوم بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (X± SE) ریشه.



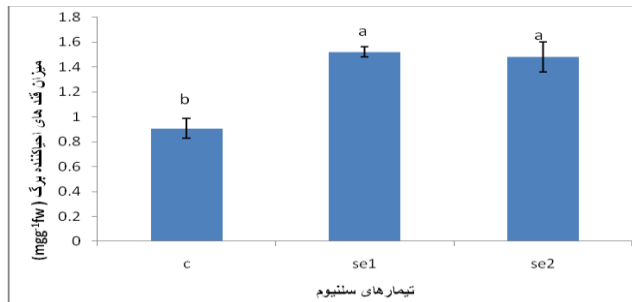
شکل ۵- اثر بکارگیری برگی غلظت های مختلف سeleniوم بر محتوای پروتئین (X± SE) برگ.



شکل ۶- اثر بکارگیری برگی غلظت های مختلف سلیوم بر محتوای پروتئین (X± SE). ریشه.



شکل ۷- اثر بکارگیری برگی غلظت های مختلف سلیوم بر محتوای کلروفیل کل (X± SE). ریشه.



شکل ۸- اثر بکارگیری برگی غلظت های مختلف سلیوم بر میزان قندهای احیاکننده برگ (X± SE). ریشه.

بحث

گلوکاتینون پراکسیداز را نشان می دهند (۱۹۰۵ و ۱۰). Nowak و همکاران (2004) تغییر در فعالیت آنزیم های اکسیدوردوکتاز را در پاسخ به اضافه کردن سلیوم در گیاهان گندم مشاهده کردند (۱۸). همچنین آزمایشات گلخانه ای افزایش در فعالیت هر دو کاتالاز و پراکسیداز را در گیاهان گندم تیمار شده با سلیوم نشان دادند (۱۰).

نتایج این تحقیق نشان داد که میزان کلروفیل کل و قندهای احیاکننده برگ در نمونه های گروه های Se1 و Se2 به مقدار معنی داری بیشتر از نمونه های گروه شاهد بود. البته این افزایش قندهای احیاکننده برگ می تواند ناشی از اثر افزایشی سلیوم بر میزان رنگیزه های فتوسنتزی و نیز افزایش راندمان فتوسنتز باشد. Wang و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که در دانه رست های برنج *Oryza sativa* L. مقادیر پایین سلیوم فتوسنتز را

نتایج حاصل از سنجش میزان پروتئین و فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز برگ و ریشه و کاتالاز برگ نشان داد که فعالیت این آنزیم ها در نمونه های گروه های Se1 و Se2 نسبت به شاهد افزایش یافت. مشخص شده است که سلیوم هنگامی که در غلظت های کم مورد استفاده قرار می گیرد، رشد و ظرفیت آنتی اکسیدانی هر دو گیاهان تک لپه و دو لپه را ترغیب می کند که نتایج ما موافق با نتایج دیگر تحقیقات در این زمینه است. (۱۰ و ۵). تحقیقات جدید نشان داده است که سلیوم نه فقط قادر به رشد و نمو گیاه می باشد بلکه باعث افزایش مقاومت و ظرفیت آنتی اکسیدان های گیاهی در معرض تنش های مختلف می شود (۱۹۰۵ و ۱۰). همچنین گیاهان تیمار شده با سلنات افزایش بیشتری در آنزیم های سم زدایی H_2O_2 به خصوص اسکوربات پراکسیداز و

- selenium supply under cold stress. *Biological Trace Element Research*. 136 , 355–363.
5. Djanaguiraman, M., Devi, D.D., Shanker, A.K., Sheeba, J.A., Bangarusamy, U., 2005. Selenium – an antioxidative protectant in soybean during senescence. *Plant and Soil*. 272, 77–86.
 6. Djanaguiraman, M., Prasad, P.V.V., Seppanen, M., 2010. Selenium protects sorghum leaves from oxidative damage under high temperature stress by enhancing antioxidant defense system. *Plant Physiology and Biochemistry* 48, 999–1007.
 7. Feng, R.W., Wei, C.Y., 2012. Antioxidative mechanisms on selenium accumulation in *Pteris vittata* L., a potential selenium phytoremediation plant. *Plant, Soil and Environment* 58 , 105–110.
 8. Filek, M., Zembala, M., Hartikainen, H., Miszalski, Z., Korna's, A., Wietecka-Posluszny, R., 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, 19–28.
 9. Germ M, Stibilj V, Kreft I., 2007. Metabolic importance of selenium for plants. *The European Journal of Plant Science and Biotechnology* 1, 91-97.
 10. Hartikainen, H., Xue, T., 1999. The promotive effect of selenium on plant growth as triggered by ultraviolet irradiation. *Journal of Environmental Quality* 28: 1372-1375.
 11. Hartikainen, H., Xue, T., Piironen, V., 2000. Selenium as an antioxidant and prooxidant in ryegrass. *Plant and Soil* 225, 193-200.
 12. Hasanuzzaman, M., Hossain, M.A., 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, 1704–1721.
 13. Hawrylak-Nowak, B., 2009. Beneficial effects of exogenous selenium in cucumber seedlings subjected to salt stress. *Biological Trace Element Research* 132, 259–269.
 14. Kumar, M., Bijo, A.J., Baghel, R.S., Reddy, C.R.K., Jha, B., 2012. Selenium and Spermine alleviates cadmium induced toxicity in the red seaweed *Gracilaria dura*

افزایش داد (۲۸). به علاوه در جو دوسر، کاربرد سلنیوم به طور معنی داری شدت فتوسنتز هدایت روزنه‌ای و شدت تنفس را افزایش داد (۶). تیمار سلنیوم شدت رشد را در گیاهان تحت تیمار شوری اصلاح کرده و موجب افزایش رنگیزه های فتوسنتزی و محتوای پرولین در برگ های گیاه خیار تحت تنش شوری شده است (۱۳ و ۱۴ و ۱۵ و ۱۶ و ۱۷ و ۱۸). که نتایج این تحقیق مبنی بر افزایش کلروفیل موافق با سایر نتایج در این زمینه است. همچنین تنظیم جذب و انتشار بعضی عناصر ضروری بوسیله سلنیوم مکانیسم اصلی برای باز فعال سازی آنتی اکسیدان های همراه، کاهش سطوح (ROS) و اصلاح مقاومت گیاهان به تنش می باشد (۲۵). در آزمایش مزرعه‌ای با 75mgm^{-2} سلنیوم (سطوح نسبتاً بالای سلنیوم)، جذب Fe بوسیله کاهو افزایش یافت (۲۵). بنابراین سلنیوم با اصلاح جذب مواد باعث افزایش آنتی اکسیدان ها و همچنین با افزایش جذب آهن باعث افزایش محتوای کلروفیل می شود.

نتایج این تحقیق دلالت بر آن دارد که سلنیوم در غلظت های ۲۵ و ۵۰ میلی گرم در لیتر می تواند موجب تحریک فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان شده و از این طریق موجب افزایش مقاومت گیاه در برابر تنش های مختلف محیطی شود.

References

1. Arnon, D., 1949. *Plant Physiology* 24, 1-15.
2. Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 72, 248-254.
3. Broadley, M.R., Alcock, J., Alford, J., Cartwright, P., Foot, I., Fairweather-Tait, S.J., Hart, D.J., Hurst, R., Knott, P., McGrath, S.P., Meacham, M.C., Norman, K., Mowat, H., Scott, P., Stroud, J.L., Tovey, M., Tucker, M., White, P.J., Young, S.D., Zhao, F.J., 2010. Selenium biofortification of high-yielding winter wheat (*Triticum aestivum* L.) by liquid or granular Se fertilisation. *Plant and Soil*. 332, 5–18.
4. Chu, J.Z., Yao, X.Q., Zhang, Z.N., 2010. Responses of wheat seedlings to exogenous

26. Terry, N., Zayed, A.M., de Souza, M.P., Tarun, A.S., 2000. Selenium in higher plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 51,401–432.
27. Wang, Z.J., Gao, Y.X., 2001. Biogeochemical cycling of selenium in Chinese environments. Appl. Geochem. 16, 1345–1351.
28. Yao, X.Q., Chu, J.Z., Wang, G.Y., 2009a. Effects of selenium on wheat seedlings under drought stress. Biological Trace Element Research 130, 283–290.
29. Yao, X.Q., Chu, J.Z., Wang, G.Y., 2009b. Effects of drought stress and selenium supply on growth and physiological characteristics of wheat seedlings. Acta Physiologiae Plantarum 31, 1031–1036.
30. Yao, X., Chu, J., He, X., Ba, C., 2011. Protective role of selenium in wheat seedlings subjected to enhanced UV-B radiation. Russian Journal of Plant Physiology 58, 283–289.
15. Luo, Q., Yu, B., Liu, Y., 2005. Differential sensitivity to chloride and sodium ions in seedlings of *Glycine max* and *G. soja* under NaCl stress. J Plant Physiol, 162,1003-1012.
16. Malik, J.A., Goel, S., Kaur, N., Sharma, S., Singh, I., Nayyar, H., 2012. Selenium antagonizes the toxic effects of arsenic on mungbean (*Phaseolus aureus* Roxb.) plants by restricting its uptake and enhancing the antioxidative and detoxification mechanisms. Environmental and Experimental Botany 77, 242–248.
17. Nakano, Y., Asada, K., 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant and Cell Physiology. 22, 867–880.
18. Nowak, J., Kaklewski, K., Ligocki, M., 2004. Influence of selenium on oxidoreductive enzymes activity in soil and in plants. Soil Biol. Biochem., 36, 1553-1558.
19. Peng, X.L., Liu, Y.Y. and Luo, S., 2002. Effects of selenium on lipid peroxidation and oxidizing ability of rice roots under ferrous stress. J. Northeast Agric. Univ 19, 9-15.
20. Pereira, G.J.G., Molina, S.M.G., Lea, P.J., Azevedo, R.A., 2002. Activity of antioxidant enzymes in response to cadmium in *Crotalaria juncea*. Plant Soil, 239, 123-132.
21. Pezzarossa, B., Remorini, D., Gentile, M.L., Massai, R., 2012. Effects of foliar and fruit addition of sodium selenate on selenium accumulation and fruit quality. Journal of the Science of Food and Agriculture 92, 781–786.
22. Schwarz, K., Foltz, C.M., 1957. Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. Journal of the American Chemical Society 70, 3292–3293.
23. Somogyi, N.J., 1957, Notes on sugar determination. J Biol Chem. 195, 19-23.
24. Tapiero, H., Townsend, D.M., Tew, K.D., 2003. The antioxidant role of selenium and seleno-compounds. Biomedicine and Pharmacotherapy 57, 134–144.
25. Terry, N., Abadia, J., 1986. Function of iron in chloroplasts. Journal of Plant Nutrition 9, 609–646.

