



<https://ijpb.ui.ac.ir/?lang=en>

Journal of Plant Biological Sciences

E-ISSN: 3041-9603

Vol. 18, Issue 2, No. 68, 2026, pp. 23- 42

Received: 25/04/2026 Accepted: 31/08/2026

(Research Paper)

Comparative Effects of Selenium and Selenium Nanoparticles on the Physiological Responses of Saffron Callus (*Crocus sativus* L.)

Mahsa Khorsandi Moghadam¹, Roya Karamian ^{*1}

¹ Department of Biology, Faculty of Sciences, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

Abstract

Selenium (Se) can regulate plant growth and antioxidant metabolism, though its effects depend strongly on the form and concentration used. This study compared the effects of conventional selenium (sodium selenate) and selenium nanoparticles (SeNPs) on the physiological responses of saffron (*Crocus sativus* L.) callus cultured *in vitro*. Uniform calli were treated with 5 mg L⁻¹ sodium selenate or SeNPs, while untreated calli served as the control. Both Se forms increased callus biomass, compatible solutes, phenolic compounds, total protein, and antioxidant enzyme activities. Sodium selenate reduced hydrogen peroxide and malondialdehyde contents, indicating improved redox regulation and reduced membrane lipid peroxidation. Conversely, SeNPs increased both oxidative-stress markers despite inducing stronger antioxidant responses, suggesting that the activated defense system was insufficient to prevent oxidative damage. Both treatments reduced photosynthetic pigment contents, with a more pronounced decline under SeNP exposure. Overall, sodium selenate produced a more favorable physiological response, whereas SeNPs at 5 mg L⁻¹ induced both metabolic stimulation and oxidative toxicity. These findings emphasize the need to optimize the concentration of each Se form independently before its application in saffron tissue culture.

Keywords: antioxidant defense; callus culture; *Crocus sativus*; oxidative stress; selenium; selenium nanoparticles

*Corresponding Author: R_karamian@basu.ac.ir



Introduction

Saffron (*Crocus sativus* L.) is a sterile, vegetatively propagated geophyte of considerable economic and medicinal importance. Propagation through corms is slow and may transmit pathogens; therefore, tissue culture is valuable for rapid clonal propagation, production of pathogen-free material, and controlled production of bioactive metabolites. Its success depends on plant growth regulators and the mineral composition of the culture medium. Selenium (Se), although not essential for higher plants, can exert beneficial effects at low concentrations by promoting growth and stimulating antioxidant systems. At excessive concentrations, however, Se may become pro-oxidant and impair cellular functions. Selenium nanoparticles (SeNPs) have attracted attention because their distinctive physicochemical properties may alter cellular uptake and biological activity. Nevertheless, plant responses depend on the form, concentration, species, and culture conditions of Se, and comparative information for saffron callus remains limited. This study compared the effects of sodium selenate and SeNPs, applied at the same nominal concentration, on growth, metabolites, oxidative-stress markers, and antioxidant enzymes in saffron callus cultured *in vitro*.

Materials and Methods

Healthy saffron corms were washed under running water and surface-disinfected sequentially with 70% ethanol for 5 min and 0.1% mercuric chloride for 10 min, followed by three rinses with sterile distilled water. Corm-derived explants were cultured on Murashige and Skoog (MS) medium containing 3% sucrose and 1 mg L⁻¹ each of 1-naphthaleneacetic acid (NAA) and 6-benzylaminopurine (BAP) to induce callus formation. After five subcultures, morphologically uniform calli were transferred to MS media with the same plant-growth-regulator composition and assigned to three treatments: an untreated control, 5 mg L⁻¹ conventional Se supplied as sodium selenate, and 5 mg L⁻¹ SeNPs. Cultures were maintained in darkness under controlled conditions in a culture room. At the end of the treatment period, calli were harvested, and samples intended for biochemical analyses were stored at -80 °C.

Fresh and dry weights were recorded as indices of biomass accumulation. Photosynthetic pigments, including chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, total chlorophyll, and carotenoids, were determined spectrophotometrically. Soluble sugars and free proline were measured as indicators of carbon status and osmotic adjustment. Total phenolics, flavonoids, and anthocyanins were assayed to evaluate non-enzymatic antioxidant and secondary-metabolic responses. Malondialdehyde (MDA) and hydrogen peroxide (H₂O₂) were quantified as indicators of lipid peroxidation and oxidative status, respectively. Total soluble protein was determined using the Bradford assay. The activities of peroxidase (POD), catalase (CAT), and superoxide dismutase (SOD) were also measured spectrophotometrically. Data were analyzed using SPSS, and treatment means were compared using Duncan's multiple range test at $P \leq 0.05$.

Results and Discussion

Both Se treatments significantly affected most of the evaluated physiological and biochemical traits, but the magnitude and direction of the responses differed between sodium selenate and SeNPs. Application of either Se form increased callus fresh and dry weights relative to the control, indicating that Se at the tested nominal concentration could promote biomass accumulation under the present culture conditions. This response may reflect improved cellular redox regulation and metabolic activity. Nevertheless, the growth-promoting effect should be interpreted alongside the oxidative-stress responses, because increased biomass does not necessarily imply the absence of cellular stress.

The highest concentrations of chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, total chlorophyll, and carotenoids were observed in untreated calli. Both sodium selenate and SeNPs reduced pigment contents, with SeNPs generally exerting the stronger negative effect, particularly on carotenoids. Because the cultures were maintained in darkness and callus is a largely undifferentiated tissue, pigment values should be regarded as biochemical characteristics of the callus rather than direct measures of photosynthetic performance. The decline may be associated with inhibition of pigment biosynthesis or reduced pigment stability under Se-induced changes in cellular redox status. The stronger response to SeNPs is consistent with their potentially greater interaction with cellular surfaces; however, nanoparticle uptake and intracellular localization were not directly measured in this study and require further investigation.

Both Se forms enhanced the accumulation of phenolics, flavonoids, and anthocyanins, and the highest phenolic levels were generally recorded in SeNP-treated calli. These compounds contribute to non-enzymatic antioxidant capacity and may accumulate when secondary-metabolic pathways are stimulated by moderate redox perturbation. Selenium may influence phenylpropanoid metabolism, including processes associated with phenylalanine ammonia-lyase activity, whereas the pronounced response to SeNPs may reflect a stronger elicitation signal. Proline and soluble sugars also increased following both treatments, with the greatest accumulation under SeNP exposure. In cultured tissues, these compatible solutes may support osmotic balance, stabilize macromolecules, store carbon, and buffer redox. Their accumulation, however, may represent either improved protective capacity or a response to treatment-induced stress; thus, it should not be interpreted solely as evidence of enhanced tolerance.

The clearest distinction between the two Se forms was observed in oxidative-stress markers. Sodium selenate reduced both H_2O_2 and MDA contents relative to the control, suggesting improved control of reactive oxygen species and lower membrane lipid peroxidation. In contrast, SeNPs at the same nominal concentration markedly increased H_2O_2 and MDA levels, indicating increased oxidative stress and membrane damage. These findings show that equal mass concentrations of conventional and nanoparticulate Se are not necessarily physiologically equivalent. Differences in dissolution, surface reactivity, cellular contact, and effective availability could account for the contrasting responses, although these mechanisms were not directly assessed. Consequently, the increase in protective metabolites and antioxidant enzymes under SeNP treatment should be viewed as a compensatory defense response rather than unequivocal evidence of a beneficial effect.

Total soluble protein increased in response to both Se forms. Moreover, POD, CAT, and SOD activities were enhanced, with the highest activities generally occurring in SeNP-treated calli. SOD provides an initial line of enzymatic defense by converting superoxide radicals to H_2O_2 , whereas CAT and POD participate in H_2O_2 detoxification. The coordinated induction of these enzymes indicates activation of the antioxidant defense network. Under sodium selenate treatment, this activation coincided with reduced H_2O_2 and MDA, suggesting that antioxidant capacity was sufficient to constrain oxidative damage. Under SeNP treatment, however, elevated enzyme activities did not prevent H_2O_2 accumulation or lipid peroxidation, suggesting that reactive oxygen species production exceeded the tissue's detoxification capacity. Thus, the stronger biochemical response elicited by SeNPs included both defense stimulation and evidence of toxicity at 5 mg L^{-1} .

Conclusion

Conventional Se and SeNPs both modified growth and metabolism in saffron callus, but they produced distinct redox outcomes. Sodium selenate promoted biomass, compatible-solute accumulation, phenolic metabolism, protein content, and antioxidant activity while reducing H_2O_2 and MDA. SeNPs also stimulated biomass and defense-related traits, often more strongly, but simultaneously decreased pigment contents and increased oxidative-stress markers. Therefore, the SeNP response at 5 mg L^{-1} cannot be regarded as uniformly beneficial. The results emphasize that Se form and concentration must be optimized independently before using Se-based treatments in saffron tissue culture. Dose-response experiments, physicochemical characterization of SeNPs in the culture medium, and direct assessment of Se uptake and localization are recommended to distinguish beneficial elicitation from nanoparticle-induced toxicity and to define a safe and effective application range.

مطالعه مقایسه‌ای اثر سلیوم و نانوذرات سلیوم بر شاخص‌های فیزیولوژیکی کالوس زعفران مزروعی (*Crocus sativus* L.)

مهسا السادات خرسندی مقدم^۱، رویا کرمان^{۱*}

^۱ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

چکیده

سلیوم به عنوان یک عنصر ریزمغذی مفید، نقش مهمی در تنظیم فرایندهای فیزیولوژیکی گیاهان ایفا می‌کند و در سال‌های اخیر، استفاده از نانوذرات آن در سیستم‌های کشت بافت گیاهی مورد توجه قرار گرفته‌است. پژوهش حاضر با هدف مقایسه اثرات سلیوم و نانوذرات سلیوم بر برخی شاخص‌های فیزیولوژیکی کالوس زعفران مزروعی (*Crocus sativus* L.) انجام شد. بدین منظور کالوس‌های ایجاد شده از بنه زعفران در محیط کشت MS حاوی یک میلی گرم در لیتر از هورمون‌های BAP و NAA پس از ۴ دوره واکشت، به همان محیط کشت شامل ۵ میلی گرم در لیتر سلیوم یا نانوسلیوم منتقل شدند. اثر این اشکال سلیوم بر وزن کالوس، محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی، ترکیبات فنلی، قند محلول، پرولین، مالون‌دی‌آلدئید، پراکسید هیدروژن و پروتئین کل و نیز فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (پراکسیداز، کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز) مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که تیمارهای سلیوم و نانوسلیوم موجب افزایش وزن تر و وزن خشک کالوس و محتوای فنل، فلاونوئید و آنتوسیانین کل شدند، لیکن محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی را کاهش دادند. همچنین محتوای پرولین، قند محلول و پروتئین کل و نیز فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به‌ویژه کاتالاز تحت تأثیر هر دو شکل سلیوم افزایش یافت. تیمار سلیوم باعث کاهش محتوای پراکسید هیدروژن و مالون‌دی‌آلدئید شد، لیکن نانوسلیوم در همین غلظت موجب افزایش آن‌ها شد. در مجموع، نتایج نشان داد که اغلب شاخص‌های فیزیولوژیکی تحت تأثیر هر دو شکل سلیوم در غلظت ۵ میلی گرم در لیتر بهبود یافتند. لیکن در برخی موارد القاء تنش اکسیداتیو ناشی از نانوذرات سلیوم، نشان‌دهنده حساسیت بیشتر کالوس زعفران به غلظت این شکل از سلیوم به علت سرعت جذب و نفوذ بالاتر آن است. بنابراین استفاده از سلیوم به ویژه در شکل نانو در غلظت مناسب در شیشه، برای بهره‌برداری ایمن و مؤثر از این عنصر ضروری است.

واژه‌های کلیدی: ترکیبات فنلی، زعفران مزروعی، سلیوم، پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی، کالوس

مقدمه

زعفران مزرعی (*Crocus sativus* L.) گیاهی علفی از تیره زنبقیان و متعلق به جنس *Crocus* با حدود ۸۰ گونه است. این گیاه قابلیت رشد در شرایط مختلف محیطی از مناطق نیمه گرمسیری تا اقلیم مدیترانه‌ای را دارا است. زعفران علاوه بر ارزش اقتصادی بالا، به عنوان یکی از گیاهان دارویی مهم شناخته می‌شود و در طب سنتی کاربردهای متعددی دارد. همچنین این گیاه از نظر مصرف آب، یکی از کارآمدترین گیاهان زراعی در دنیا محسوب شده و از نظر نیاز به عناصر غذایی نیز، گیاهی کم توقع به شمار می‌رود (Cardone et al., 2020). با وجود اهمیت بالای زعفران، این گیاه از نظر تکثیر و به نژادی با محدودیت‌های قابل توجهی مواجه است، زیرا گیاهی عقیم بوده و تکثیر آن به طور عمده توسط بیه انجام می‌شود که خود کندی تکثیر، کاهش کیفیت بیه‌ها و انتقال عوامل بیماری‌زا را در پی دارد. از این رو، توسعه سیستم‌های کشت بافت مناسب جهت تکثیر انبوه، افزایش رشد و تولید بیه‌های عاری از عوامل بیماری‌زا در این گیاه ارزشمند، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Chib et al., 2020). نتایج پژوهش‌های پیشین نشان داده‌است که شرایط محیط کشت و ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی نقش مهمی در موفقیت کشت بافت زعفران دارند. به طوری که بیشترین میزان القاء کالوس و باززایی شاخه در زعفران توسط محیط MS حاوی ۵ درصد سوکروز و ۴ میلی گرم در لیتر TDZ و NAA گزارش شده‌است (Ahmed et al., 2012). همچنین تولید ترکیبات ثانویه زعفران از طریق کشت کالوس، امکان تولید انبوه این ترکیبات ارزشمند را در شرایط کنترل شده فراهم نموده‌است (Castillo et al., 2003). عوامل متعدد فیزیولوژی و عملکرد گیاهان را در شرایط کشت بافت تحت تأثیر قرار می‌دهند که از جمله می‌توان به عناصر ریزمغذی در محیط کشت اشاره کرد. در میان عناصر غذایی، سلنیوم (Se) به علت ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی خود در دهه گذشته توجه زیست شناسان را جلب کرده‌است. سلنیوم به عنوان یک عنصر مفید نقش مهمی در فیزیولوژی و متابولیسم گیاهان ایفا می‌کند.

این عنصر در مقادیر کم موجب بهبود رشد، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و تنظیم فرآیندهای فیزیولوژیکی گیاهان می‌شود، اما در سطوح بالا می‌تواند سبب القای تنش اکسیداتیو شود (Thakur et al., 2023). از سوی دیگر، استفاده از عناصر غذایی به شکل نانوذرات به علت خواص فیزیکوشیمیایی و سرعت بالای جذب آن‌ها از رویکردهای مهم در کشاورزی نوین است. در سال‌های اخیر، استفاده از نانوذرات سلنیوم به علت سمیت کم، سرعت جذب و فراهمی زیستی بالا و توانایی قوی در حذف رادیکال‌های آزاد بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌است (El-Ramady et al., 2015). نانوذرات سلنیوم می‌توانند از طریق تأثیر بر تکثیر سلولی، تمایز بافتی و تنظیم مسیرهای متابولیکی، بر پاسخ‌های بیوشیمیایی گیاهان تأثیر بگذارند. پژوهش‌ها نشان دادند کاربرد سلنیوم و نانوسلنیوم موجب افزایش سرعت فتوسنتز، تجمع زیست‌توده (Farooq et al., 2022)، افزایش محتوای ترکیبات فنلی و پروتئین و در نهایت بهبود رشد و عملکرد گیاهان مختلف شده‌است (Adhikary et al., 2022; Sher et al., 2022; Abdullahi et al., 2023; Huang et al., 2023; Ramezan et al., 2024). همچنین گزارش شده‌است که نانوذرات سلنیوم به همراه محرک‌های زیستی می‌توانند ارزش تغذیه‌ای و فعالیت‌های زیستی گیاهان را افزایش دهند (Almutairi et al., 2023)، با توجه به فقدان گزارش‌های علمی در مورد اثر سلنیوم و نانوذرات سلنیوم بر شاخص‌های فیزیولوژیکی زعفران مزرعی، این پژوهش با هدف ارزیابی اولیه الگوی پاسخ‌های فیزیولوژیکی کالوس زعفران به دو شکل سلنیوم طراحی شد. در این پژوهش سیستم کشت کالوس به علت کنترل‌پذیری بهتر شرایط محیطی، یکنواختی ژنتیکی بافت و امکان ارزیابی سریع پاسخ‌های سلولی به تیمارهای اعمال شده، به عنوان مدل آزمایشی اولیه انتخاب شد که می‌تواند جهت پژوهش‌های بعدی در مورد مسیر بیوسنتزی آپوکاروتنوئیدهای شاخص زعفران نظیر کروسین نیز مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی بنه‌ها: بنه‌های زعفران مزروعی (*Crocus sativus* L.) از سازمان جهاد کشاورزی شهرستان ملایر خریداری و برای کشت بنه‌های سالم به قطر ۲/۵-۳ سانتی‌متر و وزن ۷-۸ گرم انتخاب شدند. ابتدا بنه‌ها پس از جدا کردن فلس‌های روی آن‌ها با آب جاری شسته شدند. سپس بنه‌ها به مدت ۵ دقیقه در اتانول ۷۰ درصد و ۱۰ دقیقه در محلول کلرید جیوه ۰/۱ درصد ضدعفونی و در نهایت سه بار با آب مقطر سترون شستشو داده شدند (Guang & Shi, 1995).

کشت بنه‌ها: جهت کشت ریزنمونه‌های بنه از محیط کشت MS حاوی ۳ درصد سوکروز (Murashige & Skoog, 1962) و یک میلی‌گرم در لیتر از هورمون‌های BAP و NAA (pH=۷/۵-۸/۵) استفاده شد. قبل از انجام کشت، همه مواد و لوازم کشت در اتوکلاو با دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد و فشار یک اتمسفر به مدت ۱۵ دقیقه سترون شدند. کالوس‌ها هر ۲۱ روز یک‌بار در محیط کشت تازه با همان ترکیب هورمونی واکشت و در تاریکی نگه داری شدند. پس از ۴ دوره واکشت، کالوس‌ها به مدت ۳ هفته به محیط کشت MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر BAP و NAA و ۵ میلی‌گرم در لیتر سلنات سدیم یا نانوذرات سلنیوم (با اندازه ۲۰-۳۵ نانومتر و خلوص ۹۸ درصد، تهیه شده از پژوهشکده نانو دانشگاه شیراز) منتقل شدند. غلظت سلنیوم بر اساس پژوهش‌های پیشین کاربرد آن در شرایط در شیشه انتخاب شد و جهت مقایسه اثرات دو شکل مختلف آن، از غلظت یکسان آن‌ها استفاده شد. پس از پایان دوره تیمار، کالوس‌ها برداشت شده و پس از اندازه‌گیری وزن تر و وزن خشک آن‌ها با ترازوی دقیق، جهت انجام سنجش شاخص‌های فیزیولوژیکی در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

ارزیابی شاخص‌های فیزیولوژیکی

محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی: ارزیابی محتوای کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئیدها توسط روش Lichtentaler (1987) انجام شد. بدین منظور ۰/۲ گرم بافت تر کالوس در هاون چینی حاوی ۵ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد

سائیده شد و سپس مخلوط حاصل با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ صاف شد، سپس میزان جذب نوری نمونه‌ها در طول موج های ۶۶۳/۲، ۶۴۶/۸ و ۴۷۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر UV-Visible مدل Perkin Elmer خوانده شد و در نهایت محتوای کلروفیل‌ها و کاروتنوئیدها با استفاده از رابطه‌های (۱ تا ۴) محاسبه و بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر کالوس بیان شد (Lichtentaler, 1987).

رابطه ۱:

$$a \text{ کلروفیل} = [12/7 (A_{663}) - 2/69 (A_{647})] \times V/1000 \times W$$

رابطه ۲:

$$b \text{ کلروفیل} = [22/9 (A_{663}) - 4/68 (A_{647})] \times V/1000 \times W$$

رابطه ۳:

$$\text{کلروفیل کل} = [20/2 (A_{663}) + 8/02 (A_{647})] \times V/1000 \times W$$

رابطه ۴:

$$1/98 \times (1000 \times A_{480} - 1/82 \times Chla - 85/02 \times Chlb) = \text{کاروتنوئیدها}$$

محتوای فنل، فلاونوئید و آنتوسیانین کل: بدین منظور ۰/۵ گرم بافت تر کالوس با محلول استخراج (متانول حاوی ۱ درصد HCl) سائیده شد و از عصاره حاصل برای سنجش محتوای فنل، فلاونوئید و آنتوسیانین کل استفاده شد. محتوای فنل کل به روش فولین سیو کالتو (McDonald et al., 2002) ارزیابی شد. میزان جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۷۶۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. محتوای فنل کل توسط منحنی استاندارد اسید گالیک محاسبه و بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر کالوس گزارش شد. برای سنجش محتوای فلاونوئید کل از روش رنگ سنجی با کلرید آلومینیوم استفاده شد و میزان جذب نوری نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۹۸ نانومتر خوانده شد. محتوای فلاونوئید کل با استفاده از منحنی استاندارد کوئرستین محاسبه و بر اساس میلی‌گرم بر گرم وزن تر کالوس گزارش شد (Chang et al., 2002). سنجش محتوای آنتوسیانین کل به روش Wagner (1979) انجام شد. ابتدا ۰/۱ بافت برگ با ۱۰ میلی‌لیتر متانول اسیدی (متانول حاوی ۱ درصد HCl) در هاون چینی بطور کامل همگن شد. سوسپانسیون حاصل به مدت ۲۴ ساعت در

۴۸۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. همچنین محتوای قند محلول نمونه‌ها با استفاده از منحنی استاندارد گلوکز محاسبه و برحسب میلی گرم بر گرم وزن خشک کالوس بیان شد.

محتوای مالون‌دی‌آلدئید: برای سنجش محتوای مالون‌دی‌آلدئید (MDA) از روش [Heath & Packer](#) (1968) استفاده شد. ابتدا ۰/۲ گرم بافت تر کالوس در هاون چینی حاوی ۵ میلی لیتر تری کلرواستیک اسید ۰/۱ درصد سائیده شد. عصاره حاصل به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس به یک میلی لیتر از محلول رویی، ۵ میلی لیتر محلول تری کلرواستیک اسید ۲۰ درصد حاوی ۰/۵ درصد تیوباربیتوریک اسید (TBA) اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۹۵ درجه سانتی گراد حرارت داده شد و سپس بلافاصله در حمام یخ سرد شد. آنگاه میزان جذب محلول توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۲۳ نانومتر خوانده شد و محتوای مالون‌دی‌آلدئید بر حسب میکرومول بر گرم وزن تر کالوس گزارش شد.

محتوای پراکسید هیدروژن: برای سنجش محتوای پراکسید هیدروژن، ۰/۵ گرم بافت تر کالوس با یک میلی لیتر تری کلرواستیک اسید ۰/۱ درصد سائیده شد. مخلوط همگن به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد. سپس ۷۰۰ میکرولیتر از محلول رویی با ۷۰۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی مولار (PH=۷) و ۷۰۰ میکرولیتر یدید پتاسیم یک مولار مخلوط شد. محتوای پراکسید هیدروژن توسط منحنی استاندارد تهیه شده از غلظت‌های مشخص H_2O_2 محاسبه و بر حسب میکرومول بر گرم وزن تر کالوس بیان شد ([Nareshkumar et al., 2015](#)).

محتوای پروتئین کل: برای ارزیابی محتوای پروتئین کل از روش برادفورد استفاده شد ([Bradford, 1976](#)). جهت تهیه عصاره پروتئینی، ۰/۵ گرم بافت تر کالوس در هاون چینی حاوی ۷ میلی لیتر بافر فسفات سدیم (۰/۵ مولار، pH=۷) به مدت ۳۰ ثانیه روی یخ سائیده شد. سپس نمونه‌ها در سانتریفیوژ یخچال‌دار با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به

تاریکی و در دمای اتاق قرار داده شد و سپس به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. میزان جذب نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۵۰ نانومتر خوانده شد. همچنین از متانول اسیدی به عنوان بلانک استفاده شد. در نهایت محتوای آنتوسیانین کل بر اساس رابطه زیر و توسط ضریب خاموشی معادل $mM^{-1} cm$ 33000^1 محاسبه و بر حسب میلی گرم بر گرم وزن تر کالوس بیان شد (رابطه ۵).

$$A = \epsilon BC$$

A = میزان جذب خوانده شده در ۵۵۰ نانومتر، ϵ = ضریب خاموشی، B = عرض کووت (یک سانتی متر) و C = غلظت بر حسب مول در لیتر

محتوای پرولین: جهت ارزیابی محتوای پرولین، ۰/۳ گرم بافت تر کالوس با یک میلی لیتر سولفوسالسیلیک اسید ۳ درصد سائیده شد و سپس سانتریفیوژ شد. در مرحله بعد سپس به ۲۰۰ میکرولیتر از محلول رویی، ۲۰۰ میکرولیتر نین‌هیدرین و ۲۰۰ میکرولیتر اسید استیک گلاسیال اضافه شد. نمونه‌ها به مدت یک ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سانتی - گراد قرار گرفته و پس از خنک شدن، ۲۰۰ میکرولیتر تولوئن به آن‌ها اضافه و به مدت ۱۰ تا ۱۵ ثانیه ورتکس شدند. در نهایت جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۲۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد و محتوای پرولین بر حسب میکرومول بر گرم وزن تر کالوس بیان شد ([Bates et al., 1973](#)).

محتوای قند محلول: برای سنجش محتوای قند محلول از روش فنل - اسید سولفوریک استفاده شد ([Dubious et al., 1956](#)). بدین منظور، ۰/۰۲ گرم بافت خشک کالوس در ۳ میلی لیتر اتانول ۸۰ درصد (v/v) سائیده شد. محلول حاصل به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و محلول رویی برداشت شد. به یک میلی لیتر از محلول رویی، یک میلی لیتر محلول فنل ۵ درصد اضافه و به خوبی مخلوط شد. سپس ۵ میلی لیتر اسید سولفوریک غلیظ به آن اضافه و به شدت مخلوط شد. نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد و در نهایت جذب نوری آن‌ها در طول موج

تريتون-۱۰۰ به عصاره افزوده شد. فعاليت آنزيم سوپراکسيد ديسموتاز بر حسب تغييرات NBT در برابر نور در طول موج ۵۶۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گيري شد و بر حسب تغييرات جذب در دقيقه به ازای ميلي گرم پروتئين بيان شد.

آناليز آماری

آزمایش‌ها به صورت فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی در ۳ تکرار و تجزیه و تحليل داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS انجام شد. همچنين مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن و در سطح احتمال ۵ درصد ($P \leq 0.05$) انجام شد.

نتایج و بحث

وزن تر و وزن خشک کالوس

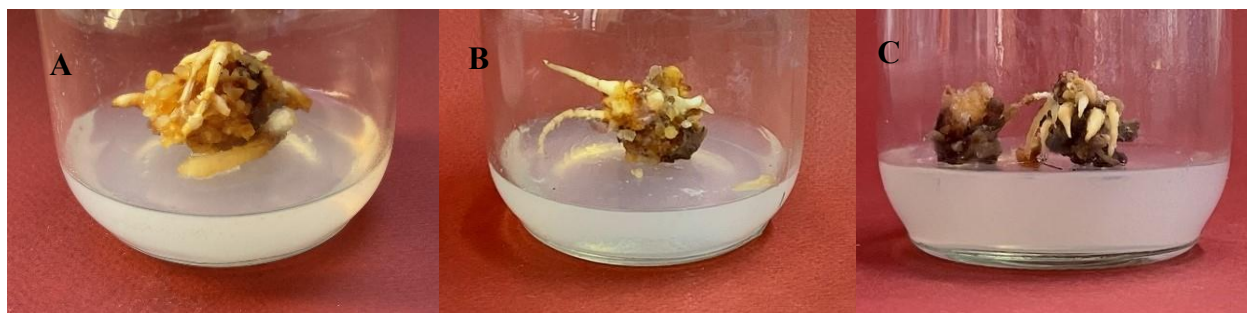
بررسی ریخت‌شناسی کالوس‌های زعفران مزروعی در تیمارهای مختلف نشان داد که سلیوم بویژه در شکل نانو، موجب بهبود رشد و کیفیت ظاهری کالوس‌ها شد (شکل ۱). همچنین نتایج مقایسه میانگین وزن تر و وزن خشک کالوس نشان داد که اثر هر دو تیمار سلیوم و نانوسلیوم در غلظت ۵ میلی گرم در لیتر بر این دو شاخص معنی‌دار بود (جدول ۱). بر اساس نتایج حاصل وزن تر کالوس از ۴/۲۳ گرم در تیمار شاهد، به ۵/۱۷ گرم در تیمار سلیوم و به ۵/۹۳ گرم در تیمار نانوسلیوم افزایش یافت. تغییرات وزن خشک کالوس نیز با الگویی مشابه از ۰/۸۳۰ گرم در تیمار شاهد، به ۱/۰۲۰ و ۱/۰۵۵ گرم به ترتیب در تیمارهای سلیوم و نانوسلیوم رسید، با این تفاوت که اختلاف میان دو تیمار سلیوم و نانوسلیوم معنی‌دار نبود (شکل ۲). نتایج حاصل از پژوهش‌های مختلف نشان داده‌است که فاکتورهای مختلف فیزیولوژیکی کالوس (رشد، بیوسنتز رنگیزه‌ها، فعالیتهای آنزیمی و شاخص‌های تنش اکسیداتیو) هر یک دامنه پاسخ وابسته به دوز اختصاصی خود را دارند و الزاماً هم‌زمان وارد فاز مهاری نمی‌شوند. در یک پژوهش بر روی کالوس گیاه *Santalum album*، تیمار نانوسلیوم موجب افزایش وزن تر و خشک کالوس شده و این افزایش به تحریک جذب عناصر غذایی و افزایش

مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از این مرحله، ۰/۱ میلی لیتر از فاز رویی برداشته شد و به آن ۵ میلی لیتر معرف برادفورد اضافه شد. سپس محلول سریعاً و رتکس شد و به مدت ۲۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد. میزان جذب نوری محلول توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد و محتوای پروتئين کل بر اساس منحنی استاندارد سرم آلبومین گاوی (BSA) محاسبه و بر اساس ميلي گرم بر گرم وزن تر کالوس گزارش شد.

فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی: از عصاره پروتئينی استخراج شده، جهت سنجش فعاليت آنزيم‌های آنتی-اکسیدانی استفاده شد. ارزیابی فعاليت آنزيم پراکسیداز بر اساس روش [MacAdam et al. \(1992\)](#) انجام شد. مخلوط واکنش شامل ۰/۸۱ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی مولار (pH=۷)، ۲۰ میکرو لیتر عصاره پروتئينی، ۹۰ میکرو لیتر گایاکول ۱۰ میلی مولار و ۹۰ میکرو لیتر آب اکسیژنه ۵ میلی مولار بود. تغییرات جذب مخلوط واکنش در طول موج ۴۲۵ نانومتر به مدت ۲ دقیقه (هر ۳۰ ثانیه یک بار) توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. فعاليت آنزيم پراکسیداز بر حسب تغییرات جذب در دقيقه به ازای ميلي گرم پروتئين بيان شد. برای ارزیابی فعاليت آنزيم کاتالاز از روش [Chance & Maehly \(1995\)](#) استفاده شد. بدین منظور از ۲۵۰ میکرو لیتر بافر فسفات سدیم ۲۰ میلی مولار (pH=۷) و ۲۵۰ میکرو لیتر آب اکسیژنه ۱۵ میلی مولار به عنوان پذیرنده الکترون استفاده شد که سپس ۶۰ میکرو لیتر عصاره پروتئينی در حمام یخ به آن‌ها اضافه شد. تغییرات جذب نوری مخلوط واکنش در طول موج ۲۴۰ نانومتر به مدت ۲ دقیقه (هر ۳۰ ثانیه یک بار) توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. همچنین فعاليت آنزيم کاتالاز بر حسب تغییرات جذب در دقيقه به ازای ميلي گرم پروتئين بيان شد. برای ارزیابی فعاليت آنزيم سوپراکسید ديسموتاز از روش [Beauchamp & Fridovich \(1971\)](#) استفاده شد. بدین منظور ۳ میلی لیتر محلول واکنش شامل بافر فسفات ۵۰ میکرو مولار (pH=۸/۷)، متيونین ۹/۹ میکرو مولار، نیتروبلو تترازولیوم (NBT) ۷/۵ میکرو مولار و

Caralluma (al., 2025). همچنین در کالوس گیاه *tuberculate* افزایش وزن تر هم‌زمان با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (سوپراکسید دیسموتاز، پراکسیداز و کاتالاز) تحت تیمار نانوسلنیوم گزارش شده‌است که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد (Zahedi et al., 2019; Ali et al., 2023)

فعالیت متابولیکی سلول‌ها توسط نانوسلنیوم نسبت داده شده- است (Mazhar et al., 2024). همچنین در پژوهش دیگر بر روی کالوس گیاه *Dracocephalum kotschy*، نانوذرات سلنیوم در مقایسه با سلنیت سدیم، عملکرد برتری در بهبود شاخص‌های رشدی و زیست‌توده کالوس نشان دادند که احتمالاً به علت توانایی بیشتر این نانوذرات در جذب و توزیع یکنواخت‌تر آن‌ها در بافت کالوس است (Khanizadeh et al.)



شکل ۱- کالوس حاصل از کشت ریزنمونه بنه زعفران مزروعی (A) چهار ماه پس از واگشت در محیط کشت پایه MS حاوی یک میلی گرم در لیتر از هورمون‌های BAP و NAA. (B) دو هفته پس از انتقال به محیط کشت پایه MS حاوی یک میلی گرم در لیتر از هورمون‌های BAP و NAA و ۵ میلی گرم در لیتر سلنات سدیم. (C) دو هفته پس از انتقال به محیط کشت پایه MS حاوی یک میلی گرم در لیتر از هورمون‌های BAP و NAA و ۵ میلی گرم در لیتر نانوذرات سلنیوم.

Figure 1- Saffron calli from corm explant (A) 4 months after subculture in MS medium supplemented with 1 mg L⁻¹ each of NAA and BAP. (B) 2 weeks after transfer to MS medium supplemented with 1 mg L⁻¹ each of NAA and BAP and 5 mg L⁻¹ sodium selenate. (C) 2 weeks after transfer to MS medium supplemented with 1 mg L⁻¹ each of NAA and BAP and 5 mg L⁻¹ selenium nanoparticles.

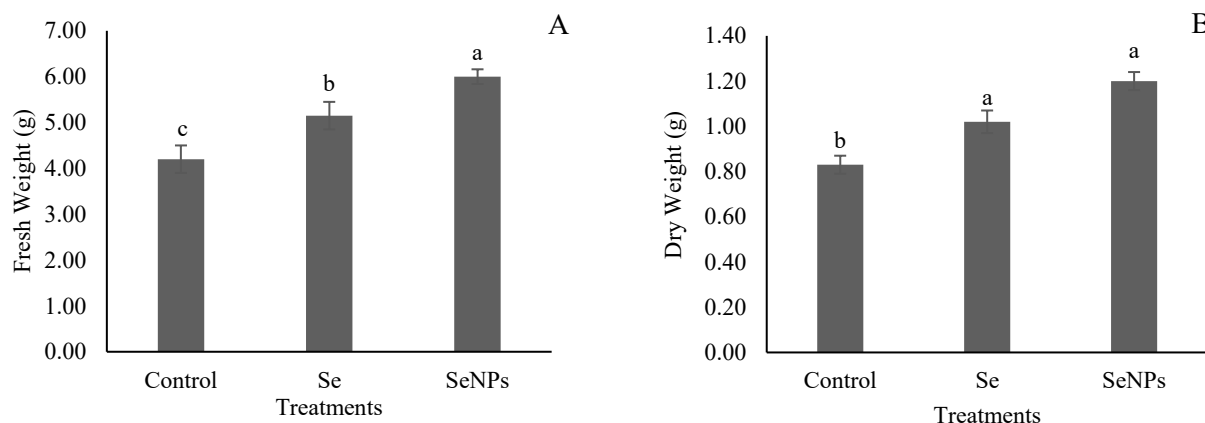
جدول ۱- تجزیه واریانس اثر تیمارهای سلنیوم و نانوذرات سلنیوم بر شاخص‌های فیزیولوژیکی کالوس زعفران مزروعی.

Table 1- Analysis of variance of the effects of selenium and selenium nanoparticles treatments on physiological indices of *Crocus sativus* calli.

S.O.V.	df	Selenium	Selenium nanoparticles	Error	CV (%)
Fresh weight	2	36.1**	36.1**	0.0669	0.45
Dry weight	2	65.6**	65.6**	0.00157	0.43
Chl a	2	99.1**	99.1**	0.000114	0.23
Chl b	2	4.31 ^{ns}	4.31 ^{ns}	0.000220	32.1
Total Chl	2	210**	210**	0.0000825	0.14
Carotenoids	2	45.0**	45.0**	0.00203	0.87
Total phenol	2	52.9**	52.9**	0.0937	0.44
Total flavonoid	2	41.3**	41.3**	0.128	0.49
Total anthocyanin	2	23.4**	23.4**	0.000171	0.38
Proline	2	685177**	685177**	0.00000077	0.001
Soluble sugar	2	199**	199**	5.92	0.43
H ₂ O ₂	2	3527**	3527**	0.0000841	0.018
MDA	2	216**	216**	0.00105	0.055
Total protein	2	9737**	9737**	0.000000196	0.002
Peroxidase	2	36.6**	36.6**	0.000154	1.23
Catalase	2	90.7**	90.7**	0.505	1.64
Superoxide dismutase	2	3802**	3802**	0.0455	0.031

S.O.V: منبع تغییرات، df: درجات آزادی، CV: ضریب تغییرات. ** و ^{ns} به ترتیب بیانگر معنی‌دار بودن در سطح ۵٪ و عدم معنی‌دار بودن است.

S.O.V: Source of variation, df: Degree of freedom, CV: Coefficient of variation. ** and ^{ns} represent significant at 5% probability level and not significant, respectively.



شکل ۲- مقایسه میانگین اثر سلینیوم (Se) و نانوذرات سلینیوم (SeNPs) بر وزن تر (A) و وزن خشک (B) کالوس‌های زعفران مزروعی.

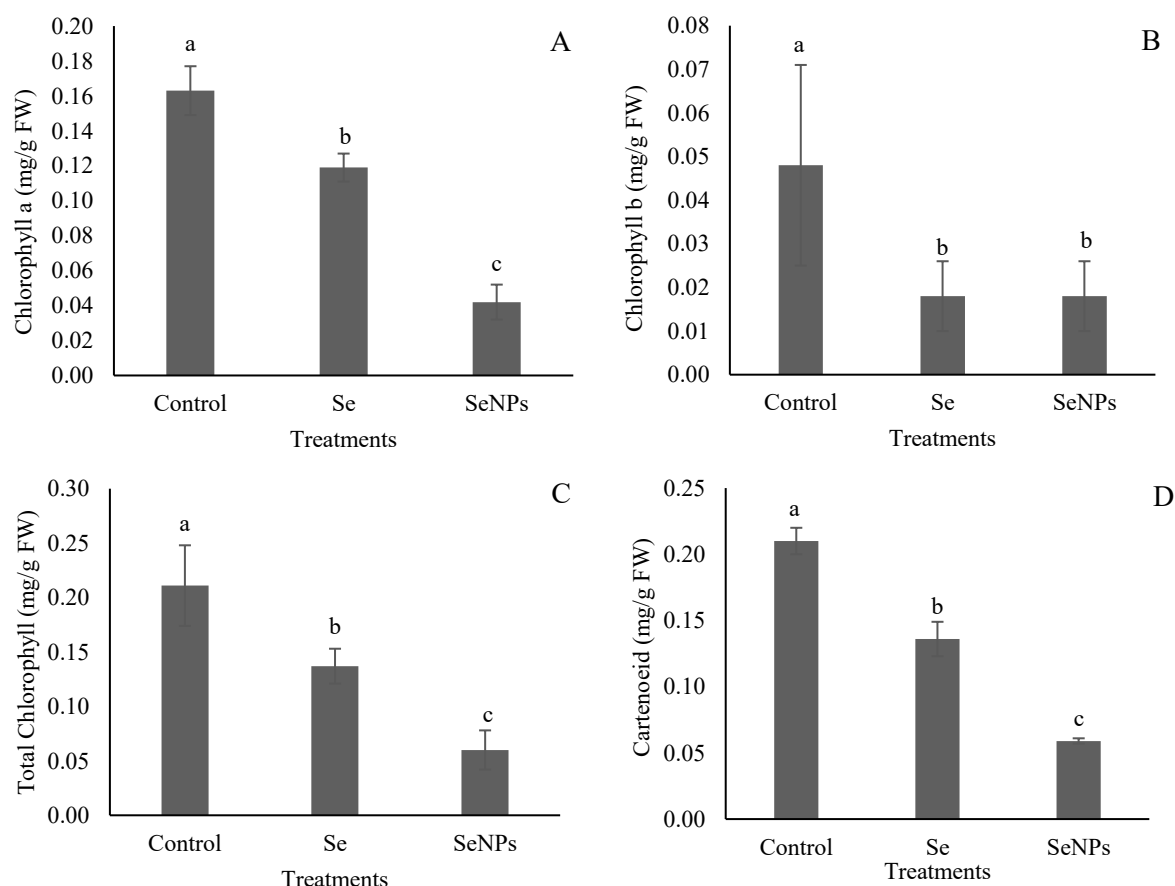
Figure 2- Comparison of the effects of selenium (Se) and selenium nanoparticles (SeNPs) on the fresh (A) and dry (B) weights of *Crocus sativus* calli.

این نانوذرات در غلظت مورد استفاده بر سنتز یا پایداری این رنگیزه‌ها است. زیرا نانوذرات به علت اندازه بسیار کوچک و سطح ویژه بالای خود می‌توانند بیشتر به درون سلول‌های گیاهی نفوذ کرده و با ایجاد اختلال در غشاهای، افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و آسیب به کلروپلاست‌ها، موجب کاهش سنتز یا تخریب رنگیزه‌های فتوسنتزی شوند (Sompura et al., 2026). همچنین همسو با نتایج حاصل از این پژوهش، گزارش شده‌است که سلنات سدیم در غلظت‌های بالا موجب کاهش محتوای کلروفیل در گیاه تنباکو شده که احتمالاً ناشی از کاهش سنتز پورفوبیلینوژن مورد نیاز برای بیوسنتز کلروفیل است (Saffar Yazdi et al., 2012; Zsiros et al., 2019). از سوی دیگر کاهش محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی پس از افزودن سلینیوم و به ویژه نانوسلینیوم، به چندین دوره واکشت در محیط کشت و نگهداری طولانی آن‌ها در تاریکی نیز مرتبط است. رشد بافت کالوس در تاریکی مانع از تمایز پلاستیدها به کلروپلاست‌های بالغ شده و منجر به تشکیل اتیوپلاست‌ها می‌شود. در غیاب نور، مسیر بیوسنتز کلروفیل در مرحله کلیدی تبدیل پروتوکلروفیلید به کلروفیلید، به علت عدم فعالیت آنزیم وابسته به نور پروتوکلروفیلید اکسیدوردوکتاز متوقف می‌شود. در چنین شرایطی، ورود سلینیوم و نانوذرات آن به عنوان یک الیستور غیرزیستی به سلول سیگنال داده و با ایجاد تخصیص مجدد در منابع کربنی و انرژی سلول، مسیرهای بیوسنتزی کلروفیل و کاروتنوئید را مستقل از نور تحت تأثیر قرار می‌دهد. سلول‌های کالوس برای مقابله با این عامل خارجی، جریان

محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی: نتایج مقایسه میانگین اثر تیمارهای سلینیوم و نانوسلینیوم بر محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی نشان داد که هر دو تیمار سلینیوم اثر معنی‌داری بر محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی داشتند (جدول ۱). بر اساس نتایج حاصل، بیشترین محتوای کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئیدها در نمونه شاهد مشاهده شد و تیمارهای سلینیوم و نانوسلینیوم موجب کاهش محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی شدند و نانوسلینیوم در مقایسه با سلینیوم، اثرات منفی بیشتری نشان داد (شکل ۳). نتایج پژوهش‌های مختلف نشان داده‌اند که پاسخ‌های فیزیولوژیکی گیاهان به سلینیوم، به گونه گیاهی، شکل سلینیوم مورد استفاده و غلظت آن وابسته است؛ به‌طوری که سلینیوم در غلظت پائین رشد گیاه را تحریک می‌کند، اما در غلظت بالا می‌تواند به عنوان اکسیدان عمل کرده و عملکرد گیاه را کاهش دهد. نتایج پژوهشی بر روی کالوس‌های گیاه فلفل نشان داد که غلظت پائین نانوسلینیوم اثرات محرک رشدی داشته، در حالی که غلظت‌های بالای آن (۱۰ و ۳۰ میلی گرم در لیتر) موجب سمیت شدید و ناهنجاری ساختاری برگ و ریشه شد (Sotoodehnia-Korani et al., 2020). همچنین گیاه *Sesamum indicum*، نانوسلینیوم در غلظت کم سبب افزایش محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی و بهبود عملکرد فتوسنتزی شد، در حالی که در غلظت‌های زیاد موجب کاهش محتوای آن‌ها و القاء تنش اکسیداتیو گردید (Ahmad et al., 2024). در پژوهش حاضر کاهش محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی بویژه در تیمار نانوسلینیوم، نشان‌دهنده اثر بازدارنده

القاء تنش اکسیداتیو موجب کاهش محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی و برعکس تقویت مسیر فنیل پروپانوییدی شود. کاهش معنی‌دار محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی در مقابل افزایش محتوای ترکیبات فنلی در تیمار سلنیوم بویژه در شکل نانو و در شرایط تاریکی، با یافته‌های [Al-Khayri et al.](#) (2023) همخوانی دارد.

انرژی و اسکلت‌های کربنی پیش‌ساز پلاستیدی را از مسیرهای فرعی بیوستت رنگیزه‌های فتوسنتزی منحرف کرده و به سمت مسیر فنیل پروپانوییدها جهت بیوستت متابولیت‌های ثانویه فنلی سوق می‌دهند. در واقع، ارزیابی محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی بعنوان شاخص‌های حساس اولیه برای بررسی پاسخ متابولیکی کالوس به سلنیوم نشان می‌دهد که این عنصر ممکن است با



شکل ۳- مقایسه میانگین اثر سلنیوم (Se) و نانوذرات سلنیوم (SeNPs) بر محتوای کلروفیل a (A)، کلروفیل b (B)، کلروفیل کل (C) و کاروتنوئیدها (D) در کالوس‌های زعفران مزروعی.

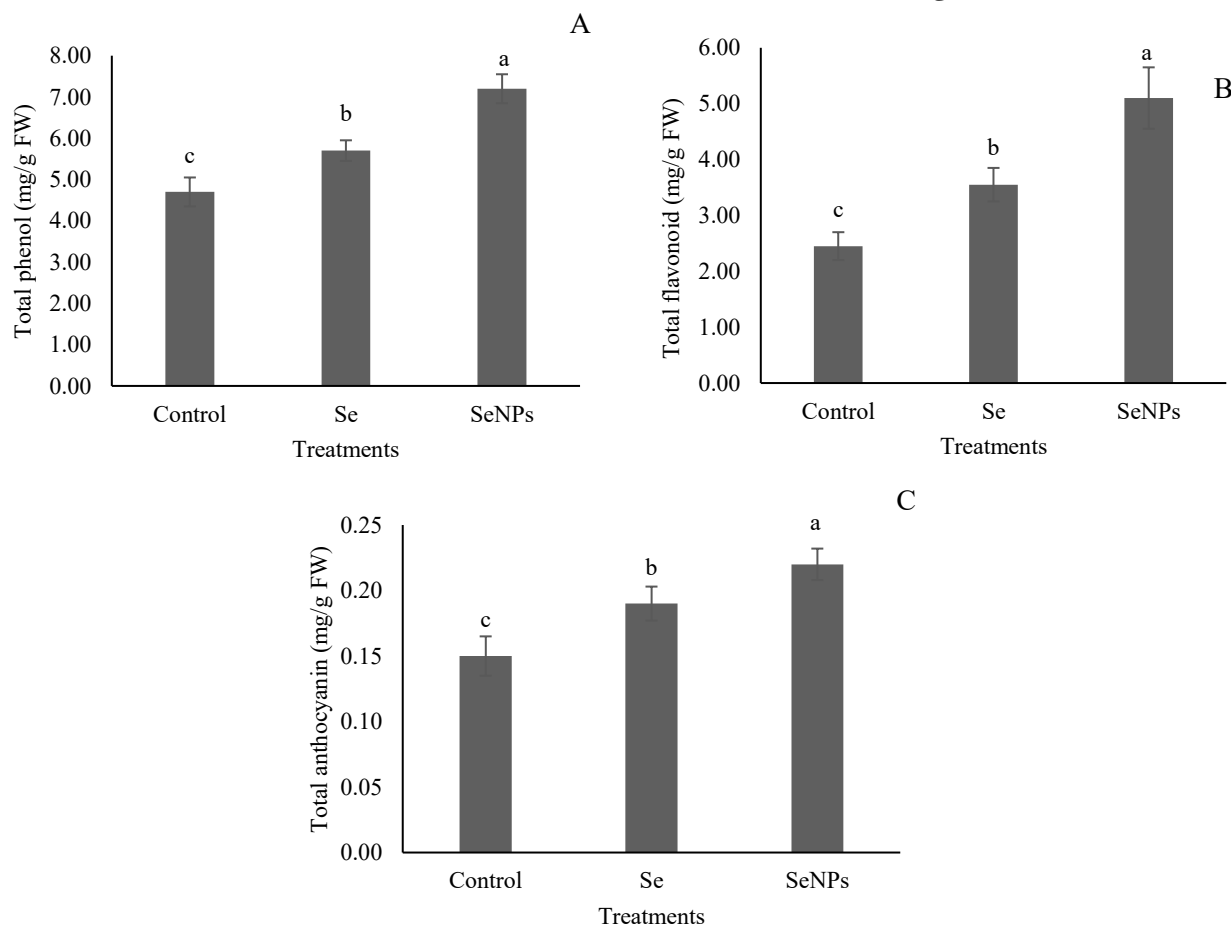
Figure 3- Comparison of the effects of selenium (Se) and selenium nanoparticles (SeNPs) on the content of chlorophyll a (A), chlorophyll b (B), total chlorophyll (C) and carotenoids (D) in *Crocus sativus* calli.

شد (شکل ۴). در این راستا، پژوهش انجام شده بر روی کالوس گیاه *Santalum album* نشان داده‌است که کاربرد نانوسلنیوم موجب افزایش معنی‌دار تولید متابولیت‌های ثانویه از جمله ترکیبات فنلی در این گیاه شده که نشان‌دهنده اثر احتمالی این نانوذرات در مسیرهای بیوستتزی مرتبط با آنتی‌اکسیدان‌های فنلی است ([Mazhar et al., 2024](#)). افزایش محتوای ترکیبات فنلی در تیمارهای سلنیوم

محتوای فنل، فلاونوئید و آنتوسیانین کل: نتایج
مقایسه میانگین اثر تیمارهای سلنیوم و نانوسلنیوم بر محتوای ترکیبات فنلی زعفران مزروعی نشان داد که اعمال سلنیوم و نانوسلنیوم در غلظت ۵ میلی گرم در لیتر تأثیر معنی‌داری بر محتوای فنل، فلاونوئید و آنتوسیانین کل داشتند و موجب افزایش محتوای این ترکیبات شدند (جدول ۱). همچنین بیشترین محتوای ترکیبات فنلی در تیمار نانوسلنیوم مشاهده

تبادل ردوکس سلولی، موجب تغییر در فعالیت آنزیم‌های دخیل در سنتز ترکیبات فنلی می‌شوند. بنابراین به منظور خنثی‌سازی اثرات سمی ایجاد شده، سنتز ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مختلف با اهداف دفاعی در سلول‌های گیاهی دچار فراتنظیمی می‌شوند. این نانوذرات بواسطه اندازه کوچک و سطح زیاد خود، به سهولت از مسیرهای آپوپلاستی و سیم پلاستی عبور می‌کنند و منجر به برهم کنش‌های الکترواستاتیکی بیشتری با غشاهای سلولی شده و اثرات بیشتری در فعال نمودن مسیرهای بیوسنتزی ترکیبات فنلی و میزان تولید محصول‌ها این مسیر بروز می‌دهند (Rani et al., 2017; Zhang et al., 2022).

و نانوسلینیوم نشان‌دهنده نقش مؤثر این عنصر در تحریک مسیرهای دفاعی و متابولیسم گیاهان است. احتمال می‌رود سلینیوم می‌تواند توسط فعال‌سازی آنزیم فنیل آلانین آمونیالاز (PAL) که آنزیم کلیدی مسیر سنتز ترکیبات فنلی محسوب می‌شود، منجر به افزایش تجمع فنل‌ها در گیاهان شود (El-Shalakany et al., 2010). همچنین، سلینیوم با تسریع مسیر بیوسنتزی فنیل پروپانویدها، می‌تواند موجب افزایش تجمع فلاونوئیدها و سایر متابولیت‌های ثانویه مرتبط با سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاه شود (Mimmo et al., 2017). نانوذرات سلینیوم در شرایط کشت بافت، با القاء تنش اکسیداتیو در محیط سلول‌های کالوس سبب تولید گونه‌های اکسیژن فعال می‌شوند و با ایجاد اختلال در



شکل ۴- مقایسه میانگین اثر سلینیوم (Se) و نانوذرات سلینیوم (SeNPs) بر محتوای فنل (A) فلاونوئید (B) و آنتوسیانین کل (C) در کالوس‌های زعفران مزروعی.

Figure 4 – Comparison of the effects of selenium (Se) and selenium nanoparticles (SeNPs) on the content of total phenol (A), flavonoid (B), and anthocyanin (C) in *Crocus sativus* calli.

اثر معنی‌داری بر محتوای پرولین داشتند (جدول ۱). بیشترین محتوای پرولین در تیمار ۵ میلی گرم در لیتر نانوسلینیوم مشاهده شد که به‌طور معنی‌داری از تیمار سلینیوم بیشتر بود،

پرولین: نتایج مقایسه میانگین اثر سلینیوم و نانوسلینیوم بر محتوای پرولین در کالوس زعفران مزروعی نشان داد که تیمارهای سلینیوم و نانوسلینیوم در غلظت ۵ میلی گرم در لیتر

هرچند سلنیوم خود نیز موجب افزایش معنی دار محتوای پرولین نسبت به شاهد شد (شکل ۵). پرولین به عنوان تنظیم کننده اسمزی، تثبیت کننده ساختار پروتئین ها، حذف کننده رادیکال های آزاد و بازدارنده پراکسیداسیون لیپیدی غشاء، نقش مهمی در افزایش تحمل گیاه ایفا می کند (Zhao et al., 2020; Madebo et al., 2021). افزایش پرولین در نتیجه تیمار هر دو شکل سلنیوم در پژوهش حاضر با نتایج گزارش شده در گیاه کلزا تحت تیمار نانوسلنیوم (Rezayian & Niknam, 2025)، گیاه جو تحت تیمار سلنات سدیم (Akbulut & Cakir, 2010) و گیاه نعنای تحت تیمار نانوسلنیوم (Nazerieh et al., 2018) همخوانی دارد. بنابراین به نظر می رسد این تیمارها توسط القاء بیان ژن های مسیر بیوسنتز پرولین به عنوان یک اسمولیت سازگار، سبب حفظ آب سلولی کالوس ها در شرایط درون شیشه شده است.

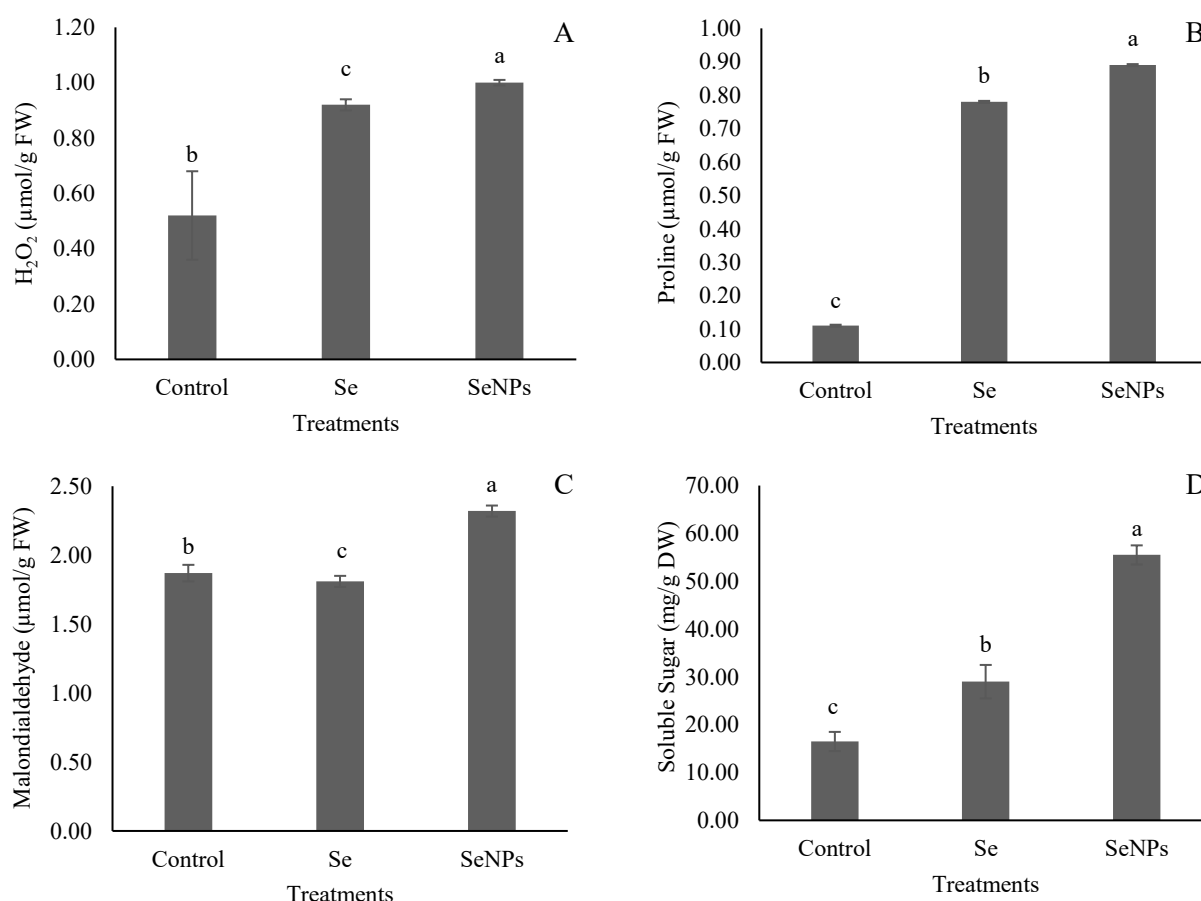
قند محلول: نتایج مقایسه میانگین اثر تیمارهای سلنیوم و نانوسلنیوم بر محتوای قند محلول کالوس زعفران مزروعی حاکی از اثر معنی دار تیمار سلنیوم و نانوسلنیوم در غلظت ۵ میلی گرم در لیتر بر محتوای قند محلول بود (جدول ۱). بیشترین محتوای قند محلول در تیمار نانوسلنیوم مشاهده شد، هرچند تیمار سلنیوم نیز خود موجب افزایش محتوای قند محلول نسبت به شاهد شد (شکل ۵). اثر نانوذرات سلنیوم در افزایش محتوای قند محلول در پژوهش های دیگر نیز گزارش شده است. به عنوان مثال، اسپری برگی نانوذرات سلنیوم در ژنوتیپ های گندم سبب افزایش معنی دار محتوای قند محلول شده است (Ikram et al., 2020). به نظر می رسد سلنیوم موجب افزایش محتوای قندهای محلول در گیاهان می شود و این ترکیبات علاوه بر نقش اصلی خود (تولید انرژی)، به عنوان تنظیم کننده اسمزی منجر به حفظ تورژسانس سلول ها می شوند (Hong et al., 2000). افزایش قابل توجه و هم زمان محتوای پرولین و قندهای محلول در تیمار نانوسلنیوم در پژوهش حاضر که به کاهش تنش اکسیداتیو و برقراری مجدد پایداری سلولی کمک می کند، با یافته های (Rezayian & Niknam, 2025) در گیاه کلزا همخوانی دارد.

مالون دی آلدئید: نتایج مقایسه میانگین اثر سلنیوم و نانوذرات سلنیوم بر محتوای مالون دی آلدئید (MDA) در کالوس

زعفران مزروعی نشان داد که تیمار سلنیوم در غلظت ۵ میلی گرم در لیتر سبب کاهش محتوای مالون دی آلدئید و تقویت سیستم آنتی اکسیدانی، در حالی که نانوسلنیوم منجر به افزایش معنی دار محتوای مالون دی آلدئید شد (جدول ۱، شکل ۵). این پدیده به وضوح بیانگر نقش نانوذرات به عنوان محرک غیرزیستی است؛ به طوری که در غیاب تنش های محیطی، نانوذرات به علت ابعاد کوچک و نفوذ پذیری بالا، یک تنش اکسیداتیو ملایم و کنترل شده را در سلول القا می کنند که به عنوان پیام محرک عمل می کند. گزارش شده است که سلنیوم در غلظت های پائین (حدود ۱ میلی گرم در لیتر) که بسته به نوع گونه گیاهی و شرایط رشد متغیر است، با تقویت هماهنگی سیستم دفاع آنتی اکسیدانی به ویژه آنزیم های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز سبب حذف گونه های اکسیژن فعال، تعدیل پراکسیداسیون لیپیدها و حفظ یکپارچگی غشاء سلولی می شود (Hartikainen et al., 2005). پژوهش های متعددی کاهش معنی دار محتوای مالون دی آلدئید در اثر کاربرد سلنیوم در گیاهانی نظیر گل صدتومانی (Wang et al., 2024)، لوبیا سبز (Rady et al., 2021) و قهوه (Mateus et al., 2021) را گزارش کرده اند. **پراکسید هیدروژن:** نتایج مقایسه میانگین اثر سلنیوم و نانوذرات سلنیوم بر محتوای پراکسید هیدروژن (H_2O_2) در کالوس زعفران مزروعی نشان داد که سلنیوم در غلظت ۵ میلی گرم در لیتر موجب کاهش محتوای H_2O_2 نسبت به شاهد شد، اما نانوسلنیوم در همین غلظت سبب افزایش محتوای H_2O_2 نسبت به تیمار سلنیوم و شاهد شد (جدول ۱، شکل ۵). بر اساس نتایج پژوهشگران؛ گزارش شده است که سلنیوم در غلظت های پائین با تقویت سیستم آنتی اکسیدانی و افزایش تجزیه H_2O_2 ، از ساختار غشاء سلولی محافظت می کند (Hartikainen et al., 2005)، اما افزایش غلظت آن به ویژه در شکل نانوذره که به سهولت از غشاها عبور می کند، خود تنش زا بوده و می تواند تعادل سیستم اکسیدانی و آنتی اکسیدانی را بر هم زند. در پژوهش حاضر افزایش معنی دار فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی تحت تیمار سلنیوم، سبب کاهش محتوای پراکسید هیدروژن در کالوس زعفران مزروعی شد، لیکن فرایند آسیب غشایی در اثر تیمار نانوسلنیوم آغاز شده که با افزایش شاخص مالون دی آلدئید همراه بود. این یافته ها با نتایج پژوهش

فراهمی زیستی بسیار بالاتری در مقایسه با فرم توده‌ای دارند. در نتیجه غلظت ۵ میلی گرم در لیتر برای شکل نانو، یک دوز فراتر از آستانه تحمل تلقی شده و فراتر از ظرفیت هم‌مستسازی سلول‌های کالوس عمل کرده است. این ورود بیش از حد نانوذرات به درون سلول‌ها، تعادل سیستم ردوکس را به نفع شرایط اکسیداتیو متمایل کرده و با آغاز پراکسیداسیون چربی‌های غشا، نشت یون‌ها و نهایتاً تخریب یکپارچگی غشاء سلولی را القا نموده است. این نتایج همسو با یافته‌های Sotoodehnia-Korani et al. (2020) در کالوس فلفل نشان دادند که دوزهای بالای نانوسلینیوم سبب سمیت شدید سلولی می‌شود.

Beiramvand et al. (2023) مطابقت داشته و نشان‌دهنده حساسیت کالوس زعفران مزروعی به غلظت سلینیوم در شکل نانوذره است. در واقع، تفاوت پاسخ کالوس‌های زعفران به غلظت یکسان دو شکل از سلینیوم، نشان‌دهنده حساسیت وابسته به دوز و شکل این عنصر است. در حالی که سلینیوم توده‌ای در این غلظت نقش حمایتی ایفا نموده و با مهار تولید رادیکال‌های آزاد، محتوای MDA و H_2O_2 را کاهش داد، نانوسلینیوم در همین غلظت منجر به تحریک گونه‌های فعال اکسیژن شد. این پدیده به ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی منحصربه‌فرد نانوذرات مربوط است؛ نانوذرات سلینیوم به دلیل نسبت سطح به حجم فوق‌العاده بالا، سطح باردار فعال و ابعاد نانومتری، سرعت جذب و



شکل ۵- مقایسه میانگین اثر سلینیوم (Se) و نانوذرات سلینیوم (SeNPs) بر محتوای پراکسید هیدروژن (A)، پرولین (B)، مالون‌دی‌آلدئید (C) و قند محلول (D) در کالوس‌های زعفران مزروعی.

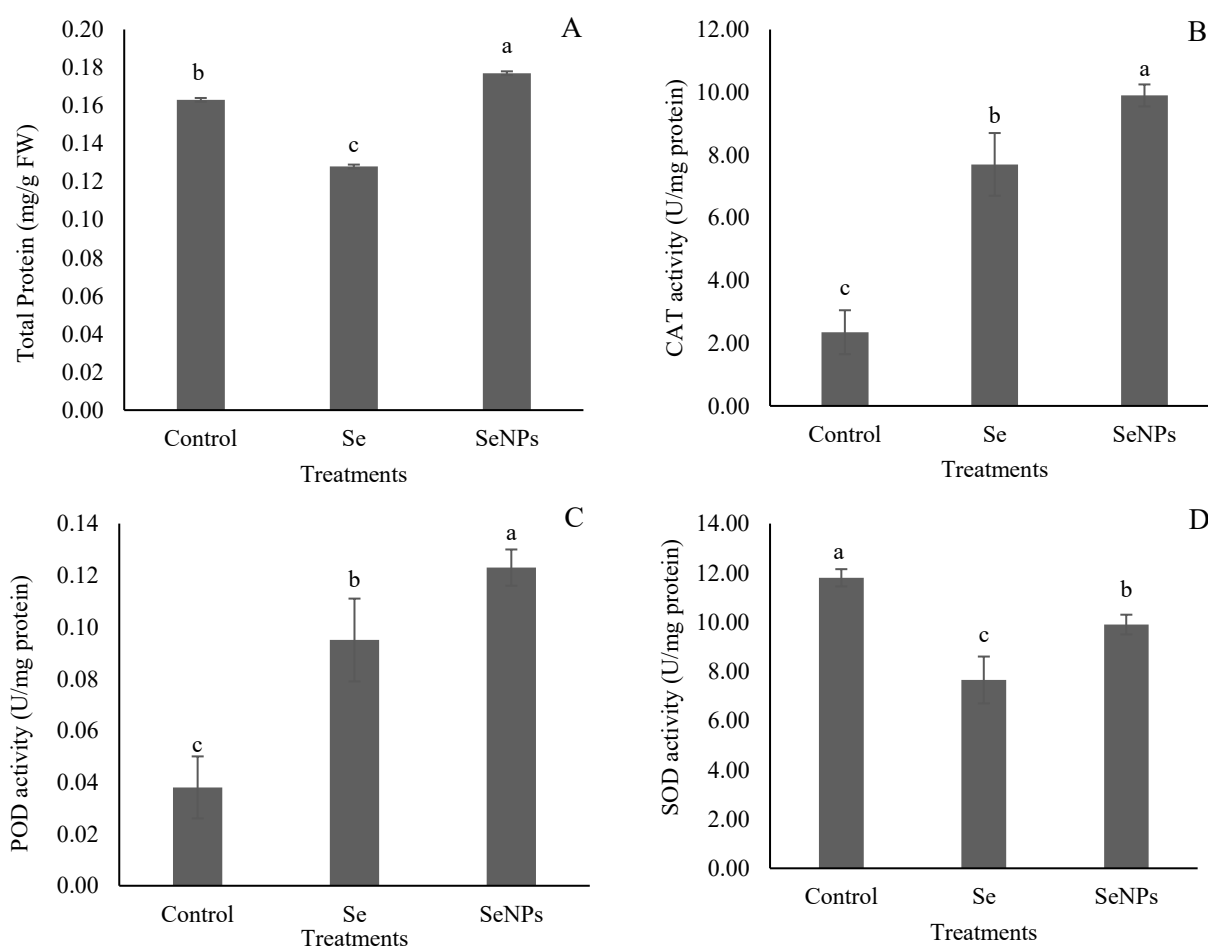
Figure 5 – Comparison of the effects of selenium (Se) and selenium nanoparticles (SeNPs) on the content of H_2O_2 (A), proline (B), MDA (C) and soluble sugars (D) in *Crocus sativus* calli.

آنتی‌اکسیدانی در کالوس زعفران مزروعی نشان داد که سلینیوم و نانوسلینیوم در غلظت ۵ میلی گرم در لیتر تأثیر معنی‌داری بر محتوای پروتئین کل و فعالیت آنزیم‌های

محتوای پروتئین کل و فعالیت آنزیم‌های آنتی-اکسیدانی: نتایج مقایسه میانگین اثر سلینیوم و نانوذرات سلینیوم بر محتوای پروتئین کل و فعالیت آنزیم‌های

پروتئین و فعالیت آنزیم ها در تیمار نانوسلنیوم مشاهده شد (شکل ۶). نتایج این پژوهش در مورد افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی با یافته های گزارش شده در گیاهان نعنای فلفلی (Jafari & Moghaddam, 2023)، خیار (Mousavi et al., 2023) و شاهی (Wu et al., 2020) تحت تیمار سلنیوم و نانوسلنیوم هم راستا است. همچنین بر اساس یافته ها گزارش شده است که نانوذرات سلنیوم به علت سطح ویژه بالا و قابلیت نفوذ بیشتر به سلول ها، توانایی بیشتری در تحریک سیستم های دفاعی گیاه نسبت به شکل های معمول سلنیوم دارند و این امر علت افزایش بیشتر فعالیت آنزیم های کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز در تیمار نانوسلنیوم را توجیه می کند (Silva et al., 2020).

آنتی اکسیدانی داشتند (جدول ۱). محتوای پروتئین کل تحت تأثیر هر دو شکل سلنیوم افزایش یافت که می تواند به علت اثر این تیمارها بر تقویت وضعیت آنتی اکسیدانی سلول ها جهت کاهش آسیب های اکسیداتیو، توسط افزایش سنتز و پایداری پروتئین ها است. همچنین نتایج پژوهش های انجام شده بر روی کالوس گیاهان *Vigna unguiculata* و *Cardamin violifolia* نشان داده است که نانوذرات سلنیوم می توانند بیان ژن های مرتبط با متابولیسم نیتروژن و سنتز پروتئین را تحریک نموده و محتوای پروتئین را افزایش دهند (Wu et al., 2020). همچنین بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش، فعالیت آنزیم های کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز در پاسخ به سلنیوم و نانوسلنیوم در غلظت ۵ میلی گرم در لیتر افزایش یافت و بیشترین محتوای



شکل ۶- مقایسه میانگین اثر سلنیوم (Se) و نانوذرات سلنیوم (SeNPs) بر محتوای پروتئین کل (A) و فعالیت آنزیم های کاتالاز (CAT) (B)، پراکسیداز (POD) (C) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) (D) در کالوس های زعفران مزروعی.

Figure 6 – Comparison of the effects of selenium (Se) and selenium nanoparticles (SeNPs) on the content of total protein (A) and activity of the enzymes catalase (CAT), (B), peroxidase (POD) (C) and superoxide dismutase (SOD) (D) in *Crocus sativus* calli.

نتیجه گیری

یافته‌های این پژوهش نشان داد که سلنیوم و نانوسلنیوم تأثیر معنی‌داری بر شاخص‌های فیزیولوژیکی کالوس زعفران مزروعی داشته و موجب افزایش محتوای ترکیبات فنلی، قند محلول، پروتئین، پروتئین و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی از جمله کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز، ولیکن کاهش محتوای رنگیزه‌های فتوستتری شدند. از سوی دیگر، سلنیوم سبب کاهش محتوای مالون‌دی‌آلدئید و پراکسید هیدروژن شد و از سوی دیگر؛ نانوسلنیوم آن‌ها را افزایش داد. تفاوت در پاسخ‌های فیزیولوژیکی مشاهده شده، نشان‌دهنده حساسیت کالوس زعفران مزروعی به شکل فیزیکیوشیمیایی عنصر سلنیوم (توده‌ای در برابر نانو) در

غلظت مورد بررسی است. در مجموع، نتایج این پژوهش تأیید می‌کند که استفاده هدفمند از سلنیوم به‌ویژه در شکل نانو در غلظت مناسب می‌تواند به‌عنوان ابزاری مؤثر جهت تنظیم اکثر پاسخ‌های فیزیولوژیکی گیاهان مورد استفاده قرار گیرد.

تعارض منافع

در مورد این پژوهش که مستخرج از رساله دکتری نویسنده اول است، هیچ یک از پژوهشگران تعارض منافع ندارند.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه بوعلی سینا همدان انجام شده‌است.

References

- Abdullahi, A., Barin, M., Soltani, A. A., Torabi Giglou, M., Ismailpour, B., & Tahami, S. K. (2023). Evaluation of influence of selenium foliar application on growth and physiological characteristics of basil (*Ocimum basilicum* L.) in arsenic-contaminated soil. *Journal of Vegetables Sciences*, 7(14), 59-76. <https://doi.org/10.22034/iuvs.2022.1973789>. 1250 [In Persian]
- Adhikary, S., Biswas, B., Chakraborty, D., Timsina, J., Pal, S., Chandra Tarafdar, J., Banerjee, S., Hossain, A., & Roy, S. (2022). Seed priming with selenium and zinc nanoparticles modifies germination, growth, and yield of direct seeded rice (*Oryza sativa* L.). *Scientific Reports*, 12, 7103. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11307-4>
- Ahmad, I., Chen, C., Younas, Z., Yousaf, T., & Mashwani, Z. U. (2024). Seed and foliar application of nano-selenium improves sesame triacylglycerols and oil yield via photosynthetic pigment and enzymatic and chemical antioxidant enhancement revealed by spectrophotometric, UHPLC-analysis and chemometric modeling. *Frontiers in Plant Science*, 5(15), 1431877. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1431877>
- Ahmed, A. K., Johnson, K. A., Skalli, S., Gherardi, M., & Marchi, A. (2012). Morphogenesis with saffron tissue culture. *Scientia Horticulturae*, 140, 78-84. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(87\)80236-5](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(87)80236-5)
- Akbulut, M., & Cakir, S. (2010). The effects of Se phytotoxicity on the antioxidant systems of leaf tissues in barley (*Hordeum vulgare* L.) seedling. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(2-3), 160-166. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2009.11.001>
- Ali, A., Mashwani, Z.-R., Raja, N. I., Mohammad, S., Luna-Arias, J. P., Ahmad, A., & Kaushik, P. (2023). Phytomediated selenium nanoparticles and light regimes elicited in vitro callus cultures for biomass accumulation and secondary metabolite production in *Caralluma tuberculata*. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1253193. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1253193>

- Al-Khayri, J. M., Rashmi, R., & Naik, P. M. (2023). Carotenoid production and biosynthetic pathway responses to nano-elicitors in plant tissue culture systems. *Plants*, 12(8), 1630. <https://doi.org/10.3390/plants12081630>
- Almutairi, K. F., Alharbi, A. R., Alsharidah, M., Seliem, M. M., Abd Elsalam, H. E., & Helal, M. M. (2023). Synergistic impacts of plant-growth-promoting bacteria and selenium nanoparticles on improving the nutritional value and biological activities of three cultivars of *Brassica* sprouts. *ACS Omega*, 8(31), 28250-28262. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c02957>
- Bates, L. S., Waldren, R. P., & Tear, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil*, 39, 205-207. <http://doi.org/10.1007/BF00018060>
- Beauchamp, C., & Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 44(1), 276-287. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90370-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90370-8)
- Beiramvand, F., Zahedi, B., & Rezaei Nejad, A. (2023). Investigation of the effect of selenium foliar application on morphophysiological and biochemical characteristics of ornamental *Salvia* under irrigation regime. *Journal of Plant Process and Function*, 11(47), 323-330. <http://jispp.iut.ac.ir/article-1-1525-fa.html> [In Persian]
- 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), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Cardone, L., Castronuovo, D., Perniola, M., Cicco, N., & Candido, V. (2020). Saffron (*Crocus sativus* L.) corms production as influenced by corm size and fertilization regimes. *Agronomy*, 10(3), 323. <https://doi.org/10.3390/agronomy10030323>
- Castillo, R., Fernández, J. A., & Gómez, L. (2003). Production of crocin using *Crocus sativus* callus by two-stage culture system. *Journal of Biotechnology*, 102(2), 143-152. <https://doi.org/10.1023/a:1025036729160>
- Chance, B., & Maehly, A. C. (1955). Assay of catalase and peroxidases. *Methods in Enzymology*, 2, 764-775. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(55\)02300-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(55)02300-8)
- Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., & Chern, J. C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colometric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3), 3. <https://doi.org/10.38212/2224-6614.2748>
- Chib, S., Thangaraj, A., & Kaul, S. (2020). Development of a system for efficient callus production, somatic embryogenesis and gene editing using CRISPR/Cas9 in saffron (*Crocus sativus* L.). *Plant Methods*, 16(47). <https://doi.org/10.1186/s13007-020-00589-2>
- Dubious, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350-356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- El-Ramady, H. R., Domokos-Szabolcsy, É., Shalaby, T. A., Prokisch, J., & Fári, M. (2015). Selenium in agriculture: water, air, soil, plants, food, animals and nanoselenium. *CO₂ Sequestration, Biofuels and Depollution*, 153-232. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-11906-9-5>
- El-Shalakany, W. A., Shatlah, M. A., Atteia, M. H., & Srour, H. A. M. (2010). Selenium induces antioxidant defensive enzymes and promotes tolerance against salinity stress in cucumber seedlings (*Cucumis sativus*). *Arab Universities Journal of Agricultural Sciences*, 18(1), 65-76. <https://doi.org/10.21608/ajs.2010.14>
- Farooq, M. U., Ishaaq, I., Barutcular, C., Skalicky, M., Maqbool, R., Rastogi, A., Hussain, S., Allakhverdiev, S. I., & Zhu, J.

- (2022). Mitigation effects of selenium on accumulation of cadmium and morphophysiological properties in rice varieties. *Plant Physiology and Biochemistry*, 170, 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.11.035>
- Guang, P., & Shi, J. M. (1995). Tissue culture of *Crocus* corm. *J. Guizhou Agric. Coll.*, 14, 47-49.
- Hartikainen, H. (2005). Biogeochemistry of selenium and its impact on food chain quality and human health. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 18, 309-18. <http://doi.org/10.1016/j.jtemb.2005.02.009>
- Heath, R. L., & Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125(1), 189-198. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1)
- Hong, Z., Lakkineni, K., Zhang, Z., & Verma, D. P. S. (2000). Removal of feedback inhibition of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. *Plant Physiology*, 122(4), 1129-1136. <https://doi.org/10.1104/pp.122.4.1129>
- Huang, S., Yu, K., Xiao, Q., Song, B., Yuan, W., Long, X., Cai, D., Xiong, X., & Zheng, W. (2023). Effect of bionano-selenium on yield, nutritional quality and selenium content of radish. *Journal of Food Composition and Analysis*, 115, 104927. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2022.104927>
- Ikram, M., Raja, N. I., Javed, B., Mashwani, Z-u-R., Hussain, M., Hussain, M., Ehsan, M., Rafique, N., Malik, K., & Sultana, T. (2020). Foliar applications of bio-fabricated selenium nanoparticles to improve the growth of wheat plants under drought stress. *Green Processing and Synthesis*, 9(1), 706-714. <https://doi.org/10.1515/gps-2020-0067>
- Jafari, H., & Moghaddam, M. (2023). The effect of different levels of sodium selenate and selenite on some growth and physiological characteristics of peppermint (*Mentha piperita* L.). *Iranian Journal of Horticultural Science*, 54(2), 269-284. <http://doi.org/10.22059/IJHS.2023.344758.2039> [In Persian]
- Khanizadeh, P., Mumivand, H., & Morshedloo, M. R. (2025). Superior effect of selenium nanoparticles over sodium selenite on growth, yield, antioxidant activity, and essential oil production in *Dracocephalum kotschy* Boiss. *BMC Plant Biology*, 25, 1472. <https://doi.org/10.1186/s12870-025-07500-y>
- Lichtentaler, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148, 350-382. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1)
- MacAdam, J. W., Nelson, C. J., & Sharp, R. E. (1992). Peroxidase activity in the leaf elongation zone of tall fescue: I. Spatial distribution of ionically bound peroxidase activity in genotypes differing in length of the elongation zone *Journal: Plant Physiology*, 99(3), 872-878. <https://doi.org/10.1104/pp.99.3.872>
- Madebo, M. P., Luo, S. M., Wang, L., Zheng, Y. H., & Jin, P. (2021). Melatonin treatment induces chilling tolerance by regulating the contents of polyamine, γ -aminobutyric acid, and proline in cucumber fruit. *Journal of Integrative Agriculture*, 20(11), 3060-3074. [https://doi.org/10.1016/s2095-3119\(20\)63485-2](https://doi.org/10.1016/s2095-3119(20)63485-2)
- Mateus, M., Tavanti, R., Tavanti, T., Santos, E., Jalal, A., & Reis, A. (2021). Selenium biofortification enhances ROS scavenge system increasing yield of coffee plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 209. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111772>
- Mazhar, M. W., Ishtiaq, M., Maqbool, M., Jafri, F. I., Siddiqui, M. H., Alamri, S., & Akhtar, M. S. (2024). Synergistic effects of selenium nanoparticles and LED light on

- enhancement of secondary metabolites in sandalwood (*Santalum album*) plants through *in vitro* callus culturing technique. *Plant Biology*, 26(12), 18106. <https://doi.org/10.7717/peerj.18106>
- McDonald, S., Prenzler, P. D., Autolovich, M., & Robards, K. (2002). Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food Chemistry*, 73, 73-48. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00288-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00288-0)
- Mimmo, T., Tiziani, R., Valentinuzzi, F., Lucini, L., Nicoletto, C., Sambo, P., Scampicchio, M., Pii, Y., & Cesco, S. (2017). Selenium biofortification in *Fragaria* × *Ananassa*: implications on strawberry fruits quality, content of bioactive health beneficial compounds and metabolomic profile. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1887. <https://doi.org/10.1007/BF00984882>
- Mousavi, A. A., Roosta, H. R., Esmacilzadeh, M., & Eshghi, S. (2023). Effects of selenium and silicon on some vegetative and biochemical attributes of cucumber under salinity and alkalinity stresses in hydroponic culture. *International Journal of Horticultural Science and Technology*, 23(1), 63-78. <http://journal-irshs.ir/article-1-541-fa.html> [In Persian]
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Nazerieh, H., Ardebili, Z. O., & Iranbakhsh, A. (2018). Potential benefits and toxicity of nanoselenium and nitric oxide in peppermint. *Acta Agriculturae Slovenica*, 111(2), 357-368. <http://doi.org/10.14720/aas.2018.111.2.11>
- Nareshkumar, A., Veeranagamallaiah, G., Pandurangaiah, M., Kiranmai, K., Amaranathareddy, V., Lokesh, U., & Sudhakar, C. (2015). Pb-stress induced oxidative stress caused alterations in antioxidant efficacy in two groundnut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars. *Agricultural Sciences*, 6(10), 1283-1297. <https://doi.org/10.4236/as.2015.610123>
- Rady, M. M., Desoky, E. S. M., Ahmed, S. M., Majrashi, A., Ali, E. F., Arnaout, S. M. A. I., & Selem, E. (2021). Foliar nourishment with nano-selenium dioxide promotes physiology, biochemistry, antioxidant defenses, and salt tolerance in *Phaseolus vulgaris*. *Plants*, 10, 1189. <https://doi.org/10.3390/plants10061189>
- Ramezan, D., Zargar, M., Nakhaev, M., Akhmadovich, K., Bayat, M., & Ghaderi, A. (2024). Selenium alleviates growth characteristics, plant pigments, photosynthetic and antioxidant capacity of basil (*Ocimum basilicum* L.) under low temperature. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 58, 103198. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2024.103198>
- Rani, R., Khan, M. A., Kayani, W. K., Ullah, S., Naeem, I., & Mirza, B. (2017). Metabolic signatures altered by *in vitro* temperature stress in *Ajuga bracteosa* Wall. ex. Benth. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39, 1-10. <https://doi.org/10.1007/s11738-017-2394-9>
- Rezayian, M., & Niknam, V. (2025). Modulatory effects of selenium nanoparticle against drought stress in canola plants. *BMC Plant Biology*, 25, 532. <https://doi.org/10.1186/s12870-025-06594-8>
- Saffar Yazdi, A., Lahouti, M., & Ganjali, A. (2012). Effect of different selenium concentrations on morphophysiological characteristics on spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Journal of Horticultural Science*, 26(3), 292-300. <https://doi.org/10.22067/jhorts4.v0i0.15211> [In Persian]
- Sotoodehnia-Korani, S., Iranbakhsh, A., Ebadi, M., Majd, A., & Oraghi Ardebili, Z. (2020). Selenium nanoparticles induced variations in growth, morphology, anatomy, biochemistry, gene expression, and epigenetic DNA methylation in *Capsicum annum*; an *in vitro* study. *Environmental Pollution*, 265, 114727. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114727>

- 7
 Sher, A., Ul-Allah, S., Sattar, A., Ijaz, M., Ahmad, W., Bibi, Y., & Qayyum, A. (2022). The effect of selenium concentration on the quantitative and qualitative yield of four safflower (*Carthamus tinctorius* L.) genotypes. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 25, 1-7. <http://doi.org/10.3389/fagro.2024.1389045>
- Silva, V. M., Tavanti, R. F. R., Gratão, P. L., Alcock, T. D., & 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. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110777>
- Sompura, Y., Bhatt, U., Parihar, S., Shrimali, N. K., Dashora, K., & Soni, V. (2026). Nanoparticles and photosynthesis: a critical mechanistic review of molecular interactions and physiological impacts. *NPJ Science of Plants*, 2, 13. <https://doi.org/10.1038/s44383-026-00024-w>
- Thakur, S., Kaur, L., Jaitak, V., & Bhardwaj, P. (2023). The role of selenium and nano selenium on physiological responses in plant. *Plant Growth Regulation*, 100(1), 1-15. <https://doi.org/10.1007/s10725-023-00988-0>
- Wagner, G. J. (1979). Content and vacuole/extra vacuole distribution of neutral sugars, free amino acids, and anthocyanin in protoplasts. *Plant Physiology*, 64(1), 88-93. <https://doi.org/10.1104/pp.64.1.88>
- Wang, H., Zhang, C., Nie, M., Cheng, D., Chen, J., Wang, S., Lev, J., & Niu, Y. (2024). Effects of foliar application of nano-Se on photosynthetic characteristics and Se accumulation in *Paeonia ostii*. *Journal of Plant Physiology*, 71-117. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-951366/v1>
- Wu, M., Cong, X., Li, M., Rao, S., Liu, Y., Guo, J., hu, S., Chen, S. H., Xu, F., Cheng, S. H., Liu, L., & Yu, T. (2020). Effects of different exogenous selenium on Se accumulation, nutrition quality, elements uptake, and antioxidant response in the hyper accumulation plant *Cardamine violifolia*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 204, 111045. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111045>
- Zahedi, S. M., Abdelrahman, M., Hosseini, M. S., Hoveizeh, N. F., & Tran, L. S. P. (2019). Alleviation of the effect of salinity on growth and yield of strawberry by foliar spray of selenium-nanoparticles. *Environmental Pollution*, 253, 246-258. <http://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.04.078>
- Zhang, Q., Ying, Y., & Ping, J. (2022). Recent advances in plant nanoscience. *Advanced Science*, 9 (2), 2103414. <https://doi.org/10.1002/advs.202103414>
- Zhao, L., Lu, L., Wang, A., Zhang, H., Huang, M., Wu, H., Xing, B., Wang, Z., & Ji, R. (2020). Nano-biotechnology in agriculture, use of nanomaterials to promote plant growth and stress tolerance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(7), 1935-1947. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b06615>
- Zsiros, O., Nagy, V., Párducz, A., Nagy, G., Ünneper, R., El-Ramady, H., Prokisch, J., Lisztes-Szabó, Z., Fári, M., Csajbók, J., Toth, S. Z., Garab G., & Szabolcsy, E. D. (2019). Effects of selenate and red Se-nanoparticles on the photosynthetic apparatus of *Nicotiana tabacum*. *Photosynthesis Research*, 139, 449-460. <https://doi.org/10.1007/s11120-018-0599-4>