Iranian Journal of Horticultural Science
Vol 52, No 2, Summer 2021 (281-291)
DOI: 10.22059/ijhs.2019.287992.1708

علوم باغبانی ایران
دورۀ ۵۲، شمارۀ ۲، تابستان ۱۴۰۰ (ص ۲۹۱-۲۸۱)

مقاله پژوهشی:

بررسی تأثیر تنش مولیبدن بر عملکرد سیستم آنتی‌اکسیدان گیاهچه‌های جعفری (*Petroselinum sativum* L.) در شرایط آزمایشگاهی

صدیقه براتی[۱]، مهرداد لاهوتی[۲] و منیره چنیانی[۳*]
۱، ۲ و ۳. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، استاد و استادیار، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۶/۳۰- تاریخ پذیرش:۱۳۹۸/۹/۶)

چکیده

ازآنجایی‌که خاک‌های کشاورزی در اکثر نقاط دنیا به مقادیر متفاوتی از فلزات سنگین آلوده هستند، تنش فلزات سنگین یکی از تنش‌های اصلی در این مناطق محسوب می‌گردد که می‌تواند تأثیر منفی بر میزان تولید محصولات گیاهی داشته باشد. در این پژوهش تأثیر تنش مولیبدن [سطح شاهد (C: ۱/۹میکرومولار) و سطوح تیماری C+۰/۵، C+۲/۵، C+۵، C+۱۰ میکرومولارمولیبدات سدیم اضافه شده به محلول غذایی هوگلند] بر رشد و عملکرد سیستم آنتی‌اکسیدان آنزیمی و غیرآنزیمی گیاه جعفری درمرحله گیاهچه‌ای (پنج‌هفته‌ای) مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد هرچند سطوح مختلف تنش مولیبدن موجب کاهش وزن خشک و طول بخش هوایی و ریشه گیاهچه‌ها و همچنین کاهش شاخص‌پایداری غشا و محتوای‌نسبی آب برگ آن‌ها شد، ولیکن، اثر افزایش‌دهنده بر محتوای پرولین (افزایش ۱۵۰ درصدی محتوای پرولین بخش‌هوایی نسبت به شاهد) و ترکیبات‌فنلی (افزایش ۸۰ و ۸۵ درصدی محتوای فنل‌کل بخش‌هوایی و ریشه نسبت به شاهد) داشت. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز، بنزیدین‌پراکسیداز، آسکوربات‌پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز هم بخش‌هوایی و هم ریشه، در شرایط مواجه با تنش مولیبدن افزایش یافتند. بنابراین این‌طور می‌توان نتیجه‌گیری کرد که گیاهچه‌های جعفری سعی می‌کنند از مسیر کاهش نسبی فرایند رشد و به عوض آن، افزایش سیستم‌دفاع آنتی‌اکسیدان به "تحمل" شرایط تنش فلزسنگین مولیبدن در این مرحله نموی بپردازد.

واژه‌های کلیدی: پرولین، تنش مولیبدن، سیستم آنتی‌اکسیدان آنزیمی، فلز سنگین، گیاه جعفری.

Effects of molybdenum stress on antioxidant system performance of parsley seedlings (*Petroselinum sativum* L.) under laboratory condition

Sedigheh Barati[1], Mehrdad Lahouti[2] and Monireh Cheniany[3*]
1, 2, 3. Former M. Sc. Student, Professor and Assistant Professor, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
(Received: Sep. 21, 2019 - Accepted: Nov. 27, 2019)

ABSTRACT

Since agricultural soils in many parts of the world are contaminated with varying amounts of heavy metals, heavy metal stress is one of the major issues in these areas that can have a negative effects on crop production. In this study, the effect of different levels of molybdenum [Control (C: 1.9 µM), C+0.5, C+2.5, C+5, C+10 µM sodium molybdate] was evaluated on the growth and function of enzymatic and non-enzymatic antioxidant system of parsley at seedling stage. The results showed that although the molybdenum stress decreased dry weight and length of both plant parts (shoot and root) as well as membrane stability index and relative water content, it had an increasing effect on proline (150% increase in proline content of shoot compared to control) and phenolic compounds (80% and 85% increase in phenolic content of shoot and root, compared to control). The activity of antioxidant enzymes catalase, benzidine peroxidase, ascorbate peroxidase and polyphenoloxidase was also increased under molybdenum stress. Therefore, it may be concluded that parsley seedlings try to "tolerate" the stress condition of molybdenum heavy metal at this physiological-growth stage by partially reducing the growth process and, in turn, enhancing its antioxidant defense systems.

Keywords: Enzymatic antioxidant system, heavy metal, molybdenum stress, parsley, proline.

* Corresponding author E-mail: cheniany@um.ac.ir

مقدمه

آلودگی عناصر سنگین، یکی از معظلات محیط زیست می‌باشد که به‌علت تخلیه بی‌وقفه، بی‌رویه و کنترل‌نشده مواد شیمیایی خطرناک، از جمله فلزات سنگین توسط سازمان‌های مختلف به محیط زیست صورت می‌گیرد. آلوده شدن خاک‌های کشاورزی به فلزات سنگین از جمله کادمیم، مولیبدن، روی و غیره، ناشی از استفاده درازمدت از کودهای فسفاتی، افزودن لجن فاضلاب، گردوغبار حاصل از کارخانه‌های ذوب، زباله‌های صنعتی و شیوه‌های بد آبیاری حاصل می‌شود (Ovecka & Takac, 2014). گرچه مولیبدن به عنوان یک عنصر ضروری نقش مهمی در فرایندهای بیوشیمیایی میکروارگانیسم‌ها، گیاهان و حیوانات ایفا می‌کند (Williams & Frasto Da silva, 2002) و به‌طور ویژه، حائزاهمیت برای فعالیت برخی آنزیم‌های کاتالیزکننده‌ی واکنش‌های کلیدی در سوخت وساز نیتروژن، گوگرد و کربن در گیاهان می باشد، اما جذب این عنصر در غلظت‌های بالا موجب آسیب‌های اکسیداتیو و به دنبال آن، تغییر در مسیرهای متابولیسمی و اختلالات فیزیولوژیکی در گیاهان می‌گردد (Warner & Kleinhofs, 1992). از باب سمیت مولیبدن و پاسخ‌های گیاه در برابر این تنش، پژوهش‌های چندی بر روی گیاهان شیرین بیان (Irani *et al.*, 2008)، گوجه فرنگی (Khavari-Nejad *et al.*, 2010)، برنج (Rout & Das, 2002) و نوعی لوبیا (Rajeev *et al.*, 2015) صورت گرفته است. گیاهان بسته به میزان حساسیت خود به تنش فلزات سنگین، مجهز به سیستم جاروب‌کننده رادیکال‌های آزاد برای حفاظت در برابر چنین آسیب‌های اکسیداتیو می‌باشند. بخشی از این سیستم شامل آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی (رنگدانه‌های کاروتنوئید، آسکوربیک‌اسید، پرولین، گلوتاتیون، پلی‌فنل‌ها و...) و آنزیمی از جمله کاتالاز، پراکسیدازها، پلی فنل‌اکسیداز و... می‌باشند (Mittler *et al.*, 2004; Karamian *et al.*, 2017). گیاه جعفری یکی از گیاهان پرمصرف تغذیه ای و دارویی برای انسان می‌باشد که به عنوان کشت رایج در اغلب استان‌های ایران کاشته می‌شود. این پژوهش برای نخستین بار و با هدف بررسی تأثیر تنش مولیبدن بر ویژگی‌های رشد و به‌طور خاص، سیستم آنتی‌اکسیدان گیاه جعفری در مرحله گیاهچه‌ای صورت گرفت تا میزان مقاومت گیاه در برابر تنش بررسی شود. بر این اساس و در بررسی‌های تکمیلی و با استفاده از بهبوددهنده‌های مقاومت (تیمارهای زیستی و غیرزیستی)، امکان کشت گیاه جعفری در زمین‌های آلوده به فلزات‌سنگین فراهم می گردد.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر در قالب طرح کاملا تصادفی و با سه تکرار، در آزمایشگاه فیزیولوژی گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد به اجرا درآمد. بذر گیاه جعفری (*Petroselinum sativum*) پس از تهیه از شرکت پاکان بذر اصفهان، با اتانول ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه و هیپوکلریت ۳/۵ درصد به مدت ۵ دقیقه ضدعفونی شدند. سپس بذرها در عمق ۱/۵ سانتی‌متری بستر گلدان‌های پلاستیکی با قطر دهانه ۳۰ سانتی‌متر و حاوی پرلیت دانه ریز کاشته شدند و آبیاری با آب‌مقطر تا زمان جوانه‌زدن بذرها صورت گرفت. پس از جوانه‌زدن بذرها، از محلول‌غذایی هوگلند (Hogland & Arnon, 1950)، به اندازه ظرفیت زراعی و به صورت یک روز در میان برای آبیاری گلدان‌ها استفاده شد. هر گلدان به عنوان یک واحد آزمایشی درنظرگرفته شد. تنش مولیبدن به صورت آبیاری با محلول‌غذایی هوگلند حاوی مولیبدن مازاد به صورت ترکیب Na_2MoO_4 و در غلظت‌های کنترل (C: سطح پایه غلظت مولیبدن در محلول غذایی هوگلند، ۱/۹ میکرومولار)، C+۰/۵، C+۲/۵، C+۵، C+۱۰ میکرومولار بر گیاهچه‌های یک هفته‌ای تا مدت چهار هفته اعمال شد. اندام‌هوایی و ریشه‌های گیاهچه‌های پنج‌هفته‌ای جهت بررسی صفات موفولوژیکی- بیوشیمیایی و فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از یکدیگر جدا و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

بررسی صفات موفولوژیکی- بیوشیمیایی

بررسی وزن خشک و طول بخش‌هوایی و ریشه به

ترتیب توسط ترازو دیجیتال و خط کش صورت گرفت. میزان پایداری غشا (MSI) سلول‌های برگ بر پایه رابطه $MSI = 1- EC_{40}/ EC_{100}$ و با دستورالعمل Azizpour *et al.* (2010) انجام شد. در این رابطه، EC_{40} هدایت الکتریکی نمونه در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و EC_{100} هدایت الکتریکی نمونه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد است. عصاره‌گیری و اندازه گیری محتوای رنگدانه‌های کلروفیل a، b و کل (Lichtenthaler, 1987) و کاروتنوئیدها (Arnon, 1956) نیز بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن‌تر نمونه گیاهی صورت گرفت. برای استخراج و اندازه‌گیری محتوای پرولین از روش Bates *et al.* (1973) و برای اندازه‌گیری محتوای مالون‌دی‌آلدهید (MDA) بر اساس رابطه A= εbc، از روش Heath & Packer (1968) استفاده شد (در این معادله، A جذب نمونه مورد نظر، ε ضریب خاموشی مالون‌دی‌آلدهید $155Mm^{-1}cm^{-1}$، b عرض کووت ۱ سانتی متر، c غلظت مالون‌دی‌آلدهید برحسب $\mu Mol\ g^{-1}F.W.$ می باشند). عصاره‌گیری ترکیبات‌فنلی بر مبنای متانول ۸۰ درصد و اندازه گیری آن بر مبنای معرف فولین‌سیوکالچو و بر اساس روش Singleton *et al.* (1999) صورت گرفت.

استخراج عصاره پروتئینی و سنجش محتوای پروتئین کل

به منظور استخراج عصاره پروتئینی ، ۰/۵ گرم از اندام‌هوایی و ریشه گیاهچه، از بافر فسفات پتاسیم (pH=۷ و۰/۱مولار) جهت عصاره‌گیری استفاده شد. این عصاره‌ها جهت سنجش محتوی پروتئین کل و فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مورد استفاده قرار گرفتند (Sairam *et al.*, 2000). برای اندازه‌گیری محتوای پروتئین کل بر مبنای روش Bradford (1956) و از تکنیک اسپکتروفتومتر کمک گرفته شد و درنهایت غلظت پروتئین موجود در هر نمونه بر حسب میلی‌گرم در گرم وزن‌تر نمونه در برابر منحنی استاندارد سرم آلبومین محاسبه گردید.

سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

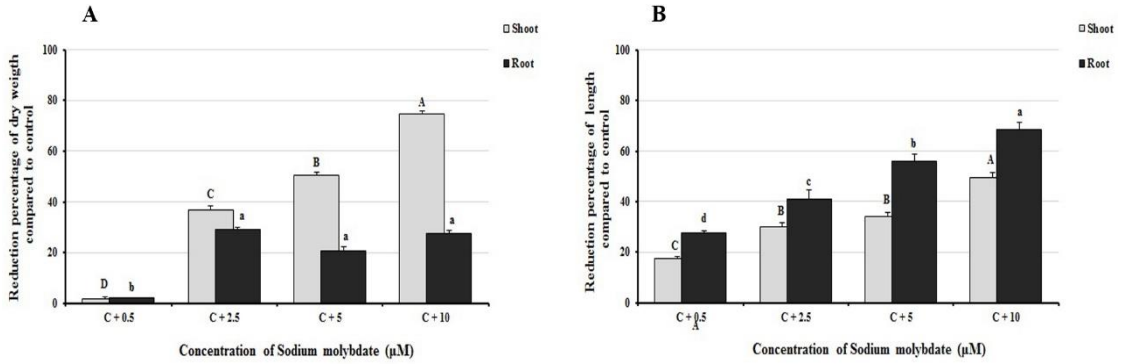
فعالیت کاتالاز (CAT) عصاره پروتئینی، برطبق روش Cakmak & Horst (1991) و به کمک بافرفسفات ۰/۰۵ مولار(pH=۷) و آب اکسیژنه ۳ درصد صورت گرفت و منحنی تغییرات جذب در طول‌موج ۲۴۰ نانومتر (طی ۳ دقیقه) بررسی شد. برای اندازه‌گیری فعالیت بنزیدین پراکسیداز (BPOX) عصاره، از سوبستراهای بنزیدین ۰/۰۲ مولار و آب اکسیژنه ۰/۳ درصد استفاده و جذب نمونه‌ها در طول‌موج ۵۳۰ نانومتر و به مدت ۳ دقیقه (هر ۳۰ ثانیه) خوانش شد (Putter, 1974). ارزیابی فعالیت آسکوربات‌پراکسیدا ز- (APX) با استفاده از بافرفسفات ۰/۰۵ مولار (pH=۶/۵)، آب اکسیژنه ۳ درصد و آسکوربات ۵ میکرومولار به همراه عصاره پروتئینی صورت گرفت و منحنی تغییرات جذب در طول‌موج ۲۵۶ نانومتر به مدت ۲ دقیقه خوانش شد (Arrigoni *et al.*, 1992). برای اندازه‌گیری فعالیت پلی‌فنل‌اکسیداز (PPO)، بافرفسفات ۰/۲ مولار (pH=۶/۸) و پیروگالل ۰/۰۲ مولار هم دما شده به ۴۰ درجه سانتی‌گراد، با عصاره-پروتئینی مخلوط و تغییرات جذب در طول‌موج ۴۳۰ نانومتر در دقیقه خوانده شد (Raymond et al., 1993). فعالیت ویژه همه آنزیم‌ها بر حسب تغییرات-جذب در دقیقه به‌ازای میلی‌گرم پروتئین محاسبه گردید. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم-افزارSPSS نسخه ۲۱ انجام شد. مقایسه میانگین داده-ها براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال خطای ۵٪ (P≤۰/۰۵) و نمودارهای مربوطه به‌وسیله نرم‌افزار Excel (2010) رسم گردید.

نتایج و بحث

نتایج بررسی تأثیر تنش مولیبدن بر صفات مورفولوژیکی بخش‌هوایی و ریشه گیاهچه جعفری نشان داد که هر چند تنش اعمال شده در غلظت‌های بالا، موجب کاهش وزن خشک هر دو بخش گیاه می شود، ولی تغییرات کاهشی مشاهده شده در وزن خشک بخش‌هوایی بسیار بیشتر از ریشه و از لحاظ آماری نیز معنی‌دار بود؛ به طوری که بیشینه کاهش ۷۴/۸۸ درصدی در وزن خشک بخش‌هوایی و در مواجه با غلظت۱۰+C میکرومولار مولیبدن به ثبت رسید (شکل ۱-A). تأثیر منفی غلظت‌های مختلف

مولیبدن بر طول ساقه و ریشه نیز مشاهده شد، اما درصد کاهش مشاهده شده برای طول ریشه (نسبت به شاهد) بیشتر از درصد کاهش طول ساقه به شاهد بود، به طوری‌که بیشترین درصد کاهش طولی اندازه‌گیری شده، مربوط به ریشه‌های تیمارشده با غلظت‌های C+۵ و C+۱۰ میکرومولار مولیبدن بود (به ترتیب ۶۸/۶۰ و ۵۶/۱۳ درصد) (شکل۱-B).

بررسی محتوای نسبی آب برگ نشان داد تیمار با غلظت‌های افزایشی مولیبدن موجب کاهش تدریجی این صفت گردید. بیشترین درصد کاهش محتوای‌نسبی‌آب (نسبت به شاهد) در تیمار C+۱۰ میکرومولار مولیبدن (۲۴/۶۴ درصد) اندازه‌گیری شد که با توجه به درصدهای کاهشی به ثبت رسیده، می تواند جزء اثرات منفی ضعیف درنظرگرفته شود (شکل ۲-A). از جهت بررسی شاخص پایداری‌غشاء سلول‌های برگ مشخص گردید که تیمار با غلظت‌های‌بیشترمولیبدن (C+۵ و C+۱۰ میکرومولار) موجب کاهش معنی‌دار و قابل‌توجه پایداری غشای سلول‌ها در مقایسه با تیمار با غلظت‌های کمتر مولیبدن (C+۰/۵ و C+۲/۵ میکرومولار) گردید (شکل ۲-B). بر این مبنا، مولیبدن در غلظت‌های بالا دارای اثرات مخرب بر شاخص پایداری غشا بود.

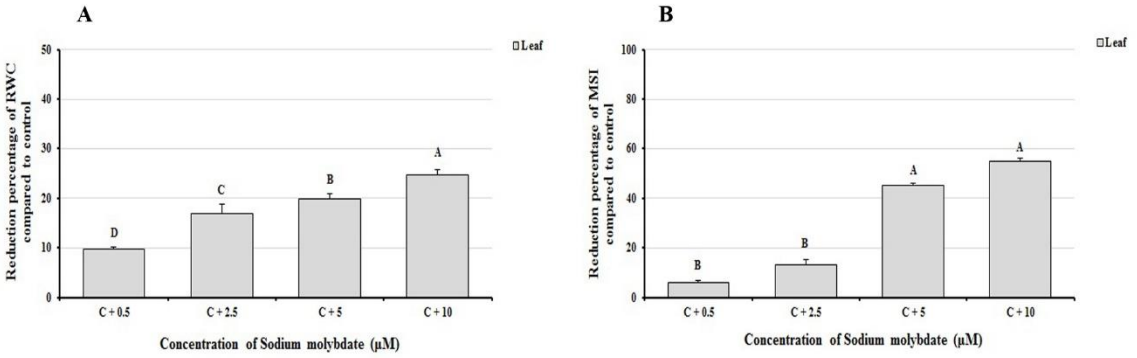


شکل ۱. مقایسه میانگین اثر تنش مولیبدن بر (A) وزن خشک و (B) طول دو بخش‌هوایی و ریشه گیاهچه جعفری.

* C: سطح پایه (کنترل) غلظت مولیبدن در محلول هوگلند (۱/۹ میکرومولار)، سطوح تیماری C+۰/۵، C+۲/۵، C+۵، C+۱۰ میکرومولارمولیبدات سدیم اضافه شده به محلول هوگلند.

Figure 1. Mean comparison effect of molybdenum stress on (A) dry weight and (B) length of two parts; shoot and root in parsley seedling.

* C: basal level (control) of molybdenum concentration in Hoagland solution (1.9 µM); Treatment levels of C+0.5, C+2.5, C+5, C+10 micromolar of sodium molybdate added to Hoagland's solution.

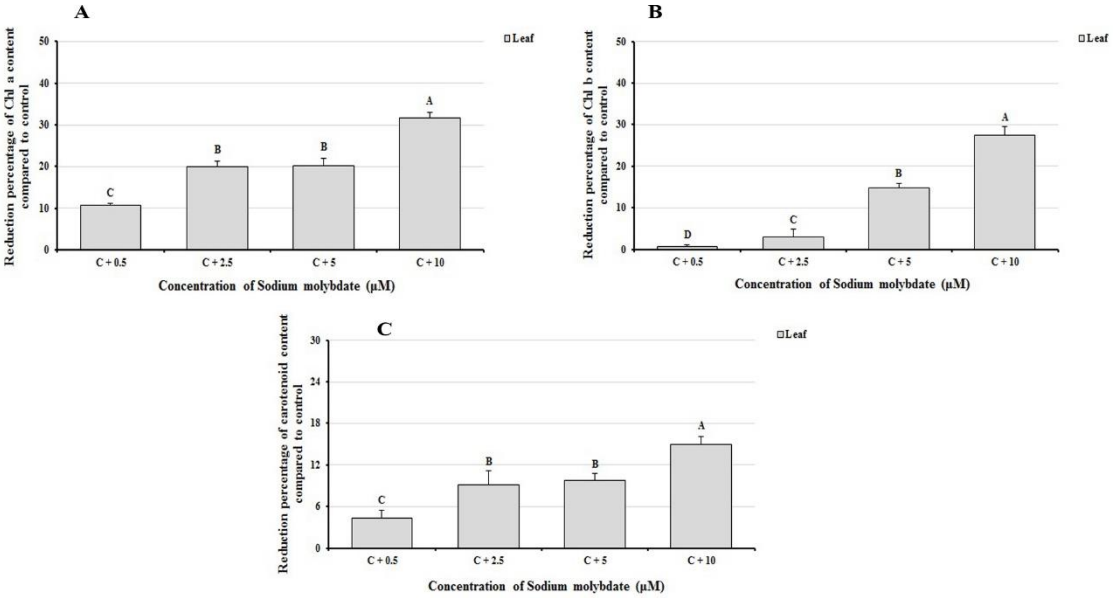


شکل ۲. مقایسه میانگین اثر تنش مولیبدن بر (A) محتوای‌نسبی‌آب و (B) شاخص‌پایداری غشای برگ گیاهچه جعفری.

* C: سطح پایه (کنترل) غلظت مولیبدن در محلول‌هوگلند (۱/۹ میکرومولار)، سطوح تیماری C+۰/۵، C+۲/۵، C+۵، C+۱۰ میکرومولارمولیبدات سدیم اضافه شده به محلول‌هوگلند.

Figure 2. Mean comparison effect of molybdenum stress on (A) Relative Water Content and (B) Membrane Stability Index of leaf in parsley seedling.

* C: basal level (control) of molybdenum concentration in Hoagland solution (1.9 µM); Treatment levels of C+0.5, C+2.5, C+5, C+10 micromolar of sodium molybdate added to Hoagland's solution.



شکل ۳. مقایسه میانگین اثر تنش مولیبدن بر (A) محتوای کلروفیل a، (B) محتوای کلروفیل b و (C) محتوای کاروتنوئید برگ گیاهچه جعفری. * C: سطح پایه (کنترل) غلظت مولیبدن در محلول هوگلند (۱/۹ میکرومولار)، سطوح تیماری C+۰/۵، C+۲/۵، C+۵، C+۱۰ میکرومولارمولیبدات سدیم اضافه شده به محلول‌هوگلند.

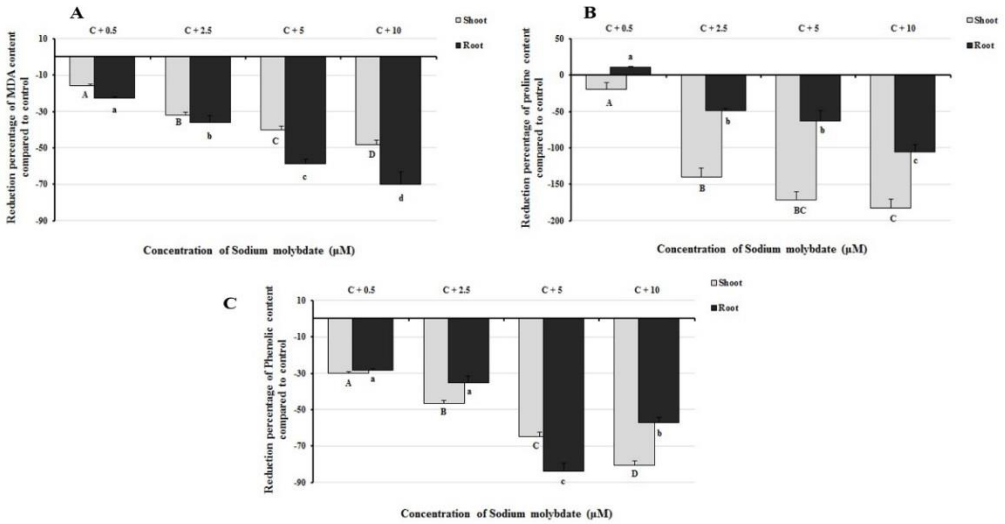
Figure 3. Mean comparison effect of molybdenum stress on (A) chlorophyll a content, (B) chlorophyll b content and (C) carotenoid content of leaf in parsley seedling. * C: basal level (control) of molybdenum concentration in Hoagland solution (1.9 µM); Treatment levels of C+0.5, C+2.5, C+5, C+10 micromolar of sodium molybdate added to Hoagland's solution.

با اعمال تنش و افزایش غلظت‌های به کاررفته مولیبدن، محتوای هر سه نوع رنگدانه کلروفیل a، کلروفیلb و کاروتنوئیدهای برگ کاهش یافتند، اما نکته قابل‌توجه آن بود که بیشترین تأثیر منفی ناشی از تیمار مولیبدن بر محتوای کلروفیل a و کلروفیل b (به ترتیب ۳۱/۷٪ و ۲۷/۴ درصد کاهش نسبت به شاهد و در زمان تیمار با غلظت C+۱۰ میکرومولارمولیبدن) و کمترین تأثیر منفی آن بر محتوای کاروتنوئید (۱۴/۹درصد کاهش و در زمان تیمار با غلظت C+۱۰ میکرومولار مولیبدن) به ثبت رسید (شکل ۳-A,B,C). با توجه به درصدهای کاهشی کمتر از سی درصد همه رنگدانه‌ها، می‌توان بیان داشت که تنش مولیبدن دارای اثرات منفی کمی بر این محتواها بود.

تنش مولیبدن اعمال‌شده بر گیاهچه جعفری موجب افزایش محتوای مالون‌دی‌آلدهید بخش‌هوایی و ریشه گیاهچه شد، ولیکن میزان افزایش مشاهده شده در محتوای مالون‌دی‌آلدهید ریشه گیاهچه و در تمام غلظت‌های تیماری مولیبدن، بیشتر ازاین محتوا در بخش‌هوایی بود (شکل ۴-A). به‌طوری که تنش فلز سنگین درغلظت C+۱۰ میکرومولار موجب افزایش ۷۰ درصدی محتوای مالون‌دی‌آلدهید در ریشه شد. بررسی محتوای پرولین گیاهچه جعفری متاثر از تنش مولیبدن نشان داد که هر چند محتوای پرولین هم بخش‌هوایی و هم ریشه گیاهچه در برابر غلظت‌های بیشتر از C+۲/۵ میکرومولار مولیبدن افزایش یافت، ولیکن میزان افزایش مشاهده شده در محتوای پرولین بخش‌هوایی حدود دوبرابر ریشه بود (شکل ۴-B)؛ به طوری که تا افزایش ۱۵۰ درصدی نسبت به شاهد، در محتوای پرولین بخش هوایی دیده شد. ارزیابی تغییرات محتوای فنل کل بخش‌هوایی بیانگر افزایش تدریجی و معنی‌دار، وابسته به افزایش غلظت مولیبدن در محیط تیماری بود. محتوای این ترکیبات در ریشه گیاهچه تا غلظت C+۵ میکرومولارمولیبدن، افزایش صعودی و به دنبال آن، کاهش یافت (شکل ۴-C).

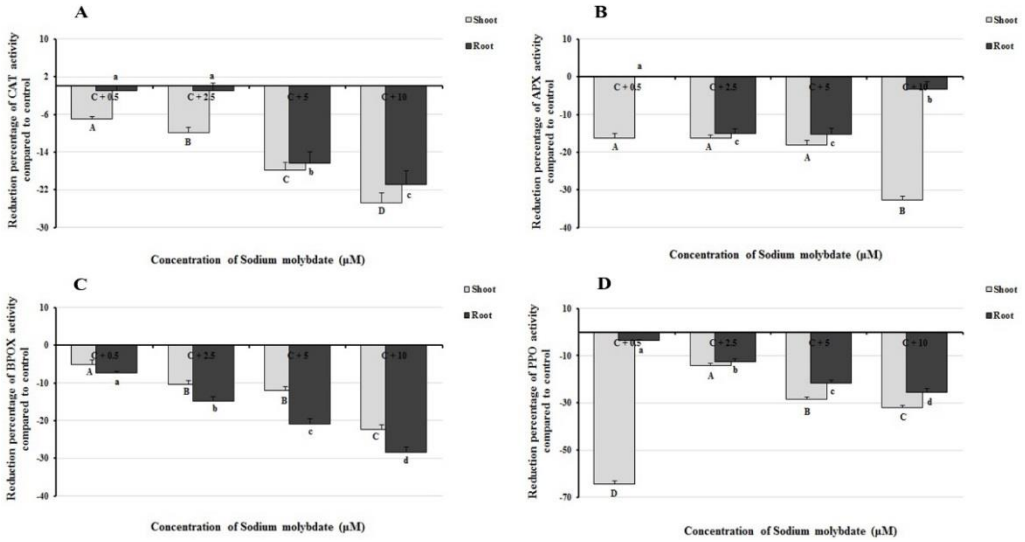
بررسی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز، بنزیدین‌پراکسیداز، آسکوربات‌پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز بیانگر افزایش فعالیت این آنزیم‌ها در هردو بخش هوایی و ریشه گیاهچه جعفری بود (شکل ۵). ولیکن دو آنزیم

کاتالاز و بنزیدین‌پراکسیداز دارای روند افزایشی متناسب با غلظت‌های اعمال شده مولیبدن بودند (شکل ۵-C;A). نکته قابل‌توجه آن است که فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات‌پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز بخش‌هوایی بیشتر از ریشه بود و تنها فعالیت آنزیم بنزیدین‌پراکسیداز ریشه بر فعالیت این آنزیم در بخش‌هوایی پیشی گرفت. کمترین افزایش نیز درفعالیت آسکوربات‌پراکسیداز ریشه گیاهچه‌ها اندازه‌گیری شد (دو درصد افزایش نسبت به شاهد) (شکل ۵-B).



شکل ۴. مقایسه میانگین اثر تنش مولیبدن بر (A) محتوای مالون‌دی‌آلدهید، (B) محتوای پرولین و (C) محتوای ترکیبات فنلی دو بخش هوایی و ریشه گیاهچه جعفری. * C: سطح پایه (کنترل) غلظت مولیبدن در محلول هوگلند (۱/۹ میکرومولار)، سطوح تیماری C+۰/۵، C+۲/۵، C+۵، C+۱۰ میکرومولارمولیبدات سدیم اضافه شده به محلول‌هوگلند.

Figure 4. Mean comparison effect of molybdenum stress on (A) malondialdehyde content, (B) proline content and (C) phenolic content of two parts; shoot and root in parsley seedling. * C: basal level (control) of molybdenum concentration in Hoagland solution (1.9 µM); Treatment levels of C+0.5, C+2.5, C+5, C+10 micromolar of sodium molybdate added to Hoagland's solution.



شکل ۵. مقایسه میانگین اثرتنش مولیبدن بر فعالیت (A) آنزیم کاتالاز، (B) آنزیم بنزیدین پراکسیداز، (C) آنزیم آسکوربات پراکسیداز و (D) آنزیم پلی فنل اکسیداز دو بخش هوایی و ریشه گیاهچه جعفری. * C: سطح پایه (کنترل) غلظت مولیبدن در محلول هوگلند (۱/۹ میکرومولار)، سطوح تیماری C+۰/۵، C+۲/۵، C+۵، C+۱۰ میکرومولارمولیبدات سدیم اضافه شده به محلول‌هوگلند.

Figure 5. Mean comparison effect of molybdenum stress on activity of (A) catalase, (B) benzidine peroxidase, (C) ascorbate peroxidase and (D) polyphenol oxidase of two parts; shoot and root in parsley seedling. * C: basal level (control) of molybdenum concentration in Hoagland solution (1.9 µM); Treatment levels of C+0.5, C+2.5, C+5, C+10 micromolar of sodium molybdate added to Hoagland's solution.

صفات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی

در این پژوهش، اثر سمیت‌زا غلظت‌های افزایشی مولیبدن بر گیاه جعفری در مرحله گیاهچه‌ای مورد بررسی قرار گرفت. بررسی تغییرات وزن خشک و طول دو بخش‌هوایی وریشه، بیانگر تأثیر منفی غلظت‌های مختلف مولیبدن بر این شاخص‌ها بود که هم راستا با مطالعات سایر محققین می‌باشد (Rajeev *et al.*, 2015). نکته قابل‌توجه آن بود که درصد کاهش وزن خشک بخش‌هوایی (نسبت به شاهد) بیشتر از ریشه و درصد کاهش طول ریشه (نسبت به شاهد) بیشتر از بخش‌هوایی بود. اساسا تغییرات در صفات موفولوژیکی نشانگر عملکرد رشد گیاهان است و هر عاملی که به نوعی اثر مهاری بر رشد داشته باشد باعث کاهش طول و به طور خاص، وزن خشک گیاه می‌گردد (Sundaramoorthy *et al.*, 2010). مسلم شده است که فلزات سنگین با اثری که برفتوسنتزدارند، زیست‌توده گیاهی را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Shanker *et al.*, 2004). یافته‌ها حاکی از آن است که افزایش مولیبدن در اختیار گیاه، ترکیبات نیتروژن‌دار، پروتئین و کربوهیدرات برگ را کاهش می‌دهد که می‌تواند دلیلی بر اثر ممانعت‌کننده مولیبدن بر رشد گیاه باشد (Rajeev *et al.*, 2015). کاهش در شاخص پایداری‌غشاء و محتوای‌نسبی‌آب برگ که در غلظت‌های بیشتر مولیبدن به ثبت رسید، از دیگر یافته‌های این پژوهش است. بررسی‌ها نشان داده است که فرایندهای متابولیسمی گیاه، به طور مستقیم یا غیرمستقیم تحت تأثیر روابط آبی، از سطح سلولی تا کل گیاه می‌باشد و از این رو، محتوای آب درونی به عنوان عامل کلیدی که رشدونمو گیاه را کنترل می‌کند در نظرگرفته می‌شود (Tanentzap *et al.*, 2015). دلیل تغییرات مشاهده شده آن است که فلزات‌سنگین می‌توانند با اثر بر روی سیستم‌های غشایی و آسیب به دیواره سلولی از یک سو و کاهش اندازه و تعداد سلول‌های نگهبان روزنه، کاهش سطح برگ و اختلال در سرعت تعرق برگ از سوی دیگرموجب کاهش صفات مذکور شوند (Cenkci *et al.*, 2010). نتایج به دست آمده از این پژوهش نشان داد که کلروفیل‌ها و کاروتنوئیدها به ترتیب، بیشترین و کمترین تأثیرپذیری منفی را از حضورغلظت‌های مولیبدن داشته اند. یافته‌های مربوط به محتوای کلروفیل‌ها موافق با بررسی Khavari-Nejad *et al.* (2010) می‌باشد که از کاهش محتوای کلروفیل‌های گیاه گوجه فرنگی در برابر مولیبدن گزارش نمودند. با ورود حجم بالای فلزات سنگین من‌جمله مولیبدن به داخل کلروپلاست و تجمع آن ها در این اندامک، تنش‌های اکسیداتیو رخ دهد که موجب آسیب‌هایی از قبیل پراکسیداسیون غشاءپوششی و تیلاکوئیدی کلروپلاست و از هم‌گسستگی آن‌ها می‌گردد (Zengin & Munzuroglu , 2005). فلزات سنگین همچنین می‌توانند به گروه‌های سولفیدریل آنزیم‌های کلروپلاستی متصل و در بیوسنتز کلروفیل‌ها اختلال ایجاد کنند (Srivastava *et al.*, 2006). آن‌ها از جذب و انتقال سایر عناصرضروری منجمله Fe^{+2}، Mn^{+2} و Zn^{+2} ممانعت می‌کنند و از این طریق، ظرفیت سنتز رنگدانه‌های کلروفیلی در برگ را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Gardea-Torresdet *et al.*, 2004). ولیکن کاروتنوئیدها به عنوان بخشی از سیستم آنتی‌اکسیدانی غیرآنزیمی هستند (Karamian *et al.*, 2017) و از این رو، کاهش کمتر آن‌ها در برابر تنش مولیبدن می‌تواند به عنوان یک جنبه مثبت درنظرگرفته شود.

آنتی اکسیدان های غیرآنزیمی و آنزیمی

بررسی محتوای پرولین و مالون‌دی‌آلدهید دو بخش هوایی و ریشه گیاهچه جعفری نشان داد که هرچند تنش مولیبدن موجب افزایش محتوای این دو ترکیب در هر دو اندام شد، اما بخش‌هوایی با محتوای بالاتر پرولین ، از محتوای کمتر مالون‌دی‌آلدهید برخوردار بود. بر اساس گزارش ها، پیامد تنش فلزات سنگین تولید بالای گونه‌های‌کنشگراکسیژن (ROS) و آسیب‌های ناشی از آن‌ها است که به دنبال آن بسته به ظرفیت گیاه، پاسخ‌های آنتی اکسیدانی غیرآنزیمی و آنزیمی در گیاه ظاهر می‌شود (Sanita *et al.*, 1999). تجمع معنی‌دار و وابسته به غلظت پرولین، به ویژه در بخش‌هوایی گیاهچه جعفری، گویای نقش حفاظتی-دفاعی این مولکول در برابر تنش مولیبدن می‌باشد. پرولین با چندین مکانیسم از جمله جاروب‌کردن

ROS، تنظیم اسمزی، جلوگیری از دناتوره‌شدن آنزیم‌ها و حفظ ساختار پروتئین‌ها، بردباری و یا مقاومت گیاه در برابر تنش را بالا می‌برد. این انباشتگی پرولین در بافت‌های گیاهی می‌تواند در نتیجه کاهش تجزیه و یا هیدرولیز پرولین، افزایش بیوسنتز پرولین ویا کاهش در استفاده از پرولین در مسیرهای کاربردی باشد (Kuznetsov & Shevyakova, 1999). هر چند پرولین و افزایش غلظت آن در سلول‌های گیاه جعفری تلاش می‌کند تا به عنوان جزئی از سیستم آنتی اکسیدان غیرآنزیمی، اثرات منفی ناشی از سمیت غلظت‌های بالا مولیبدن را کاهش دهد، اما بالارفتن شاخص مالون‌دی‌آلدهید (به طورخاص در ریشه گیاهچه که دارای سطوح پایین‌تری از پرولین بودند) بیانگر پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی متاثر از رادیکال‌های آزاد در گیاه است. مالون‌دی‌آلدهید افزایش‌یافته یک شاخص از تنش فیزیولوژیکی است (Pourakbar *et al*., 2007). Irani *et al*. (2008) با مطالعه دو واریته از گیاه شیرین‌بیان گزارش کردند که تنش مولیبدن سبب پراکسیداسیون لیپید می‌شود. این اثر احتمالا به دلیل اثرات سمی مولیبدن در غلظت‌های بالا می‌باشد که با ایجاد رادیکال‌های آزاد واکنش‌پذیر باعث پراکسیداسیون اسیدهای‌چرب و به دنبال آن افزایش مالون‌دی‌آلدهید افزایش می‌شود. یکی دیگر از راهکارهای دفاعی گیاه در زمان وقوع تنش‌ها و ازجمله تنش فلزات سنگین، افزایش دادن سطح متابولیت‌های ثانوی-فنلی است. ترکیبات‌فنلی در این شرایط می‌توانند موجب تسهیل در جذب عناصر غذایی شوند، درانتقال بهتر مواد پرورده از منبع به مخزن کمک کنند و به این ترتیب، نقش مثبتی در فعالیت‌های فتوسنتزی، آنزیم‌های مربوط به فتوسنتز، رشد بهتر و عملکرد بیشتر گیاهان داشته باشند (Fariduddin *et al*., 2003). بررسی‌های ما نشان داد که تنش مولیبدن موجب افزایش محتوای ترکیبات فنلی بخش‌هوایی و ریشه گیاهچه جعفری شد. القای بیوسنتز ترکیبات‌فنلی در پاسخ به سمیت نیکل در گندم و در پاسخ به سمیت آلومینیوم در ذرت نیز مشاهده شده است (Michalak, 2006). در پژوهشی که توسط Sakihama & Yamasaki (2002) با تیمار سرب بر گیاه لوبیا انجام گرفت، افزایش قابل‌توجه در ترکیبات فنلی گزارش شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی فنل‌ها مربوط به خاصیت احیایی آنها است که اجازه می دهد به عنوان دهنده هیدروژن، برطرف‌کننده و جاروبگر اکسیژن منفرد و و سایر گونه‌های کنشگر اکسیژن عمل کنند (Sakihama & Yamasaki, 2002). این ترکیبات همچنین می‌توانند مانع فیزیکی برای حفاظت سلول‌ها در مقابل عملکرد مضر عناصر سنگین ایجاد کنند (Diaz *et al*., 2001)، به این نحو که گروه‌های هیدروکسیل و کربوکسیل ترکیبات‌فنلی و فلاونوئیدها قادرند به طور اختصاصی به عناصر سنگین متصل و آن‌ها را بلوکه کنند (Jung *et al*., 2003). در این تحقیق اثر غلظت‌های مختلف تنش مولیبدن بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان گیاهچه جعفری نیز مورد بررسی قرار گرفت و نتایج موید این مسئله بود که در مواجهه با تنش، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیدازها و پلی‌فنل‌اکسیداز افزایش یافت. البته کاتالاز و بنزیدین پراکسیداز به عنوان دو آنزیم دارای روند افزایشی متناسب با غلظت مولیبدن بودند. بر اساس مطالعات، تغییر فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز نشان دهنده نقش متابولیکی آن‌ها در زمان وقوع تنش است (Assche & Clijsters, 1990). به طوری‌که در اکثر پژوهش‌ها، افزایش فعالیت کاتالاز و پراکسیدازها در زمان تنش فلزی مشاهده شده است، ولیکن میزان این افزایش در گونه‌های مختلف متفاوت است (Das & Rout, 2002). Li & Li (2002) افزایش فعالیت کاتالاز و پراکسیداز را تحت تنش مولیبدن در برگ‌های سیب‌زمینی گزارش کردند. همچنین Liu *et al*. (2005) با انجام تحقیقی بر روی گیاه سویا نشان دادند که تیمار مولیبدن باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز می‌شود. طبق تحقیقات Irani *et al*. (2008)، فعالیت پراکسیداز در واریته گیاه شیرین‌بیان در تمام تیمارهای مولیبدن افزایش معنی‌داری را نسبت به تیمار شاهد نشان داد. Das & Rout (2002) در تحقیقی که بر روی واریته‌های مختلف برنج انجام دادند بیان داشتند که در تیمار گیاهان با غلظت‌های مختلف مولیبدن، سمیت فلز با افزایش فعالیت کاتالاز

و پراکسیداز در ارتباط مستقیم بوده است. القای فعالیت پراکسیداز از پاسخ‌های عمومی و اولیه گیاهان به جذب مقادیر بالای فلزات است (Andrson, 2003). با این وجود، به نظر می‌رسد که به جهت تجمع بالای H_2O_2 ناشی از سمیت فلزات سنگین، آنزیم‌های متعددی در روبشگری مقدماتی این رادیکال‌ها شرکت کنند که از مهم ترین آن‌ها، کاتالاز، آسکوربات-پراکسیداز و سایر پراکسیدازها می‌باشند (Mckersie & Leshem, 1994).

از دیگر یافته‌های پژوهش حاضر، افزایش فعالیت پلی‌فنل‌اکسیداز در بخش‌هوایی و ریشه‌های مواجه شده با تنش مولیبدن بود که با نتایج تحقیقات صورت‌گرفته بر روی تنش‌فلزات سنگین مطابقت دارد (Aksoy & Dinler, 2012; Martins & Mourato, 2006). این آنزیم در شرایط تنش موجب اکسیداسیون ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها به ترکیبات کوئینون و سمی کوئینون می‌شود که نقش مؤثری در روبشگری رادیکال های آزاد و به طور خاص H_2O_2 دارند (Dai *et al*., 2006). طبق گزارش Mittler *et al.*(2004)، ROSها به عنوان مولکول‌های پیام‌رسان موجب شروع واکنش‌های حفاظتی گیاهان در برابر با تنش‌ها می‌شوند. به این نحو که با تأثیر بر عوامل رونویسی و افزایش بیان ژن آنزیم‌های پلی‌فنل اکسیداز، سوپراکسید دسموتاز و آسکوربات پراکسیداز و ترکیبات آنتی اکسیدان غیرآنزیمی، موجب القا و تشدید سیستم روبشگر ROSهای مازاد می‌شوند (Wang *et al*.,2007).

نتیجه گیری کلی

با توجه به اینکه محتوای آنتی اکسیدان‌های غیرآنزیمی (پرولین و ترکیبات فنلی) و آنتی اکسیدان‌های آنزیمی (کاتالاز، پراکسیدازها و سوپراکسیددیسموتاز) در زمان اعمال تنش مولیبدن بر گیاه جعفری افزایش یافت، بنابراین اینطور می توان نتیجه‌گیری نمود که گیاه سعی می‌کند با کاهش دادن نسبی فرایند رشد و به عوض آن، افزایش دادن سیستم‌های دفاعی- آنتی اکسیدان به "تحمل" شرایط تنش فلز سنگین بپردازد. از این رو احتمال کاشت این گیاه در زمین های دارای تنش مولیبدن دور از دسترس نمی باشد.

سپاسگزاری

از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد بابت تأمین هزینه‌های پژوهش حاضر از محل اعتبارات متمرکز این معاونت (با شماره کد طرح به شماره ۳/۳۷۴۹۹)، تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

1. Aksoy, M. & Dinler, B. S. (2012). Changes in physiological parameters and some antioxidant enzymes activities of soybean (*Glycine max* L.) leaves under cadmium and salt stress. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 8(4), 179 – 190.
2. Andrson, S. (2003). Basic information about molybdenum as plant nutrient. *Plant Cell and Environment*, 24, 1271-1278.
3. Arnon, D. J. (1956). Chlorophyll absorption spectrum and quantitative determination. *Biochemical and Biophysical Acta*, 20, 449-461.
4. Arrigoni, O. L., Gara, F., Tommasi, R. & Lis, O. (1992). Change in ascorbate system during seed development of *Vicia faba*. *Plant Physiology*, 99, 235-238.
5. Assche, F. & Cliysters, H. (1990). Effect of metals on enzyme activity in plants. *Plant, Cell and Environment*, 13(3), 195-206.
6. Azizpour, K., Shakiba, M. R., Khosh Kholgh Sima, N., Alyari, H., Moghaddam, M., Esfandiari, E. & Pessarakli, M. (2010). Physiological response of spring durum wheat genotypes to salinity. *Journal of Plant Nutrition*, 33, 859-873.
7. 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.
8. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of micro gram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
9. Cakmak, I. & Horst, W. J. (1991). Effect of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiologia Plantarum*, 83, 463-468.
10. Cenkci, S., Cioerci, I. H., Yildiz, M., Oezay, C., Bozdao, A. & Terzi, H. (2010). Lead contamination reduces chlorophyll biosynthesis and genomic template stability in (*Brassica rapa* L.). *Environmental and Experimental Botany*, 67, 467-473.

11. Fariduddin, Q., Hayat, S. & Ahmad, A. (2003). Salicylic acid influences net photosynthetic rate, carboxylation efficiency, nitrate reductase activity and seed yield in *Brassica juncea*. *Photosynthetica*, 41, 281-284.
12. Gardea-Torresdey, J., Peralta-Videa, J., Montes, M., Role, G. & Corral-Diaz, B. (2004). Bioaccumulation of cadmium, chromium and copper by (*Convolvulus arvensis* L.) Impact on plant growth and uptake of nutritional elements. *Bio resource Technology*, 92, 229-235.
13. Heath, R. L. & Packer, L. (1969). Photo peroxidation in isolated chloroplast, 1. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*,125, 189-198.
14. Hogland, D. R. & Arnon, D. I. (1950). The water culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station*, Circular, 347.
15. Irani, M., Sarmadi, M., Bernard, F. & Shakerbazarno, H. (2008). Effect of molybdenum stress on anthocyanin, protein, malondialdehyde content and peroxidase activity in two varieties of licorice (*Glycyrrhiza glabra*) under in vitro culture. *Special Issue on Pajouhesh & Sazandegi*, (8), 20-13 (In Farsi).
16. Jung, CH., Maeder, V., Funk, F. & Frey, B. (2003). Release of phenols from *Lupinus albus* L. roots exposed to Cu and their possible role in Cu detoxification. *Plant Soil*, 252 (2), 301-312.
17. Karamian, R., Asadbeigy, M. & Yari, S. (2017). Antioxidant activity of *Glycyrrhiza glabra* L. extract and protective effect of its leaf extract on ethanol-induced nephrotoxicity in male rats. *Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences*, 26(4), 1-12.
18. Khavari-Nejad, R. A., Goshehgir, Z. & Sa'adatman, S. (2010). The effects of selenium molybdenum interaction on contents of photosyntetic pigments in tomato (*Lycopersicum esculentum*). *Journal of Plant Science Researches*, 30, 711-719.
19. Kuznetsov, V. & Shevyakova, N. I. (1999). Proline under stress: Biological role, metabolism and regulation. *Journal of Plant Physiology*, 46 (2), 247-287.
20. Li, J. & Li, X. D. (2002). Effect of copper and molybdenum on quality in pakchoi. *Fujian Agricultural Science and Technology*, 3, 13-14.
21. Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophyll fluorescence signature of leaves during the autumnal chlorophyll breakdown. *Journal of Plant Physiology*, 131, 101-110.
22. Liu, P., Yang, Y. S., Xu, G. D., Fang, Y. H. & Yang, Y. A. (2005). The response of antioxidant enzymes of three soybean varieties to molybdenum and boron in soil with a connection to plant quality. *Plant, Soil and Environment*, 51(8), 351-359.
23. Martins, L. L. & Mourato, M. P. (2006). Effect of excess copper on tomato plants growth parameters, enzyme activities, chlorophyll, and mineral content. *Journal of Plant Nutrition*, (12), 2179-2198.
24. McKersie, B. D. & Leshem, Y. (1994). *Stress and stress coping in cultivated plants.* (pp. 1-180.) Kluwer Academic Publish.
25. Michalak, A. (2006). Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Polish Journal of Environmental Studies*, 15(4), 523-530.
26. Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. & Van Breusegem, F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, 9 (10), 490-498.
27. Ovecka, M. & Takac, T. (2014). Managing heavy metal toxicity stress in plant: biological and biotechnological tools, *Biotechnoligy Advances*, 32(1), 73-86.
28. Pourakbar, L., Khayami, M., Khara, J. & Farbodina, T. (2007). Copper-Induse change in antioxidative system in maize (*Zea mays* L.). *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10, 3662-3667.
29. Putter, J. (1974). *Peroxidase. In: methods of enzymatic analysis* (2nd ed.). Weinhan.
30. Rajeev, G., Yogesh, K., Sharma, K. & Arvind, K. (2015). Effect of molybdenum stress on growth, yield and seed quality in black gram. *Journal of Plant Nutriation*, 48, 879-886.
31. Raymond, M., Poulin, E., Boirox, V., Dupont, E & Pasteur N. (1993). Stability of insecticide resistance due to amplification of esterase genes in *Cluex pipiens. Heredity*, 70, 301-307.
32. Rout, G.R. & Das, P. (2002). Rapid hydroponic screening for molybdenum tolerance in rice through morphological and biochemical analysis. *Rostlinna Vyroba*, 48(11), 505-512.
33. Sairam, R. K. & Saxena, D.C. (2000). Oxidative stress and antioxidant in wheat genotypes, possible mechanism of water stress tolerance. *Journal of Argonomy and Grop Science*, 184, 55-61
34. Sakihama, Y & Yamasaki, H. (2002). Lipid peroxidation induces by phenolics in conjunction with aluminium ions. *Biology Plantarum*, 45, 249- 254.
35. Sanita, D., Toppi, L. & Gabbrielli, R. (1999). Response to cadmium in higher plants. *Environmental* and *Experimental Botany*, 41, 105-130.
36. Shanker, K. A., Cervantes, C., Loza, H. & Avudainayagam, S. (2004). Chromium toxicity in plant. *Environment International*, 3, 739-753.
37. Singleton, V.L., Orthofer, R. & Lamuela-raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.

38. Srivastava, S., Mishara, S., Tripathi, R., Dwivedi, S. & Gupta, D. (2006). Copper induced oxidative stress and responses of antioxidants and phytochelatins in (*Hydrilla verticillata*). *Royle Aquatic Toxicology*, 80(4), 405-415.
39. Sundaramoorthy, P., Alagappan, C., Kaliyaperumal, S. G., Pachikkaran, U. & Logalashmanan, B. (2010). Chromium stress in paddy: (i) Nutrient status of paddy under chromium stress., (ii) Phytoremediation of chromium by aquatic and terrestrial weeds. *Comptes Rendus Biologies*, 333, 597-607.
40. Tanentzap, F. M., Stempel, A. & Ryser, P. (2015). Reliability of leaf relative water content (RWC) measurements after storage: consequences for in situ measurements. *Botany*, 93, 535-541.
41. Wang, Y., Liu, C., Li, K., Sun, F., Hu, H., Li, X., Zhao, Y., Han, C., Zhang, W., Duan, Y., Liv, M. & Li, X. (2007). Arabidopsis EIN_2 modulates stress response through abscisic acid response pathway. *Plant Molecular Biology*, 64, 633-644.
42. Warner, R. L. & Kleinhofs, A. (1992). Genetics and molecular biology of nitrate metabolism in higher plants. *Physiologia Plantarum*, 85(2), 245-252.
43. Williams, R. J. P. & Frausto Da Silva, J. J. R. (2002). The involvement of molybdenum in life. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 292(2), 293-299.
44. Zengin, F. & Munzuroglu, O. (2005). Effect of some heavy metal on content of chlorophyll, proline and some antioxidant chemicals in bean seedling. *Acta Biological Cracoviensa Series Botanica*, 47, 157-164.