DOI: 10.22059/ijswr.2020.302202.668608 تحقیقات آب و خاک ایران، دوره ۵۱، شماره ۸، آبان ماه ۱۳۹۹ (ص ۲۰۰۶-۱۹۹۷)

Evaluation of Lead Accumulation in Different Parts of violet (*Viola tricolor*) and Reaction of the Plant to Lead Oxidative Stress

SAMIRA ABOLGHASEMI[*1], ROOHANGIZ NADERI[1], BABAK MOTESHREZADE[2], SEYED ALIREZA SALAMI[1]

1. Department of Horticultural Science, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.
2. Department of Soil Science, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.
(Received: May. 19, 2020- Revised: June. 16, 2020- Accepted: June. 21, 2020)

ABSTRACT

Nowadays, soil contamination with heavy metals is one of the major environmental concerns. Among heavy metals, lead is one of the main concerns due to its effects on human health and environment. The most important sources of this pollution in most parts of the world are mines, industrial waste, chemical fertilizers and pesticides. In order to investigate the adsorption capacity of lead by the ornamental plant of viola (*Viola tricolor*) and to find the morphological and physiological responses of plant against lead stress, a study in contaminated soil with different levels of lead (0, 200 and 400 mg/kg) was done in a completely randomized design with five repetitions in the greenhouse of the Faculty of Agriculture, University of Tehran. The results showed by increasing the concentration of lead in the soil, its amount increased in three parts of shoots, roots and flowers of the plant and the highest accumulation of lead in the roots was found to be 41.27 mg/kg. The high lead pollution reduced the fresh and dry weight of shoots and roots and the root length as compared to the control. Also, total antioxidants and glycine betaine as a defensive factor against stress were found at a concentration of 400 mg/kg lead, which were 61.3% and 114.33 µmol/g, respectively. Therefore, violet can be recommended as an adsorbent of lead and a stress reliever in urban and industrial green space cultivation.

Key words: Soil Contaminant, Lead Accumulator, Heavy Metal Stress, Glycine Betaine, Antioxidant Percentage.

[*]Corresponding Author's Email: s_abolghasemi@ut.ac.ir

بررسی میزان انباشتگی سرب در قسمت‌های مختلف گیاه بنفشه (*Viola tricolor*) و واکنش گیاه به تنش اکسیداتیو سرب

سمیرا ابوالقاسمی*[۱]، روح انگیز نادری[۱]، بابک متشرع زاده[۲]، سید علیرضا سلامی[۱]

۱. گروه علوم باغبانی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.

۲. گروه علوم و مهندسی خاک، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۴/۳۰- تاریخ بازنگری: ۱۳۹۹/۳/۲۷- تاریخ تصویب: ۱۳۹۹/۴/۱)

چکیده

امروزه آلودگی خاک‌ها به فلزات سنگین، یکی از نگرانی‌های مهم زیست محیطی به شمار می‌رود .در بین فلزات سنگین، سرب به دلیل، اثراتی که می‌تواند بر سلامتی انسان و محیط زیست داشته باشد، به عنوان یکی از نگرانی‌های اصلی به شمار می‌رود. مهم‌ترین منبع آلودگی فلزات سنگین در بیشتر نقاط دنیا معادن، پساب‌های صنعتی، کودهای شیمیایی و آفت‌کش‌ها می‌باشند. به منظور بررسی جذب سرب به وسیله گیاه زینتی بنفشه (*Viola tricolor*) و پاسخ‌های مورفولوژی و فیزیولوژی گیاه در برابر تنش فلز سنگین سرب، پژوهشی در خاک آلوده با سطوح مختلف سرب (شاهد، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) در قالب طرح کاملا تصادفی با پنج تکرار در گلخانه تحقیقاتی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران انجام گرفت. نتایج نشان داد با افزایش غلظت سرب در خاک، میزان آن در هر سه بخش شاخساره، ریشه و گل گیاه افزایش یافت و بیشترین تجمع سرب در ریشه به مقدار ۴۱/۲۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم مشاهده شد. آلودگی بالای سرب باعث کاهش وزن تر و خشک شاخساره و ریشه و طول ریشه نسبت به شاهد گردید. همچنین میزان آنتی اکسیدان کل و گلایسین‌بتائین به عنوان یک فاکتور دفاعی در برابر تنش، در غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سرب، به ترتیب به میزان ۶۱/۳ درصد و ۱۱۴/۲۳ میکرومول بر گرم وزن تر رسیدند. بر اساس نتایج حاصله، می‌توان گیاه زینتی بنفشه را به عنوان جاذب فلز سنگین سرب و متحمل تنش ناشی از آن در کشت فضای سبز شهری و صنعتی توصیه نمود.

واژه‌های کلیدی: آلاینده خاک، انباره سرب، تنش فلز سنگین، درصد آنتی اکسیدان، گلایسین بتائین.

مقدمه

عناصر سنگین که در نتیجه فعالیت‌های عمده شهری، صنعتی و کشاورزی تولید می‌شوند، باعث آلودگی مناطق وسیعی از جهان شده‌اند و با تجمع در زنجیره غذایی خطرات بسیاری برای انسان و جانوران بهمراه دارند (Amini *and Amirjani*, 2012). بر اساس گزارش‌های علمی، سرب مهم‌ترین و فراوان ترین فلز آلاینده در محیط زیست است. از جمله مهم‌ترین منابع آلاینده سرب می‌توان به فعالیت‌های معادن، صنایع، دود حاصل از فعالیت وسایل نقلیه، ترکیبات حاوی سرب مانند رنگ‌ها، گازوئیل و مواد منفجره اشاره کرد (Li *et al*., 2007). غلظت بحرانی سرب کل در خاک بین ۱۰۰ تا ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک گزارش شده است (Defoe *et al*., 2014). افزایش این فلز در محیط باعث اثراتی از قبیل اختلال در جوانه‌زنی دانه، اختلال در میتوز، القای کلروز و نکروز در برگ، کاهش فتوسنتز و تنفس، عدم توازن آبی و تغییر در تعادل هورمونی گیاه می‌شود. سرب همچنین منجر به توقف فعالیت‌های آنزیمی، اختلال در تغذیه معدنی و تغییر در نفوذپذیری غشا می‌گردد (Małkowski *et al*, 2002; Sharma and Dubey, 2005; Kim *et al*., 2002). فلز سرب عنصری ضروری برای گیاهان نمی‌باشد، با این حال، به راحتی توسط گیاهان از طریق خاک جذب می‌شود. با توجه به تحرک پایین این فلز، عموماً به مقدار زیاد در ریشه‌ها تجمع نموده و تنها بخش کمی از آن به شاخساره منتقل می‌شود (Patra *et al*., 2004). با توجه به فاکتور انتقال (نسبت غلظت فلز در شاخساره به غلظت آن در ریشه) می‌توان میزان انتقال سرب را به اندام هوایی محاسبه نمود، در صورتی که این نسبت بالاتر از یک باشد گیاه به عنوان یک بیش اندوز فلز مورد نظر شناخته می‌شود (Fayiga and Ma, 2006).

بنفشه از خانواده Violaceae، به عنوان گیاه پوششی برای گلدهی در اوایل بهار و به صورت گیاهان دائمی در فضای سبز شهری مورد کشت و کار قرار می‌گیرد. خانواده Violaceae دارای

*نویسنده مسئول: s_abolghasemi@ut.ac.ir

تعداد زیادی گونه با قابلیت زیستن در خاک های آلوده است که به دو دسته متالوفیت های اختیاری[1] و متالوفیت های اجباری[2] تقسیم می شوند (Liu *et al*., 2004). دانشمندان به منظور بررسی میزان جذب فلزات سنگین و مطالعه‌ی مکان ذخیره و انباشت این فلزات در اندام‌های ریشه و شاخساره، از دو گونه خانواده Violaceae، بنفشه‌های *V. tricolor* و *V. lutea* استفاده کردند. پس از کشت بنفشه‌ها در خاک آلوده، میزان عناصر خاک به طور چشم‌گیری کاهش یافت و در اندام‌های گیاهان افزوده شد و مشخص شد بخش Melanium از خانواده‌ی Violaceae حذف کننده و پالاینده‌ی فلزات سنگین به شمار می‌آیند (Herman *et al*., 2013). مطالعه‌ای بر روی بنفشه‌های رشد یافته و بومی منطقه‌ی دارای مقادیر بالای فلز روی که در گیاهان دیگر ایجاد سمیت داشت، انجام گرفت. با آزمایشات بیوشیمیایی و فیزیولوژی و بررسی دقیق دانه‌ی گرده مشخص شد این گیاهان متعلق به گونه‌ی *V. lutea* هستند،که احتمالا در شرایط تنش اکسیداتیو، در میوز آن‌ها اختلال ایجاد شده است و این گیاه به عنوان متالوفیت‌های خاک‌های آلوده به فلز روی معرفی شد (Hildebrandt *et al*., 2006). طی تحقیقاتی که در خاک‌های آلوده به سرب معادن اطراف کوه‌های کشور آلمان انجام گرفت، مقدار ۲۵۹ میلی‌گرم بر کیلوگرم عنصر سرب در بافت‌های بنفشه مشاهده شد (Banasova *et al*., 2006). در سال ۲۰۰۲ در غرب اروپا گونه های گیاهی مقاوم به خاک های اطراف معادن با غلظت بالای فلزات روی و سرب گزارش شد این گونه ها شامل *Dianthus carthusiano* , *Aemeria maritime* , *Silen vulgaris* , *Viola tricolor* بودند (Wierzbicka and Rostanski *et al*., 2002).

با گسترش شهرنشینی گیاهان زینتی یکی از مهمترین بخش‌های تزئینات مناطق شهری محسوب می‌شوند. فراوان بودن گونه‌های گیاهان زینتی، سریع الرشد بودن، زیباسازی محیط و مهم‌تر از آن، عدم ورود به زنجیره غذایی انسان موجب شده امروزه گیاهان زینتی به عنوان پالاینده‌های خاک‌ها و آب‌های آلوده مورد توجه قرار گیرند (Liu *et al*., 2008). پژوهش‌هایی در جهت شناسایی و کاربرد گیاهان متحمل و انباره فلزات سنگین به منظور گیاه پالایی و بهبود بخشیدن به ساختار خاک انجام گرفته است. نتایج مطالعه روشن‌فر و همکاران بر ظرفیت گیاه پالایی تاج خروس (*Amaranthus retroflexus*) نشان داد این گیاه قابلیت جداسازی و حذف فلزات سنگین روی، نیکل، کادمیوم و سرب را دارد و می‌توان با کاربرد تاج خروس فلزات سنگین موجود در خاک را بدون استفاده از مواد شیمیایی و صرف انرژی کمتر حذف نمود (Roshanfar *et al*., 2020). همچنین با کاربرد مواد شیمیایی تقویت‌کننده و کلیت‌کننده نظیر EDTA، این گیاه قادر است ۶۸۶/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم سرب را در ریشه خود ذخیره نماید (Amouei *et al*., 2012).

با توجه به مسئله آلودگی ناشی از فلزات سنگین از جمله سرب و خطرات ناشی از آن برای گیاهان و جانوران و از طرف دیگر امکان سنجی استفاده از گیاه بنفشه به عنوان گیاه زینتی و پوشش فضای سبز مناطق صنعتی و آلوده، این پژوهش با هدف بررسی میزان جذب و تجمع سرب در بخش‌های ریشه، برگ و گل بنفشه و پاسخ‌های مورفولوژی و فیزیولوژی آن در برابر تنش اکسیداتیو حاصل از سرب، انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

برای این تحقیق نشای بنفشه گونه *V. tricolor* رقم Blotch از خزانه استاندارد، واقع در شهرستان ورامین استان تهران با ارتفاع ۹۵۰ متر از سطح دریا، رطوبت نسبی حدود ۵۰ درصد، دما ۵-۱۰ درجه سانتی‌گراد، کشت شده در فروردین ۱۳۹۷، تهیه گردید. آزمایش گلخانه‌ای و برپایه‌ی طرح کاملا تصادفی در ۵ تکرار و سه واحد آزمایشی و کاربرد سه سطح شاهد، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از آلودگی فلز سنگین سرب به صورت نمک نیترات سرب ($Pb(NO_3)_2$)، در گلخانه علوم باغبانی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران در سال ۱۳۹۷ به اجرا در آمد؛ مقادیر نمک جهت آلودگی بستر کشت، بر اساس بررسی منابع و حدود بحرانی فلزات سنگین از یک سو (Kabata-Pendias and Pendias, 2001) و نیز عدم نیاز گیاهان به عناصر فوق و بروز تنش حتی در مقادیر کم انتخاب گردید. بستر کشت شامل خاک لوم و خاک برگ با نسبت ۱:۱ تهیه گردید. یک کیلوگرم بستر کشت به ازای هر گلدان یک و نیم کیلوگرمی، به دقت وزن شد و به ۱۵ گلدان مورد استفاده در آزمایش، اضافه شد، سپس با کاربرد نمک نیترات سرب آلوده گردید. بستر کاشت به طریق پاشش محلول نمک به لایه‌های خاک، آلوده گردید و سپس خاک‌های آلوده تا حد ظرفیت زراعی آبیاری شدند تا حد امکان برهمکنش‌های خاک و آلاینده تکوین یافته و شرایط آلودگی طبیعی‌تر شود. به منظور اطمینان از تعادل فلز خاک، دو ماه در این حالت نگهداری گردید (Huang *et al*., 2009). در این مرحله گیاهان در خاک‌های آلوده کشت شدند و به مدت ۹۰ روز تا مشاهده علائم سمیت در گیاه، نگهداری شدند و پس از طی این دوره، یادداشت‌برداری‌های مورفولوژیک انجام گرفت، سپس بخش‌های هوایی و ریشه گیاه از یکدیگر جدا و وزن‌های تر و خشک بخش هوایی و ریشه با ترازوی

1 facultative metallophytes

2 obligatory metalophytes

دیجیتال با دقت ۰/۱ (مدل BP2IID، آلمان)، طول ریشه با استفاده از کولیس، محتوای نسبی آب برگ با روش ترنر (Turner, 1981)، میزان پرولین با روش بتس (Bates and Waldren, 1973)، در هر واحد آزمایشی اندازه‌گیری شدند. سطح سه برگ از هر بوته با استفاده از نرم‌افزار آنالیز تصویر (ImageJ، نسخه 1.32J) اندازه‌گیری گردید. ظرفیت آنتی اکسیدانی به روش ابی و همکاران (Abe et al., 1998) از طریق خنثی کنندگی رادیکال آزاد (DPPH) (۱- ۱دی فنیل ۲ - پیکریل هیدرازین) تعیین گردید. ابتدا مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت تازه برگ با استفاده از نیتروژن مایع در هاون چینی کاملا ساییده شد، سپس به پودر حاصل ۴ میلی لیتر اتانول ۹۶٪ اضافه و کاملا هموژنیزه گردید، محلول حاصل به مدت ۱۰ دقیقه و در g ۳۵۰۰ سانتریوفیوژ شد. مقدار ۸۰ میکرولیتر از محلول استخراجی با ۱۰۰۰ میکرولیتر از DPPH محلول در اتانول (۰/۱ میلی‌مولار) مخلوط شد، سپس به مدت ۳۰ دقیقه در یک محفظه تاریک در دمای اتاق نگه داری گردید. نمونه شاهد و استاندارد به ترتیب شامل ۸۰ میکرولیتر حلال استخراج و ۱۰۰۰میکرولیتر محلول ۰/۱ نرمال (DPPH) بود. سپس میزان جذب استاندارد و نمونه ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۱۷ نانومتر تعیین گردید. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها به صورت درصد بازدارندگی(DPPH٪) با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید.

$$\%DPPH=[(A_{cont}-A_{samp})/(A_{cont})]*100 \quad \text{(رابطه ۱)}$$

%DPPH = درصد بازدارندگی رادیکال آزاد

A_{cont} = میزان جذب DPPH

A_{samp} = میزان جذب عصاره

نشت یونی با استفاده از روش لوتس و همکاران (Lutts *et al.*, 1996) اندزه‌گیری شد، از هر تیمار، شش برگ جدا شد و سپس ۰/۵ گرم برگ از نمونه‌های جدا شده به صورت قطعات یک سانتی‌مترمربع به لوله آزمایش حاوی ۱۵ میلی‌لیتر آب مقطر دوبار تقطیر منتقل شد و بلافاصله در دستگاه شیکر با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد و بعد از آن هدایت الکتریکی بخش مایع با استفاده از یک هدایت سنج الکتریکی اندازه گیری شد (EC_1). سپس، لوله‌های آزمایش حاوی برگ و آب مقطر به اتوکلاو با دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه منتقل شدند و پس از خنک شدن در دمای اتاق، هدایت الکتریکی (نشت یونی) کل آن اندازه گیری شد (EC_2). پس از آن، درصد نشت یونی از طریق فرمول زیر محاسبه گردید.

$$EC_1/EC_2 \times 100 = \text{درصد نشت یونی برگ} \quad \text{(رابطه ۲)}$$

میزان گلایسین بتائین به روش گریو و گراتان (Grieve and Grattan, 1983) اندازه‌گیری شد، ۰/۵ گرم از برگ به ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد و به مدت ۴۸ ساعت در مای ۲۵ درجه سانتی‌گراد بر روی شیکر قرار داده شد، در مرحله بعد یک میلی‌لیتر از عصاره گیاهی با یک میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۲ نرمال مخلوط و در حمام آب یخ قرار گرفت و نهایتا ۰/۲ میلی‌لیتر از یدید پتاسیم و ید را به مخلوط واکنش اضافه و مخلوط شد. نمونه‌ها با دور ۱۰۰۰۰ و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای صفر درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. مقدار جذب آن در ۳۶۵ نانومتر قرائت گردید و از طریق منحنی استاندارد و معادله خط اعداد قرائت شده به غلظت گلایسین بتائین در نمونه‌ها به صورت (میکروگرم در میلی لیتر) تبدیل شدند. با استفاده از رابطه زیر مقدار گلایسین بتائین بر حسب (میکرومول بر گرم وزن خشک) بیان گردید.

(رابطه ۳)

$$\mu mole\ GB\ g^{-1}\ F.W= [(\mu g\ GB\ ml^{-1} * ml\ Dichloroethane) / ۱۰۲\ \mu g\ \mu mole^{-1}] / [(g\ sample/۵)]$$

سپس غلظت عنصر سرب در اندام های شاخساره، ریشه و گل گیاه با استفاده از دستگاه Icp Mass[۱] (مدل Agilent 7500، آمریکا) در طول موج ۲۲۰/۳۵ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفت و سپس فاکتور انتقال سرب با استفاده از فرمول زیر، محاسبه گردید.

$$TF=C\ shoot / C\ root \quad \text{(رابطه ۴)}$$

C shoot/ C root نسبت غلظت فلز سنگین در شاخساره به غلظت فلز سنگین در ریشه است (Niu et al., 2007).

آنالیز آماری داده ها با استفاده از نرم افزار Minitab و SAS و آزمون دانکن انجام گرفت. تجزیه واریانس با ضریب اطمینان ۹۹ و ۹۵ درصد صورت گرفت و نمودارها با استفاده از نرم افزار اکسل ۲۰۱۳ رسم گردید.

نتایج و بحث

با توجه به نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) غلظت سرب در شاخساره، ریشه و گل بنفشه در سطح احتمال یک درصد معنی دار شد. با افزایش غلظت سرب در بستر کشت، غلظت آن در تمام اندام‌های شاخساره، ریشه و گل گیاه افزایش یافت.

در مطالعه‌ای جمعیت‌های بنفشه خودروی رشد یافته در خاک‌های آلوده به فلز سنگین سرب را مورد بررسی قرار دادند، نتایج نشان داد این گیاهان مورد بررسی سرب را نسبت به عناصر

---

۱ Inductively coupled plasma mass spectrometry

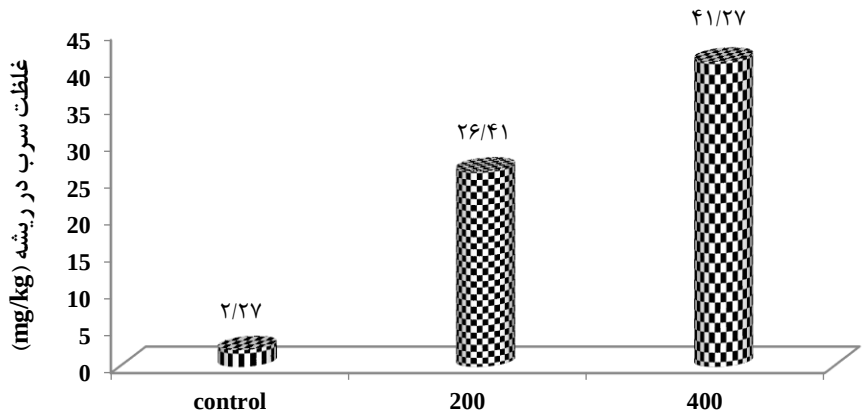
ضروری رشد، بیشتر جذب کرده و در اندام‌های خود ذخیره کرده‌اند (Reid and Hayes, 2003). نتایج تحقیقی که روی دو گونه بنفشه *V. tricolor* و *V. arvensis* در محیط کشت بافت و در معرض سطوح مختلفی از سرب و روی انجام گرفت، نشان داد جذب سرب ($Pb(NO_3)_2$) نسبت به روی ($Zn(SO_4)x7H_2O$)توسط بنفشه‌ها بیشتر است و گونه *V. arvensis*جذب بالاتری نسبت به ژنوتیپ *V. tricolor* دارد. در این پژوهش مشخص شد سرب در اندامک‌های واکوئل، دیواره سلولی، و در برخی سلول‌ها در سیتوپلاسم و هسته تجمع یافت. آن‌ها عنوان کردند که در برخی ژنوتیپ‌ها دیواره سلولی قادر است با افزایش جذب فسفر و پتاسیم و استفاده از این عناصر تحمل خود را در برابر تنش فلز سنگین بالا ببرند (Sychta *et al*., 2018). اولین سد دفاعی در گیاهان متحمل فلزات سنگین، دیواره سلولی است که وظیفه جداسازی این عناصر و جلوگیری از ورود آن‌ها به داخل سلول را دارد، دیواره سلولی از طریق نامحلول کردن فلزات سنگین نظیر سرب با اجزای دیواره سلولی، آن‌ها را بی حرکت می‌کند. پکتین‌ها و هموگالاکتزونازها نقش مهمی در ایجاد این اتصالات با فلزات سنگین دارند (Rabęda *et al*., 2015). دومین سد دفاعی در برابر فلزات سنگین در سلول‌ها واکوئل است که با سمیت زدایی و تجمع آن‌ها موجب حفاظت اندامک‌های حساس سلولی از جمله هسته، پلاستیدها و میتوکندری می‌شود. فلزات سنگین توسط پروتئین‌های متالوتیونئین[۱]ها، فیتوکلاتین[۲]ها و گلوتاتیون[۳] به داخل واکوئل انتقال می‌یابند (Ovecka and Takac, 2014).

بیشترین سرب تجمع یافته در هر سه اندام در تیمار ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم مشاهده شد به طوری که غلظت سرب در ریشه به میزان ۴۱/۲۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم، در شاخساره ۰/۶۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم و در گل ۰/۱۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم اندازه-گیری شد (شکل ۱ و ۲ و ۳). کمترین غلظت سرب در گیاهان شاهد (صفر میلی‌گرم بر کیلوگرم) مشاهده شد. در مقایسه سه اندام مورد مطالعه بنفشه تحت تنش سرب، ریشه بیشترین میزان تجمع سرب را نشان داد و کمترین آن در گل مشاهده شد. با وجود اینکه سرب یک عنصر ضروری برای گیاهان نمی‌باشد، با این وجود، به راحتی توسط گیاهان از خاک جذب شده و در ریشه تجمع یافته و تنها بخش کمی از آن به شاخساره منتقل می‌شود (Patra *et al*., 2004). دانشمندان گزارش دادند که مقدار سرب در بخش‌های مختلف گیاه به صورت ریشه > برگ > ساقه > گل‌آذین > بذر می‌باشد (Sharma and Dubey, 2005).

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس اثر تیمار سرب بر غلظت سرب در اندام های مختلف بنفشه

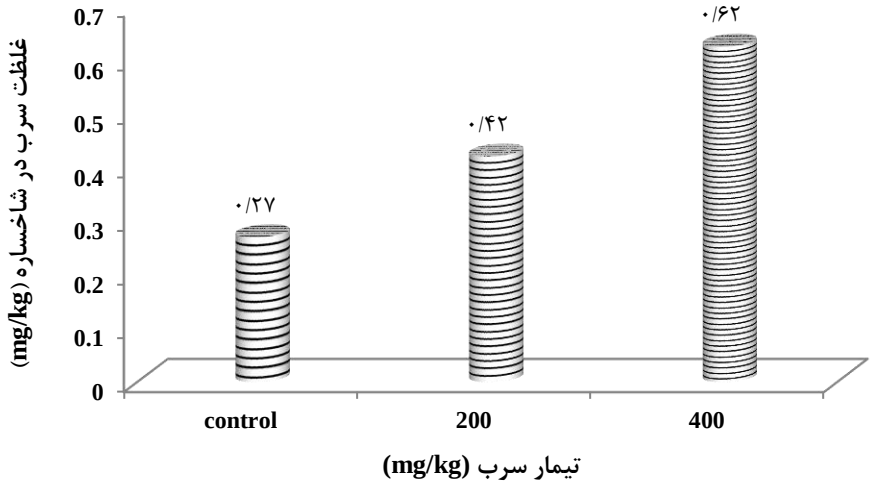
منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		شاخساره	ریشه	گل
تیمار سرب	۲	۰/۰۶۳^{ns}	۷۷۵/۰۳**	۰/۰۰۰۱۳**
خطا	۳	۰/۰۲	۰/۸۵	۰/۰۰۰۰۰۷
ضریب تغییرات	-	۷/۱	۱۰/۹	۱/۷

^{ns} ، * و **: به ترتیب غیرمعنی‌داری، معنی‌داری در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد.

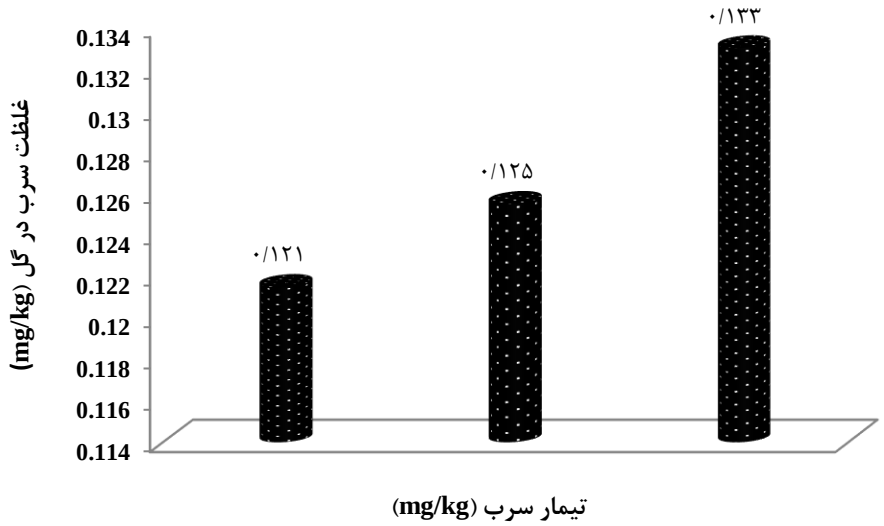


۱ Metallothionein
۲ Phytochelatin
۳ Glutathione

شکل ۱- غلظت سرب در ریشه گیاه بنفشه تحت تیمار سرب



شکل ۲- غلظت سرب در برگ گیاه بنفشه تحت تیمار سرب



شکل ۳- غلظت سرب در گل گیاه بنفشه تحت تیمار سرب

دلایل متعددی برای محدود شدن سرب در انتقال به شاخساره وجود دارد از جمله عدم تحرک سرب از طریق پکتین-های دارای بار منفی درون دیواره سلولی، رسوب سرب در فضای بین سلولی به صورت نمک‌های نامحلول (Małecka *et al.*, 2008)، تجمع در غشاء پلاسمایی (Jiang *et al.*, 2004)، تجزیه در واکوئل ریزودرمی و غشاء سلولی (Kopittke *et al.*, 2007)، محدود شدن مسیر آپوپلاستی از طریق نوار کاسپاری آندودرم ریشه، کاهش اثرات سرب از طریق سیستم‌های سمیت‌زدایی بخش اصلی آن در ریشه (Pourrut *et al.*, 2011). حرکت و جابه-جایی سرب از ریشه‌های موئین، توسط رویدادهای بیوشیمیایی و فیزیکی مانند باند شدن، غیر فعال شدن و ته نشینی، محدود می‌شود، برای مثال سرب با یون‌های اورتوفسفات موجود در هسته باند تشکیل داده و بی حرکت می‌شود (Tandler and Solari, 1969).

فاکتور انتقال سرب در بنفشه براساس تناسب بین مقدار سرب تجمع یافته در شاخساره به مقدار تجمع یافته آن در ریشه محاسبه شد و در هر دو غلظت (۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) فاکتور انتقال سرب ۰/۰۱۵ مشاهده شد، نتایج نشان می‌دهد سرب در اندام‌های گیاهی عنصر بی تحرک است که قابلیت انتقال آن به بخش هوایی بسیار اندک است و ذخیره آن در ریشه انجام گرفته و کمتر در شاخساره انباشت می‌شود. معدود گیاهانی شناخته شده‌اند که قادر به انتقال سرب از ریشه به اندام

هوایی خود هستند و به طور عمده گیاهان سرب را در سلول‌های ریشه ذخیره می‌کنند (Pachura *et al*, 2016). محققین دلیل انتقال کم سرب به اندام هوایی را این چنین بیان کردند که انتقال سرب به بخش‌های هوایی گیاه از طریق آوندهای چوب صورت می‌گیرد و عامل انتقال در این آوندها، شیب هیدرواستاتیک و شیب پتانسیل آب است. بنابراین با کاهش رشد گیاه، میزان تبخیر و تعرق کاهش و میزان انتقال در این آوندها نیز کاهش می‌یابد و انتقال سرب به بخش‌های هوایی گیاه دچار مشکل می‌شود (Amanifar et al., 2012). در پژوهشی، پنج گیاه با زیست توده زیاد و سه گیاه با زیست توده کم از جمله *V. baoshanensis* تحت تیمار سرب مورد ارزیابی قرار گرفتند، نتایج نشان داد که تمامی گیاهان مورد بررسی با زیست توده‌های متفاوت، سرب را بیشتر در بخش زیرزمینی خود تجمع می‌دهند (Zhuang *et al*., 2007).

نتایج تجزیه واریانس اثر سرب بر ویژگی‌های مورفولوژی و فیزیولوژی بنفشه ازجمله وزن تر و خشک شاخساره و سطح برگ، وزن تر و طول ریشه، درصد آنتی‌اکسیدان کل، نشت یونی و میزان گلایسین بتائین در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۲).

جدول۲. نتایج تجزیه واریانس اثر تیمار سرب بر ویژگی های موفولوژی و فیزیولوژی مورد مطالعه

		میانگین مربعات								
منابع تغییرات	درجه آزادی	وزن خشک شاخساره (gr)	سطح برگ (cm^2)	وزن تر ریشه (gr)	وزن خشک ریشه (gr)	طول ریشه (cm)	آنتی اکسیدان کل (٪)	نشت یونی (٪)	گلایسین بتائین (µmol/gr.dw)	پرولین (µmol/gr.fw)
تیمار سرب	۲	۰/۴۵**	۳۰/۸۴**	۲/۲۷**	۰/۰۳۸^{ns}	۱۴/۴۱*	۲۷۵/۲۵**	۱۵۴/۳۴**	۱۸۱۷**	۰/۰۱۲^{ns}
خطا	۳	۰/۰۰۵	۰/۸۶	۰/۱	۰/۰۱	۱/۳۲	۰/۵۲	۴/۴۷	۶۱/۷	۰/۰۰۶
ضریب تغییرات	-	۵/۰۵	۸/۳	۱۲/۲	۹/۶	۱۰/۱	۵/۴	۶/۹	۱۲/۵	۱۵/۷

^{ns}، * و **: به ترتیب غیرمعنی‌داری، معنی‌داری در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد.

وزن تر و خشک برگ و ریشه با افزایش غلظت سرب در خاک کاهش یافت به طوری که در تیمار ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سرب، وزن تر و خشک برگ به ترتیب ۳۳/۳ و ۶۶/۶ درصد و وزن تر و خشک ریشه به ترتیب ۴۷/۲ و ۹/۱ درصد نسبت به شاهد کاهش نشان دادند. همچنین طول ریشه در غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به میزان ۳۴/۶ درصد نسبت به شاهد کاهش داشت. از متداول‌ترین علائم سمیت سرب، بازدارندگی رشد اندام هوایی و ریشه می‌باشد (Huang *et al*., 2009)، همچنین تاثیر ساختمانی و فیزیولوژیکی متاثر از سمیت سرب موجب کاهش سرعت رشد و تقسیم سلول‌های ریشه به ویژه به دلیل اثر سوء سرب بر سلول‌های مریستمی دانست. از طرفی نیز سرب به دلیل تولید رادیکال‌های آزاد و ایجاد تنش اکسیداتیو، علاوه بر اثر سوء مستقیم به رشد و توسعه سلول در گیاه، به دلیل هم ظرفیت بودن با عناصر غذایی مانند آهن، مس، روی و منگنز، برای جذب توسط گیاه با این عناصر رقابت دارد که همین امر موجب کاهش جذب عناصر غذایی و در نتیجه کاهش مقدار و سرعت رشد در اندام هوایی و ریشه گیاه خواهد شد (Thamayanthi *et al*., 2011). یون سرب از تقسیمات سلولی و رشد سلول‌های ریشه در ناحیه مریستمی جلوگیری می‌کند. همچنین سرب تمایز زودرس و چوبی شدن دیواره سلول‌های واقع در منطقه رشد طولی ریشه را تحریک نموده و از رشد آن ممانعت می‌نمایند. کاهش جذب عناصری مانند کلسیم در حضور سرب، با توجه به نقش‌های فیزیولوژیکی که کلسیم در سلول‌های گیاهی دارد، می‌تواند از دلایل کاهش رشد گیاه و تولید ماده خشک محسوب شود (Rezanejad *et al*., 2017). از دلایل دیگری که محققان در این زمینه بیان کرده‌اند این است که فلزات سنگین به واسطه تحت تاثیر قرار دادن آنزیم‌های هیدرولیتیکی مانند آمیلاز که نشاسته را تبدیل به قند می‌کند، باعث می‌شوند مواد غذایی به ریشه و ساقه نرسد و در نتیجه طول آن‌ها محدود گردد (Kabir *et al*., 2008).

محتوای آنتی اکسیدان کل بنفشه‌های مورد مطالعه، تحت تیمار سرب افزایش نشان داد به طوری که در سطح ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سرب به ترتیب به میزان ۳۲/۳ و ۳۴/۶ درصد نسبت به شاهد افزایش داشت. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به مجموعه‌ای از ترکیبات مربوط می‌شود که توانایی حفظ سیستم-های بیولوژیکی در برابر اثرات مضر گونه‌های فعال اکسیژن و نیتروژن دارند. در واقع آنتی‌اکسیدان‌ها نقش مهمی در مهار گونه-های فعال اکسیژن و نیتروژن و جلوگیری از تشکیل آن‌ها ایفا می‌کنند (Singh *et al*., 2011). گیاهی که توانایی افزایش محتوای آنتی‌اکسیدانی خود را در برابر تنش‌ها داشته باشد شانس زنده ماندن بالاتری دارد، در نتیجه گیاه بنفشه تحت تیمار سرب با افزایش میزان آنتی اکسیدان کل تحمل خود را در برابر تنش اکسیداتیو، بالا برد.

نشت یونی با افزایش غلظت سرب خاک افزایش یافت

(جدول ۳)، که در گیاه شاهد ۲۱/۵ درصد، در گیاهان تحت تیمار ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سرب به ترتیب ۳۴/۴ و ۳۸/۳ درصد مشاهده شد. سرب و کادمیوم موجب تحریک تولید رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن (ROS [۱]) در گیاه می‌شود که این ترکیبات ممکن است به سلول‌های گیاهی آسیب وارد کند (Andra *et al*., 2010). ROS تولید شده موجب آسیب به غشاء سلولی شده و در ترکیب لیپیدهای غشای سلولی تغییراتی ایجاد می‌کند و به انتشار یون‌ها به بیرون از سلول منجر می‌شود (Singh and Agrawal, 2010). نشت یونی با پراکسیداسیون لیپیدها و تولید مالون‌دی‌آلدهاید ارتباط مستقیم دارد و با تخریب غشا توسط رادیکال‌های آزاد تولید شده تحت تنش اکسیداتیو، میزان نشت یونی نیز افزایش می‌یابد تا جایی که منجر به مرگ سلولی می‌شود (Pourakbar and Ebrahimzade, 2012). در این مطالعه نشت یونی در بنفشه مورد مطالعه تحت تیمار سطوح مختلف نیترات سرب افزایش یافت که مشخص شد این فلز ساختار و فعالیت غشای پلاسمایی را به سرعت تحت تأثیر قرار می‌دهد، با این وجود میزان افازیش نشت یونی به مقدار ناچیزی در این گیاه رخ داده است که نشان دهنده مقاومت آن در برابر تنش فلز سنگین سرب است.

کاربرد سرب موجب افزایش گلایسین بتائین در گیاه بنفشه شد (جدول ۳) و در سطح ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سرب بالاترین میزان گلایسین بتائین (میانگین ۱۱۴/۲۳ میکرومول بر گرم وزن تر) و کمترین آن در گیاه شاهد به میزان ۴۱/۱ میکرومول بر گرم وزن تر مشاهده شد. از پاسخ‌های گیاهان در برابر فلزات سنگین می‌توان تغییر فرآیندهای متابولیک گیاه و افزایش در تولید تنظیم‌کننده‌های اسمزی، آنتی اکسیدان‌ها و مواد محافظت‌کننده را نام برد (Seregin and Ivanov, 2001). گلایسین بتائین ($(CH_3)_3\ N + CH_2COO^-$) معمول‌ترین محلول آلی سازگار می‌باشد که در اکثر میکروارگانیسم‌ها، گیاهان و حیوانات وجود دارد و در میان ترکیبات آمونیوم شناخته شده است و جزء فراوان‌ترین ترکیب در گیاهان می‌باشد که به تنش پاسخ می‌دهد (Yang *et al*., 2003). این محلول از جمله اسموپروتکتانت‌هایی است که فاقد اثرات سمی بوده و قادر به محافظت گیاه در برابر انواع تنش‌ها مانند فلزات سنگین بوده و از طریق تنظیم اسمزی سلول، خنثی‌سازی سمیت انواع اکسیژن فعال، پایداری غشاء سلولی، کاهش آسیب سلولی و محافظت از آنزیم‌های مختلف، تحمل گیاه را به تنش افزایش داده و در شرایط تنش نقش تنظیم‌کننده اسمزی را ایفا می‌کند (Ashraf and Foolad, 2007). افزایش میزان گلایسین بتائین در بنفشه را می‌توان به عنوان فاکتوری در افزایش توان تحمل تنش در این گیاه در نظر گرفت.

جدول۳. نتایج مقایسه میانگین اثر سرب بر ویژگی‌های مورفولوژی و فیزیولوژی مورد مطالعه

تیمار سرب (mg/kg)	وزن خشک شاخساره (gr)	سطح برگ (cm^2)	وزن تر ریشه (gr)	وزن خشک ریشه (gr)	طول ریشه (cm)	آنتی اکسیدان کل (٪)	نشت یونی (٪)	گلایسین بتائین (µmol/gr.fw)
شاهد	۱/۹۶±۰/۰۹	۲۳/۰۶±۱/۱	۴/۵۱ ± ۰/۴	۱/۲ ± ۰/۱	۱۵/۰ ± ۰/۳	۴۰/۰۹± ۶/۰	۲۱/۵ ± ۳/۴	۴۱/۱ ± ۴/۷
۲۰۰	۱/۰۶±۰/۰۵	۱۸/۱۸±۱	۳/۳۵ ± ۰/۲	۰/۹۳ ± ۰	۱۳/۴ ± ۱/۶	۵۹/۳ ± ۰/۸	۳۴/۴ ±۰/۸	۶۲/۸ ± ۱۲/۵
۴۰۰	۱/۲۳±۰/۰۴	۱۵/۲۹±۰/۱	۲/۳۸ ± ۰/۳	۱/۰۹ ± ۰/۱	۹/۸ ± ۰/۹	۶۱/۳ ±۰/۶	۳۸/۳ ±۰/۷	۱۱۴/۲ ± ۲/۳

نتیجه گیری کلی

با توجه به گسترش آلودگی‌های خاک، شناخت و معرفی گیاهان جاذب و متحمل آلاینده های فلزی خاک ضروری است، سرب فلزی سمی برای محیط زیست موجودات زنده است و در این مطالعه منجر به تغییراتی در وزن اندام‌های گیاه بنفشه، نشت یونی و درصد آنتی اکسیدان کل آن شد، همچنین مشخص شد که بنفشه با افزایش میزان آنتی اکسیدان کل و میزان گلایسین بتائین تحمل خود را در برابر تنش فلز سنگین سرب بالا می‌برد. بنفشه گونه *V. tricolor* جزو گیاهان زینتی پر کاربرد در فضای سبز شهری تلقی می‌شود و با توجه به نتایج به دست آمده و تجمع میزان قابل توجهی از سرب در اندام‌های آن، می‌توان آن را به عنوان گیاه زینتی متحمل خاک‌های آلوده به فلز سنگین سرب و پوشش سبز مناطق صنعتی معرفی نمود و توصیه می‌شود از استفاده آن توسط موجودات زنده از جمله انسان و حیوانات جلوگیری شود.

سپاس‌گزاری

این مقاله بخشی از رساله دکتری با عنوان "ارزیابی مقاومت برخی ژنوتیپ‌های بنفشه تجاری و بومی ایران تحت تنش کادمیوم و سرب و بیان برخی ژن‌های مرتبط با آن" می‌باشد که با حمایت مالی پردیس کشاورزی دانشگاه تهران به انجام رسیده و بدینوسیله قدردانی می‌شود.

۱ Reactive Oxygen Species

"هیچ‌گونه تعارض منافع بین نویسندگان وجود ندارد"

REFERENCES

Abe, N., Murata, A. J. and Hirota. B. (1998). Novel DPPH radical scavengers, bisorbicillinol and demethyltrichodimerol, from a fungus. *Biotechnology and Biochemistry*, 62:661-666.

Amanifar, S., Aliasgharzad, N., Najafi, N., Oustan, S. and Bolandnazar, S. (2012). Effect of Arbuscular Mycorrhizal Fungi on Lead Phytoremediation by Sorghum *(Sorghum bicolor* L.). *Water and Soil Science*. 22:155-170. (In Farsi).

Amini, F. and Amirjani, M.R. (2012).The effect of nickel and lead treatment on chlorophyll content and accumulation of these metals in alfalfa plant (*Medicago sativa*). *Journal of Production and Processing of Agricultural and Garden Products*. 6: 11-19. (In Farsi).

Amouei, A. A., Naddafi, K. and Mahvi, A. H. (2012). The Effect of Chemical Additives on the Uptake and Accumulation of Pb and Cd in Native Plants of North of Iran. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*, 21(86): 116-124. (In Farsi).

Andra, S. S., Datta, R., Sarkar, D., Makris, K. C., Mullens, C. P., Sahi, S. V. and Bach, S. B. (2010). Synthesis of phytochelatins in vetiver grass upon lead exposure in the presence of phosphorus. *Plant and soil*, 326(1-2): 171-185.

Ashraf, M., and Foolad, M. (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and experimental botany*, 59:206-216.

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

Defoe, P. P., Hettiarachchi, G. M., Benedict, C. and Martin, S. (2014). Safety of gardening on lead-and arsenic contaminated brownfields. *Journal of Environmental Quality*. 43(6): 2064-2078.

Fayiga, A.Q., and Ma, L.Q. (2006). Using phosphate rock to immobilize metals in soils and

genetic tolerance. Environmental Exeriment of Botany. 52: 199-223.

Grieve, C., and Grattan, S. J. P. (1983). Rapid assay for determination of water soluble quaternary ammonium compounds. *soil*. 70:303-307.

Hildebrandt, U., Hoef-Emden, K., Backhausen, S., Bothe, H., Bożek, M. ,Siuta, A. and Kuta, E. (2006). The rare, endemic zinc violets of Central Europe originate from *Viola lutea* Huds. *Plant Systematics and Evolution.* 257:205-222.

Huang, Y., Ying, H. and Yunxia, L. (2009). Combined toxicity of copper and cadmium to six

increase arsenic uptake in Pteris vittata. Sci. *Science of the Total Environment*. 359: 17-25.

Jiang, X., Luo, Y., Liu, Q., Liu, S. and Zhao, Q. J. E. G. (2004). Effects of cadmium on nutrient uptake and translocation by Indian Mustard. *Health*, 26:319-324.

Kabata-Pendias, A. and Pendias, H. (2001). Trace elements in soils and plants–CRC Press. *Geoderma*, *122:143-149.*

Kabir, M., Iqbal, M. Z., Shafiq, M. and Farooqi, Z. R. (2008). Reduction in germination and seedling growth of *Thespesia populnea* L., caused by lead and cadmium treatments. *Botany*, 40(6): 2419-2426.

Kim, Y.-Y., Yang, Y.-Y., and Lee, Y. (2002). Pbn and Cd uptake in rice roots. *Physiologia Plantarum*, 116(3), 368-372.

Kopittke, P., Asher, C., Kopittke, R. and Menzies, N. (2007). Toxic effects of Pb2+ on growth of cowpea (*Vigna unguiculata*). *Environmental pollution*. 150: 280-287.

Li, Q., Yu, L.-j., Deng, Y., Li, W., Li, M.-t., and Cao, J.-h. (2007). Leaf epidermal characters of *Lonicera japonica* and *Lonicera confuse* and their ecology adaptation. *Journal of Forestry research*, 18(2). 103-108.

Liu, W., Shu, W. and Lan. C. (2004). *Viola baoshanensis*, a plant that hyperaccumulates cadmium. *Chinese Science Bulletin*, 49:29-32.

Liu, J. N., Zhou, Q. X., Sun, T., Ma, L. Q. and Wang, S. (2008). Growth responses of three ornamental plants to Cd and Cd–Pb stress and their metal accumulation characteristics. *hazardous materials*, 151(1): 261-267.

Lutts, S., Kinet, J.M. and Bouharmont, J. (1996). NaCl-induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. *Botany*, 78: 389-398.

Małecka, A., Piechalak, A., Morkunas, I. and Tomaszewska, B. (2008). Accumulation of lead in root cells of *Pisum sativum*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30(5): 629-637.

Małkowski, E., Kita, A., Galas, W., Karcz, W., and Kuperberg, J. M. (2002). Lead distribution in corn seedlings (*Zea mays* L.) and its effect on growth and the concentrations of potassium and calcium. *Plant Growth Regulation*, 37(1), 69-76

Niu, Z.-x., Sun, L.-n., Sun, T.-h., Li, Y.-s. and Hong, W. (2007). Evaluation of phytoextracting cadmium and lead by sunflower, ricinus, alfalfa and mustard in hydroponic culture. *environmental sciences*, 19:961-967.

Pachura, P., Ociepa-Kubicka, A., Skowron-Grabowska, B. J. D. and Treatment, W. (2016). Assessment of the availability of heavy metals to plants based on the translocation index and the bioaccumulation factor. *Water Treatment*. 57:1469-1477.

Patra, M., Bhowmik, N., Bandopadhyay, B. and Sharma, A. (2004). Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. *Environmental and Experimental Botany*. 52:199-223.

Pourakbar, L. and Ebrahimzadeh, N. (2012). Cultivation and physiological responses of *Zea mays* L to corn and nickel. *Journal of Applied Agricultural Research*. 3: 147-157.

Pourrut, B., Shahid, M., Dumat, C., Winterton, P. and Pinelli, E. (2011). Lead uptake, toxicity, and detoxification in plants. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. 213. 113-136.

Rabęda, I., Bilski, H., Mellerowicz, E. J., Napieralska, A. ,Suski, S. ,Woźny, A. and Krzesłowska, M. J. E. (2015). Colocalization of low-methylesterified pectins and Pb deposits in the apoplast of aspen roots exposed to lead. *Environmental pollution*, 205:315-326.

Reid, R. and Hayes. J. J. (2003). Mechanisms and control of nutrient uptake in plants. *International review of cytology*, 229:73-115.

Roshanfar, M., Khanlarian, M., Rashchi, F. and Motesharezadeh, B. (2020). Phyto-extraction of zinc, lead, nickel, and cadmium from a zinc leach residue. *Journal of Cleaner Production*, 121539.

Seregin, I. V. and Ivanov, V. B. (2001). Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants. *Plant physiology*, 48(4): 523-544.

Sharma, P. and Dubey. R. S. (2005). Lead toxicity in plants. *Brazilian plant physiology*, 17:35-52.

Singh, A., and Agrawal, M. (2010). Effects of municipal waste water irrigation on availability of heavy metals and morpho-physiological characteristics of *Beta vulgaris* L. *Environmental Biology*, 31(5): 727.

Singh, R., Gautam, N., Mishra, A. and Gupta, R. (2011). Heavy metals and living systems: An overview. *Indian journal of pharmacology*, 43(3): 246.

Sychta, K., Słomka, A. Suski, S. Fiedor, E. Gregoraszczuk, E. and Kuta. E. (2018). Suspended cells of metallicolous and nonmetallicolous Viola species tolerate, accumulate and detoxify zinc and lead. *Plant physiology and biochemistry*, 132:666-674.

Tandler, C. J., and Solari, A. J. (1969). Nucleolar orthophosphate ions: electron microscope and diffraction studies. *Cell Biology*, 41(1), 91-108.

Thamayanthi, D., Sharavanan, P. S. and Vijayaragavan, M. (2011). Effect of cadmium on seed germination, growth and pigments content of Zinnia plant. *Current Botany*. 40:145-157.

Turner, N. C. (1981). Techniques and experimental approaches for the measurement of plant water status. *Plant and soil*, *58*(1-3), 339-366.

ang, W. J., Rich, P. J., Axtell, J. D., Wood, K. V., Bonham, C. C., Ejeta, G. and Rhodes, D. (2003). Genotypic variation for glycinebetaine in sorghum. *Crop Science*, 43(1): 162-169.

Zhuang, P., Yang, Q. Wang, H. and Shu. W. (2007). Phytoextraction of heavy metals by eight plant species in the field. *Water, Air, and Soil Pollution*, 184:235-242.