

The Effect of Lead on the Regeneration and the Metal Accumulation in *Brassica Oleracea* Var. *Acephala* by *In Vitro* Culture

Omid Sadeghi¹, Mina Taghizadeh^{2*} and Mousa Solgi³

- 1- M.Sc. Graduate of Horticultural Science, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Arak University, Arak, Iran
- 2- ***Corresponding Author:** Assistant Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Arak University, Arak, Iran (m-taghizadeh@araku.ac.ir)
- 3- Assistant Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Arak University, Arak, Iran

Received: 9 January, 2018

Accepted: 26 September, 2018

Abstract

Background and Objectives

Among the major environmental pollutants, lead is the most substantial contaminant due to causing toxicity in plants and organisms. Recently, the remediation of these metals has been considered in plants. Plant *in vitro* culture is a key tool in phytoremediation research. In general, Plant tissue culture and *in vitro* selection techniques are used to increase the tolerance and the accumulation of heavy metals which have been reported in numerous plant species and populations. The application of ornamental plants for phytoremediation in metal-contaminated soil is a new alternative. Ornamental kale is an important bedding plant in many landscapes of cold temperate regions. The present study was aimed to evaluate the Pb resistance and remediation of *Brassica Oleracea* Var. *Acephala* affected by *in vitro* culture as a bedding plant. This experiment was carried out in 2016 at Arak University.

Materials and Methods

In this study, the stalk explants of *Brassica Oleracea* Var. *Acephala* was used for callus induction. Callus and plantlet were exposed to different concentrations of lead in the media. The Callus induction medium was MS (Murashige and Skoog) supplemented with 0.1 mgL⁻¹ 2,4-D and BA. The regeneration medium was MS medium supplemented with 0.5 mgL⁻¹ NAA in combination with 1 mgL⁻¹ BA. The rooting medium was half-strength MS medium without plant growth regulators and sucrose. All of the media containing 30 gL⁻¹ sucrose, 7 gL⁻¹ agar, and pH were adjusted to 5.8. All of the regeneration stages from callus induction to rooting and the acclimatization stages were done by different concentration of Pb(NO₃)₂ (0, 10, 25, and 50 mgL⁻¹). The traits, such as callus browning, fresh and dry weight, callus formation, survival rate, root and shoot length, leaf number, and the lead accumulation, were evaluated during various stages of callus regeneration and rooting in plantlets. A Completely Randomized Design (CRD) arrangement with three replications was used in this experiment. Data were analyzed using the ANOVA procedure of SAS statistical software (version 9.2).

Results

Based on the results, not only did different concentrations of lead not have the toxic effects but also they had a stimulation effect in some concentrations on callus growth and regeneration. Lead



concentrations increased leaf number and length of shoots in the regenerated ornamental kale. Lead accumulation in cultures was increased by increasing the concentration of lead in the medium at all stages of the regeneration. The highest accumulation of Pb was obtained 2395.7 ppb in callus treated by 25 mg L⁻¹ Pb in media.

Discussion

The results of the present study showed the occurrence probability of the somaclonal variation due to 2,4-D supplemented in the media. In the regenerated plant, results revealed that the growth traits and Pb uptake were affected by Pb concentrations. Some *in vitro* derived plantlets showed an increase in uptake potential of lead in their organs (6.1 to 2.7 times compared to the control) and that it is remarkable and suitable for phytoremediation studies.

Keywords: Callus, Heavy metals, Phytoremediation, Plantlet, Tissue culture

اثر سرب بر باززایی و تجمع فلزی *Brassica oleracea var. acephala* در شرایط کشت

درون شیشه‌ای

امید صادقی^۱، مینا تقی‌زاده^{۲*} و موسی سلگی^۳

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم باغبانی، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اراک، اراک، ایران

۲- *نویسنده مسئول: استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اراک، اراک، ایران (m-taghizadeh@araku.ac.ir)

۳- استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اراک، اراک، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۷/۰۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۱۹

چکیده

سرب به‌عنوان، مهم‌ترین ماده آلاینده به‌دلیل ایجاد سمیت در گیاهان و موجودات زنده اهمیت زیادی دارد. کشت درون شیشه‌ای گیاهی، به‌طور کلی یک ابزار کلیدی در تحقیقات گیاه‌پالایی می‌باشد. به‌همین منظور در پژوهشی در سال ۱۳۹۵ در دانشگاه اراک، غلظت‌های مختلف نیترات سرب (۵۰- صفر میلی‌گرم در لیتر) در طی مراحل مختلف باززایی کالوس و سازگاری گیاهچه‌های کلم زیتنی مورد بررسی قرار گرفت. پس از اعمال تیمارها صفاتی مانند میزان قهوه‌ای شدن و رشد کالوس، وزن تر، وزن خشک، کالوس‌زایی و میزان تجمع سرب مورد بررسی قرار گرفتند. در مرحله سازگاری تعداد برگ، طول ریشه و اندام هوایی، وزن تر، وزن خشک و میزان سرب تجمع‌یافته در گیاهچه‌ها اندازه‌گیری شد. بر اساس نتایج به‌دست آمده غلظت‌های مختلف سرب بر رشد کالوس‌ها اثر سمی نداشت و حتی در برخی غلظت‌ها رشد و باززایی نیز تحریک شد. اثر سرب بر گیاهچه‌های باززایی شده کلم زیتنی نشان داد که افزایش غلظت فلز سرب سبب تحریک تعداد برگ و طول اندام هوایی شد. میزان تجمع سرب در کشت‌ها در تمامی مراحل باززایی با افزایش غلظت سرب در محیط، افزایش یافت. گیاهچه‌های به‌دست آمده در این پژوهش به‌دلیل جذب و تجمع سرب قابل توجه در اندام‌های هوایی (۱/۶ تا ۷/۲ برابر نسبت به شاهد) در مطالعات گیاه‌پالایی مناسب و دارای اهمیت می‌باشند.

کلیدواژه‌ها: فلزات سنگین، کالوس، کشت بافت، گیاه‌پالایی، گیاهچه

مقدمه

با پیشرفت علم و تکنولوژی، انسان و دیگر موجودات زنده همواره در معرض خطرات زیست محیطی بیشتری قرار می‌گیرند و روز به روز بر آلودگی محیط‌زیست افزوده می‌شود (Tu et al., 2002). سرب، فلزی سنگین است که به‌عنوان شایع‌ترین منبع آلاینده محیط‌زیست ذکر گردیده است و آلودگی این فلز در گیاهان مناطق اطراف بزرگراه‌ها معمولاً از متوسط تا بسیار شدید گزارش شده است (Rahmani et al., 2000). به تازگی پالایش

این فلزات توسط گیاهان مورد توجه واقع شده است (Alkorta and Garbisu, 2001). سرب به‌عنوان، مهم‌ترین ماده آلاینده در جوامع صنعتی است و به دلیل ایجاد سمیت در گیاهان و موجودات زنده اهمیت زیادی دارد (Lone et al., 2008).

کشت بافت گیاهان نقش مهمی در تولید گیاهان زراعی و زینتی ایفا کرده و بستری مناسب برای دستکاری گیاهان در جهت بهبود عملکرد آن‌ها محسوب می‌گردد. به‌طور کلی کشت بافت گیاهی یک ابزار

می‌روند. این گیاه به‌طور کلی مقاومت زیادی نسبت به سرما و خشکی دارد به همین دلیل در بسیاری از شهرها به‌صورت زینتی همراه با گیاهان پوششی کاشته می‌شود (Karimi *et al.*, 2015). بنابراین در این پژوهش توان مقاومت و پالایندگی این گیاه ارزشمند نسبت به حضور غلظت‌های مختلف سرب در طی مراحل انگیزش و باززایی در شرایط درون شیشه‌ای مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در آزمایشگاه گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه اراک در سال ۱۳۹۴ به منظور بررسی اثر غلظت‌های مختلف فلز سرب در طی مراحل مختلف باززایی کلم زینتی در قالب سه آزمایش انجام شد. ابتدا گل آذین‌ها (به طول ۲-۱/۵ سانتی‌متر) که در اواسط اسفند از گیاهان مادری نمونه‌گیری شده بود در زیر آب جاری به مدت ۱۵ الی ۲۰ دقیقه مورد شستشوی اولیه قرار گرفتند. سپس مواد گیاهی با اتانول ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه و هیپوکلریت سدیم تجاری (وایتکس دارای پنج درصد ماده فعال) در غلظت ۲۰ درصد به مدت پنج دقیقه گندزدایی شدند. به منظور انگیزش کالوس از ریزنمونه‌های ساقه گل آذین کلم زینتی از محیط کشت MS به همراه ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر از تنظیم‌کننده‌های رشد BA، 2,4-D، و ۷ گرم در لیتر آگار استفاده شد. در آزمایش اول پس از سه هفته کالوس‌های انگیزش یافته به محیط کشت دارای غلظت‌های صفر، ۱۰، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر نترات سرب $Pb(NO_3)_2$ منتقل شدند. در آزمایش دوم کالوس‌ها در مرحله باززایی (محیط کشت دارای ترکیب هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و یک میلی‌گرم در لیتر BA) تحت تیمار نترات سرب $Pb(NO_3)_2$ در غلظت‌های صفر، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر قرار گرفتند. پس از کشت کالوس‌ها و مسدود کردن پتری‌دیش‌ها توسط پارافیلیم به اتاقک رشد دارای درجه حرارت ۲۴ درجه سانتی‌گراد و ۱۶ ساعت روشنایی منتقل شدند. در هر دو آزمایش پس از ۳۰ روز

کلیدی در پژوهش‌های گیاه‌پالایی می‌باشد. روش کشت بافت را می‌توان برای بررسی تحمل فلزات و با قرار دادن ریزنمونه‌های گیاهی در معرض محیط کشت دارای مقادیر شناخته‌شده از فلزات سنگین استفاده کرد. این تکنیک همچنین فرصت مطالعه اثر فلز در بیشتر گیاهان را دارد (Akhtar *et al.*, 2012; Ashwini *et al.*, 2014; Sharma *et al.*, 2014). یکی از راه‌های ممکن برای دست‌یافتن به تنوع سوماکلونال به‌منظور ایجاد تنوع، کشت درون شیشه‌ای گیاهان در سطح وسیع است که بدون دخالت زیاد در دستکاری ژنتیکی صورت می‌گیرد (Nehnevajova *et al.*, 2007). تنوع سوماکلونال می‌تواند تنوع ژنتیکی را در میان گیاهان باززایی‌شده افزایش دهد و باعث تغییر در صفات کمی و کیفی نیز شود. گزارش شده که تنوع سوماکلونال بر تغییر در صفات مرفولوژیکی در جمعیت گیاهانی که باززایی شده‌اند، مؤثر بوده است (Evans *et al.*, 1984). اغلب کشت درون شیشه‌ای گیاهان مانند کشت کالوس، سوسپانسیون سلولی و ریشه موئین در مطالعات گیاه‌پالایی به‌عنوان سیستم‌های مدل مورد استفاده قرار می‌گیرد. کشت‌های درون شیشه‌ای یک سری مزایایی در این مطالعات دارد که به پیش‌بینی دقیق توانایی متابولیکی سلول‌های گیاهی و توان آن‌ها در تحمل سم‌زدایی نسبت به فلزات سنگین کمک می‌کند. از مهم‌ترین مزایای ارزیابی‌های درون شیشه‌ای می‌توان به کاهش زمان و فضای مورد نیاز برای بررسی تحمل، سمیت‌زدایی و جذب فلزات سنگین بدون عوامل مداخله‌کننده از جمله میکروارگانیزم‌ها اشاره نمود (Doran, 2009). بر همین اساس در این پژوهش به بررسی توان مقاومت و جذب یکی از گیاهان زینتی و غیرخوراکی خانواده شب‌بو (از خانواده‌های مهم در زمینه گیاه‌پالایی) نسبت به فلز سرب در شرایط درون شیشه‌ای پرداخته شد. کلم زینتی با نام علمی *Brassica oleracea* var. *acephala* گیاهی یک‌ساله از تیره شب‌بو و از جنس کلم است (Ghahreman, 1993) و ارقام مختلف آن به دلیل مجموعه برگ‌های رنگارنگ آن در فضای سبز به کار

از روش تبدیل جذر لگاریتمی نرمال شدند. آزمون چند دامنه‌ای دانکن (DMRT) برای تعیین معنی‌دار بودن تفاوت آماری میانگین تیمارها انجام شد.

نتایج و بحث

آزمایش اول: اثر غلظت‌های مختلف فلز سرب بر کالوس‌ها در کشت درون شیشه‌ای کلم زینتی

نتایج تجزیه واریانس نشان‌دهنده آن بود که میزان رشد کالوس‌ها تحت تأثیر غلظت‌های مختلف این فلز قرار گرفت (جدول ۱) و میزان تجمع فلز در توده‌های کالوسی بر اساس غلظت‌های مختلف سرب در محیط متغیر بود به طوری که با افزایش غلظت سرب در محیط کشت میزان رشد کالوس نسبت به شاهد افزایش یافت. هرچند مقادیر جزئی قهوه‌ای شدن در برخی ریزنمونه‌ها کالوس‌ها مشاهده شد (شکل ۱) ولی در هیچ کدام از غلظت‌ها کالوس‌ها از بین نرفتند و به همین دلیل میزان قهوه‌ای شدن در اثر حضور غلظت‌های مختلف سرب معنی‌دار نشد. بیشترین میزان رشد و کالوس‌زایی در حضور ۱۰ میلی‌گرم در لیتر سرب در محیط کشت داشت. در حضور غلظت‌های مختلف سرب در محیط کشت علاوه بر افزایش وزن خشک، میزان تجمع سرب در کالوس نیز افزایش یافت. بیشترین میزان تجمع فلز سرب در حضور ۲۵ میلی‌گرم در لیتر با ۲۳۹۵/۷ پی‌پی‌بی و ۱۳۰ میلی‌گرم مشاهده داشت که نسبت به شاهد افزایش معنی‌دار و قابل توجهی بود (جدول ۲).

از شروع اعمال تیمارها صفاتی مانند قهوه‌ای شدن، میزان رشد کالوس از نظر قطر و کالوس‌زایی، وزن تر، وزن خشک، کالوس‌زایی، شاخساره‌زایی، ریشه‌زایی، جنین‌زایی و میزان تجمع سرب بررسی شد. کالوس‌زایی از روی کالوس‌های اولیه در تیمارهای مختلف بر اساس رتبه‌بندی بین اعداد ۱ تا ۵ انجام گرفت که عدد یک نشان‌دهنده کمترین و ۵ نشان‌دهنده بیشترین کالوس‌زایی بود. در آزمایش سوم اثر فلز سرب بر گیاهچه‌های باززایی شده در شرایط درون شیشه‌ای صورت گرفت. در این مرحله گیاهچه‌های باززایی شده ریشه‌دار به ظروف شیشه‌مربایی دارای پرلیت استریل و محیط کشت MS کاهش یافته به نیم غلظت پایه، بدون هورمون، ساکارز و آگار و غلظت‌های صفر، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر نترات سرب منتقل شدند. میزان زنده‌مانی، تعداد برگ، طول ریشه، طول اندام هوایی، وزن تر، وزن خشک و میزان سرب تجمع یافته در گیاهچه‌های باززایی شده در هفته چهارم پس از اعمال فلز سرب اندازه‌گیری شد. میزان تجمع سرب در هر سه مرحله از آزمایش با استفاده از دستگاه جذب اتمی مدل AA GBC932 محاسبه شد. هر سه آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و پنج مشاهده در هر تکرار انجام شد. تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها به منظور ارزیابی صفات مرفولوژیکی در مراحل مختلف آزمایش درون شیشه‌ای بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن و با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام گردید. داده‌های غیرنرمال با استفاده

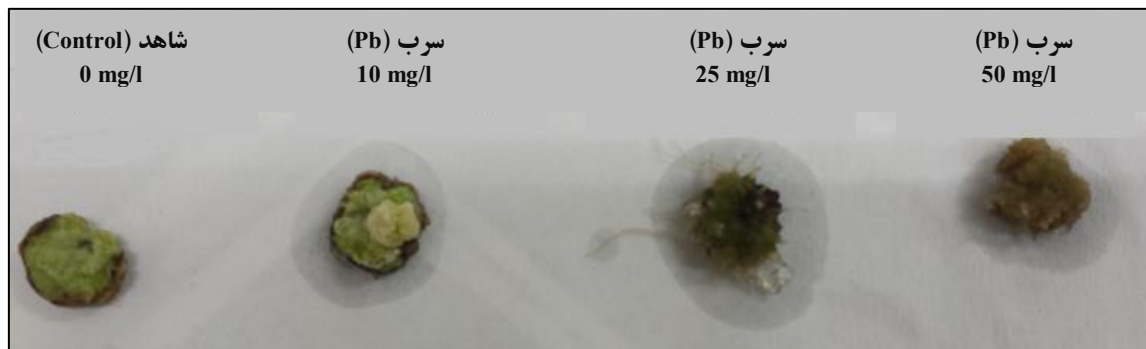
جدول ۱- تجزیه واریانس اثر غلظت‌های سرب بر کالوس‌زایی کلم زینتی در شرایط درون شیشه‌ای

Table 1. Variance analysis of lead concentrations on callusing ornamental kale in *in vitro* culture

میانگین مربعات (MS)						
تجمع سرب Pb accumulation	وزن خشک Dry weight	وزن تو Fresh weight	رتبه‌بندی Callus ranking	قطر کالوس Callus diameter	قهوه‌ای شدن Necrosis	درجه آزادی df
437.34*	0.001*	0.13 ^{ns}	2.77*	0.10*	0.82 ^{ns}	3
87.04	0.0003	0.07	0.41	0.01	0.18	8
24.43	15.59	22.5	29.79	8.88	29.31	

*: معنی‌دار در سطح ۵ درصد، ns: غیرمعنی‌دار می‌باشد.

*: Significant at 5%, ns: not significant.



شکل ۱- تأثیر غلظت‌های مختلف فلز سرب بر کالوس‌زایی کلم زینتی در شرایط درون شیشه‌ای

Figure 1. The effect of different lead concentrations on callusing ornamental kale in *in vitro* culture

جدول ۲- اثر غلظت‌های مختلف سرب بر صفات ارزیابی‌شده در مرحله استقرار کالوس کلم زینتی

Table 2. The effect of different lead concentrations on the traits evaluated ornamental kale callus at the establishment stage

غلظت سرب (میلی‌گرم در لیتر)	قطر کالوس (سانتی‌متر)	رتبه‌بندی کالوس	وزن خشک (گرم)	تجمع سرب (پی‌پی‌بی)
Pb concentration (mg/l)	Callus diameter (cm)	Callus ranking	Dry weight (g)	Pb accumulation (ppb)
0	1.2 ^b	1 ^c	0.09 ^b	400.3 ^b
10	1.55 ^a	3.33 ^a	0.09 ^b	1826.6 ^a
25	1.58 ^a	2 ^{bc}	0.13 ^a	2395.7 ^a
50	1.57 ^a	2.33 ^{ab}	0.13 ^a	1911 ^a

در هر ستون میانگین‌های دارای حرف مشترک اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد آزمون چند دامنه‌ای دانکن ندارند.

Values followed by the same letter were not significantly different at 5% level.

کشت برای رشد کالوس می‌باشد، که با نتایج این آزمایش مشابهت دارد. (Nehnevajova *et al.* (2007). در نتایجی مشابه بیان کردند، پژوهش‌هایی در مورد عدم اثرات مضر غلظت سرب در محیط کشت در شرایط درون شیشه‌ای وجود دارد، از جمله این پژوهش‌ها روی خردل هندی انجام شد، که با افزودن ۵۰ الی ۲۰۰ میلی مولار سرب به محیط کشت MS ممانعتی بر رشد کالوس و باززایی شاخساره‌های خردل هندی نسبت به شاهد نداشت. همچنین برخی محققین اظهار کردند، فلزات سنگین در غلظت‌های کم به دلیل اثر مثبت بر فعالیت آنزیم‌ها می‌توانند نقش تحریکی بر مراحل رشدی گیاهان مانند جوانه‌زنی دانه گرده داشته باشد (Sharafi, 1395).

آزمایش دوم: اثر غلظت فلز سرب در مرحله باززایی کالوس در کشت درون شیشه‌ای کلم زینتی

در طی این آزمایش صفات درون شیشه‌ای مانند قهوه‌ای شدن، ریشه‌زایی، شاخساره‌زایی، قطر کالوس و

بر اساس نتایج حاصل از اثر غلظت فلز سرب بر صفات ارزیابی‌شده در مرحله استقرار کالوس‌ها می‌توان گفت که رشد کالوس در تمامی غلظت‌ها نسبت به شاهد تحریک شد که بیشترین کیفیت در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد. همچنین میزان وزن خشک نیز با افزایش غلظت فلز سرب، نسبت به شاهد افزایش یافت. میزان تجمع سرب در تمامی غلظت‌های فلز سرب در محیط کشت نسبت به شاهد بیشتر بود، به گونه‌ای که میزان تجمع در کالوس در تیمارهای ۱۰ تا ۵۰ میلی‌گرم در لیتر ۴/۵ تا ۵/۹ پی‌پی‌ام اندازه‌گیری شد (جدول ۲).

بر اساس نتایج به دست آمده در این آزمایش سرب نه تنها اثر بازدارندگی بر رشد کالوس‌ها نداشت بلکه باعث تحریک در رشد نیز شد. همچنین غلظت‌های کم سرب در محیط کشت دارای ۴۰- صفر میلی‌گرم در لیتر اثر مثبت بر رشد برموداگرس در مرحله کالوس داشت، که احتمالاً نقش تحریکی سرب بیشتر به دلیل در دسترس قرار دادن عناصر غذایی و هورمون‌های موجود در محیط

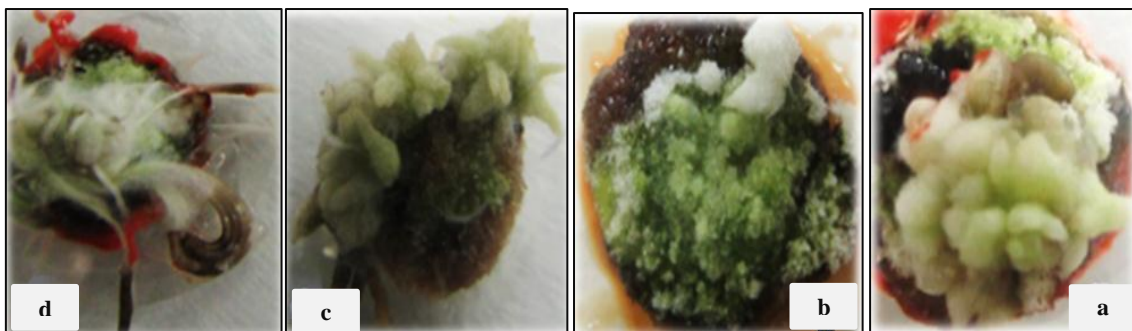
بیشتر به دلیل در دسترس قرار دادن عناصر غذایی و هورمون‌های موجود در محیط کشت برای رشد کالوس‌ها می‌باشد. تأثیر مثبت برخی از فلزات سنگین در محیط کشت بافت سایر گیاهان در منابع موجود است که با نتایج این آزمایش تشابهت دارد. برای مثال در کشت بافت گیاه آفتابگردان غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم در دسی مترمکعب $Pb(NO_3)_2$ اثر معنی داری در افزایش شاخساره‌های باززایی شده داشتند و غلظت‌های کم این نمک باعث تحریک ریشه‌زایی گردید (Strubinska and Sniezko, 2002). پژوهش‌هایی هم مبنی بر عدم اثر منفی غلظت‌های سرب محیط کشت در گیاهان درون شیشه‌ای وجود دارد. از جمله در خردل هندی افزودن ۵۰ الی ۲۰۰ میلی‌مولار سرب به محیط کشت MS ممانعتی در رشد کالوس و باززایی شاخساره‌ها شده نسبت به شاهد نشد (Nehnevajova et al., 2007). حساسیت گیاهان به فلزات سمی موجود در محیط بسیار متنوع است و در اغلب موارد حضور آن‌ها باعث کاهش رشد می‌گردد. عدم حساسیت گیاهان به برخی غلظت‌های فلزات سمی می‌تواند منعکس‌کننده در محدودیت جذب عناصر و یا سنتز یکسری ترکیبات مانند آنزیم‌ها، لیپیدها و یا کلات‌ها باشد که باعث نوعی ساز و کار سم‌زدایی سلولی می‌شود. بسته به نوع ماده و غلظت فلز این حساسیت بین گیاهان متفاوت است. محققین اعتقاد دارند که در طی مراحل کشت بافت گیاهان برخی از فلزات سنگین در غلظت‌های کم اثر مثبت در اندام‌زایی دارد (Fassler et al., 2010). نقش تحریکی فلزات را به عواملی نظیر تأثیر بر حلالیت یکسری از عناصر غذایی (آهن، منیزیم و فسفر)، فراهمی بیشتر آن‌ها برای گیاهان و اثر بازدارندگی بر سنتز اتیلن (مانند نقره) و تحریک در اندام‌زایی نسبت داده‌اند (Bojarczuk, 2004). در این آزمایش هم می‌توان چنین استنباط کرد که غلظت‌های کم سرب اثر تحریکی بر رشد داشت. هر چند نقش فیزیولوژیکی سرب در گیاهان شناخته نشده است اما Keaton (1937) بیان نمود که اگر سرب در گیاهان به عنوان عناصر غذایی نقش داشته باشند، نیاز گیاهان به این عنصر در حدود کمتر از دو نانوگرم در

کیفیت کالوس با حضور غلظت‌های مختلف سرب در طی مراحل باززایی کالوس‌ها مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۲). در این مرحله تنها اثر حضور سرب در محیط کشت بر میزان قهوه‌ای شدن و تجمع سرب در کالوس‌ها معنی‌دار بود (جدول ۳). نتایج حاصل از اثر غلظت‌های فلز سرب در مرحله باززایی بر صفات ارزیابی شده نشان‌دهنده آن بود که صفت قهوه‌ای شدن در هر دو غلظت ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر نسبت به شاهد دارای تفاوت معنی‌دار بود و حضور این فلز در محیط کشت باعث کاهش میزان قهوه‌ای شدن کالوس‌ها گردید ولی دو غلظت نسبت به یکدیگر تفاوت معنی‌داری نداشتند. میزان تجمع سرب در غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر نسبت به شاهد تفاوت معنی‌دار داشت ولی غلظت ۲۵ میلی‌گرم در لیتر نسبت به شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت به گونه‌ایکه بیشترین میزان تجمع سرب در کالوس‌ها در حضور ۵۰ میلی‌گرم در لیتر سرب با ۴۳۳۵ پی‌پی‌بی مشاهده شد (جدول ۴).

به‌طور کلی نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که میزان قهوه‌ای شدن کالوس‌ها در مرحله باززایی با افزایش غلظت فلز سرب کاهش یافت. همچنین میزان تجمع سرب با افزایش غلظت سرب نیز نسبت به شاهد افزایش یافت (جدول ۴). پس می‌توان این‌گونه نتیجه‌گیری کرد که کالوس‌های باززایی شده در این مرحله از آزمایش نسبت به غلظت‌های اعمال شده چندان حساس نبودند و در اثر افزایش غلظت سرب سمیت برای کالوس‌های در حال باززایی رخ نداد. (Ashwini et al. (2014 به گونه‌ای مشابه اثر سرب در شرایط کشت درون شیشه‌ای گیاه داتوره (*Lantana camara*) را مورد بررسی قرار دادند و توانستند لاین‌های درون شیشه‌ای متحمل به سرب را در محیط کشت دارای غلظت‌های یک تا ۵۰ میلی‌گرم در لیتر سرب به‌دست آورند. آن‌ها تحریک رشد گیاه این گیاه را در شرایط درون شیشه‌ای با افزایش غلظت فلز سرب گزارش کردند. در پژوهش مشابه دیگری Taghizadeh et al. (2015) اثر تحریکی سرب را مرحله کالوس گیاه چمن برموداگرس (*Cynodon dactylon* L.) تا غلظت ۴۰ میلی‌گرم در لیتر نشان دادند. احتمالاً نقش تحریکی سرب

کلم زینتی به تدریج به شرایط بیرون سازگار شدند و واکنش آن‌ها نسبت به تنش سرب مورد بررسی قرار گرفت. تفاوت در میزان رشد ظاهری گیاهچه‌ها در طی غلظت‌های مختلف سرب آشکار بود و تحریک رشد در حضور فلز سرب در بستر کشت مشاهده شد (شکل ۳).

گرم ماده خشک می‌باشد که این مقدار به‌طور قابل توجهی حتی کمتر از نیاز به عناصر ریزمغذی‌ها می‌باشد. **آزمایش سوم: اثر فلز سرب در مرحله سازگاری گیاهچه‌های باززایی شده در کشت درون شیشه‌ای کلم زینتی**
در این بخش از آزمایش گیاهچه‌های ریشه‌دار شده



شکل ۲- a: کالوس‌زایی مجدد b: قهوه‌ای شدن c: شاخساره‌زایی روی کالوس d: ریشه‌زایی روی کالوس در مرحله باززایی کالوس‌ها تحت تیمار فلز سرب

Figure 2. a: Re- callusing b: browning c: shoots the callus formation d: rooting on callus in callus regeneration stage during Pb treatment

جدول ۳- تجزیه واریانس اثر غلظت‌های سرب بر باززایی کالوس کلم زینتی در شرایط درون شیشه‌ای

Table 3. Variance analysis of lead concentrations on regeneration ornamental kale calli in *in vitro* culture

میانگین مربعات (MS)									
تجمع سرب Pb accumulation	وزن خشک Dry weight	وزن تر Fresh weight	رتبه‌بندی Callus ranking	قطر کالوس Callus diameter	شاخساره‌زایی Shooting	ریشه‌زایی Rooting	قهوه‌ای شدن Necrosis	درجه آزادی df	منابع تغییرات S.O.V.
991.63*	0.001 ^{ns}	0.47 ^{ns}	0.7 ^{ns}	0.037 ^{ns}	1.54 ^{ns}	0.36 ^{ns}	0.62*	2	غلظت سرب Pb concentration
130.7	0.001	0.14	0.16	0.01	0.9	0.17	0.055	6	خطا Error
23.64	30.82	27.97	24.28	9.17	10.3	32.3	12.73		ضریب تغییرات (درصد) C.V. (%)

*: Significant at 5%, ns :not significant.

*: معنی دار در سطح ۵ درصد، ns: غیرمعنی دار می‌باشد.

جدول ۴- اثر غلظت‌های مختلف فلز سرب بر باززایی کالوس‌ها در کشت درون شیشه‌ای کلم زینتی

Table 4. The effect of different Pb concentrations on callus regeneration of ornamental kale *in vitro* culture

تجمع سرب (پی‌پی‌بی) Pb accumulation (ppb)	قهوه‌ای شدن (درصد) Necrosis (%)	غلظت سرب (میلی‌گرم در لیتر) Pb concentrations (mg/l)
806 ^b	5 ^a	0
2794 ^{ab}	1.6 ^b	25
4335 ^a	2.6 ^b	50

در هر ستون میانگین‌های دارای حرف مشترک اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد آزمون چند دامنه‌ای دانکن ندارند.

Values followed by the same letter were not significantly different at 5% level.



شکل ۳- مراحل انتقال گیاهچه‌های باززایی شده به بستر پرلیت تحت تیمار سرب (۱) گیاهچه‌های باززایی شده در محیط کشت MS (۲) انتقال گیاهچه‌ها به پرلیت دارای محیط کشت تقلیل یافته MS و سرب (۳) گیاهچه‌های استقرار یافته تحت تنش سرب

Figure 3. The transferring stage of shoot regenerated to perlite treated with Pb 1) shoot regenerated in MS culture medium 2) plantlet transferring to MS reduced and Pb 3) Establishment plantlet under Pb stress

شاخص‌های رشدی گیاه آبی‌زی علف چشمه مانند تعداد برگ، طول ساقه، وزن تر و خشک در غلظت‌های کمتر از چهار میکرومولار گزارش شده است (Taghizadeh *et al.*, 2017). یکی از ویژگی‌های اساسی در گیاهان فرآیناباش (Hyperaccumulator) این است که گونه‌های گیاهی که معمولاً برای گیاه پالایی استفاده می‌شوند باید قادر به تولید زیست‌توده (Biomass) زیاد تحت تنش غلظت‌های مختلف فلزات باشد. در آزمایش انجام شده فلز سرب حتی با افزایش غلظت نه تنها باعث سمیت نشد بلکه باعث تحریک رشد نیز شد. به گونه‌ای مشابه در نتایج (Ashwini *et al.*, 2014) در طی ریزازدیادی گیاه داتوره تحت تنش فلز سرب گزارش کردند که شاخص تحمل رشد، نشان‌دهنده افزایش ۱۵۲ درصدی طول اندام هوایی با قرارگیری در محیط دارای یک میلی‌مول نیترات سرب بود. همچنین آن‌ها مشاهده کردند غلظت‌های مختلف نیترات سرب بر بازدارندگی رشد اندام هوایی مؤثر نبود. هر چند در مغایرت با نتایج این آزمایش در واکنش‌های برخی از گیاهان ذکر شده است که حضور فلز سرب در محیط باعث سمیت می‌شود (Alkorta and Garbisu, 2001; Sharma, 2009).

نتایج تجزیه واریانس مبنی بر معنی‌دار بودن اثر سرب بر صفات تعداد برگ، طول اندام هوایی، زنده‌مانی و وزن تر بود (جدول ۵). نتایج نشان داد که حضور فلز سرب در بستر کشت بر تعداد برگ گیاهچه‌ها معنی‌دار و در هر دو غلظت ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر سرب نسبت به شاهد افزایش تعداد برگ افزایش داشت. طول اندام هوایی در غلظت ۲۵ میلی‌گرم در لیتر نسبت به شاهد غیرمعنی‌دار بود، ولی این صفت در غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر نسبت به شاهد معنی‌دار بود و افزایش یافت. میزان زنده‌مانی و همچنین وزن تر در هر دو غلظت ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر نسبت به شاهد تفاوت معنی‌داری داشتند به گونه‌ای که میزان زنده‌مانی با افزایش غلظت سرب کاهش پیدا کرد ولی وزن تر گیاهچه‌ها با افزایش غلظت فلز سرب افزایش یافت. بیشترین میزان رشد گیاهچه‌های درون شیشه‌ای در غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر سرب مشاهده شد (جدول ۶ و شکل ۴). اثر غلظت‌های مختلف سرب بر سایر صفات نیز معنی‌دار نبود (جدول ۶).

همان‌گونه که در این نتایج این آزمایش مشاهده شد، اثرات تحریکی و عدم سمیت فلزات سنگین بر تحریک

جدول ۵- تجزیه واریانس اثر غلظت‌های سرب بر گیاهچه‌های کلم زینتی در مرحله سازگاری
Table 5. Variance analysis of lead concentrations on plant regenerated ornamental kale in acclimatization step

میانگین مربعات (MS)								منابع تغییرات S.O.V.
تجمع سرب Pb Accumulation	وزن خشک Dry weight	وزن تر Fresh weight	زنده‌مانی Surviving	طول ریشه Root length	ارتفاع ساقه shoot length	تعداد برگ Leaf number	درجه آزادی df	
499.26 ^{ns}	0.004 ^{ns}	0.052 ^{**}	1.25 ^{**}	0.16 ^{ns}	0.21 [*]	1.36 [*]	2	غلظت سرب Pb concentration
248.08	0.006	0.001	0.02	0.2	0.03	0.15	6	خطا Error
31.04	25.2	3.44	7.5	26.26	10.76	11.95		ضریب تغییرات (درصد) C.V. (%)

*: معنی دار در سطح یک درصد، *: معنی دار در سطح پنج درصد، ns: غیرمعنی دار می‌باشد.

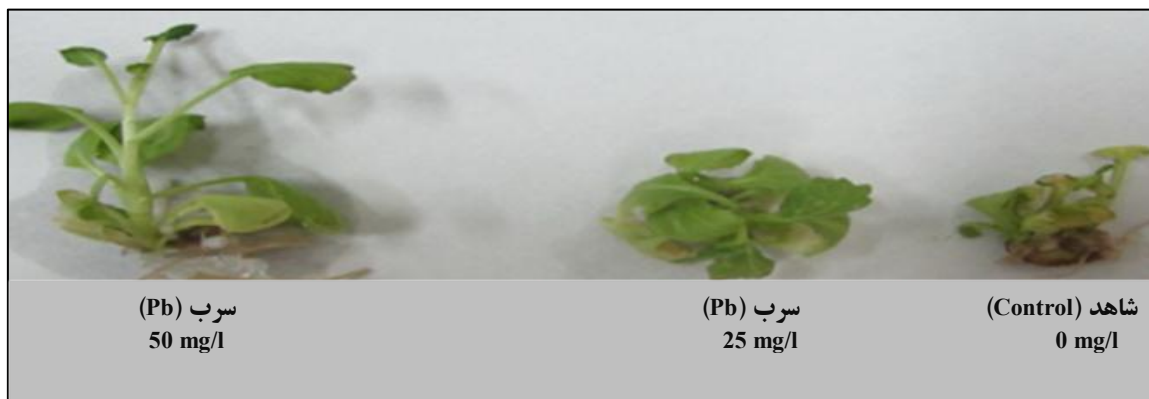
*: Significant at 5%, **: significant at 1%, ns :not significant.

جدول ۶- اثر غلظت‌های مختلف فلز سرب در مرحله گیاهچه‌های باززایی شده بر صفات ارزیابی شده
Table 6. The effect of different concentrations of lead in the shoot regenerated on evaluated traits

وزن تر (گرم) Fresh Weight (g)	زنده‌مانی (درصد) Surviving(%)	ارتفاع ساقه (سانتی‌متر) shoot length (cm)	تعداد برگ Leaf number	غلظت سرب (میلی‌گرم در لیتر) Pb concentrations (mg/l)
0.39 ^c	6.33 ^a	2.5 ^b	6 ^b	0
0.68 ^b	4.33 ^b	2.26 ^b	13 ^a	25
0.96 ^a	1.33 ^c	4.16 ^a	13 ^a	50

در هر ستون میانگین‌های دارای حرف مشترک اختلاف معنی دار در سطح پنج درصد آزمون چند دامنه‌ای دانکن ندارند.

Values followed by the same letter were not significantly different at 5% level.



شکل ۴- اثر غلظت‌های مختلف سرب بر گیاهچه‌های باززایی شده کلم زینتی تحت شرایط درون شیشه‌ای
Figure 4. The effect of different Pb concentrations on plant regenerated of ornamental kale in in vitro culture

باززایی شده تحت تیمار فلز سرب، میزان جذب سرب و زیست‌توده‌های گیاهچه‌های کلم زینتی به صورت مجزا نسبت به شاهد (با معیار ۱۰۰ درصد) مقایسه گردید (Nehnevajova et al., 2007; Taghizadeh et al., 2015). در این آزمایش نتایج نشان داد میزان جذب این فلز و

دلیل این تفاوت احتمالاً نشان‌دهنده تأثیر غلظت فلز و گونه گیاهی می‌باشد. با توجه به این که احتمالاً در اثر رخ دادن پدیده تنوع سوماکلونال، تفاوت در بین تک گیاهچه‌های ممکن است وجود داشته باشد و به منظور بررسی چگونگی پالایندگی گیاهچه‌های

تیمارهای تنش به دست آمده‌اند و همچنین جذب بالای از سرب در اندام‌های گیاهی (۱/۶ تا ۷/۲ برابر بیشتر نسبت به شاهد) نشان دادند (جدول ۷).

معمولاً برخی گیاهانی که از طریق کشت بافت بازرایی می‌شوند اغلب تغییرات فنوتیپی متفاوتی با فنوتیپ گیاه اصلی نشان می‌دهند، چنین تنوع به اصطلاح تنوع سوماکلونال گفته (Larkin and Scowcroft, 1988). دلایل تنوع سوماکلونال در طی مراحل بازرایی گیاهان بستگی به ژنوتیپ، سن، نوع ریزنمونه و مسیر بازرایی (اندام‌زایی یا جنین‌زایی) و همچنین استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی به ویژه توفوردی بوده دارد (Morcillo et al., 2006). Taghizadeh et al. (2010). به‌طور مشابهی دریافته‌اند که برخی از واریته‌های درون شیشه‌ای برموداگرس در شرایط درون شیشه‌ای ۲/۴ برابر زیست توده و ۱/۵ برابر جذب سرب بیشتری نسبت به شاهد داشتند. بر اساس نتایج آزمایش آن‌ها مسیرهای مختلف القایی همیشه باعث تجمع و جذب در برموداگرس نمی‌شوند. به احتمال زیاد وقوع تنوع سوماکلونال در اثر کاربرد تنظیم‌کننده رشد توفوردی در محیط MS به منظور القای کالوس و حضور فلز سنگین سرب در طی مسیر بازرایی کلم زینتی از عوامل مؤثر در این تنش می‌باشد که با نتایج سایر پژوهش‌ها همسواست (Al-Zahim et al., 1999; Nehnevajova et al., 2007;) (Najeeb et al., 2017; Taghizadeh et al., 2010).

ماده خشک تحت تأثیر غلظت‌های مختلف سرب قرار گرفته است. بیشترین میزان وزن خشک در هر دو غلظت مربوط به گیاهچه بازرایی شده در غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر و تیمار Pb501 که در حدود ۱/۶ برابر بیشتر از شاهد بود، مشاهده گردید. همچنین این گیاهچه میزان تجمع سرب آن ۲/۹ برابر بیشتر از شاهد بود. کمترین مقدار وزن خشک نیز در غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر و در گیاهچه تحت تیمار Pb502 با ۷۹/۲ بود که ۲۱ درصد زیست‌توده آن کمتر از شاهد به دست آمد، در صورتی که این گیاهچه بیشترین میزان تجمع سرب را در بین تمام گیاهچه‌ها داشت که نسبت به شاهد ۷/۲ بیشتر بود. کمترین میزان تجمع سرب نیز در گیاهچه Pb252 با ۹۲/۷ درصد مشاهده شد که این میزان نسبت به شاهد تقریباً هفت درصد کاهش داشت.

این بررسی نشان‌دهنده این است که کم یا زیاد بودن وزن خشک تأثیری در میزان تجمع سرب ندارد. البته این تنوع به دست آمده احتمالاً می‌تواند نشان‌دهنده تنوع سوماکلونال باشد که باعث تنوع در زیست‌توده و میزان تجمع سرب در بین گیاهچه‌های بازرایی شده باشد. بنابراین با توجه به دست آورد اعمال تنش سرب در طی مراحل بازرایی کلم زینتی، گیاهچه‌های Pb253، Pb251، Pb501، Pb502، Pb503 که احتمالاً می‌توان آن‌ها را لاین سوماکلونال نیز نامید، می‌توانند مناسب جهت اهداف پالایندگی سرب باشد. دلیل این انتخاب نیز می‌تواند این باشد که گیاهچه‌های ذکر شده در طی آزمایش تحت

جدول ۷- مقایسه نسبی گیاهچه‌های بازرایی شده مقاوم به سرب کلم زینتی در شرایط درون شیشه‌ای نسبت به شاهد

Table 7. Comparison of Pb tolerant plantlets of ornamental kale in with control *in vitro* condition

سرب تجمع شده (درصد) Pb accumulation (%)	وزن خشک (درصد) Dry weight (%)	گیاهچه بازرایی شده Plantlet regenerated
100	100	Control (0)
169.9	144	Pb ₂₅₁
92.7	112	Pb ₂₅₂
522.8	120	Pb ₂₅₃
296.7	168	Pb ₅₀₁
722.9	79.2	Pb ₅₀₂
181.8	103.2	Pb ₅₀₃

مقادیر وزن خشک و تجمع سرب گیاهچه‌های بازرایی شده نسبت به شاهد به صورت درصد می‌باشد.

Values of dry weight and Pb accumulation of regenerated plants were related to control plants (100%).

نتیجه گیری

در طی مراحل مختلف باززایی کالوس‌های کلم زیتنی که تحت تنش سرب قرار گرفته بودند، میزان تجمع سرب با افزایش غلظت سرب افزایش پیدا کرد. غلظت‌های اعمال شده سرب نه تنها باعث سمیت در مراحل کشت درون شیشه‌ای این گیاه نشد بلکه باعث تحریک رشد نیز گردید. حضور عواملی نظیر هورمون‌ها در محیط کشت به‌ویژه توفوردی و فلز سرب احتمالاً باعث رخ دادن تنوع سوماکلونال شد.

به‌طور کلی بر اساس نتایج به‌دست آمده غلظت‌های صفر الی ۵۰ میلی گرم در لیتر سرب باعث سمیت در کشت‌ها نشد و توانایی مقاومت در برابر این فلز را افزایش داد. میزان تولید ماده خشک و تجمع فلز سرب در بین گیاهچه‌های باززایی شده بسیار متنوع بود که این رخ داد

می‌تواند حاصل از وقوع تنوع سوماکلونال در طی مراحل باززایی کالوس‌ها باشد. حضور تنظیم‌کننده رشد توفوردی و غلظت‌های سمی فلز سرب نیز احتمالاً باعث افزایش تنوع میزان جذب و تجمع سرب در گیاهان باززایی شده است. این تنوع و تغییرات باعث بهبود در جذب فلز سرب و معرفی لاین‌های جدیدی شد که می‌توانند در زمینه گیاه‌پالایی مناسب و کارآمد باشند. البته بررسی نهایی در زمینه کارآمد بودن توانایی افزایش پالایندگی در روش انتخاب درون شیشه‌ای باید در شرایط مزرعه‌ای نیز صورت گیرد.

سپاس‌گزاری

بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه اراک که پشتیبانی مالی این طرح را در قالب پایان‌نامه کارشناسی ارشد تقبل نمودند سپاس‌گزاری می‌شود.

References

- Akhtar, S., Niaz, M., Sajid-ur-Rahman, M. Y. and Zaffar, M. (2012). Somaclonal variation for development of salt tolerance in selected wheat (*Triticum aestivum*) cultivars. *International Journal of Agriculture and Biology*, 14(4), 600-604.
- Alkorta, I. and Garbisu, C. (2001). Phytoremediation of organic contaminants. *Bioresource Technology*, 79(3), 273-276.
- Al-Zahim, M., Ford, B. and Newbury, H. (1999). Detection of somaclonal variation in garlic (*Allium sativum* L.) using RAPD and cytological analysis. *Plant cell Reports*, 18(6), 473-477.
- Ashwini, A., Waoo, S. and Sujata, G. (2014). Toxic effect of different lead concentrations on *in-vitro* culture of *Datura innoxia*. *Journal of Scientific and Innovative Research*, 3(5), 532-535.
- Bojarczuk, K. (2004). Effect of toxic metals on the development of poplar (*Populus tremula* L. × *P. alba* L.) cultured in vitro. *Polish Journal of Environmental Studies*, 13(2), 115-120.
- Doran, P. M. (2009). Application of Plant Tissue Cultures in Phytoremediation Research: Incentives and Limitations. *Biotechnology and Bioengineering*, 103(1), 60-76
- Evans, D. A., Sharp, W. R. and Medina-Filho, A. P. (1984). Somaclonal variation and gametoclonal variation. *American Journal of Botany*, 71(6), 759-774.
- Fassler, E., Evangelou, M. W., Robinson, B. H. and Schulin R. (2010). Effects of indole-3-acetic acid (IAA) on sunflower growth and heavy metal uptake in combination with ethylene diamine disuccinic acid (EDDS). *Chemosphere*, 80(8), 901-907.
- Ghahreman, A. (1993). *Plant systematic* (2 Vol.). Tehran: Tehran University Press. [In Farsi]

- Karimi, M., Taghizadeh, M., Sanati, M. H. and Solgi, M. (2015). *Effect of salicylic acid and variety on seed priming of ornamental cabbage (Brassica oleracea var. acephala) under heavy metal stress*. Second National Conference on conservation planning, environmental protection and sustainable development, Shahid Beheshti University, Tehran. [In Farsi]
- Keaton, C. M. (1937). The influence of lead compounds on the growth of barley. *Soil Science*, 43(6), 401-411.
- Larkin, P. J. and Scowcroft, W. R. (1988). Somaclonal variation- a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoretical and Applied Genetic*, 60, 197-214.
- Lone, M. I., Li, H., Zhen, P. J., Stoffella, E. and Yang, X. (2008). Phytoremediation of heavy metal polluted soils and water: Progresses and perspectives. *Journal of Zhejiang University Science*, 9(3), 210-220.
- Morcillo, F., Gagneur, C., Adam, H., Richard, F. Singh, R., Cheah, S. C., Rival, A. Duval, Y. and Tregear, J. W. (2006). Somaclonal variation in micropropagated oil palm: Characterisation two novel genes with enhanced expression in epigenetically abnormal cell lines and in response to auxin. *Tree Physiology*, 26(5), 585-594.
- Najeeb, U., Ahmad, W., Zia, M. H., Malik, Z., Zhou, W. (2017). Enhancing the lead phytostabilization in wetland plant *Juncus effusus* L. through somaclonal manipulation and EDTA enrichment. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, 3310-3317.
- Nehnevajova, E., Herzig, R., Erismann, K. H. and Schwitzguebel, J. P. (2007). In vitro breeding of *Brassica juncea* L. to enhance metal accumulation and extraction properties. *Plant Cell Report*, 26(4), 429-437.
- Rahmani, H. R., Kalbasi, M. S. and Haj, R. (2000). Plant pollution by lead from automobile around the some of Iran highways. *Journal of Environmental Studies*, 26(26), 76-83.
- Sharafi, Y. (2017). Effects of some heavy metals (Copper and Lead) on pollen germination and tube growth of some cherry (*Pruons avium*). *Plant Productions*, 39(4), 79-86.
- Sharma, S. (2009). Study on impact of heavy metal accumulation in *Brachythecium populeum* (Hedw.) *Ecological Indicators*, 9(4), 807-811.
- Sharma, S., Chatterjee, S., Datta, S., Mitra A., Vairale, M., Veer, V., Chourasia, A. and Gupta, D. K. (2014). In vitro selection of plants for the removal of toxic metals from contaminated soil: Role of genetic variation in phytoremediation. In D. K. Gupta, S. Chatterjee (Ed.), *Heavy metal remediation: Transport and accumulation in plants* (pp. 155-178). USA: Nova Science Publishers, Inc.
- Strubinska, J. and Snieszko, R. (2002). Lead tolerance and the interactive effects of lead and IAA on direct root regeneration in the sunflower. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 7:2002.
- Taghizadeh, M. (2010). *Assessment of turfgrass potential for Lead phytoremediation, In Vitroically Inducing and Molecular tracing*. Ph.D. Thesis of Horticultural Science, Tehran University, Tehran. [In Farsi]
- Taghizadeh, M., Kafi, M. and Fattahi Moghadam, M. R. (2015). Breeding by In vitro Culture to Improve Tolerance and Accumulation of Lead in *Cynodon Dactylon* L. *Journal Agriculture Science and Technology*, 17, 1851-1860.
- Taghizadeh, M., Mohtadi, A. and Asemaneh, T. (2017). Investigating of copper effect on growth and physiological characteristics of nasturtium officinale. *Plant Productions*, 39(4), 101-114.

Tu, C., Ma, L. Q. and Bondada, B. (2002). Arsenic accumulation in the hyperaccumulator chinese brake and its utilization potential for phytoremediation. *Journal Environmental Quality*, 31(5), 1671-1675.