

## مطالعه تاثیر کاربرد کود دامی بر گیاه پالایی رعنازیا (*Gaillardia grandiflora*) و جذب سرب از خاک

محمد جواد بهمن زادگان جهرمی<sup>۱</sup>، وحید عبدوسی<sup>۲\*</sup>، سعید سماوات<sup>۳</sup>، علی محمدی ترکاشوند<sup>۴</sup> و حمید مظفری<sup>۵</sup>

۱ و ۲. دانشجوی دکتری و استادیار، گروه علوم باغی و زراعی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۳. دانشیار، مؤسسه تحقیقات خاک و آب، کرج، ایران

۴. دانشیار، گروه علوم باغی و زراعی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۵. استادیار، گروه زراعت، واحد شهر قدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۱۶ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۴/۱۵)

### چکیده

به منظور بررسی اثر کاربرد کود دامی بر گیاه پالایی رعنازیا آزمایشی به صورت اسپلیت فاکتوریل بر پایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تکرار اجرا شد. فاکتور سال در کرت‌های اصلی و فاکتورهای سرب در چهار سطح (صفر، ۴۰، ۸۰ و ۱۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک) و فاکتور کاربرد کود دامی در سه سطح (صفر، ۲۵ و ۵۰ گرم بر کیلوگرم خاک) به صورت فاکتوریل در کرت‌های فرعی بودند. تنش اکسیداتیو ناشی از افزایش غلظت سرب در خاک باعث کاهش محتوای کلروفیل شد که در نهایت منجر به کاهش رشد و همچنین زیست‌توده گیاه گردید. با افزایش غلظت سرب در خاک فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز در برگ ابتدا افزایش و سپس کاهش یافت، در حالی که فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز به بالاترین مقدار در بیشترین میزان غلظت سرب در خاک افزایش یافت. استفاده از کود دامی با بهبود کلروفیل و در نهایت رشد گیاه، سمیت سرب را در گیاهان کاهش داد. کاربرد کود دامی با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی باعث کاهش پراکسیداسیون لیپیدهای غشا و پراکسید هیدروژن در گیاه شد و در نتیجه شدت تنش را در گیاهان رعنازیا کاهش داد. تیمار ۵۰ گرم بر کیلوگرم کود دامی تحت ۱۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سرب از بالاترین محتوای سرب اندام هوایی و ریشه به ترتیب با ۰/۷۲ و ۱/۹۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم پروردار بود و بالاترین محتوای پرولین برگ نیز در این تیمار حاصل شد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که تیمار کود دامی نقش امیدوارکننده‌ای در افزایش جذب سرب از خاک و کاهش اثرات سمی بر گیاه رعنازیا دارد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت، پرولین، زیست‌توده گیاه، عناصر سنگین، گیاه پالایی، مواد آلی.

## Study on effect of manure on phytoremediation of blanket flower (*Gaillardia grandiflora*) and soil lead uptake

Mohammad Javad Bahmanzadegan Jahromi<sup>1</sup>, Vahid Abdossi<sup>2\*</sup>, Saeed Samavat<sup>3</sup>, Ali Mohammadi Torkashvand<sup>4</sup> and Hamid Mozafari<sup>5</sup>

1, 2. Ph. D. Candidate and Assistant Professor, Department of Horticultural Science and Agronomy, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

3. Associate Professor, Soil and Water Research Institute, Karaj, Iran

4. Associate Professor, Department of Horticultural Science and Agronomy, Science and Research Branch, Tehran, Iran

5. Assistant Professor, Department of Agronomy, Shahr-e-Qods Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

(Received: Mar. 06, 2021- Accepted: July 06, 2021)

### ABSTRACT

In order to investigate the effect of farmyard manure application on phytoremediation of blanket flower a split factorial experiment based on a randomized complete blocks design with four replications was carried out. The factor year was in main plots and lead factors at four levels (0, 40, 80 and 120 mg/kg soil) and farmyard manure application at three levels (0, 25 and 50 g/kg soil) was in sub plots. Oxidative stress caused by increasing the concentration of lead in the soil reduced the chlorophyll content, which ultimately led to reduction of plant growth as well as plant biomass. With increasing of Pb concentration in soil, activities of catalase and peroxidase in leaves, first increased and then declined, while superoxide dismutase enzyme activity ascending up to highest level of Pb concentration. The application of farmyard manure by increasing the activity of antioxidant enzymes reduced the peroxidation of membrane lipids and hydrogen peroxide in the plant and thus reduced the intensity of stress in blanket flower. Application of farmyard manure increased the lead concentration in the roots and shoots of blanket flower, so that the the highest lead content of shoots and roots was founded in 50 g/kg of farmyard manure under 120 mg/kg of lead in rate of 0.72 and 1.96 mg/kg, respectively, and the highest leaf proline content was obtained in this treatment. So, it can be concluded that manure fertilizer play a promising role in increasing the Pb uptake and reducing its phytotoxicity on blanket flower.

**Keywords:** Antioxidant enzymes, biomass, heavy metals, organic matter, phytoremediation, proline.

\* Corresponding author E-mail: abdossi@yahoo.com

### مقدمه

مواد آلی به دلیل تأثیرات سازنده بر خصوصیات فیزیکی، شیمیایی و حاصلخیز خاک، به عنوان یکی از ارگان‌های مهم حاصلخیزی خاک شناخته می‌شوند (Yang *et al.*, 2018). کود دامی باعث افزایش خلل و فرج خاک و بهبود رشد و گسترش ریشه گیاه در خاک شده و باعث افزایش جذب و نگهداری آب و عناصر غذایی در گیاه می‌شود و بر اثر تامین عناصر ضروری از جمله نیتروژن موجب افزایش رشد و فتوسنتز گیاه می‌شود و در نتیجه عملکرد و ماده خشک گیاه افزایش می‌یابد (Blaise *et al.*, 2005). مقدار ماده آلی خاک در مناطق خشک و نیمه خشک که بیش از ۶۰ درصد زمین‌های کشاورزی ایران را تشکیل داده‌اند اغلب کمتر از یک درصد است (Nowkandeh *et al.*, 2018). به علاوه، جذب برخی از عناصر غذایی ضروری رشد گیاه در این مناطق به دلیل قلیایی بودن زیاد خاک مشکل است و باید کمبود آن از طریق مدیریت مناسب کودی و با استفاده از کودهای آلی جبران شود. با این حال، ویژگی‌های شیمیایی خاک از جمله میزان آلودگی خاک می‌تواند مواد مغذی موجود در خاک را تحت تأثیر قرار دهد (Mojdehi *et al.*, 2020). میزان ورود فلزات سنگین به زنجیره غذایی به ویژگی‌های خاک مانند pH، درصد رس و مواد آلی و همچنین میزان جذب به وسیله گیاهان بستگی دارد. در این میان، به نظر می‌رسد یافتن روش مناسب برای کاهش غلظت فلزات سنگین در خاک ضروری است، اگرچه در بسیاری از مناطق صنعتی، غلظت فلزات سنگین دائماً در حال افزایش است. قابل ذکر است که گیاهان اغلب می‌توانند با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی خود، سمیت فلزات سنگین را خنثی کنند، اما تأثیر همزمان فلزات سنگین یا غلظت زیاد آن‌ها ممکن است بر مکانیسم مقاومت گیاه در برابر فلزات سنگین تأثیر بگذارد (Bhaduri & Fulekar, 2012).

سرب یکی از آلاینده‌های سمی است که از طریق ریشه وارد گیاهان می‌شود و مکانیسم مورفولوژیکی، فیزیکی-بیوشیمیایی و مولکولی آن‌ها را تغییر می‌دهد (Zouari *et al.*, 2018). سطح بالای سرب همچنین باعث مهار فعالیت‌های آنزیمی، عدم تعادل آب، تغییر در نفوذپذیری غشا و اختلال در تغذیه مواد معدنی می‌شود

(Yadav, 2010). سرب با واکنش با گروه‌های سولفیدریل، فعالیت آنزیم‌ها را در سطح سلولی مهار می‌کند. به نظر می‌رسد یکی از اثرات سمیت شیمیایی سرب، ایجاد تنش اکسیداتیو در قسمت‌های در حال رشد گیاه به دلیل افزایش تولید گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر (ROS) و در نتیجه تغییر تعادل سلولی است (Yadav, 2010). تعدادی از گونه‌های فعال اکسیژن، از جمله آنیون سوپراکسید ( $O_2^{\cdot-}$ )، اکسیژن تکی ( $O_2^{\cdot}$ )، پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ ) و رادیکال هیدروکسیل ( $OH\cdot$ ) در طی متابولیسم اکسیداتیو طبیعی در ارگانسیم‌های هوازی تولید می‌شوند، اما این ROSها می‌توانند هنگامی که در مقادیر بیشتری تولید شوند، تهدید شدید باشند (Dugar & Bafna, 2013). اگرچه فرآیندهای تولید ROS در شرایط عادی کند هستند، اما سرب تولید آن‌ها را تسریع می‌کند (Dugar & Bafna, 2013). گونه‌های فعال اکسیژن تولید شده باعث ایجاد اثرات مضر مختلفی در سلول‌های گیاهی مانند مهار فعالیت فتوسنتز، مهار تولید ATP، پراکسیداسیون لیپیدها، پروتئین‌ها، اسیدهای آمینه و اسیدهای نوکلئیک می‌شود (Alamri *et al.*, 2018) که منجر به کاهش رشد و بهره‌وری گیاهان می‌شود. برای غلبه بر اثرات سوء تنش‌های غیرزیستی، گیاهان دارای سیستم‌های دفاعی مختلفی مانند آنتی‌اکسیدانی‌های آنزیمی و غیر آنزیمی هستند. سیستم آنتی‌اکسیدانی آنزیمی شامل سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، آسکوربات پراکسیداز (APX)، پراکسیداز (POX) و آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی (گلوکاتایون، آسکوربات) است که به طور مداوم ROSهای مضر را از بین می‌برند. همچنین برای مقابله با تنش اسمزی ناشی از تنش غیر زنده، گیاهان اسمولیت‌هایی مانند ترهالوز، پلیول‌ها (گلیسرول، اینوزیتول‌ها، سوربیتول‌ها و غیره)، اسیدهای آمینه (پرولین و گلیسین بتائین) را تجمع می‌دهند که وضعیت آب گیاه را به طور طبیعی حفظ می‌کنند (Alamri *et al.*, 2018). پراکسیداسیون لیپیدها وابسته به تولید رادیکال سوپراکسید است و در نتیجه تخریب غشاهای زیستی ماده‌ای به نام مالون‌دی‌آلدئید در سلولها افزایش می‌یابد. از طرفی اسید آمینه پرولین که از گلوتامات بوجود می‌آید نقشی کلیدی در تنظیم اسمزی، حفاظت آنزیمی،

سرب از خاک، آزمایشی در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه جهرم طی دو فصل رشد ۱۳۹۸ و ۱۳۹۹ صورت گرفت. آزمایش در قالب طرح اسپلیت فاکتوریل بر پایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تکرار اجرا شد که در هر سال ۴۸ گلدان برای انجام آزمایش مورد بررسی قرار گرفتند. تیمارهای آزمایشی شامل فاکتور سال در کرت‌های اصلی و فاکتورهای سرب در چهار سطح (صفر، ۴۰، ۸۰ و ۱۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک) و فاکتور کاربرد کود دامی در سه سطح (صفر، ۲۵ و ۵۰ گرم بر کیلوگرم خاک) به صورت فاکتوریل در کرت‌های فرعی بودند. لازم به ذکر است مقادیر محاسبه شده نمک فلز سرب به صورت نیترات سرب، قبل از اجرای آزمایش به صورت مخلوط و با استفاده از اسپری به خاک اضافه و با خاک مخلوط شد. برای برقراری تعادل به خاک به مدت سه هفته استراحت داده شد و در معرض تناوب‌های تر و خشک شدن قرار گرفتند تا حد ممکن واکنش‌های بین آلودگی و خاک رخ دهد و شرایط آلودگی به وضعیت طبیعی نزدیکتر شود، سپس داخل گلدان‌های پلاستیکی ۲ کیلوگرمی انتقال یافتند و قلمه‌های ریشه‌دار شده رعنازیا در اواسط اردیبهشت‌ماه در آن‌ها کاشته شدند. تیمارهای کود دامی از منبع کود گوسفندی قبل از کاشت با خاک مخلوط شدند. قبل از اجرای آزمایش، نمونه خاک و کود دامی جهت آنالیز برخی صفات فیزیکی و بیوشیمیایی به آزمایشگاه خاک ارسال شدند و در جدول ۱ نشان داده شدند. رطوبت خاک گلدان‌ها در تمام تیمارها در طول دوره رشد در محدوده ظرفیت زراعی مزرعه نگه داشته شدند.

#### اندازه‌گیری صفات

##### محتوای کلروفیل و کاروتنوئید

برای سنجش محتوای کلروفیل کل از روش Arnon (1996) استفاده شد. استخراج کلروفیل از برگ بالغ با کمک استون ۸۰ درصد انجام شد. انجام محاسبات طبق مقاله Ghaffari *et al.* (2019) صورت گرفت. همچنین محتوای کاروتنوئید براساس روش پیشنهادی Gross *et al.* (1991) اندازه‌گیری شد.

پایداری و بقاء ماشین سنتز پروتئین، تنظیم اسیدیته سلول و جمع‌آوری رادیکال‌های آزاد می‌کند (نسیم و دهیر، ۲۰۱۰). برخی از محققان بر این باورند که افزودن مواد آلی به عنوان اصلاح کننده خاک، یک روش معمول برای فراهمی فلزات سنگین در خاک‌های آلوده است. آن‌ها نشان دادند که اصلاح خاک‌های آلوده با مواد آلی فراهمی زیستی و تحرک فلزات سنگین را افزایش می‌دهد (Pizzeghello *et al.*, 2013; Chaab *et al.*, 2016). در حالی که دیگران نشان دادند که مواد آلی توانایی اتصال فلز به یون‌ها دارند و بنابراین می‌توانند برای تثبیت فلزات سنگین استفاده شوند (Chaab *et al.*, 2016). بنابراین، تأثیرات مواد آلی بر رفتار سرب در خاک و گیاه نیاز به بررسی بیشتری دارد.

کاشت گیاهان زینتی که دارای توانایی جذب و تجمع فلزات سنگین در اندام‌های خود هستند، در مناطق آلوده به فلزات سنگین و انتقال آن‌ها به مناطق دیگر پس از برداشت می‌تواند به مرور زمان سبب کاهش مقدار این فلزات در خاک شده و سبب پاکسازی محل‌های آلوده از این فلزات گردد (Riaz *et al.*, 2010). رعنازیا (*Gaillardia grandiflora*) یکی از زیباترین گیاهان زینتی از خانواده Asteraceae به شمار می‌آید و بومی مرکز و غرب آمریکا است. اکنون کشت آن به دلیل شباهت به گل داوودی و امکان کشت در تمام سال در حال گسترش است. رعنازیا دارای ارقام متنوعی است که بسیاری از ارقام آن برای مصارف زینتی پرورش داده شده‌اند (Gadagi *et al.*, 2004). در حال حاضر تصفیه خاک توسط گیاهان به یک فناوری موثر و مقرون به صرفه تبدیل شده است که برای استخراج یا حذف فلزات غیرفعال و آلاینده‌های فلزی از خاک آلوده استفاده می‌شود (Tangahu *et al.*, 2011).

از این رو هدف از این مطالعه بررسی توانایی پالایش فلز سنگین سرب توسط گیاه رعنازیا تحت کاربرد کود دامی در شرایط کشت گلدانی و بررسی خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی این گیاه تحت این شرایط می‌باشد.

#### مواد و روش‌ها

به‌منظور بررسی توانایی گیاه رعنازیا در گیاه پالایی

قرار گرفت و بعد از آن بلافاصله لوله‌ها در حمام آب یخ، سرد شدند. در نهایت میزان مالون‌دی‌آلدئید با اندازه‌گیری جذب در طول موج‌های ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر محاسبه شد.

#### سنجش پراکسید هیدروژن (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

سنجش پراکسید هیدروژن با استفاده از روش Velikova *et al.*, (2000) انجام گرفت. بافت برگ (۵۰۰ میلی‌گرم) در حمام یخ با ۳ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید ۰/۱ مولار سائیده شد. عصاره در سانتریفوژ با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه برای ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول بالای به ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی‌مولار (pH=7) و ۱ میلی‌لیتر یدور پتاسیم ۱ مولار اضافه شد و جذب در طول موج ۳۹۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده شد.

#### تهیه عصاره آنزیمی

برای تهیه عصاره آنزیمی، بافت تر (۱۰۰ میلی‌گرم) سائیده شد و سه میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی‌مولار (اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA) یک میلی‌مولار، فنیل متان سولفونیل فلورید (PMSF) یک میلی‌مولار و پلی وینیل پیرولیدون (PVP) یک درصد) اضافه شد. عصاره حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در سانتریفوژ با ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه قرار گرفت. از محلول رویی برای سنجش فعالیت آنزیم‌ها استفاده گردید (Nakano & Asada, 1981).

#### فعالیت آنزیم کاتالاز (EC 1.11.1.6)(CAT)

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از محاسبه کاهش جذب H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> و با روش Aebi (1984) انجام گرفت. میزان H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> موجود در مخلوط واکنش پس از یک دقیقه در طول موج ۲۴۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر محاسبه شد.

#### فعالیت آنزیم پراکسیداز (EC 1.11.1.7)(POX)

سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز با استفاده از گاپاکل صورت گرفت. میزان جذب تراگاپاکول (حاصل از

جدول ۱. برخی صفات فیزیکی و بیوشیمیایی خاک و کود دامی مورد استفاده در مطالعه.

Table 1. Some physical and biochemical properties of soil and farmyard manure used in the study.

Soil Texture	Soil (Sandy loam)	Manure fertilizer
Total N (%)	0.031	1.69
exchangeable P (mg kg <sup>-1</sup> )	12.5	170
exchangeable K (mg kg <sup>-1</sup> )	195	3812
Fe (mg kg <sup>-1</sup> )	2.05	5.73
Mn (mg kg <sup>-1</sup> )	3.30	3.67
Zn (mg kg <sup>-1</sup> )	1.16	9.5
Pb (mg kg <sup>-1</sup> )	BD*	3.04
Organic carbon (%)	0.28	25
pH	7.6	7.8
Electrical conductivity (dSm <sup>-1</sup> )	0.9	2

\* قابل اندازه‌گیری به وسیله دستگاه جذب اتمی نبود.

\*It could not be measured by an atomic absorption spectrometer.

#### محتوای پرولین

برای اندازه‌گیری محتوای پرولین برگ از روش Bates *et al.* (1973) استفاده شد. نمونه برگ (۲۰۰ میلی‌گرم) کوبیده و سپس ۱۰ میلی‌لیتر سولفوسالسیلیک اسید ۳ درصد به آن اضافه شد و از کاغذ صافی عبور داده شد. محلول رویی (۲ میلی‌لیتر) به ۲ میلی‌لیتر ناین هیدرین و ۲ میلی‌لیتر اسید گلاسیال استیک اضافه شد. محتوی حاصل بهم خورد و در حمام آب جوش در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت گذاشته شدند. سپس لوله‌های محتوی محلول در یخ قرار داده شدند، بعد به آن‌ها ۴ میلی‌لیتر تولوئن اضافه شد و به مدت ۲۰-۱۵ ثانیه بهم زده شدند. نمونه‌های حاصل در طول موج ۵۲۰ نانومتر با کمک دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت شدند.

#### تعیین پراکسیداسیون لیپیدهای غشا (MDA)

براساس روش Madhava & Sresty (2000) و با استفاده از اندازه‌گیری مالون‌دی‌آلدئید به عنوان فرآورده‌نهایی پراکسیداسیون لیپیدی غشا انجام گرفت. نمونه تر گیاهی (۰/۵ گرم) در ۵ میلی‌لیتر محلول تری کلرواستیک اسید (TCA) ۰/۵ درصد درون هاون ساییده شد. عصاره در سانتریفوژ با ۳۶۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت. سپس ۲ میلی‌لیتر از محلول رویی به ۲ میلی‌لیتر محلول TCA ۲۰ درصد حاوی ۰/۶۷ درصد تیوباربتوریک اسید (TBA) اضافه شد و مخلوط به دست آمده به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد در حمام آب گرم

کوبیدن از الک ۲ میلی‌متری عبور داده شدند. بدین منظور ۱۰ گرم از نمونه‌های خاک در ظروف مخصوص با ۲۰ میلی‌لیتر از محلول DTPA-TEA ترکیب و به مدت دو ساعت با دستگاه شیکر دورانی (با ۱۴۵ دور در دقیقه) به هم زده شدند. پس از سانتریفیوژ، نمونه‌ها از کاغذ صافی واتمن (شماره ۴۲) عبور داده شدند. سپس فلز موجود در عصاره‌ها به وسیله دستگاه جذب اتمی اندازه‌گیری شدند (Lindsay & Norvell, 1978).

### نتایج و بحث

#### محتوای کلروفیل و کارتنوئید و پرولین برگ

نتایج تجزیه واریانس محتوای کلروفیل و پرولین برگ به طور معنی‌داری تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی سرب و کود دامی قرار گرفتند و تنها محتوای پرولین تحت تاثیر برهمکنش دوگانه سرب × کود دامی قرار گرفت (جدول ۲). مقایسه میانگین محتوای کلروفیل نشان داد با افزایش غلظت سرب، محتوای کلروفیل گیاه رعنازیبا کاهش یافت و تیمار ۱۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سرب کاهش ۶۱ درصدی نسبت به تیمار عدم سرب نشان داد. در حالی‌که، کاربرد کود دامی باعث افزایش محتوای کلروفیل شد و کاربرد ۲۵ و ۵۰ گرم بر کیلوگرم کود دامی به ترتیب افزایش ۱۰ و ۲۲ درصدی نسبت به تیمار عدم کود دامی داشتند (جدول ۳). از سوی دیگر، با افزایش تیمارهای تنش سرب و کاربرد کود دامی محتوای پرولین برگ افزایش یافت. مقایسه میانگین بر همکنش سرب × کود دامی نشان داد بیشترین محتوای پرولین مربوط به کاربرد ۵۰ گرم بر کیلوگرم کود دامی تحت تیمار تنش ۱۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سرب (۷/۷۳ میکرومول بر گرم) بود که افزایش ۹۴ درصدی نسبت به تیمار شاهد (عدم سرب و عدم کاربرد کود دامی) نشان داد و کمترین محتوای پرولین نیز مربوط به تیمار شاهد (۳/۹۸ میکرومول بر گرم) بود (شکل ۱).

رنگدانه‌های کلروپلاست اجزای اصلی فتوسنتز هستند و مسئول تولید زیست توده در گیاهان هستند. با این حال، گیاهان تحت شرایط سرب بیوسنتز کلروفیل کل را کاهش داده و تخریب کلروفیل را افزایش می‌دهند (جدول ۲).

اکسید شدن گایاکول) در طول موج ۴۷۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر در لحظه شروع واکنش پس از اضافه نمودن عصاره آنزیمی و پس از یک دقیقه خوانده شد (Herzog & Fahimi 1973).

#### فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز (EC 1.15.1.1) (SOD)

سنجش فعالیت سوپراکسیددیسموتاز با روش Minami & Yoshikawa (1979) به دنبال مهار کاهش فتوشیمیایی ناشی از تترازولیوم نیتروبلو (NBT) تعیین شد. مخلوط واکنش شامل ۴۰ میلی‌مولار بافر فسفات پتاسیم (pH 7.8)، ۱۰ میلی‌مولار متیونین، ۳۳ میلی‌مولار NBT، ۳/۳ میلی‌مولار ریپوفلاوین، ۰/۶۶ میلی‌مولار EDTA و ۰/۱۷٪ عصاره آنزیمی در یک حجم نهایی ۳ میلی‌لیتری بود. مخلوط واکنش به مدت ۳۰ دقیقه در زیر لامپ فلورسنت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و میزان جذب در طول موج ۵۶۰ نانومتر با دستگاه اسپکتوفوتومتر اندازه‌گیری شد.

پس از برداشت بوته‌ها (اواسط شهریور ماه)، بخش‌های هوایی و ریشه‌ها تفکیک شدند و بلافاصله وزن تازه برگها (FW) با ترازوی دیجیتالی اندازه‌گیری شد و پس از آن جهت زدودن هرگونه آلودگی با آب مقطر شسته شدند. نمونه‌ها به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد درون آون خشک شدند و سپس توسط ترازوی دیجیتالی وزن شدند. به منظور تعیین محتوای سرب، نمونه‌های خشک (اندام هوایی و ریشه) پودر شدند. سپس نمونه‌های پودر شده‌ی اندام-های هوایی و ریشه (۰/۱ گرم) به مدت سه ساعت در کوره‌ای با دمای ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و سپس با ۱۰ میلی‌لیتر  $HNO_3$  یک مولار هضم شدند. محلول‌های حاصل پس از عبور از کاغذ صافی با آب مقطر به حجم ۲۵ میلی‌لیتر رسانده شدند و سپس محتوای سرب نمونه‌ها توسط دستگاه جذب اتمی قرائت شدند و برحسب میلی‌گرم بر کیلوگرم بیان شدند (Bankaji *et al.*, 2015). خاک برداشت شده از گلدان‌ها نیز در پایان آزمایش به سرعت در هوا خشک شدند و جهت تعیین محتوای سرب خاک پس از

جدول ۲. نتایج تجزیه واریانس اثر تنش سرب و کود دامی بر برخی صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی رعنازیا در سال‌های ۱۳۹۸ و ۱۳۹۹.

Table 2. Results of variance analysis effect of lead stress (Pb) and farmyard manure (FYM) on some physiological and biochemical traits of gaillardia during 2019 and 2020.

Source of variation	d.f	Mean of squares						
		chlorophyll	proline	Malondialdehyde	Hydrogen peroxide	Catalase	Peroxidase	Superoxide dismutase
Year (Y)	1	0.0001 <sup>ns</sup>	0.005 <sup>ns</sup>	15.87 <sup>ns</sup>	0.0001 <sup>ns</sup>	0.0004 <sup>ns</sup>	0.00001 <sup>ns</sup>	15.18 <sup>ns</sup>
Y(R)	3	0.0006	0.035	0.16	5.14	0.002	0.0002	5.04
Pb	3	0.532 <sup>***</sup>	24.35 <sup>***</sup>	189.33 <sup>***</sup>	267.89 <sup>***</sup>	0.388 <sup>***</sup>	0.0834 <sup>***</sup>	753.76 <sup>***</sup>
Y × Pb	3	0.0008 <sup>ns</sup>	0.030 <sup>ns</sup>	2.94 <sup>ns</sup>	0.71 <sup>ns</sup>	0.0001 <sup>ns</sup>	0.00001 <sup>ns</sup>	2.86 <sup>ns</sup>
FYM	2	0.048 <sup>***</sup>	5.91 <sup>**</sup>	32.04 <sup>***</sup>	90.34 <sup>***</sup>	0.017 <sup>***</sup>	0.0046 <sup>***</sup>	455.10 <sup>***</sup>
Y × FYM	2	0.0001 <sup>ns</sup>	0.005 <sup>ns</sup>	0.0001 <sup>ns</sup>	0.0001 <sup>ns</sup>	0.0001 <sup>ns</sup>	0.00001 <sup>ns</sup>	0.003 <sup>ns</sup>
Pb × FYM	6	0.001 <sup>ns</sup>	2.38 <sup>**</sup>	3.60 <sup>ns</sup>	10.19 <sup>*</sup>	0.001 <sup>ns</sup>	0.0003 <sup>*</sup>	420.93 <sup>*</sup>
Y × Pb × FYM	6	0.0003 <sup>ns</sup>	0.011 <sup>ns</sup>	1.18 <sup>ns</sup>	2.82 <sup>ns</sup>	0.0003 <sup>ns</sup>	0.00001 <sup>ns</sup>	1.10 <sup>ns</sup>
Error	66	0.001	0.022	1.84	2.99	0.001	0.0001	33.50
C.V (%)	-	5.63	2.56	3.52	6.40	4.43	8.19	6.89

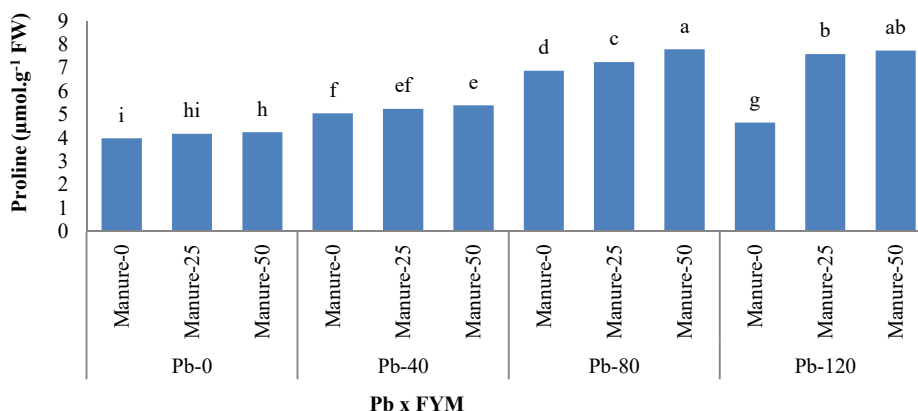
ns, \*, \*\*, \*\*\*: Non-significantly difference and significantly difference at 5, 1 and 0.001% of probability level, respectively.

جدول ۳. مقایسه میانگین اثر تنش سرب و کود دامی بر محتوای کلروفیل، مالون‌دی‌آلدئید و کاتالاز رعنازیا در سال‌های ۱۳۹۸ و ۱۳۹۹.

Table 3. Mean comparison effect of lead stress (Pb) and farmyard manure (M) on chlorophyll content, malondialdehyde and catalase of gaillardia during 2019 and 2020.

Treatments	Chlorophyll content (mg g <sup>-1</sup> FW)	Malondialdehyde (nmol g <sup>-1</sup> FW)	Catalase (Units g <sup>-1</sup> FW)
Pb levels (mg kg <sup>-1</sup> )			
0	0.76 <sup>a</sup>	24.27 <sup>d</sup>	0.44 <sup>d</sup>
40	0.70 <sup>b</sup>	33.94 <sup>c</sup>	0.52 <sup>c</sup>
80	0.47 <sup>c</sup>	42.44 <sup>b</sup>	0.84 <sup>a</sup>
120	0.30 <sup>d</sup>	53.83 <sup>a</sup>	0.67 <sup>b</sup>
Farmyard manure (g kg <sup>-1</sup> )			
0	0.50 <sup>c</sup>	39.79 <sup>a</sup>	0.58 <sup>c</sup>
25	0.55 <sup>b</sup>	39.02 <sup>a</sup>	0.62 <sup>b</sup>
50	0.61 <sup>a</sup>	37.05 <sup>b</sup>	0.65 <sup>a</sup>

در هر ستون میانگین‌هایی با حداقل یک حرف مشترک، در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌داری ندارند. In each column means followed by at least a common letter, are not significantly difference at 5% probability level.



شکل ۱. مقایسه میانگین اثر متقابل تنش سرب و کود دامی بر میزان پرولین برگ رعنازیا.

Figure 1. Mean comparison interaction effect of Pb stress and farmyard manure on proline content of gaillardia leaf.

کلروپلاست ناشی از ROS (Hadi, 2015)، یا به دلیل عدم تعادل در تامین مواد مغذی مانند منیزیم و آهن باشد (Alamri *et al.*, 2018). گزارش شده است که

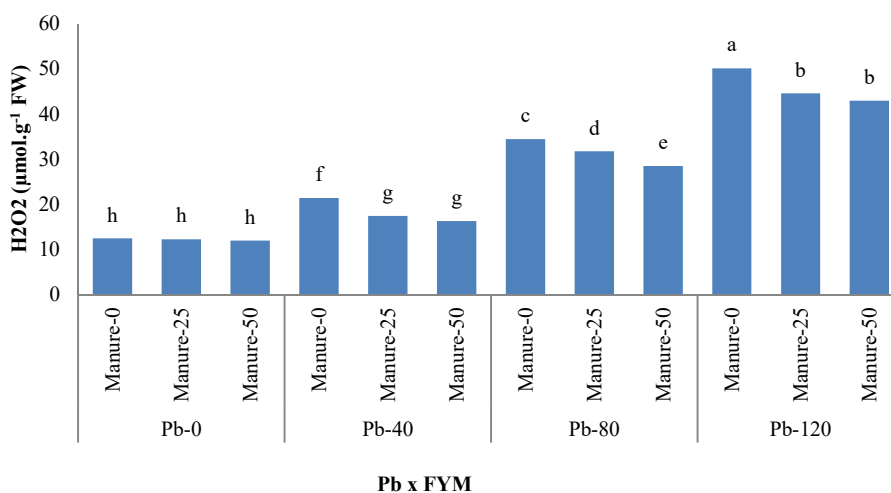
کاهش کلروفیل کل در گیاهان در معرض سرب ممکن است به دلیل تخریب کلروفیل با افزایش فعالیت کلروفیلاز، اختلال در حجم استرومای

جدول ۳ نشان می‌دهد با افزایش سطوح تنش سرب، غلظت مالون‌دی‌آلدئید افزایش یافت و تیمار ۱۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سرب، افزایش ۱۲۲ درصدی نسبت به تیمار عدم سرب نشان داد، با این حال کاربرد کود دامی در سطح ۵۰ گرم بر کیلوگرم باعث کاهش ۷ درصدی غلظت مالون‌دی‌آلدئید نسبت به تیمار عدم کود دامی شد (جدول ۳). مقایسه میانگین برهمکنش سرب × کود دامی بر غلظت پراکسید هیدروژن نشان داد بین سطوح کودی در تیمار عدم تنش سرب تفاوت معنی‌داری از لحاظ آماری وجود نداشت، در حالی‌که کاربرد کود دامی باعث کاهش غلظت پراکسید هیدروژن در سطوح ۴۰، ۸۰ و ۱۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سرب شد. بالاترین غلظت پراکسید هیدروژن مربوط به تیمار تنش ۱۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سرب و عدم کاربرد کود دامی (۵۰/۱۸ میکرومول بر گرم) بود که افزایش سه برابری نسبت به تیمار شاهد نشان داد (شکل ۲). بنابراین محتوای مالون‌دی‌آلدئید و پراکسید هیدروژن در گیاهان رعنازیبا به میزان قابل توجهی تحت تیمار سرب افزایش یافتند. تنش سرب تولید ROS را افزایش می‌دهد، که باعث ایجاد تنش اکسیداتیو شدید در سلول‌های گیاهی می‌شود. توانایی فلزات سنگین در آسیب‌رساندن به زنجیره انتقال الکترون و جریان  $K^+$  ممکن است از طریق تولید رادیکال‌های  $OH^-$ ،  $O_2^-$  و  $H_2O_2$  و در نهایت، پراکسیداسیون لیپیدها در گیاهان باشد.

پرولین در بسیاری از گونه‌های گیاهی وجود دارد و به طور معمول در پاسخ به سمیت فلزات در مقادیر زیادی تجمع می‌یابد (Ali *et al.*, 2017)، پرولین یک شاخص خوب تنش است و نقش مهمی در تنظیم اسمزی دارد و می‌تواند تا حدی شرایط لازم برای ادامه جذب آب از محیط ریشه را برای گیاه فراهم کند. به علاوه، این ماده با مهار رادیکال‌های آزاد و تشکیل کمپلکس‌های پرولین-سرب تحت شرایط تنش به پایداری ساختارهای زیر سلولی و محافظت از آنزیم‌ها کمک می‌کند (Ashraf & Foolad, 2007). از سوی دیگر، کاربرد کود دامی با کاهش آبخوبی نیتروژن در خاک و تامین بیشتر آن، افزایش دسترسی و کارایی بالاتر عناصر غذایی، تولید مواد محرک رشد و همچنین افزایش جمعیت میکروبی خاک منجر به افزایش سنتز و غلظت کلروفیل برگ شده است (Rahimi *et al.*, 2019). در واقع کود دامی به علت داشتن نیتروژن به ساخت ترکیبات حاوی نیتروژن مانند رنگدانه‌های فتوسنتزی و پرولین کمک می‌کند (Bayat & Belopukhov, 2019).

#### غلظت مالون‌دی‌آلدئید و پراکسید هیدروژن

تیمارهای سرب و کود دامی تاثیر معنی‌داری بر غلظت مالون‌دی‌آلدئید و پراکسید هیدروژن برگ داشتند و برهمکنش سرب × کود دامی تنها برای صفت پراکسید هیدروژن معنی‌دار بود (جدول ۲). مقایسه میانگین



شکل ۲. مقایسه میانگین اثر متقابل تنش سرب و کود دامی بر میزان پراکسید هیدروژن برگ رعنازیبا.

Figure 2. Mean comparison interaction effect of Pb stress and farmyard manure on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> of gaillardia leaf.

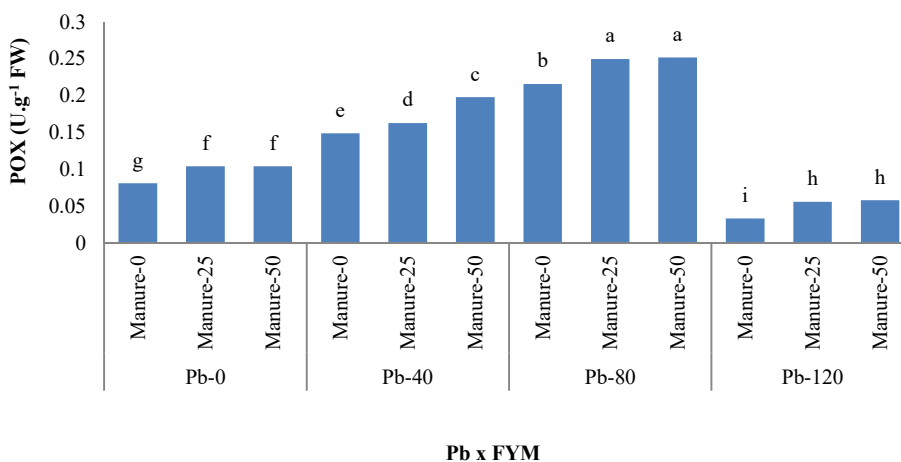
وجود بیشترین فعالیت این آنزیم مربوط به تیمار ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سرب بود که افزایش ۹۱ درصدی نسبت به تیمار عدم تنش سرب نشان داد. کاربرد ۲۵ و ۵۰ گرم بر کیلوگرم کود دامی نیز به ترتیب باعث افزایش ۷ و ۱۲ درصدی فعالیت آنزیم کاتالاز نسبت به تیمار عدم کود دامی شدند (جدول ۳). فعالیت آنزیم پراکسیداز با افزایش تیمار سرب در خاک تا سطح ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم افزایش یافت و بعد در سطح ۱۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سرب کاهش شدیدی نشان داد. بالاترین فعالیت آنزیم پراکسیداز مربوط به سطوح ۲۵ و ۵۰ گرم بر کیلوگرم کود دامی تحت تنش ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سرب بود که افزایش شش برابری نسبت به تیمار شاهد داشتند. پایین‌ترین فعالیت آنزیم پراکسیداز نیز مربوط به عدم کاربرد کود دامی تحت تنش ۱۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سرب بود که کاهش ۵۹ درصدی نسبت به تیمار شاهد داشت (شکل ۳).

فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز با افزایش تیمارهای سرب سیر صعودی داشت و کاربرد کود دامی در تمام سطوح تنش باعث افزایش فعالیت این آنزیم شد به طوری که سطوح ۲۵ و ۵۰ گرم بر کیلوگرم کود دامی تحت تیمار ۱۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سرب از بالاترین فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز برخوردار بودند و افزایش سه و نیم برابری نسبت به تیمار شاهد داشتند (شکل ۴).

بنابراین افزایش MDA افزایش تنش اکسیداتیو را نشان می‌دهد و شاید این ممکن است یکی از مکانیسم‌های احتمالی باشد که توسط آن سمیت ناشی از تنش سرب می‌تواند در بافت‌های گیاه ظاهر شود. سطح پراکسیداسیون لیپیدها از نظر MDA اندازه‌گیری می‌شود (Hu *et al.*, 2012). در حالی که کاربرد کود دامی از طریق تامین عناصر ضروری رشد و بهبود شرایط رشد و تولید پرولین در شرایط تنش در گیاه رعنازیا باعث کاهش تولید ROSها در گیاه شده است و از این طریق پراکسیداسیون لیپیدهای غشا را کاهش داده است. محتوای مالون‌دی‌آلدئید با کاربرد کودهای آلی در گیاهان گندم تحت تنش کروم کاهش یافت. این اثر ممکن است به دلیل کاهش آسیب غشا توسط جذب رادیکال‌های آزاد تحت مواد آلی باشد (Ali *et al.*, 2018). به طور مشابه Kaya *et al.* (2018) گزارش کردند که نفوذپذیری غشا تحت کاربرد مواد آلی در شرایط تنش بهبود یافت.

#### فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسید و سوپراکسیددیسموتاز برگ به‌طور معنی‌داری تحت تاثیر تیمارهای سرب و کود دامی قرار گرفتند، همچنین آنزیم‌های پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز تحت تاثیر برهمکنش سرب × کود دامی قرار گرفتند (جدول ۲). با افزایش تیمار تنش سرب، فعالیت آنزیم کاتالاز افزایش یافت، با این



شکل ۳. مقایسه میانگین اثر متقابل تنش سرب و کود دامی بر میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز برگ رعنازیا.  
Figure 3. Mean comparison interaction effect of Pb stress and farmyard manure on POX activity of gaillardia leaf.



حاوی آهن در ساختار خود می‌باشد، این افزایش فعالیت آنزیم‌ها احتمالاً ناشی از تامین این عناصر برای بیوسنتز این آنزیم‌ها باشد (Kumar *et al.*, 2010).

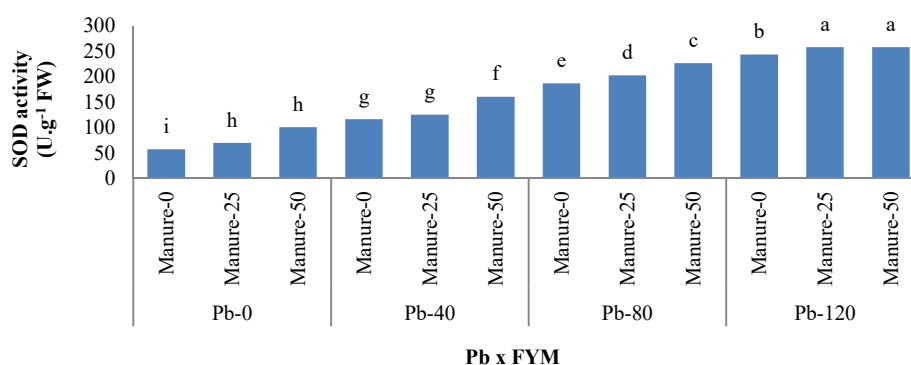
#### محتوای سرب

محتوای سرب اندام هوایی، ریشه و خاک به‌طور معنی‌داری تحت تاثیر تیمارهای سرب، کود دامی و برهمکنش سرب × کود دامی قرار گرفتند (جدول ۴). مقایسه میانگین برهمکنش سرب × کود دامی نشان داد با افزایش تیمار سرب، محتوای سرب اندام هوایی، ریشه و خاک افزایش یافت.

با این حال، محتوای سرب اندام هوایی و ریشه تحت کاربرد کود دامی بالاتر بود. تیمار ۵۰ گرم بر کیلوگرم کود دامی تحت ۱۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سرب از بالاترین محتوای سرب اندام هوایی و ریشه به ترتیب با ۰/۷۲ و ۱/۹۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم برخوردار بود (جدول ۶).

این نتایج برای محتوای سرب خاک برعکس بود به طوری که در تمام سطوح تنش، کاربرد کود دامی باعث کاهش محتوای سرب خاک شد. بیشترین محتوای سرب خاک مربوط به عدم کاربرد کود دامی تحت تنش ۱۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سرب با ۱۰۶/۹۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم بود (جدول ۵). نتایج ما به خوبی نشان داد که با افزایش غلظت سرب اعمال شده در سیستم خاک، جذب سرب افزایش می‌یابد. تجمع سرب در قسمت‌های مختلف گیاه با غلظت سرب در محیط رشد ارتباط دارد (Hu *et al.*, 2019).

مطالعه حاضر نشان می‌دهد که سمیت سرب منجر به تحریک برخی از آنزیم‌های اصلی سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی از جمله کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز در گیاه رعنازیبا شد. برای مقاومت در برابر آسیب اکسیداتیو، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و برخی متابولیت‌ها موجود در گیاهان، نقشی حیاتی دارند که منجر به سازگاری و بقای نهایی گیاهان در شرایط تنش می‌شود (Malar *et al.*, 2014). اگرچه نتایج متناقضی بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی تحت تاثیر تنش اکسیداتیو گزارش شده است، که این را می‌توان به تفاوت بین گونه‌ها، بافت‌های گیاهی مورد مطالعه و یا دوره قرار گرفتن در معرض فلز نسبت داد (Zouari *et al.*, 2018). سوپراکسید دیسموتاز اولین خط دفاعی در برابر تنش اکسیداتیو است و یون‌های سوپراکسید ( $O_2^-$ ) مضر تولید شده در سیتوزول و کلروپلاست را کاتالیز می‌کند و آن‌ها را به  $H_2O_2$  و مولکول‌های اکسیژن کم خطر تبدیل می‌کند. کاتالاز و پراکسیداز با تبدیل  $H_2O_2$  به آب ( $H_2O$ ) و مولکول‌های اکسیژن ( $O_2$ ) در سم‌زدایی بیشتر کمک می‌کنند (Usman *et al.*, 2020). هرچند فعالیت آنزیم کاتالاز و پراکسیداز تحت سطح بالای سرب کاهش یافتند، این کاهش می‌تواند در نتیجه غیر فعال شدن این آنزیم‌ها به دلیل برهمکنش مستقیم آن با یون‌های فلز و ROS و همچنین کاهش سنتز پروتئین این آنزیم‌ها نسبت داده شود (Li *et al.*, 2016). علاوه بر این، از آنجایی که کود دامی حاوی عناصر ریزمغذی از جمله آهن است و با دانستن اینکه این آنزیم‌ها به ویژه کاتالاز



شکل ۴. مقایسه میانگین اثر متقابل تنش سرب و کود دامی بر میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز برگ رعنازیبا.  
Figure 4. Mean comparison interaction effect of Pb stress and farmyard manure on SOD activity of Gaillardia leaf.

جدول ۴. نتایج تجزیه واریانس اثر تنش سرب و کود دامی بر محتوای سرب اندام هوایی، ریشه و خاک، ماده خشک اندام هوایی و ریشه رعنازیا در سال‌های ۱۳۹۸ و ۱۳۹۹.

Table 4. Results of variance analysis effect of lead stress (Pb) and farmyard manure (FYM) on Pb content in shoot, root and soil, shoot and root dry matter of gaillardia during 2019 and 2020.

Source of variation	df	Mean of squares				
		Pb shoot	Pb root	Pb soil	Shoot dry matter	Root dry matter
Year (Y)	1	0.0001 <sup>ns</sup>	0.013 <sup>ns</sup>	0.37 <sup>ns</sup>	0.059 <sup>ns</sup>	0.46 <sup>ns</sup>
Y(R)	3	0.0003	0.001	2.30	0.041	0.63
Pb	3	0.868 <sup>***</sup>	8.42 <sup>***</sup>	233.68 <sup>***</sup>	285.69 <sup>***</sup>	154.63 <sup>***</sup>
Y × Pb	3	0.0002 <sup>ns</sup>	0.016 <sup>ns</sup>	1.35 <sup>ns</sup>	0.02 <sup>ns</sup>	1.02 <sup>ns</sup>
M	2	0.059 <sup>***</sup>	0.233 <sup>***</sup>	67.88 <sup>***</sup>	64.64 <sup>**</sup>	4.22 <sup>**</sup>
Y × M	2	0.0001 <sup>ns</sup>	0.017 <sup>ns</sup>	1.47 <sup>ns</sup>	0.02 <sup>ns</sup>	0.68 <sup>ns</sup>
Pb × M	6	0.009 <sup>**</sup>	0.053 <sup>***</sup>	15.60 <sup>**</sup>	2.70 <sup>**</sup>	2.86 <sup>**</sup>
Y × Pb × FYM	6	0.0002 <sup>ns</sup>	0.009 <sup>ns</sup>	5.39 <sup>ns</sup>	0.02 <sup>ns</sup>	0.53 <sup>ns</sup>
Error	66	0.002	0.006	3.05	0.15	0.31
C.V (%)	-	12.36	6.13	3.55	4.33	8.87

ns, \*, \*\*, \*\*\*: Non-significantly difference and significantly difference at 5, 1 and 0.001% of probability level, respectively.

جدول ۵. مقایسه میانگین اثر متقابل تنش سرب و کود دامی بر محتوای سرب اندام هوایی، ریشه و خاک، ماده خشک اندام هوایی و ریشه رعنازیا در سال‌های ۱۳۹۸ و ۱۳۹۹.

Table 5. Mean comparison interaction effect of Pb stress and farmyard manure on Pb content in shoot, root and soil, shoot and root dry matter of gaillardia during 2019 and 2020.

Pb levels (mg kg <sup>-1</sup> )	Farmyard manure (g kg <sup>-1</sup> )	Pb shoot	Pb root	Pb soil	Shoot dry matter	Root dry matter
		(mg kg <sup>-1</sup> DW)			(g)	
0	0 (control)	BD*	BD	BD	12.29 <sup>c</sup>	7.64 <sup>c</sup>
	25	BD	BD	BD	14.84 <sup>b</sup>	10.29 <sup>ab</sup>
	50	BD	BD	BD	15.36 <sup>a</sup>	11.65 <sup>a</sup>
40	0	0.36 <sup>e</sup>	1.33 <sup>f</sup>	31.08 <sup>f</sup>	8.78 <sup>f</sup>	6.12 <sup>d</sup>
	25	0.45 <sup>ef</sup>	1.60 <sup>de</sup>	30.49 <sup>f</sup>	13.15 <sup>d</sup>	8.20 <sup>c</sup>
	50	0.49 <sup>de</sup>	1.57 <sup>f</sup>	29.05 <sup>e</sup>	13.80 <sup>c</sup>	9.59 <sup>b</sup>
80	0	0.43 <sup>f</sup>	1.47 <sup>c</sup>	67.78 <sup>d</sup>	3.19 <sup>g</sup>	4.45 <sup>c</sup>
	25	0.53 <sup>cd</sup>	1.77 <sup>b</sup>	63.09 <sup>c</sup>	7.46 <sup>e</sup>	5.55 <sup>d</sup>
	50	0.60 <sup>b</sup>	1.76 <sup>bc</sup>	62.03 <sup>c</sup>	7.87 <sup>e</sup>	5.87 <sup>d</sup>
120	0	0.53 <sup>cd</sup>	1.63 <sup>cd</sup>	106.98 <sup>a</sup>	2.60 <sup>g</sup>	1.06 <sup>e</sup>
	25	0.56 <sup>bc</sup>	1.88 <sup>ab</sup>	101.25 <sup>b</sup>	4.36 <sup>h</sup>	1.68 <sup>e</sup>
	50	0.72 <sup>a</sup>	1.96 <sup>a</sup>	98.63 <sup>bc</sup>	4.32 <sup>h</sup>	2.84 <sup>f</sup>

در هر ستون میانگین‌هایی با حداقل یک حرف مشترک، در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.  
\* قابل اندازه‌گیری به وسیله دستگاه جذب اتمی نبود.

In each column means followed by at least a common letter, are not significantly different at 5% probability level.

\* It could not be measured by an atomic absorption spectrometer.

جدول ۶. مقایسه میانگین برهمکنش اثرات تنش سرب و کود دامی بر محتوای سرب اندام هوایی، ریشه و خاک، ماده خشک اندام هوایی و ریشه رعنازیا در سال‌های ۱۳۹۸ و ۱۳۹۹.

Table 6. Mean comparison interaction effect of lead stress (Pb) and farmyard manure (FYM) on Pb content in shoot, root and soil, shoot and root dry matter of gaillardia during 2019 and 2020.

Pb levels (mg kg <sup>-1</sup> )	Farmyard manure (g kg <sup>-1</sup> )	Pb shoot	Pb root	Pb soil	Shoot dry matter	Root dry matter
		(mg kg <sup>-1</sup> DW)			(g)	
0	0 (control)	BD*	BD	BD	12.29 <sup>c</sup>	7.64 <sup>c</sup>
	25	BD	BD	BD	14.84 <sup>b</sup>	10.29 <sup>ab</sup>
	50	BD	BD	BD	15.36 <sup>a</sup>	11.65 <sup>a</sup>
40	0	0.36 <sup>e</sup>	1.33 <sup>f</sup>	31.08 <sup>f</sup>	8.78 <sup>f</sup>	6.12 <sup>d</sup>
	25	0.45 <sup>ef</sup>	1.60 <sup>de</sup>	30.49 <sup>f</sup>	13.15 <sup>d</sup>	8.20 <sup>c</sup>
	50	0.49 <sup>de</sup>	1.57 <sup>f</sup>	29.05 <sup>e</sup>	13.80 <sup>c</sup>	9.59 <sup>b</sup>
80	0	0.43 <sup>f</sup>	1.47 <sup>c</sup>	67.78 <sup>d</sup>	3.19 <sup>g</sup>	4.45 <sup>c</sup>
	25	0.53 <sup>cd</sup>	1.77 <sup>b</sup>	63.09 <sup>c</sup>	7.46 <sup>e</sup>	5.55 <sup>d</sup>
	50	0.60 <sup>b</sup>	1.76 <sup>bc</sup>	62.03 <sup>c</sup>	7.87 <sup>e</sup>	5.87 <sup>d</sup>
120	0	0.53 <sup>cd</sup>	1.63 <sup>cd</sup>	106.98 <sup>a</sup>	2.60 <sup>g</sup>	1.06 <sup>e</sup>
	25	0.56 <sup>bc</sup>	1.88 <sup>ab</sup>	101.25 <sup>b</sup>	4.36 <sup>h</sup>	1.68 <sup>e</sup>
	50	0.72 <sup>a</sup>	1.96 <sup>a</sup>	98.63 <sup>bc</sup>	4.32 <sup>h</sup>	2.84 <sup>f</sup>

در هر ستون میانگین‌هایی با حداقل یک حرف مشترک، در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.  
\* قابل اندازه‌گیری به وسیله دستگاه جذب اتمی نبود.

In each column means followed by at least a common letter, are not significantly difference at 5% probability level.

\* It could not be measured by an atomic absorption spectrometer.

تمام سطوح تنش سرب شد. بالاترین وزن خشک اندام هوایی و ریشه بوته رعنازیبا به ترتیب با ۱۵/۳۶ و ۱۱/۶۵ گرم مربوط به کاربرد ۵۰ گرم بر کیلوگرم کود دامی تحت تیمار عدم تنش سرب بود (جدول ۶). در سطح تنش ۱۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سرب، وزن خشک اندام هوایی و ریشه تحت عدم کاربرد کود دامی به ترتیب ۲/۶۰ و ۱/۰۶ گرم بودند، در حالی که تحت کاربرد ۵۰ گرم بر کیلوگرم کود دامی به ترتیب ۴/۳۲ و ۲/۸۴ گرم بودند (جدول ۵). سرب یکی از سمی‌ترین عناصری است که اثرات از بین برنده‌ای روی گیاهان دارد (Kul *et al.*, 2019). در این مطالعه مشخص شد که تیمارهای سرب با کاهش رنگدانه‌های فتوسنتزی باعث کاهش رشد و در نهایت کاهش زیست توده گیاه شد (جدول‌های ۳ و ۶). در واقع، فلزات سنگین با برهم زدن متابولیسم گیاه باعث آسیب اکسیداتیو می‌شوند (Kul *et al.*, 2019). به طور مشابه، کاهش رشد ناشی از کاربرد فلزات سنگین با برهم زدن تعادل فرآیندهای متابولیکی مانند فتوسنتز، انتقال مواد فتوسنتزی و مواد مغذی توضیح داده شده است (Iqbal *et al.*, 2010). در این راستا، Marshner (2012) نشان داده است که کادمیوم می‌تواند بر انبساط دیواره سلولی و تقسیم سلول تأثیر بگذارد و در نتیجه رشد را کاهش دهد. تحت تنش سرب، گیاهان حداقل محتوای مواد مغذی ضروری را دارند. این ممکن است به دلیل آسیب فیزیکی ریشه باشد که قادر به جذب بسیاری از یون‌ها نیستند (Lamhamdi *et al.*, 2013). با این حال، استفاده از کود دامی باعث بهبود جذب عناصر کلان و ریز در گیاهان تحت تنش و بدون تنش می‌شود (Alamri *et al.*, 2018). این مواد مغذی ضروری، عناصر اساسی و اصلی رشد دهنده هستند که با بهبود مکانیسم‌های فیزیولوژی و مولکولی گیاهان، اثر نامطلوب تنش‌های مختلف محیطی را کاهش می‌دهند (Arshad *et al.*, 2016).

#### نتیجه‌گیری کلی

براساس نتایج حاصل از این مطالعه مشخص شد که بین غلظت سرب در خاک و محتوای سرب در گیاه ارتباط نزدیکی وجود داشته و افزایش غلظت سرب در خاک منجر به افزایش غلظت سرب گیاه شده است. افزایش

غلظت سرب در ریشه در مقایسه با قسمت‌های هوایی گیاه به طور قابل توجهی بالاتر است. نتایج مشابهی توسط بسیاری از محققان گزارش شده است (Mallhi *et al.*, 2019; Zouari *et al.*, 2018; Hu *et al.*, 2019). این ممکن است به دلیل توانایی سرب در تشکیل پیوند با پلی‌ساکاریدهایی مانند قند و سایر ماکرومولکول‌ها در ریشه باشد. این فرضیه ممکن است وجود داشته باشد که ریشه‌ها می‌توانند با جلوگیری از تجمع بیش از حد و سمی سرب در شاخه‌ها، نقش مهمی در فعالیت بازدارندگی فلزات داشته باشند (Chaab *et al.*, 2016). به علاوه، کاربرد کود دامی با کاهش pH خاک و افزایش لیگاندهای آلی سبب افزایش جذب سرب توسط ریشه گیاه و انتقال آن به بخش‌های هوایی گیاه می‌شود (Kabata Pendias & Pendias, 2001). همچنین Prabhā *et al.* (2007) در مطالعه خود نشان دادند که ترکیبات آلی مانند کمپوست و یا کود گاوی به طور طبیعی حاوی مقدار قابل توجهی از عناصر کم مصرف هستند که به علت وجود مواد آلی زیاد و متابولیت‌های میکروبی به صورت کلات‌های آلی در آمده‌اند و باعث افزایش حلالیت فلزات در مجاورت ریشه‌ها شده و قابلیت جذب و دسترسی توسط گیاهان را افزایش می‌دهند. در این مطالعه همچنین استفاده از کود دامی باعث افزایش جذب سرب در ریشه و شاخه‌های رعنازیبا شد. در واقع کاربرد کود دامی هم جذب و هم جابجایی سرب را در گیاهان افزایش می‌دهد. در مطالعه Baghaie *et al.* (2011)، به نقش کاربرد کودهای آلی در کاهش قابلیت دسترسی فلزات سنگین در خاک پرداختند و نشان دادند کاربرد کود گاوی در خاک آلوده به سرب باعث کاهش مقدار سرب در خاک شد.

#### وزن خشک اندام هوایی و ریشه رعنازیبا

نتایج تجزیه واریانس نشان داد وزن خشک اندام هوایی و ریشه گیاه رعنازیبا به طور معنی‌داری تحت تأثیر تیمارهای سرب، کود دامی و برهمکنش سرب × کود دامی قرار گرفتند (جدول ۴). افزایش تیمارهای تنش باعث کاهش وزن خشک اندام هوایی و ریشه شد، در حالی که کاربرد کود دامی باعث افزایش این صفات در

بی خواهد داشت. همچنین بر طبق این نتایج مشخص شد که کاربرد کود دامی به میزان ۵۰ گرم در کیلوگرم ضمن بهبود شرایط فیزیولوژیکی گیاه و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی باعث بهبود گیاه‌پالایی سرب در گیاه و افزایش زیست‌توده و رشد گیاه رعنازیا شد.

محتوای سرب منجر به تغییراتی در پارمترهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه شده که از آن جمله می‌توان به افزایش پراکسید هیدروژن و تخریب لیپیدهای غشا اشاره نمود که اثر منفی بر محتوای کلروفیل برگ داشته و در نتیجه کاهش رشد و زیست توده گیاه را در

## REFERNCES

1. Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods of enzymology*, 105, 121-126.
2. Alamri, A. A., Siddiqui, M. H., Al-Khaishany, M. Y. Y., Khan, M. N., Ali, H. M., Alaraidh, I. A., Alsahli, A. A., Al-Rabiah, H., & Mateen, M. (2018). Ascorbic acid improves the tolerance of wheat plants to lead toxicity. *Journal of Plant Interactions*, 13(1), 409-419.
3. Ali, R. M., Mahmoud, M. H., Abbas, H. M., & Fakhr, M. (2017). Physiological studies on the interactive effects of lead and antioxidants on *Carum carvi* plant. *Egyptian Journal of Botany*, 57(2), 317-333.
4. Ali, S., Muhammad, R., Abdul, W., Muhammad, B. H., Afzal, H., Shiliang, L., Abdulaziz, A. A., Abeer, H., & Abd-Allah Elsayed, F. (2018). Fulvic acid prevents chromium-induced morphological, photosynthetic, and oxidative alterations in wheat irrigated with tannery waste water. *Journal of Plant Growth Regulation*, 37(4), 1357-1367.
5. Arnon, I. (1996). *Crop production in dry regions*. Leonard Hill, London 650 pp.
6. Arshad, M., Ali, S., Noman, A., Ali, Q., Rizwan, M., Farid, M., & Irshad, M. K. (2016). Phosphorus amendment decreased cadmium (Cd) uptake and ameliorates chlorophyll contents, gas exchange attributes, antioxidants, and mineral nutrients in wheat (*Triticum aestivum* L.) under Cd stress. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 62, 533-546.
7. Ashraf, M., & Foolad, M. R. (2007) Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany*, 59, 206-216.
8. Baghaie, A., Khoshgoftarmanesh, A. H., Afyuni, M., & Schulin, R. (2011). The role of organic and inorganic fractions of cow manure and biosolids on lead sorption. *Soil Science and Plant Nutrition*, 57, 11-18.
9. Bankaji, I., Caçador, I., & Sleimi, I. (2015). Physiological and biochemical responses of *Suaeda fruticosa* to cadmium and copper stresses: growth, nutrient uptake, antioxidant enzymes, phytochelatin, and glutathione levels. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 13058-13069.
10. Bates, L. S., Waldren, R. P., & Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil*, 39(1), 205-207.
11. Bayat, H., & Belopukhov, S. (2019). The Effect of humic acid, plant growth promoting rhizobacteria and seaweed on essential oil, growth parameters and chlorophyll content in basil (*Ocimum basilicum* L.). *Agricultural Research and Technology*, 19(4), 192-197.
12. Bhaduri, A. M., & Fulekar, M. (2012). Antioxidant enzyme responses of plants to heavy metal stress. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 11, 55-69.
13. Blaise, D., Singh, J. V., Bonde, A. N., Tekale, K. U., & Mayee, C. D. (2005). Effects of farmyard manure and fertilizers on yield, fiber quality and nutrient balance of rain fed cotton (*Gossypium hirsutum*). *Bioresource Technology*, 96, 345-349.
14. Chaab, A., Moezzi, A., Sayyad, G., & Chorom, M. (2016). Alleviation of cadmium toxicity to maize by the application of humic acid and compost. *Life Science Journal*, 13(12), 56-63.
15. Dugar, D., & Bafna, A. (2013). Effect of lead stress on chlorophyll content, malondialdehyde and peroxidase activity in seedlings of mung bean (*Vigna radiata*). *International Journal of Research in Chemistry and Environment*, 3(3), 20-25.
16. Gadagi, R. S., Krishnaraj, P.U., Kulkarni, J. H., & Sa, T. (2004). The effect of combined *Azospirillum* inoculation and nitrogen fertilizer on plant growth promotion and yield response of the blanket flower *Gaillardia pulchella*. *Scientia Horticulturae*, 100, 323-332.
17. Ghaffari, H., Tadayon, M. R., Nadeem, M., Cheema, M., & Razmjoo, J. (2019). Proline mediated changes in antioxidant enzymatic activities and physiology of sugar beet under drought stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 41(2), 23.
18. Gross, J. (1991). *Pigments in vegetables: chlorophylls and carotenoids*. Van Nostrand Reinhold. USA.
19. Hadi, F. (2015). A mini review on lead (Pb) toxicity in plants. *Journal of Biology and Life Science*, 6, 91-101.

20. Herzog, V., & Fahimi, H. (1973). Determination of the activity of peroxidase. *Analytical Biochemistry*, 55, 554-562.
21. Hu, R., Sunc, K., Suc, X., Pana, Y., Zhanga, Y., & Wang, X. (2012). Physiological responses and tolerance mechanisms to Pb in two xerophiles: *Salsola passerina* Bunge and *Chenopodium album* L. *Journal of Hazardous Materials*, 205-206, 131-138.
22. Hu, Z. H., Zhuo, F., Jing, S. H. Li, X., Yan, T. X., Lei, L. L., Lu, R. R., Zhang, X. F., & Jing, Y. X. (2019). Combined application of *Arbuscular mycorrhizal* fungi and steel slag improves plant growth and reduces Cd, Pb accumulation in *Zea mays*. *International Journal of Phytoremediation*, 21, 1-9.
23. Iqbal, N., Masood, A., Nazar, R., Syeed, S., & Khan, N. A. (2010). Photosynthesis, growth and antioxidant metabolism in mustard (*Brassica juncea* L.) cultivars differing in Cd tolerance. *Agricultural Sciences in China*, 9, 519-527.
24. Kabata Pendias, A., & Pendias, H. (2001). *Trace element in soils and plants*. 3<sup>rd</sup> ed., CRC Press, New York, USA.
25. Kaya, C., Akram, N. A., Ashraf, M., & Sonmez, O. (2018). Exogenous application of humic acid mitigates salinity stress in maize (*Zea mays* L.) plants by improving some key physico-biochemical attributes. *Cereal Research Communications*, 46(1), 67-78.
26. Kul, R., Ekinici, M., & Yildirim, E. (2019). Effects of lead stress on growth and some physiological characteristics of bean. *Global Journal of Botanical Science*, 7, 15-19.
27. Kumar, P., Tewari, R. K., & Sharma, P. N. (2010). Sodium nitroprusside-mediated alleviation of iron deficiency and modulation of antioxidant responses in maize plants. *AoB Plants*, 2, 1-12.
28. Lamhamdi, M., El Galiou, O., Bakrim, A., Nôvoa-Muñoz, J. C., AriasEstévez, M., Aarab, A., & Lafont, R. (2013). Effect of lead stress on mineral content and growth of wheat (*Triticum aestivum*) and spinach (*Spinacia oleracea*) seedlings. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 20, 29-36.
29. Li, Y., Zhou, C., Huang, M., Luo, J., Hou, X., Wu, P., & Ma, X. (2016). Lead tolerance mechanism in *Conyza canadensis*: subcellular distribution, ultrastructure, antioxidative defense system, and phytochelatin. *Journal of Plant Research*, 129, 251-262.
30. Lindsay, W. L., & Norvell, W. A. (1978). Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese, and copper. *Soil Science Society of America Journal*, 42, 421-428.
31. Madhava, K. V., & Sresty, T. V. S. (2000). Antioxidative parameters in the seedlings of pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses. *Plant Science*, 157, 113-128.
32. Malar, S., Vikram, S. S., Favas, P., & Perumal, V. (2014). Lead heavy metal toxicity induced changes on growth and antioxidative enzymes level in water hyacinths [*Eichhornia crassipes* (Mart.)]. *Botanical Studies*, 55, 54.
33. Mallhi, Z. I., Rizwan, M., Mansha, A., Ali, Q., Asim, S., Ali, S., Hussain, A., Alrokayan, S. H., Khan, H. A., Alam, P., & Ahmad, P. (2019). Citric acid enhances plant growth, photosynthesis, and phytoextraction of lead by alleviating the oxidative stress in castor beans. *Plants*, 8, 525.
34. Marschner, P. (2012). *Marschner's mineral nutrition of higher plants*. (3<sup>rd</sup> Ed) Academic Press, London.
35. Minami, M., & Yoshikawa, H. (1979). A simplified assay method of superoxide dismutase activity for clinical use. *Clinical Chemistry Acta* 92, 337-342.
36. Mojdehi, F., Taghizadeh, M., Baghaie, A. H., Changizi, M., & Khaghani, S. (2020). Organic amendment can decrease plant abiotic stress in a soil Co-contaminated with lead and cadmium under ornamental Sunflower cultivation. *International Archives of Health Sciences*, 7, 89-95.
37. Nakano, Y., & Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 22, 867-880.
38. Nasim, S.A., & Dhir, B. (2010). Heavy metals alter the potency of Medicinal Plants. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 203, 139-149.
39. Nowkandeh, S. M., Noroozi, A. A., & Homaei, M. (2018). Estimating soil organic matter content from hyperion reflectance images using PLSR, PCR, MinR and SWR models in semi-arid regions of Iran. *Environmental Development*, 25, 23-32.
40. Pizzeghello, D., Francioso, O., Ertani, A., Muscolo, A., & Nardi, S. (2013). Isopentenyl adenosine and cytokinin-like activity of different humic substances. *Journal of Geochemical Exploration*, 129, 70-75.
41. Prabha, M. L., Jayraaj, I. A., Jayraaj, R., & Rao, D. S. (2007). Effect of vermicompost on growth parameters of selected vegetable and medicinal plants. *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences*, 9, 321-326.
42. Rahimi, A., Moghaddam, S. S., Ghiyasi, M., Heydarzadeh, S., Ghazizadeh, K., & Popović-Djordjević, J. (2019). The influence of chemical, organic and biological fertilizers on agrobiological and antioxidant properties of Syrian cephalaria (*Cephalaria syriaca* L.). *Agriculture*, 9(6), 122-135.
43. Riaz, A., Younis, A., Hameed, M., & Kiran, S. (2010). Morphological and biochemical responses of turf grasses to water deficit conditions. *Pakistan Journal of Botany*, 42(5), 3441-3448.

44. Tangahu, B.V., Sheikh Abdullah, S. R., Basri, H., Idris, M., Anuar, N., & Mukhlisin, M. (2011). A review on heavy metals (As, Pb, and Hg) uptake by plants through phytoremediation. *International Journal of Chemical Engineering*, 2011, 1-31
45. Usman, K., Abu-Dieyeh, M. H., Zouari, N., & Al-Ghouti, M. A. (2020). Lead (Pb) bioaccumulation and antioxidative responses in *Tetraena qataranse*. *Scientific Reports*, 10, 1-7-.
46. Velikova, V., Yordanov, I., & Edreva, A. (2000). Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. *Plant Science*, 151, 59-66.
47. Yadav, S. K. (2010). Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South African Journal of Botany*, 76, 167-179.
48. Yang, G. H., Zhu, G. Y., Li, H., Han, X. M., Li, J. M., & Ma, Y. B. (2018). Accumulation and bioavailability of heavy metals in a soil-wheat/maize system with long-term sewage sludge amendments. *Journal of Integrative Agriculture*, 17, 1861-70.
49. Zouari, M., Elloumi, N., Labrousse, P., Ben Rouina, B., Ben Abdallah, F., & Ben Ahmed, C. (2018). Olive trees response to lead stress: Exogenous proline provided better tolerance than glycine betaine. *South African Journal of Botany*, 118, 158-165.