

The effects of different levels of biochar obtained from beeswax waste on the growth and biochemical characteristics of marigold (*Calendula officinalis* L.) under salinity and zinc stress

F. Hedayati¹, N. Pourghasemian^{2,3*}, M. Naghizadeh⁴, R. Moradi⁵

1. M.Sc. Graduate of medicinal plant, Department of Plant Productions, Agricultural Faculty of Bardsir, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

2. Associate Professor, Department of Plant Productions, Agricultural Faculty of Bardsir, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

3. Research group cultivation and processing of saffron and damask rose, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

4. Assistant Professor Department of Plant Productions, Agricultural Faculty of Bardsir, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

5. Associate Professor, Department of Plant Production, University of Torbat Heydarieh, Torbat Heydarieh, Iran

Received 20 May 2023; Accepted 13 September 2023

Extended abstract

Introduction

Marigold (*Calendula officinalis* L.) is an annual plant in the Asteraceae family that has been cultivated for ornamental purposes for many years. However, the plant's medicinal properties have also been identified and it is now commonly used for medicinal purposes. The most abundant compounds found in marigold are phenolic compounds, including flavonoids and phenolic acids, as well as saponins. The biosynthesis of secondary metabolites in plants is heavily influenced by environmental factors, which are known to significantly affect both the quantity and composition of these compounds. Environmental factors can be present in varying conditions, sometimes in levels that are optimal for plant growth and sometimes in levels that are stressful and can negatively impact plant growth and development. A substantial portion of the earth's arable land, approximately 6%, is affected by salinity, which can lead to oxidative stress in plants. Although, zinc is an essential micronutrient required for plant growth, excessive levels of this element can be toxic and result in oxidative stress, ultimately leading to plant death. There are various methods to mitigate the impacts of metal toxicity and salinity stress on plants, and one effective approach is the use of biochar as a soil amendment. Beeswax waste has recently been identified as an organic material, and studies have shown that it is a nutrient-rich substance that can be applied as a fertilizer. Given the dual importance of marigold as both a medicinal and ornamental plant, the present study aimed to explore the potential of beeswax waste biochar in mitigating the negative impact of salinity and zinc stress on this plant species. Furthermore, the study aimed to investigate the effects of varying concentrations of zinc, ranging from low to high levels, on the growth and development of marigold. The study also examined the synergistic effects of zinc and salinity on marigold growth, as well as the role of both high and low concentrations of zinc under saline conditions and in the presence of different biochar levels.

* Corresponding author: Nasibeh Pourghasemian; E-Mail: n.pourghasemian@uk.ac.ir



Materials and methods

To investigate the impact of beeswax waste biochar application on marigold growth under salinity and zinc stress, a factorial experiment was conducted using a completely randomized design with three replications. The experimental factors included two levels of salinity stress (control $EC=1 \text{ dsm}^{-1}$; salt stress with $EC=6 \text{ dsm}^{-1}$), four levels of zinc element (control, 300, 1500, and 3000 mgkg^{-1} soil), and three levels of beeswax waste biochar (control, 1.5%, and 3% ww^{-1}). Biochemical traits, including photosynthetic pigments (chlorophyll a, b, and total), phenol, flavonoid, anthocyanin, catalase, and ascorbate peroxidase enzymes, were measured three months after planting. Yield traits, such as biomass and flower dry weight, were measured approximately four months after planting, when the plants exhibited signs of decline.

Results and discussion

The results of the experiment revealed that salinity and zinc stress significantly reduced the biomass, flower and root dry weight, and height of marigold plants compared to the non-stress condition. Among the treatments, the highest amount of biomass and dry weight of flowers were observed in the control treatment (without salinity stress) with 300 ppm of zinc and 1.5% biochar, which were 9.83 gr and 1.59 gr, respectively. Conversely, the lowest values were observed in the treatment with 6 dSm^{-1} salinity and 1500 ppm of zinc concentration without biochar, which were 1.8 gr and 0.27 gr, respectively. Although the amount of photosynthetic pigments and secondary metabolites, such as phenolic compounds, flavonoids, and anthocyanins, decreased compared to the non-stress condition, the activity of catalase and ascorbate peroxidase enzymes increased under salinity and zinc stress compared to the control treatment. Furthermore, the application of biochar in plants under salinity and zinc stress conditions increased vegetative traits, improved photosynthetic pigments, secondary metabolites, and antioxidant enzymes compared to the condition of not applying biochar.

Conclusion

Low zinc concentration had a positive impact on marigold growth, but concentrations higher than 300 ppm resulted in toxicity and stress. Salinity and zinc stress caused a decrease in growth characteristics, photosynthetic pigments, and secondary metabolites. Remarkably, the application of biochar, even in the presence of salt stress with 300 ppm zinc concentration, improved the growth and biochemical characteristics of marigolds.

Keywords: Ascorbate peroxidase, Catalase, Medicinal plants, Photosynthetic pigments, Secondary metabolites

تأثیر سطوح مختلف بیوجار حاصل از تفاله موم زنبورعسل بر خصوصیات رشدی و بیوشیمیایی گیاه همیشه‌بهار (*Calendula officinalis* L.) تحت تنش شوری و روی

فاطمه هدایتی^۱، نسیم پورقاسمیان^{۲*}، مهدی نقی‌زاده^۴، روح‌اله مرادی^۵

۱. دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد گیاهان دارویی، گروه تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزی بردسیر، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان
۲. دانشیار، گروه تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزی بردسیر، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان
۳. گروه پژوهشی کشت و فراوری زعفران و گل محمدی، دانشگاه شهید باهنر کرمان
۴. استادیار، گروه تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزی بردسیر، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان
۵. دانشیار، گروه تولیدات گیاهی، دانشگاه تربت حیدریه، ایران

مشخصات مقاله	چکیده
واژه‌های کلیدی: متابولیت‌های ثانویه کاتالاز اسکوربات پراکسیداز رنگیزه‌های فتوسنتزی گیاه دارویی	به‌منظور بررسی اثر کاربرد بیوجار حاصل از تفاله موم زنبورعسل در شرایط تنش شوری و روی در گیاه دارویی همیشه‌بهار، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه فاکتور شامل تنش شوری در دو سطح (شاهد، آب شهر و ۶ دسی‌زیمنس بر متر)، عنصر روی در ۴ سطح (شاهد، ۳۰۰، ۱۵۰۰ و ۳۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک) و بیوجار حاصل از تفاله موم زنبورعسل در سه سطح (شاهد، ۱/۵ و ۳ درصد وزنی) در سه تکرار اجرا شد. نتایج آزمایش نشان داد که اعمال تنش شوری و روی منجر به کاهش معنی‌دار وزن خشک بوته و گل گیاه همیشه‌بهار در مقایسه با شرایط عدم تنش گردید. به‌طوری‌که بیشترین میزان بیوماس و وزن خشک گل در تیمار عدم تنش شوری (شاهد) به همراه تنش روی با غلظت ۳۰۰ پی‌پی‌ام و بیوجار ۱/۵ درصد وزنی به ترتیب میزان ۹/۸۳ و ۱/۵۹ گرم در بوته مشاهده شد و کمترین میزان آن متعلق به تیمار شوری ۶ دسی‌زیمنس بر متر و تنش روی با غلظت ۱۵۰۰ پی‌پی‌ام و عدم مصرف بیوجار به ترتیب به میزان ۱/۸ و ۰/۲۷ گرم در بوته بود همچنین میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی و متابولیت‌های ثانویه نظیر ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها در مقایسه با شرایط عدم تنش کاهش ولی میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و اسکوربات پراکسیداز تحت تنش شوری و روی در مقایسه با تیمارهای شاهد افزایش یافتند. استفاده از بیوجار در سطح ۱/۵ درصد، در شرایط تنش شوری و روی سبب افزایش صفات رویشی، بهبود رنگیزه‌های فتوسنتزی، متابولیت‌های ثانویه و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، در مقایسه با شرایط عدم مصرف بیوجار شد.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۳/۳۰	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۲۲	

مقدمه

کاشت همیشه‌بهار به‌عنوان یک گیاه دارویی زمانی از لحاظ اقتصادی مقرون‌به‌صرفه است که تولید متابولیت‌های ثانویه آن به حد مطلوب رسیده باشد. ترکیبات فنولی (فلاونوئیدها و فنولیک اسیدها) و ساپونین‌ها از جمله فراوان‌ترین ترکیبات موجود در همیشه‌بهار هستند (Chakraborty, 2010).

گیاه همیشه‌بهار با نام علمی *Calendula officinalis* L. گیاهی بوته‌ای و یک‌ساله از خانواده Asteraceae است. سالیان دراز به‌عنوان یک گیاه زینتی کشت می‌شد تا زمانی که خواص دارویی آن مشخص گردید و به‌عنوان یک گیاه دارویی نیز مورد استفاده قرار گرفت (Khalid and Teixeira, 2012).

خاک‌های کشاورزی حاوی ۱۰۰ تا ۳۰۰ میکروگرم بر گرم روی هستند (Rai et al., 2004).

حد مطلوب و کشنده این عنصر برای گیاهان مختلف و در شرایط متفاوت، یکسان نیست. روی به‌عنوان یک عنصر غذایی در بسیاری از سیستم‌های آنزیمی گیاه نقش کاتالیزوری فعال‌کننده و یا ساختمانی دارد (Brown et al., 1993). سمیت روی در گیاهان ممکن است اثر منفی بر انتقال یون و فرایندهای متابولیکی مانند تعرق و فتوسنتز و فعالیت‌های آنزیمی، متابولیسم نیتروژن و بر جذب عناصر دیگر گذاشته و در نهایت به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم منجر به استرس اکسیداتیو شود (Reichman et al., 2001).

برای کاهش اثرات ناشی از سمیت فلزات و همچنین شوری که خود نیز نوعی سمیت با کلرید سدیم است، راهکارهای مختلفی وجود دارد. یکی از این روش‌ها که امروزه مورد توجه قرار گرفته است، استفاده از بیوچار به‌عنوان یک اصلاح‌کننده خاک است (Housley et al., 2015). بیوچار به دلیل داشتن سطح ویژه، تخلخل بالا و پتانسیل جذب قابل توجه، به‌عنوان یک اصلاح‌کننده خاک برای ترمیم یا جداسازی فلزات سنگین و آلاینده‌های آلی استفاده می‌شود (Tang et al., 2013). در برخی مطالعات نشان داده شد بیوچار می‌تواند عناصر سنگین مانند مس، کادمیوم، سرب و روی را روی سطح خود جذب کرده و فراهمی زیستی آن‌ها را کاهش دهد (Buss et al., 2012; Liu et al., 2014).

تفاله موم زنبورعسل، به‌عنوان یک ماده آلی و دورریختنی که به‌تازگی مورد مطالعه قرار گرفته است، غنی از مواد غذایی است که نقش آن به‌عنوان کود در مطالعه‌ای که توسط پورقاسمیان و همکاران (Pourghasemian et al., 2018) در رشد شب بو و مطالعه دیگری بر رشد و ایجاد مقاومت به خشکی در گیاه گاوزبان اروپایی (Pourghasemian and Moradi, 2017) انجام گرفت، به اثبات رسیده است. همچنین در مطالعه دیگری که توسط مرادی و همکاران (Moradi et al., 2019) روی بیوچار تفاله موم زنبورعسل و گیاه زعفران در شرایط آلوده به کادمیوم انجام شد، به نقش مثبت آن در کاهش اثرات ناشی از آلودگی به کادمیوم در گیاه زعفران اشاره شده است. باین‌حال جهت اثبات نقش این ماده در امور ذکرشده، نیاز به مطالعات بیشتر احساس می‌شود؛ بنابراین با توجه به اهمیت گیاه همیشه‌بهار به‌عنوان یک گیاه دارویی و زینتی، مطالعه حاضر با هدف بررسی نقش بیوچار تفاله موم زنبورعسل در کاهش اثر تنش شوری و روی در این

ترکیبات فنولی و بخصوص فلاونوئیدها، علاوه بر نقش آنتی-اکسیدانی، دارای خواص ضد میکروبی نیز هستند (Preethi et al., 2008). به‌طور کلی ترکیبات موجود در همیشه‌بهار آن را به یک منبع غنی از ترکیب‌های آنتی‌اکسیدان تبدیل کرده است (Khalid and Teixeira da Silva, 2012). همچنین گیاه همیشه‌بهار دارای اثرهای ضد ویروسی، ضد توموری و آنتی‌موتازنی است، به‌طوری‌که در حال حاضر یکی از مهم‌ترین کاربردهای آن درمان التهاب‌های پوستی است. جوشانده آن در شستن چشم‌ها، غرغره کردن، درمان ورم ملتحمه، التهاب گلو، التهاب دهان و لثه مورد استفاده قرار می‌گیرد (Hormozinejad et al., 2018).

گل‌های همیشه‌بهار دارای روغن‌های فرار (اسانس‌ها)، اسیدهای چرب، ویتامین E، سزکویی ترپن‌ها، گلیکوزیدها، ساپونین‌ها، زانتوفیل‌ها، تریول ترین‌ها و ماده‌ای به نام کالدولین هستند (Gazim et al., 2008).

عوامل محیطی در میزان و نوع متابولیت‌های ثانویه گیاهان نقش به‌سزایی دارد به‌طور طبیعی این عوامل گاهی در حد مطلوب و گاهی در حدی که گیاه را در معرض تنش قرار دهد، در اختیار گیاهان قرار می‌گیرد (Khalid and Teixeira de Silva, 2012). گیاهان در دوره‌ی حیات خود با انواع تنش‌های محیطی مواجه می‌شوند. تنش، نتیجه روند غیرعادی فرایندهای فیزیولوژیک بوده و از تأثیر یک یا چند عامل محیطی حاصل می‌شود (Mirzaie et al., 2020).

شوری به‌عنوان یکی از تنش‌های مهم غیرزیستی شناخته شده است. استفاده از آب بی کیفیت، اقدامات مدیریتی نادرست مانند، جنگل‌زدایی و از بین رفتن ریشه‌های عمیق پوشش‌های گیاهی، پمپاژ بیش‌ازحد آب‌های زیرزمینی، زهکشی ضعیف و نفوذ آب دریا در مناطق ساحلی، استفاده نامناسب از کودها سبب شور شدن حدود ۷۷ میلیون هکتار از اراضی زیر کشت شده است (FAO, 2022). غلظت بالای نمک به چند روش گیاهان را تحت تأثیر قرار می‌دهد که شامل تنش آبی، سمیت یونی، اختلالات تغذیه‌ای، تنش اکسیداتیو، تغییر فرایندهای متابولیکی، کاهش تقسیم و توسعه سلولی است (Shanker and Venkateswarlu, 2011).

روی به‌عنوان یکی از ریزمغذی‌های مورد نیاز گیاه شناخته شده است که در صورت افزایش از حد مشخصی، برای گیاه کشنده است. میانگین غلظت Zn خاک برای خاک‌های معدنی و آلی به ترتیب ۵۰ و ۶۰ میکروگرم بر گرم خاک است. بیشتر

گیاه مورد مطالعه قرار گرفت. همچنین محققین این مطالعه، روی را به عنوان یک عنصر ضروری که در سطح زیاد می تواند برای گیاه مضر باشد، در سطوح مختلف هم سطوح پایین و هم سطوح بالا بررسی کردند، با این هدف که بتوانند تأثیر متقابل آن بر شوری و نقش مقدار زیاد و کم آن را در شرایط شور و در حضور سطوح مختلف بیوچار بررسی کنند.

مواد و روش ها

به منظور بررسی تأثیر سطوح مختلف بیوچار بر تنش ناشی از شوری و روی بر گیاه همیشه بهار، مطالعه ای در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی بردسیر، دانشگاه شهید باهنر کرمان به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه فاکتور شامل تنش شوری در دو سطح (شاهد، آب چاه با هدایت الکتریکی ۶ دسی زیمنس بر متر)، عنصر روی در ۴ سطح (شاهد، ۳۰۰، ۱۵۰۰ و ۳۰۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم خاک) و بیوچار حاصل از تفاله موم زنبور عسل در سه سطح (شاهد، ۱/۵ و ۳ درصد وزنی) و در سه تکرار اجرا شد.

برای اعمال تیمارهای مورد نظر، ابتدا بیوچار تولید شده از تفاله موم زنبور عسل که در شرایط بی هوایی در کوره ای با حرارت غیرمستقیم تولید شد با درصد های مورد نظر به خاک اضافه شدند، ویژگی های فیزیکی و شیمیایی بیوچار و خاک مورد استفاده قبل از ترکیب با بیوچار و اعمال تنش ها، اندازه گیری شدند (جدول ۱).

جدول ۱. خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک و بیوچار

Table 1. Physical and chemical properties of soil and biochar

Properties	خصوصیات	خاک Soil	بیوچار Biochar
Texture	بافت	لومی رسی loam-clay	-
Ec	هدایت الکتریکی	dSm ⁻¹	3.96
pH	اسیدیته	pH	7.2
Organic matter	ماده آلی	%	1.03
Total Zn	روی کل	mgkg ⁻¹	0.07
Organic carbon	کربن آلی	%	0.76
N	نیتروژن	%	0.24
P	فسفر	mkg ⁻¹	19.41
K	پتاسیم	mkg ⁻¹	310

برای اعمال تیمار روی با غلظت های مذکور، سولفات روی را در آب حل کرده و خاک به طور یکنواخت به روی آلوده شد.

خاک آلوده شده به مدت ۳۰ روز تحت شرایط رطوبتی و دمایی ثابت خوابانیده (انکوبه) شد تا تعادل عنصر روی و بیوچار در فاز محلول و جامد برقرار گردد.

به منظور کشت، از سینی های نشا که با کوکوپیت پر شده اند استفاده و زمانی که نشاها به مرحله ۳-۴ برگگی رسیدند به گلدان های پلاستیکی حاوی خاک آلوده به روی و آغشته به بیوچار منتقل شدند. تا زمان انتقال گیاهان به گلدان های پلاستیکی تنش شوری اعمال نشده و آبیاری تمامی گیاهان در سینی کاشت با آب شهر صورت گرفت؛ اما پس از انتقال نشاها به گلدان های پلاستیکی تنش شوری در نیمی از گلدان ها اعمال و با آب با شوری ۶ دسی زیمنس بر متر و بقیه گلدان ها با آب شهر آبیاری گردید.

صفات بیوشیمیایی شامل رنگیته های فتوسنتزی کلروفیل a و b و کل، فنل، فلاونوئید، آنتوسیانین و آنزیم های آنتی اکسیدانت کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز سه ماه پس از کاشت و صفات رویشی شامل بیوماس، وزن خشک گل حدود چهار ماه پس از کاشت و زمانی که گیاهان به سمت زوال رفتند، اندازه گیری شدند.

برای اندازه گیری میزان کلروفیل و کاروتنوئید از روش لیچنتنالر (Lichtenthaler, 1987) استفاده شد. غلظت رنگیته های گیاهی با استفاده از رابطه های ۱ تا ۳ محاسبه شد.

$$Chl. a = (12.25A663.2 - 2.79A646.8) \quad [1]$$

$$Chl. b = (21.21A646.8 - 5.1 A663.2) \quad [2]$$

$$Car = [(1000A470 - 1.8 Chl.a - 85.02 Chl.b) / 198] \quad [3]$$

که در آن Chl a، Chl b و Car به ترتیب غلظت کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئیدها (کاروتن و گرانوفیل) هستند (Lichtenthaler, 1987).

جهت اندازه گیری مقدار آنتوسیانین اندام هوایی از روش وانگر (Wagner, 1979) استفاده شده است.

جهت اندازه گیری فنل، ۰/۱ گرم از بافت گیاهی در ۱ میلی لیتر اتانول ۸۰ درصد سائیده عصاره حاصل به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق در تاریکی نگهداری شد. سپس نمونه ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۰۰۰g سانتریفیوژ و از محلول رویی برای سنجش فنل ها استفاده شد. برای رسم منحنی استاندارد، غلظت های ۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۲۵ و ۱۵۰ میلی گرم بر لیتر اسید گالیک تهیه و با استفاده از منحنی استاندارد گالیک اسید، غلظت فنل ها تخمین زده شد (Wagner, 1979).

هموزنیزه گردید. سپس عصاره‌های حاصل در دور ۱۴۰۰g و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و از محلول رویی جهت اندازه‌گیری فعالیت APX و CAT استفاده شدند.

سنجش فعالیت آنزیم CAT با استفاده از محاسبه کاهش جذب H_2O_2 در ۲۴۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر مدل Beckman Du 530 انجام شد. کاهش جذب اسکوریات پراکسیداز در اثر فعالیت APX در طول موج ۲۹۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Beckman Du 530) در مدت یک دقیقه اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم‌ها برحسب واحد آنزیم در مقدار پروتئین کل میلی‌گرم موجود در ۵۰ میکرولیتر عصاره گزارش شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۴ انجام شد و میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد مقایسه شدند. مقایسه میانگین برهمکنش تیمارهای مورد بررسی به صورت برش‌دهی انجام شد.

نتایج و بحث

صفات رویشی گیاه همیشه‌بهار

نتایج تجزیه واریانس نشان داد اثرات ساده شوری، روی، بیوجار و نیز برهمکنش آن‌ها بر زیست‌توده و وزن خشک گل همیشه‌بهار در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۲).

برای سنجش فلاونوئیدها از روش رنگ‌سنجی آلومینیوم کلراید استفاده شد (Wagner, 1979). در این روش میزان ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول عصاره (۳ گرم ماده خشک اندام هوایی گیاه را پودر و با ۲۱ میلی‌لیتر متانول، ۴۸ ساعت در شیکر قرار داده و سپس صاف گردید) با ۰/۵ میلی‌لیتر آلومینیوم کلراید ۲ درصد مخلوط و با آب مقطر به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. بعد از نگهداری نمونه‌ها در دمای اتاق به مدت ۱۵ دقیقه جذب در طول موج ۴۳۰ نانومتر خوانده شد.

از کوئسترتین به منظور رسم منحنی استاندارد استفاده شد و نتایج برحسب میلی‌گرم کوئسترتین در هر گرم عصاره بیان شد. به این صورت که محلول پایه‌ای از این ماده با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه گردید.

برای سنجش غلظت پروتئین از روش بردفورد (Bradford, 1976) استفاده شد. غلظت پروتئین با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه شد.

جهت اندازه‌گیری آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی شامل کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز (APX)، از برگ‌های بالغ گیاه در زمان آغاز گلدهی نمونه‌گیری صورت گرفت.

۰/۱ گرم از نمونه برگ‌گی تازه توسط ازت مایع پودر شده و به همراه یک میلی‌لیتر بافر استخراج شامل: فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار با pH=7.8، EDTA ۰/۱ میلی‌مولار و PVP یک درصد (پلی‌وینیل پیرولیدون) بر روی یخ

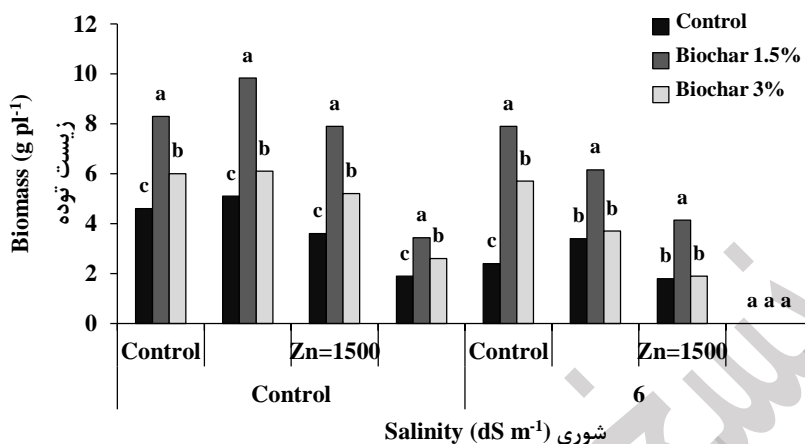
جدول ۲. تجزیه واریانس بیوجار، تنش شوری و روی بر برخی صفات رشدی و رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی گیاه همیشه‌بهار
Table 2. Analysis of variance of some growth traits and photosynthetic pigments of marigold plants as affected by biochar, salt stress and Zn.

منابع تغییرات	درجه آزادی	زیست‌توده	وزن خشک گل	کلروفیل a	کلروفیل b	کاروتنوئید
S.O.V	(df)	Biomass	Flower dry weight	Chla	Chlb	Cartenoid
شوری	1	94.39**	2.46**	303.57**	37.75**	27.82**
Salinity (A)						
روی	3	79.11**	2.01**	90.47**	13.58**	14.76**
Zn (B)						
بیوجار	2	59.96**	1.63**	7.93**	1.27**	0.32 ^{ns}
Biochar (C)						
A×B	3	3.61**	0.09**	23.87**	3.69**	3.66**
A×C	2	1.35**	0.03**	0.85**	0.14**	0.006 ^{ns}
B×C	6	4.82**	0.12**	0.27**	0.06**	0.005 ^{ns}
A×B×C	6	1.44**	0.03**	0.72**	0.08**	0.06 ^{ns}
Error	خطا	0.010	0.002	0.33	0.008	0.13
C.V%	-	10.58	4.18	3.07	12.37	8.06

* و ** به ترتیب اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد و ۱ درصد و ns عدم اختلاف معنی‌دار را نشان می‌دهند.
ns = non-significant; * = significant at 5% level; ** = significant at 1% level.

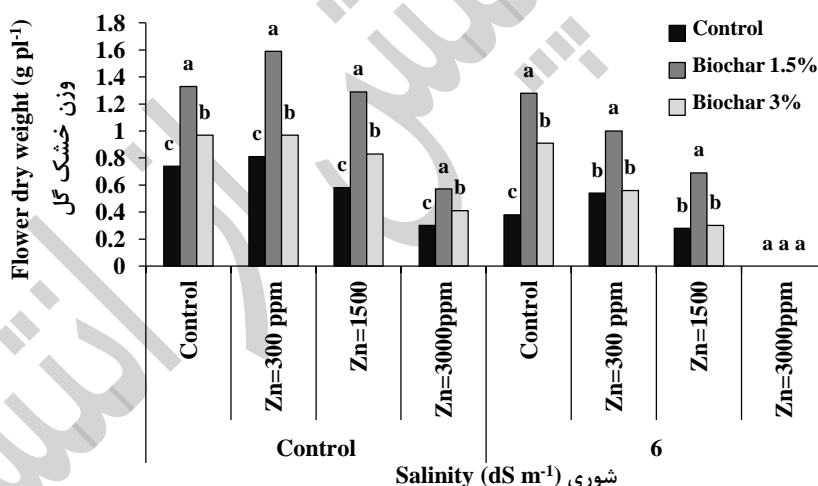
میزان زیست توده کل و وزن خشک گل همیشه بهار کاهش پیدا کرد (شکل ۱ و ۲).

نتایج مقایسه میانگین در مطالعه حاضر نشان داد که با افزایش تنش شوری و افزایش روی از ۳۰۰ پی پی ام به بالا



شکل ۱. اثر متقابل شوری در بیوجار و روی بر زیست توده گیاه، در هر سطح روی، میانگین‌های دارای حروف مشترک به صورت برش دهی دارای اختلاف معنی داری در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون LSD نمی باشند.

Fig. 1. Effect of salinity, biochar and Zn on plant biomass, In Zn levels, means with same letters as slicing are not significantly different by LSD test ($p < 0.05$).



شکل ۲. اثر متقابل شوری در بیوجار و روی بر وزن خشک گل، در هر سطح روی، میانگین‌های دارای حروف مشترک به صورت برش دهی دارای اختلاف معنی داری در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون LSD نمی باشند.

Fig. 2. Effect of salinity, biochar and Zn on flower dry weight, In Zn levels, means with same letters as slicing are not significantly different by LSD test ($p < 0.05$).

در گیاه کاهش می دهد و در نهایت عملکرد را تحت تأثیر قرار می دهد (Dehghan Nayeri, 2014).

عنصر روی در بسیاری از مسیرهای مهم بیوشیمیایی مرتبط با متابولیسم کربوهیدراتها، فتوسنتز و تبدیل قندها به نشاسته، متابولیسم پروتئین و اکسین، تشکیل دانه گرده، حفظ یکپارچگی غشاهای سلولی و همچنین مقاومت به عوامل بیماری زا مؤثر است (Kanayama and Kochetv, 2014).

در پاسخ رشد به شوری دو فاز وجود دارد، فاز اول کاهش رشد، یک فرایند سریع تر است که به علت اثر اسمزی است. فاز دوم، روند بسیار آهسته تری است که به علت تجمع نمک در برگها، منجر به سمیت نمک در گیاهان می شود. ممکن است این سمیت منجر به مرگ برگها و کاهش سطح برگهای فتوسنتزی شود که تولید فرآوردههای فتوسنتز را

اندازه‌گیری برای گیاه وجود نداشت. سمیت روی در گیاهان در ابتدا با ممانعت از رشد و کاهش زیست‌توده حاصله مشخص می‌شود، اما در سمیت شدید برای گیاهان کشنده است، با این حال در مطالعه حاضر فلز روی در سطح ۳۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم به‌تنهایی و در عدم حضور نمک کلرید سدیم، برای گیاه تنها کاهش بیومس را به همراه داشت و کشنده نبود. شوری با تجمع یون‌های نمک در برگ‌ها منجر به پیری زودرس آن‌ها می‌شود (Mancarella et al., 2016).

کلروفیل *ba* و کاروتنوئید

نتایج نشان داد که اثرات ساده شوری، روی، بیوچار و همچنین برهمکنش آن‌ها بر کلروفیل *a* و *b* در سطح احتمال یک درصد تأثیر معنی‌داری داشت (جدول ۲). کاهش مقدار کلروفیل در گیاهان تحت تنش فلزات سنگین و شوری می‌تواند به علت مهار مراحل مختلف سنتز کلروفیل و آسیب به سنتز برخی آنزیم‌ها باشد و نیز جایگزین شدن یون منیزیم مرکزی کلروفیل به وسیله فلزات سنگین و سدیم ناشی از کلرید سدیم، صدمه دیگری است که باعث از بین رفتن کلروفیل می‌شود (Ahmad et al., 2012).

در مطالعه حاضر نیز با افزایش تنش شوری و افزایش روی از ۳۰۰ پی‌پی‌ام به بالا محتوای کلروفیل *a* و *b* کاهش یافت، در حالی که کاربرد اصلاح‌کننده خاک (بیوچار) سبب بهبود این رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی در سطوح مختلف تنش شوری و روی شد (شکل‌های ۳ و ۴). به‌طوری‌که، بیشترین میزان کلروفیل *a* و *b* در تیمار عدم شوری و ۳۰۰ پی‌پی‌ام روی به همراه بیوچار ۱/۵ درصد وزنی به ترتیب ۱۱/۸۳، ۲/۷۹ میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ و کمترین میزان آن در سطح شوری ۶ دسی‌زیمنس بر متر به همراه غلظت ۱۵۰۰ پی‌پی‌ام روی و عدم مصرف بیوچار به ترتیب به میزان ۴/۴۹ و ۱/۲۹ میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ مشاهده شد (شکل‌های ۳ و ۴).

تأثیر شوری بر میزان کلروفیل با متوقف کردن آنزیم خاصی که مسئول سنتز رنگ‌دانه‌های سبز در گیاه است در ارتباط است. همچنین کاهش جذب عناصری مانند آهن و منیزیم در شرایط تنش شوری سبب کاهش محتوای کلروفیل در گیاه می‌شود (Ahmad et al., 2012).

استفاده از بیوچار افزایش محتوای کلروفیل را به دنبال دارد که سبب افزایش در جذب منیزیم می‌شود که جزء مهمی از رنگ‌دانه کلروفیل است (Abeer et al., 2015). برخی از مطالعات نشان دادند بیوچار به‌واسطه تغییراتی که در

در حالی که مقدار اضافی آن‌ها در خاک موجب اختلالات متابولیکی و در نهایت بازدارندگی رشد در بیشتر گونه‌های گیاهی می‌شود. غلظت بالای روی، مانند سایر فلزات سنگین، برای گیاهان سمی است (Balashouri, 1995)، با این حال میزان این سمیت به جنس، گونه و سن گیاه بستگی دارد (Balashouri, 1995; Kanayama and Kochetv, 2016).

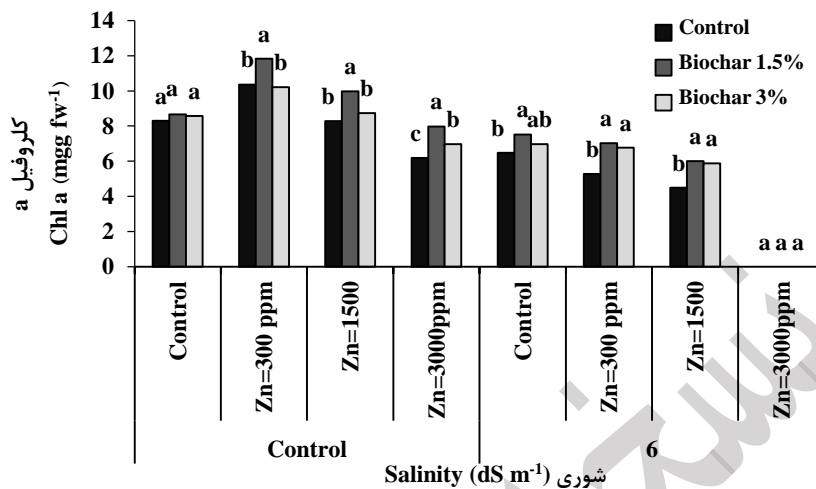
کاربرد اصلاح‌کننده خاک (بیوچار) سبب بهبود وزن خشک زیست‌توده و گل در سطوح مختلف شوری و تنش روی شد (شکل ۱ و ۲). به‌طوری‌که بیشترین میزان زیست‌توده و وزن خشک گل در تیمار عدم تنش شوری (شاهد) به همراه تنش روی با غلظت ۳۰۰ پی‌پی‌ام و بیوچار ۱/۵ درصد وزنی به ترتیب میزان ۹/۸۳ و ۱/۵۹ گرم در بوته مشاهده شد و کمترین میزان آن متعلق به تیمار شوری ۶ دسی‌زیمنس بر متر و تنش روی با غلظت ۱۵۰۰ پی‌پی‌ام و عدم مصرف بیوچار به ترتیب به میزان ۱/۸ و ۰/۲۷ گرم در بوته بود (شکل ۱ و ۲).

یکی از راهکارهای اساسی برای کاهش اثرات منفی تنش در گیاه، استفاده از راهکارهای زیستی از جمله انواع مختلف مواد آلی مانند انواع کود دامی، بقایای گیاهی و بیوچار است. بیوچار به دلیل پایداری و ظرفیت نگهداری بالای مواد مغذی و آب در مقایسه با سایر مواد اصلاحی ارگانیک، به‌عنوان یک ماده اصلاحی خاک مورد استفاده قرار گرفته است (Lehmann, 2007). به‌طور کلی، بیوچار از ظرفیت تبادل کاتیونی (CEC) و ظرفیت نگهداری مواد مغذی بالا برخوردار است و از این طریق آبشویی مواد مغذی را کاهش و دسترسی بهتر برای مواد غذایی را فراهم می‌کند (Nemati et al., 2015). همچنین یافته‌های این پژوهش با یافته‌های زانگ و همکاران (Zhang et al., 2014) در مورد تأثیر بیوچار بر رشد گیاه زینتی کالاتیا با افزایش وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه، همسو بود. بیوچار لجن فاضلاب از طریق کاهش فراهمی فلزات سنگین کادمیوم، سرب، مس، روی و کروم منجر به افزایش رشد کلم (*Brassica pekinensis* L.) شد (Liu et al., 2014).

در شرایط شوری (۶ دسی‌زیمنس بر متر)، روی در سطح ۳۰۰۰ پی‌پی‌ام برای گیاه کشنده بود به شکلی که هیچ‌یک از سطوح بیوچار در این سطح از روی نتوانستند به گیاه همیشه‌بهار برای رشد کمک کنند و تمام گیاهچه‌ها در همان مراحل اولیه رشد از بین رفتند و امکان انجام هیچ‌گونه

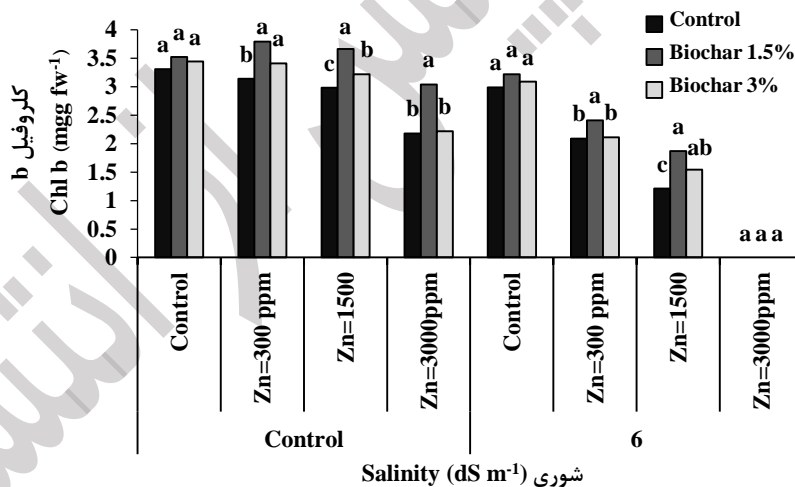
گردد. گیاه مورد بررسی در مطالعه مذکور، ذرت بود (Sukaron et al., 2011).

حاصلخیزی و افزایش ظرفیت آب قابل استفاده برای گیاه انجام می‌دهد، می‌تواند سبب افزایش میزان کلروفیل a در گیاه



شکل ۳. اثر متقابل شوری در بیوچار و روی بر کلروفیل a، در هر سطح روی، میانگین‌های دارای حروف مشترک به صورت برش دهی دارای اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون LSD نمی‌باشند

Fig. 3 Effect of salinity, biochar and Zn on Chl a, In Zn levels, means with same letters as slicing are not significantly different by LSD test ($p < 0.05$).



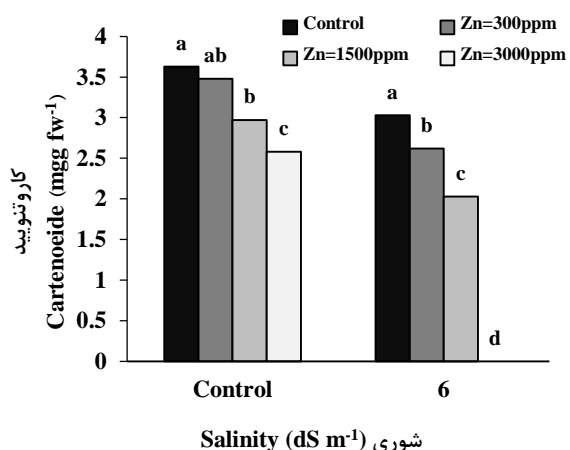
شکل ۴. اثر متقابل شوری در بیوچار و روی بر کلروفیل b، در هر سطح روی، میانگین‌های دارای حروف مشترک به صورت برش دهی دارای اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون LSD نمی‌باشند

Fig. 4. Effect of salinity, biochar and Zn on Chl b, In Zn levels, means with same letters as slicing are not significantly different by LSD test ($p < 0.05$).

داد، در حالی که سطح ۳ درصد وزنی بیوچار، در بسیاری موارد سبب کاهش صفت‌های مذکور شد (شکل‌های ۱، ۲، ۳ و ۴). به نظر می‌رسد مصرف بیوچار از یک حد خاص، می‌تواند عاملی در افزایش تنش شوری و بالا رفتن شوری خاک گردد (Moradi et al., 2019). در شرایط عدم شوری و عدم مصرف بیوچار، بیشترین محتوای کلروفیل a و b در سطح

بالین حال میزان بیوچار مورداستفاده، تعیین‌کننده نوع تأثیر آن بر رشد قسمت‌های مختلف گیاه، مانند رنگیزه‌های فتوسنتزی است. به طوری که در مطالعه حاضر، مصرف بیوچار در سطح ۱/۵ درصد وزنی در تمام تیمارهای مورد مطالعه (وجود و عدم وجود سطوح مختلف روی و تنش شوری) میزان کلروفیل a، b و به دنبال آن بیومس گیاه و وزن گل را افزایش

۳۰۰ پی پی ام زوی به ترتیب ۱۰/۳۶ و ۳/۷۹ میلی گرم بر گرم و کمترین آن‌ها در سطح ۳۰۰ پی پی ام به ترتیب ۶/۱۸ و ۲/۱۸ میلی گرم بر گرم گزارش شد (شکل‌های ۳ و ۴).
اثرات فلز سنگین روی بر محتوای کلروفیلی گیاه بسته به غلظت فلز متفاوت است. به طوری که غلظت پایین فلز روی (۳۰۰ پی پی ام) به دلیل نقش کوفاکتوری اش برای بسیاری از آنزیم‌های ضروری در مسیر بیوسنتز رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی، به عنوان محرک تولید برخی آنزیم‌ها مانند رداکتاز عمل کرده و به دنبال آن می‌تواند از تخریب رنگ‌دانه جلوگیری کند (Khuo et al., 2011). نتایج مطالعه حاضر با نتایج حاصل از مطالعه انجام شده در گیاه نعنای (Candan and Tarhan, 2003)، مطابقت و همخوانی داشت.



شکل ۵. اثر متقابل شوری در بیوچار و روی بر کاروتنوئید، در هر سطح شوری، میانگین‌های دارای حروف مشترک به صورت برش دهی دارای اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون LSD نمی‌باشند

Fig. 5 Effect of salinity, biochar and Zn on carotenoid, In salinity levels, means with same letters as slicing are not significantly different by LSD test ($p < 0.05$).

به طوری که تنش شوری محتوای آنتوسیانین را کاهش داد، تنش روی تا سطح ۳۰۰ پی پی ام سبب افزایش آنتوسیانین و از ۳۰۰ به بعد سبب کاهش آن شد، در حالی که کاربرد اصلاح-کننده خاک (بیوچار) سبب بهبود آنتوسیانین برگ در سطوح مختلف تنش شوری و روی شد (شکل ۶). به طوری که بین بیشترین آنتوسیانین در تیمار عدم شوری، ۳۰۰ پی پی ام روی به همراه بیوچار ۱/۵ درصد و کمترین میزان آن در شوری ۶ دسی‌زیمنس بر متر به همراه ۱۵۰۰ پی پی ام روی و عدم مصرف بیوچار حدود ۹۱ درصد اختلاف وجود داشت (شکل ۶).

گیاهان در شرایط تنش‌های ملایم به سمت افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه می‌روند اما با افزایش تنش، در بسیاری موارد به دلیل کاهش تولید متابولیت‌های اولیه و ضعف بنیه، گیاه به سمت کاهش تولید متابولیت‌های ثانویه کشیده می‌شود. این کاهش در برخی موارد نیز به دلیل آسیب مستقیم حاصل از تنش بر آنزیم‌های دخیل در تولید این متابولیت‌هاست. این نتیجه در مطالعه‌ای که توسط فابریکی اورنگ و

۳۰۰ پی پی ام زوی به ترتیب ۱۰/۳۶ و ۳/۷۹ میلی گرم بر گرم و کمترین آن‌ها در سطح ۳۰۰ پی پی ام به ترتیب ۶/۱۸ و ۲/۱۸ میلی گرم بر گرم گزارش شد (شکل‌های ۳ و ۴).

اثرات فلز سنگین روی بر محتوای کلروفیلی گیاه بسته به غلظت فلز متفاوت است. به طوری که غلظت پایین فلز روی (۳۰۰ پی پی ام) به دلیل نقش کوفاکتوری اش برای بسیاری از آنزیم‌های ضروری در مسیر بیوسنتز رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی، به عنوان محرک تولید برخی آنزیم‌ها مانند رداکتاز عمل کرده و به دنبال آن می‌تواند از تخریب رنگ‌دانه جلوگیری کند (Khuo et al., 2011). نتایج مطالعه حاضر با نتایج حاصل از مطالعه انجام شده در گیاه نعنای (Candan and Tarhan, 2003)، مطابقت و همخوانی داشت.

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثرات ساده شوری، روی و برهمکنش شوری در روی بر محتوای کاروتنوئید در سطح یک درصد تأثیر معنی‌داری داشت (جدول ۲). با افزایش شدت تنش روی و شوری میزان کاروتنوئید برگ کاهش یافت. به طوری که بیشترین کاروتنوئید برگ در تیمار شاهد (بدون شوری و روی) ۳/۶۳ میلی گرم در گرم وزن تر برگ و کمترین آن در تیمار شوری ۶ دسی‌زیمنس بر متر به همراه ۱۵۰۰ پی پی ام روی ۲/۰۳ میلی گرم در گرم وزن تر برگ مشاهده شد که این اختلاف حدود ۴۴ درصد بود (شکل ۵).

کاروتنوئیدها نقش‌های مهمی به عنوان رنگ‌دانه‌های کمکی جمع کننده نور، حفاظت در سیکل گزانتوفیل، ربایش رادیکال‌های آزاد، حفاظت در برابر پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی و جذب کننده‌ی گرده‌افشان‌ها و پراکنش بذرها دارند (Khuo et al., 2011). باین حال نتایج مطالعه حاضر نشان داد که این آنتی‌اکسیدان غیر آنزیمی نتوانسته است فعالیت مثبت و قابل توجهی در جهت حمایت گیاه در مقابل تنش‌های موجود بردارد و خود نیز از تنش‌های موجود آسیب دیده است. همچنین در مطالعه‌ای که توسط میا و همکاران (Mia et al., 2014) صورت گرفت، مشاهده شد که کاروتنوئید برگ-های گیاه شبدر قرمز با کاربرد بیوچار افزایش می‌یابد، باین حال در مطالعه حاضر بیوچار در تنش و عدم تنش تأثیری بر میزان کاروتنوئید برگ نداشت (جدول ۲)

آنتوسیانین، فنل و فلاونوئید

نتایج نشان داد اثرات ساده شوری، روی، بیوچار بر متابولیت‌های ثانویه مورد مطالعه (آنتوسیانین، فنل و فلاونوئید) در

دهند و برای جبران نقص در غلظت مولکولها در طی دوره تنش، وارد عمل شوند (Gholinejad et al., 2014). باین حال در مطالعه‌ای که توسط برقی و قلی پور (Barghi and Gholipouri, 2020) انجام شد، با افزایش تنش شوری میزان آنتوسیانین در گیاه دارویی سیاه‌دانه (*Nigella Sativa* L.) کاهش یافت که با نتایج پژوهش حاضر همسو است (شکل ۶).

داود نیا (Fabriki and Davoodnia, 2018) انجام گرفت، تأیید شد. ایشان همچنین نشان دادند که تنش شوری نسبت به تنش خشکی تأثیر کمتری بر تولید متابولیت‌های ثانویه‌ای مانند آنتوسیانین‌ها و فنل‌ها دارد. همچنین در شرایط تنش، نقشی که برای آنتوسیانین‌ها می‌توان در نظر گرفت این است که آن‌ها سبب تسهیل ورود نمک و عنصر اضافی به واکوئل سلول‌ها می‌شوند. آنتوسیانین‌ها می‌توانند در هماهنگی با مولکول‌های حفاظتی در سلول‌های گیاهی عمل خود را انجام

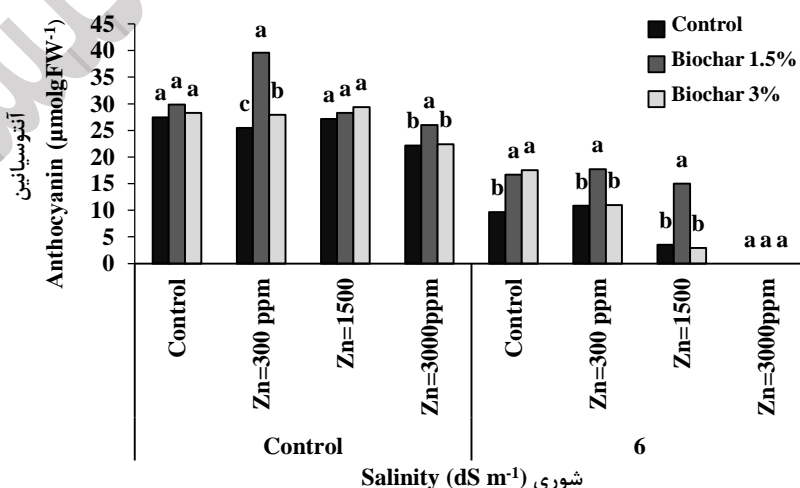
جدول ۳. تجزیه واریانس بیوجار، تنش شوری و روی بر برخی صفات بیوشیمیایی گیاه همیشه‌بهار

Table 3. Analysis of variance of some biochemical traits of marigold plants as affected by biochar, salt stress and Zn

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی	آنتوسیانین Anthocyanin	فنول Phenol	فلاونوئید Phelavenoid	کاتالاز Catalase	آسکوربات پراکسیداز Ascorbate peroxidase
شوری Salinity (A)	1	1.21**	0.42**	51.37**	0.0002 ^{ns}	60.5 ^{ns}
روی Zn (B)	3	0.13**	0.12**	14.44**	0.081**	2555.5**
بیوجار Biochar (C)	2	0.18**	0.01**	0.66**	0.014**	39.5 ^{ns}
A×B	3	0.04**	0.068**	9.15**	0.52**	6419.5**
A×C	2	0.001**	0.001 ^{ns}	0.003 ^{ns}	0.00008 ^{ns}	2.00 ^{ns}
B×C	6	0.026**	0.001 ^{ns}	0.11**	0.0005**	8.00 ^{ns}
A×B×C	6	0.044**	0.001 ^{ns}	0.03 ^{ns}	0.002**	2.5 ^{ns}
Error	خطا	48	0.001	0.001	0.0002	28.2
CV%	-	7.36	7.31	5.69	8.51	4.24

* و ** به ترتیب اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد و ۱ درصد و ^{ns} عدم اختلاف معنی‌دار را نشان می‌دهند.

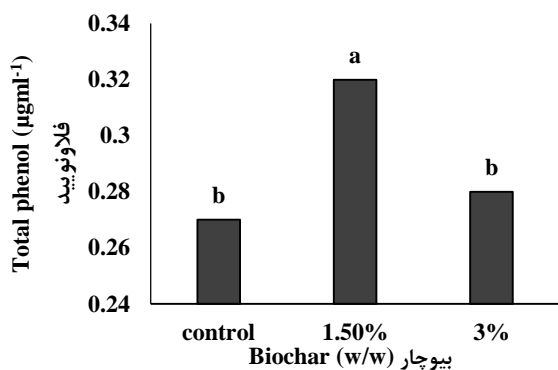
ns = non-significant; * = significant at 5% level; ** = significant at 1% level.



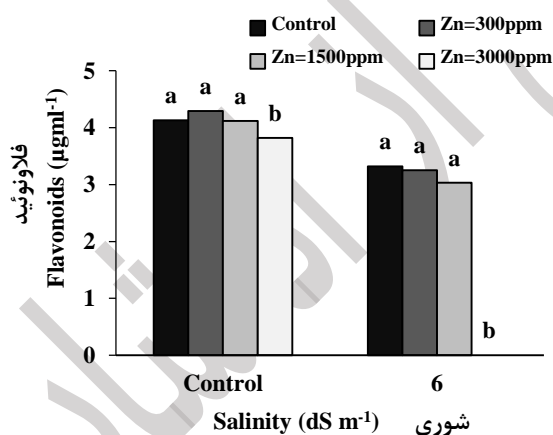
شکل ۶. اثر متقابل شوری در بیوجار و روی بر آنتوسیانین، در هر سطح روی، میانگین‌های دارای حروف مشترک به صورت برش دهی دارای اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون LSD نمی‌باشند

Fig. 6. Effect of salinity, biochar and Zn on anthocyanin, In Zn levels, means with same letters as slicing are not significantly different by LSD test ($p < 0.05$).

شوری (شاهد) به همراه روی در سطوح ۰، ۳۰۰ و ۱۵۰۰ پی‌پی‌ام بدون تفاوت معنی‌دار با یکدیگر، به ترتیب به میزان ۴/۱۳، ۴/۲۹ و ۴/۱۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر و کمترین میزان آن در شوری ۶ دسی‌زیمنس بر متر به همراه ۱۵۰۰ پی‌پی‌ام روی، ۳/۰۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد، کاربرد سطوح مختلف روی بر میزان فلاونوئید برگ تأثیری نداشت (شکل ۹).



شکل ۸. اثر بیوجار بر فنل کل
Fig. 8. The effect of biochar on total phenol



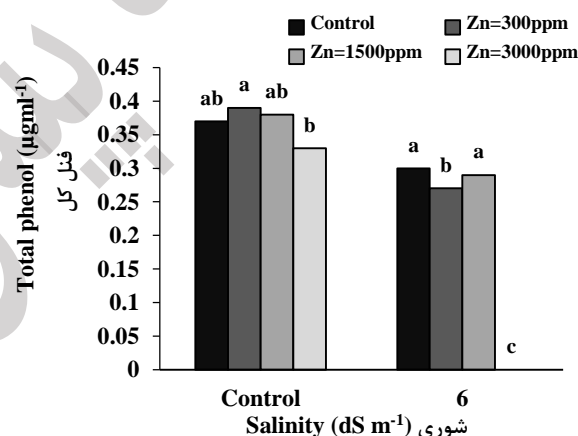
شکل ۹. اثر متقابل شوری و روی بر فلاونوئید، در هر سطح شوری، میانگین‌های دارای حروف مشترک به صورت برش دهی دارای اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون LSD نمی‌باشند

Fig. 9. Effect of salinity and Zn on phenol levels, In salinity levels, means with same letters as slicing are not significantly different by LSD test ($p < 0.05$).

اثر متقابل روی در بیوجار بر فلاونوئید برگ نشان داد که با افزایش شدت تنش روی میزان فلاونوئید برگ کاهش یافت ولی کاربرد اصلاح‌کننده بیوجار سبب بهبود محتوای فلاونوئید در سطوح مختلف تنش روی شد، به طوری که بیشترین

در شرایط عدم شوری و عدم مصرف بیوجار، عدم مصرف روی، همچنین مصرف آن در سطوح ۳۰۰ و ۱۵۰۰ تقریباً بدون تفاوت معنی‌دار با یکدیگر بیشترین میزان آنتوسیانین را نشان دادند، این میزان به طور متوسط حدود ۲۰ درصد بیش از آنتوسیانین موجود در سطح ۳۰۰۰ پی‌پی‌ام در شرایط مذکور بود (شکل ۶).

مصرف بیوجار مخصوصاً در سطح ۱/۵ درصد وزنی سبب افزایش آنتوسیانین، فنل کل و فلاونوئید شد (شکل‌های ۶، ۷ و ۸). استفاده از بیوجار در خاک به دلیل افزایش دسترسی عناصر غذایی در خاک و بهبود ویژگی‌های فیزیکی، زیستی و شیمیایی خاک شرایط رشد گیاه را بهبود بخشیده و مانع از روبرویی گیاه با اثرات سوء تنش می‌شود (Major et al., 2010). در نتیجه مقدار ترکیبات ثانویه که به منظور محافظت از گیاه در شرایط تنش تولید می‌شوند، افزایش می‌یابد.



شکل ۷. اثر متقابل شوری در روی فنل کل، در هر سطح شوری، میانگین‌های دارای حروف مشترک به صورت برش دهی دارای اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون LSD نمی‌باشند.

Fig.7. Effect of salinity and Zn on total phenol, In salinity levels, means with same letters as slicing are not significantly different by LSD test ($p < 0.05$).

با افزایش شوری میزان فنل کل کاهش یافت، اما بین سطوح صفر، ۳۰۰ و ۱۵۰۰ پی‌پی‌ام روی، در هیچ‌یک از سطوح شوری، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. مصرف ۳۰۰۰ پی‌پی‌ام روی در مقابل ۳۰۰ پی‌پی‌ام، در شرایط عدم شوری، کاهش ۱۵ درصدی را در میزان فنل کل نشان داد (شکل ۷). با افزایش تنش شوری و روی محتوای فلاونوئید برگ کاهش پیدا کرد. به طوری که بالاترین میزان فلاونوئید در تیمار عدم

در این پژوهش گیاهانی که با بیوچار تیمار شده‌اند مقدار ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در آن‌ها افزایش یافته است که با نتایج شهباز و همکاران (Shahbaz et al., 2018) در گیاه آفتابگردان مطابقت دارد.

بیوچار از ظرفیت تبادل کاتیونی (CEC) و ظرفیت نگهداری مواد مغذی بالا برخوردار است و از این طریق آبشویی مواد مغذی را کاهش می‌دهد بیوچار همچنین می‌تواند به‌عنوان منبع مواد مغذی (نیترات، نیتروژن، پتاسیم، آهن، منگنز و روی) در نظر گرفته شود (Nemati et al., 2015). در شرایط شوری (۶ دسی زیمنس بر متر)، میزان آنزیم کاتالاز در غلظت‌های پایین روی افزایش، اما در غلظت‌های بالای روی (۱۵۰۰ و ۳۰۰۰ پی‌پی‌ام) روند نزولی داشت. همچنین بیشترین فعالیت کاتالاز با مصرف ۱/۵ درصد بیوچار در تمام تیمارها مشاهده شد. مصرف ۱/۵ درصد بیوچار، نسبت به عدم مصرف بیوچار در شرایط استفاده از روی در سطوح، ۳۰۰ و ۱۵۰۰ پی‌پی‌ام به ترتیب سبب افزایش ۱۵، ۱۶ و ۲۰ درصدی کاتالاز شد.

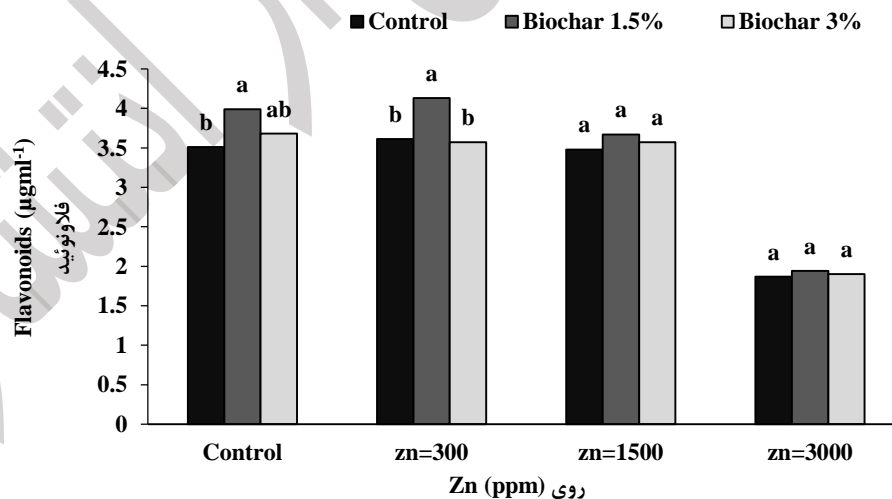
فلاونوئید در تیمار روی ۳۰۰ پی‌پی‌ام و عدم مصرف روی به همراه بیوچار ۱/۵ درصد وزنی به ترتیب به میزان ۴/۱۳ و ۳/۹۹ میکروگرم بر میلی‌گرم و کمترین آن در بالاترین سطح روی (۳۰۰۰ پی‌پی‌ام) مشاهده شد، مصرف بیوچار در بالاترین سطوح روی (۳۰۰۰ و ۱۵۰۰ پی‌پی‌ام) تأثیری بر فلاونوئید نداشت (شکل ۱۰).

فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و اسکوربات پراکسیداز

نتایج نشان داد اثرات ساده روی و بیوچار و نیز برهمکنش آن‌ها (به‌جز شوری در بیوچار) بر فعالیت آنزیم کاتالاز برگ در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۳).

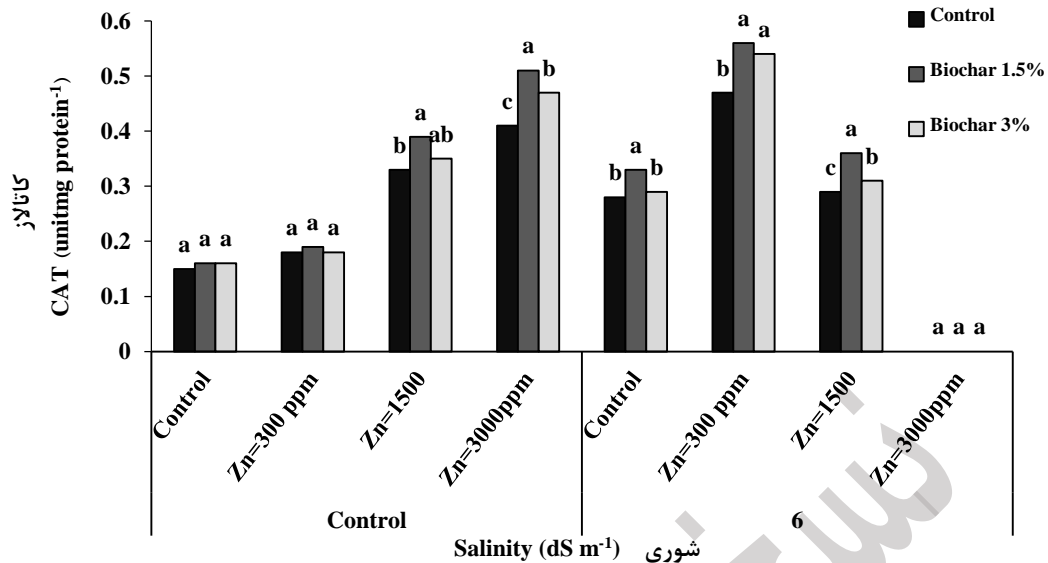
در شرایط عدم شوری و عدم مصرف بیوچار، روی در سطح ۳۰۰۰ پی‌پی‌ام و صفر (عدم روی) به ترتیب بیشترین (۰/۴۱ واحد بر میلی‌گرم پروتئین) و کمترین (۰/۱۵ واحد بر میلی‌گرم پروتئین) فعالیت کاتالاز را به خود اختصاص دادند (شکل ۱۱).

در شرایط عدم تنش شوری با افزایش شدت تنش روی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز افزایش یافت. در شرایط مذکور (عدم شوری) مصرف بیوچار در تمام سطوح روی، سبب افزایش قابل توجه در کاتالاز شد.

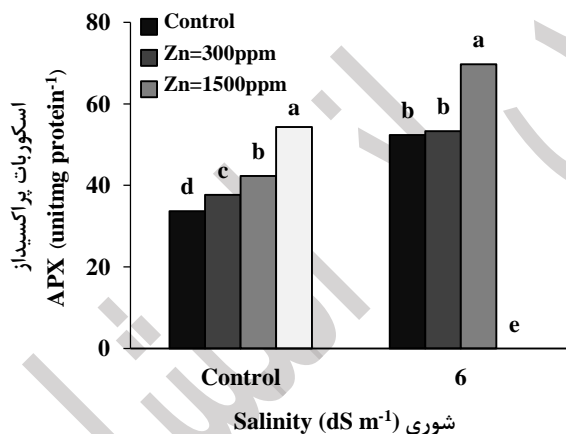


شکل ۱۰. اثر متقابل روی و بیوچار بر فلاونوئید، در هر سطح روی، میانگین‌های دارای حروف مشترک به صورت برش دهی دارای اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون LSD نمی‌باشند.

Fig.10. Effect of Zn and biochar on phenonoids, In Zn levels, means with same letters as slicing are not significantly different by LSD test ($p < 0.05$).



شکل ۱۱. اثر متقابل شوری، روی و بیوچار بر فعالیت آنزیم کاتالاز، در هر سطح روی، میانگین‌های دارای حروف مشترک به صورت برش دهی دارای اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون LSD نمی‌باشند
Fig 11. Effect of salinity, Zn and biochar on CAT activity, In Zn levels, means with same letters as slicing are not significantly different by LSD test (p <0.05)



شکل ۱۲. اثر متقابل شوری و روی بر فعالیت آنزیم اسکوربات پراکسیداز، در هر سطح شوری، میانگین‌های دارای حروف مشترک به صورت برش دهی دارای اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون LSD نمی‌باشند.
Fig. 12. Effect of salinity and Zn on APX activity, In salinity levels, means with same letters as slicing are not significantly different by LSD test (p <0.05).

نتایج بررسی داده‌ها نشان داد که اثر ساده روی و برهمکنش شوری در روی بر فعالیت اسکوربات پراکسیداز برگ در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۳).

اسکوربات پراکسیداز به‌عنوان یک احیاکننده برای خیلی از رادیکال‌های آزاد و به‌خصوص پراکسید هیدروژن عمل می‌کند؛ بنابراین خسارت ناشی از تنش اکسیداتیو را به کمترین مقدار می‌رساند (Gholinejad et al., 2014). اسکوربات پراکسیداز دارای چندین نقش اساسی در فرآیندهای فیزیولوژیکی گیاه مانند رشد و نمو و متابولیسم است و همچنین به‌عنوان یک احیاکننده برای خیلی از رادیکال‌های آزاد و به‌خصوص پراکسید هیدروژن عمل می‌کند؛ بنابراین خسارت ناشی از تنش اکسیداتیو را به کمترین مقدار می‌رساند (Gholinejad et al., 2014).

در شرایط شوری (۶ دسی‌زیمنس بر متر) مصرف ۱۵۰۰ پی‌پی‌ام روی نسبت به عدم مصرف آن، فعالیت آنزیم اسکوربات پراکسیداز را ۲۵ درصد افزایش داد (شکل ۱۲). مصرف ۳۰۰ پی‌پی‌ام روی نسبت به عدم مصرف روی تأثیری بر فعالیت آنزیم اسکوربات پراکسیداز نداشت.

کاهش ولی میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت افزایش یافت؛ اما غلظت ۳۰۰ پی‌پی‌ام روی در شرایط تنش شوری سبب بهبود صفات رشدی و فیزیولوژیکی گیاه همیشه‌بهار گردید. باین‌حال کاربرد ماده اصلاح‌کننده بیوپچار در شرایط تنش شوری و فلز روی سبب بهبود رشد گیاه شده و باعث افزایش صفات رشدی، رنگیزه‌های فتوسنتزی و متابولیت‌های ثانویه و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شد. بهترین غلظت بیوپچار برای مقابله با تنش شوری و فلز روی غلظت ۱/۵ درصد وزنی بیوپچار بود؛ بنابراین در پژوهش حاضر غلظت ۳۰۰ پی‌پی‌ام روی و ۱/۵ درصد وزنی بیوپچار به‌عنوان بهترین تیمار برای افزایش مقاومت به تنش شوری و روی مشخص شد

نتیجه‌گیری نهایی

شوری و فلزات سنگین از تنش‌های محیطی هستند که منجر به کاهش رشد و نمو و عملکرد گیاه شده و با ایجاد تنش اکسیداتیو به ماکرومولکول‌های سلولی حمله می‌کند. فلز روی در غلظت‌های پایین تأثیر مطلوبی بر گیاه همیشه‌بهار داشته اما در غلظت‌های بالاتر از ۳۰۰ پی‌پی‌ام باعث ایجاد سمیت و تنش بر روی گیاه شد. تحت تنش شوری و فلز سنگین روی، در گیاه همیشه‌بهار، تغییر در صفات‌های رشدی و بیوشیمیایی مشاهده شد. به‌طوری‌که با افزایش شدت تنش شوری و روی صفات رشدی، رنگیزه‌های فتوسنتزی و متابولیت‌های ثانویه

منابع

- Abeer, H., Abdallah, E.F., Alqarawi, A.A., Egamberdieva, D., 2015. Induction of salt stress tolerance in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) by arbuscular mycorrhizal fungi. *Legume Research*. 38, 579-88. <https://doi.org/10.18805/lr.v38i5.5933>
- Ahmad, P., Azooz, M.M., Prasad, M.N.V, eds., 2012. Ecophysiology and responses of plants under salt stress. *Journal of Springer Science a Business Media*. New York, pp. 443-472
- Balashouri, P., 1995. Effect of zinc on germination, growth and pigment content and phytomass of *Vigna radiata* and *Sorghum bicolor*. *Journal of Ecobiology*. 7, 109-114.
- Barghi, A., Gholipouri, A., 2020. Effects of jasmonic acid and 24-epi brassinolid on quantitative and qualitative yield of *Nigella sativa* L. under salinity stress condition. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*. 36, 839-850. [In Persian with English Summary]
- Buss, W., Kammann, C., Koyro, H., 2012. Biochar reduces copper toxicity in *Chenopodium quinoa* willd. in a sandy soil. *Journal of Environmental Quality*. 41, 1157-1165. <https://doi.org/10.2134/jeq2011.0022>
- Bradford, M.M., 1979. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72, 248-254.
- Brown, P.H., Cakmak I., Zhang, Q., 1993. Form and function of zinc in plants. 93-106 In: Robson, A.D. (ed.), *Zinc in soils and plants* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherland.
- Candan, N., Tarhan, L., 2003. The correlation between antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation levels in *Mentha pulegium* organs grown in Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} and Mn^{2+} stress conditions. *Plant Science*. 165, 769-776. [https://doi.org/10.1016/s0168-9452\(03\)00269-3](https://doi.org/10.1016/s0168-9452(03)00269-3)
- Chakraborty, G. S., 2010. Phytochemical screening of *Calendula officinalis* Linn leaf extract by T L C. *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy*. 1, 131-134
- Dehghan Neiri., 2014. Investigating the effects of salinity stress and salicylic acid on some morphological, physiological and biochemical characteristics of marigold (*Calendula officinalis* L.). Master's thesis in the field of agriculture, horticultural sciences, Shahid Bahonar University, Kerman. Page 116. [In Persian with English Summary]
- FAO., 2022. Global Symposium on Salt-Affected Soils: Outcome document. Rome. <https://doi.org/10.4060/cb9929en>
- Fabriki-Ourang, S., Davoodnia, B., 2018. Changes in growth characteristics and secondary metabolites in *Thymus vulgaris* L. under moderate salinity and drought shocks. 6, 27-40. [In Persian with English Summary].
- Gazim, Z., Rezende, C., Fraga, S., Dias, Filho, B., Nakamura, C., Cortez, D., 2008. Analysis of

- the essential oils from *Calendula officinalis* growing Brazil using three different extraction procedures. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 44, 391-395.
- Gholinejad, R., Sirousmehr, A., Fakheri, B., 2014. Effect of drought stress and organic fertilizer on activity of some antioxidant enzymes, photosynthetic pigments, proline and yield of Borage (*Borago officinalis*). *Journal of horticulture science*. 3 (28), 338-346.
- Hormozinejad, E., Zolfaghari, M., Mahmoodi Sourestani, M., Enayati Zamir, N., 2018. Effects of plant growth promoting rhizobacteria and chemical fertilizer on growth, yield, flowering, physiological properties, and total phenolic content of *Calendula officinalis* L. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*. 34, 684-696. [In Persian with English Summary]
- Housley, C., Kachenco, A.G., Singh. B., 2015. Effects of Eucalyptus Saligna biochar-amended media on the growth of *Acmenasmithii*, *Viola* var. *hybrida*, and *Viola*×*wittrockiana*. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 90, 187-194.
- Kanayama, Y., Kochetov, A. 2016. Abiotic stress biology in horticultural plants; horticultural research. 15, 213-220.
- Khalid, K.A., Teixeira da Silva, J., 2012. Biology of *calendula officinalis* Linn: focus on pharmacology, biological activities and agronomic practices. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*. 6, 12-27.
- Khoo, H-E., Prasad, K.N., Kong, K-W., Jiang, Y., Ismail, A., 2011. Carotenoids and their isomers: color pigments in fruits and vegetables. *Molecules*. 16, 1710- 1738. <https://doi.org/10.3390/molecules16021710>
- Lehmann, J., 2007. A Handful of carbon. *Nature*, 447, 143-144.
- Lichtenthaler, H.K., 1987. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*. 148, 350-382.
- Liu, J., Li J., Su X., Xia Z., 2014, Grafting improves drought tolerance by regulating antioxidant enzyme activities and stress responsive gene expression in tobacco. *Environmental and Experimental Botany*. 107, 173-179. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.06.012>
- Major, J., Lehmann, J., Rondon, M., Goodale, C., 2010. Fate of soil- applied black carbon: downward migration, leaching and soil respiration. *Global Change Biology*. 16, 1366-1379.
- Mancarella, S., Orsini, F., Van Oosten, M.J., Sanoubar, R., Stanghellini, C., Kondo, S., Gianquinto, G., Maggio, A., 2016. Leaf sodium accumulation facilitates salt stress adaptation and preserves photosystem functionality in salt stressed *Ocimum basilicum*. *Environmental and Experimental Botany*. 130, 162-173.
- Mia, S., van, G., roenigen, J., Van, de, V., oorde, T., Oram, N., Bezemer, T., Mommer, L. Jeffery, S., 2014. Biochar application rate affects biological nitrogen fixation in redclover conditional on potassium availability. *Agric. Ecosyst. Environ.* 191, 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2014.03.011>
- Mirzaie, M., Lada Moghadam, A.R., Hakimi, L., Danaee, E., 2020. Water stress modifies essential oil yield and composition, glandular trichomes and stomatal features of lemongrass (*Cymbopogon citratus* L.) inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi. *Journal of Agricultural Science and Technology*. 22, 1575-1585.
- Moradi, R., Pourghasemian, N., Naghizade, M., 2019. Effect of beeswax waste biochar on growth, physiology and cadmium uptake in saffron. *Journal of Cleaner Production*. 1251-1261
- Nemati, M. R., Simard, F., Fortin, J. P., Beaudoin, J., 2015. Potential use of biochar in growing media. *Vadose Zone Journal*. 14, 44-61. <https://doi.org/10.2136/vzj2014.06.0074>
- Pourghasemian, N., Moradi, R., 2017. Potential of using beeswax waste as the substrate for borage (*Borago officinalis*) planting in different irrigation regimes. *Journal of Plant Process and Function*. 7, 42-65. [In Persian with English Summary].
- Pourghasemian, N., Moradi, R., Naghizade, M. 2018. Effect of planting time and place on quality of some brompton stock varieties for cultivation in Bardsir, Kerman. *Journal of Agricultural Crops Production*. 20, 679-692. In Persian. <https://doi.org/10.22059/jci.2018.246733.1879>
- Preethi, K., Chandran, R. K., 2008. Effect of *Calendula officinalis* flower extract on acute phase proteins, antioxidant defense mechanism and granuloma formation during thermal burns.

- Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition, 43, 58-64.
<https://doi.org/10.3164/jcbrn.2008043>
- Rai, V., Vaypayee P., Singh S.N., Mehrotra S., 2004. Effect of chromium accumulation on photosynthetic pigments, oxidative stress defense system, nitrate reduction, proline level and eugenol content of *Ocimum tenuiflorum*. *Plant Science*. 167, 1159-1164.
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.06.016>
- Reichman, S. M., Asher, C.J., Mulligan D. R., Menzies, N.W., 2001. Seedling responses of three Australian tree species to toxic concentrations of zinc in solution culture. *Plant Soil*. 235, 151-158.
<https://doi.org/10.1023/A:10119034303852829>
- Shahbaz, A. K., Lewinska, K., Iqbal, J., Ali, Q., Rahman, M., Iqbal, M., Abbas, F., Tauqeer, H. Ramzani, M., 2018. Improvement in productivity, nutritional quality, and antioxidative defense mechanisms of Sunflower (*Helianthus annuus* L.) and Maize (*Zea mays* L.) in nickel contaminated soil amended with different biochar and zeolite ratios. *Journal of Environmental Management*. 218, 256-270.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.04.046>
- Shanker, K., Venkateswarlu, B., 2011. *Abiotic Stress in Plants – Mechanisms and Adaptations*. Published by Intec JanezaTrdine 9, 51000 Rijeka, Croatia.
- Sukaron, N., Utomo, W., Kusuma, Z., Nugroho, Wh., maize (*Zea mays* L.). 2011. Soil fertility status, nutrient uptake, and yield following biochar and cattle manure application on sandy soils of Lombok, Indonesia. *Journal of Tropical Agriculture* 49, 47-52.
- Tang, J., Zhu, W., Kookana, R., Katayama, A., 2013. Characteristics of biochar and its application in remediation of contaminated soil. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 116, 653-659.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.05.035>
- Wagner, G.J., 1979. Content and vacuole/extravacuole distribution of neutral sugars, free amino acids, and anthocyanin in protoplasts. *Plant Physiology*. 64, 88-93.
<https://doi.org/10.1104/pp.64.1.88>
- Zhang, L., Sun, X., Tian, Y., and Gong, X., 2014. Biochar and humic acid amendments improve the quality of composted green waste as a growth medium for the ornamental plant *Calathea insignis*. *Scientia Horticulturae*. 176, 70-78.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.06.021>