University of Birjand

Journal homepage:
https://escs.birjand.ac.ir

تنشهای محیطی در علوم زراعی
Environmental Stresses In Crop Sciences

Vol. 17, No. 4, pp. 667-683 (Winter 2025)

https://doi.org/10.22077/ESCS.2024.6360.2211

Original article

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. Hedayati[1], N. Pourghasemian[2,3*], M. Naghizadeh[4], R. Moradi[5]

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

© 2025, The Author(s). Published by University of Birjand. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0).

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 dsm^{-1}; salt stress with EC=6 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

تنش‌های محیطی در علوم زراعی
Environmental Stresses in Crop Sciences
جلد هفدهم، شماره چهارم، زمستان ۱۴۰۳

https://doi.org/10.22077/ESCS.2024.6360.2211

مقاله پژوهشی

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

فاطمه هدایتی[۱]، نسیبه پورقاسمیان[۲،۳*]، 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 فرآوری 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

واژه‌های کلیدی:
اسکوربات پراکسیداز
رنگیزه‌های فتوسنتزی
کاتالاز
گیاه دارویی
متابولیت‌های ثانویه

تاریخ دریافت:
۱۴۰۲/۰۲/۳۰

تاریخ پذیرش:
۱۴۰۲/۰۶/۲۲

تاریخ انتشار:
زمستان ۱۴۰۳

۱۷(۴): ۶۶۷-۶۸۳

چکیده

به‌منظور بررسی اثر کاربرد بیوچار 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 بیوچار 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 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 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 آسکوربات پراکسیداز تحت تنش شوری و روی در مقایسه با تیمارهای شاهد افزایش یافتند. استفاده از بیوچار 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 بیوچار شد.

مقدمه

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 مورداستفاده قرار گرفت (Khalid and Teixeira de Silva, 2012).

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

* نگارنده پاسخگو: نسیبه پورقاسمیان. پست الکترونیک: n.pourghasemian@uk.ac.ir

ترکیبات فنولی و بخصوص فلاونوئیدها، علاوه بر نقش آنتی-اکسیدانی، دارای خواص ضدمیکروبی نیز هستند (Preethi et al., 2008). به‌طورکلی 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 ضدویروسی، ضد توموری و آنتی‌موتاژنی است، به‌طوری‌که در حال حاضر یکی از مهم‌ترین کاربردهای آن درمان التهاب‌های پوستی است. جوشانده آن در شستن چشم‌ها، غرغره‌کردن، درمان ورم ملتحمه، التهاب گلو، التهاب دهان و لثه مورداستفاده قرار می‌گیرد (Hormozinejad et al., 2018).

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

عوامل محیطی در میزان و نوع متابولیت‌های ثانویه گیاهان نقش به سزایی 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 شناخته‌شده است. استفاده از آب بی‌کیفیت، 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 موردنیاز 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 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 درنهایت 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 موردتوجه 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 قابل‌توجه، 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 موردمطالعه 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. بااین‌حال 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

گیاه موردمطالعه قرار گرفت. همچنین محققین این مطالعه، روی را به‌عنوان یک عنصر ضروری که در سطح زیاد می‌تواند 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 روش‌ها

به‌منظور بررسی تأثیر سطوح مختلف بیوچار بر تنش ناشی از شوری و روی بر گیاه همیشه‌بهار، مطالعه‌ای در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی بردسیر، دانشگاه شهید باهنر کرمان به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه فاکتور شامل تنش شوری در دو سطح (شاهد، آب چاه با هدایت الکتریکی ۶ دسی‌زیمنس بر متر)، عنصر روی در ۴ سطح (شاهد، ۳۰۰، ۱۵۰۰ و ۳۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک) و بیوچار حاصل از تفاله موم زنبورعسل در سه سطح (شاهد، ۱/۵ و ۳ درصد وزنی) و در سه تکرار اجرا شد.

برای اعمال تیمارهای موردنظر، ابتدا بیوچار تولیدشده از تفاله موم زنبورعسل که در شرایط بی‌هوازی در کوره‌ای با حرارت غیرمستقیم تولید شد با درصدهای موردنظر به خاک اضافه شدند، ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی بیوچار و خاک مورداستفاده قبل از ترکیب با بیوچار و اعمال تنش‌ها، اندازه‌گیری 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		لومی‌رسی loam-clay	-
Ec	هدایت الکتریکی	dSm^{-1}	1.8	3.96
pH	اسیدیته	pH	7.2	9.4
Organic matter	ماده آلی	%	1.03	-
Total Zn	روی کل	$mgkg^{-1}$	0.07	-
Organic carbon	کربن آلی	%	0.76	22
N	نیتروژن	%	0.24	3.47
P	فسفر	mkg^{-1}	19.41	28.31
K	پتاسیم	mkg^{-1}	310	384

برای اعمال تیمار روی با غلظت‌های مذکور، سولفات روی را در آب حل کرده و خاک به‌طور یکنواخت به روی آلوده شد. خاک‌آلوده 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.

به‌منظور کشت، از سینی‌های نشا که با کوکوپیت پر شده‌اند استفاده و زمانی که نشاها به مرحله ۳-۴ برگی رسیدند به گلدان‌های پلاستیکی حاوی خاک‌آلوده به روی و آغشته به بیوچار منتقل شدند. تا زمان انتقال گیاهان به گلدان‌های پلاستیکی تنش شوری اعمال نشده و آبیاری تمامی گیاهان در سینی کاشت با آب شهر صورت گرفت؛ اما پس از انتقال نشاها به گلدان‌های پلاستیکی تنش شوری در نیمی از گلدان‌ها اعمال و با آب با شوری ۶ دسی‌زیمنس بر متر و بقیه گلدان‌ها با آب شهر آبیاری گردید.

صفات بیوشیمیایی شامل رنگیزه‌های فتوسنتزی کلروفیل a و b و کل، فنل، فلاونوئید، آنتوسیانین و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت 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، اندازه‌گیری شدند.

برای اندازه‌گیری میزان کلروفیل و کاروتنوئید از روش لیچتنتالر (Lichtenthaler, 1987) استفاده شد. غلظت رنگیزه‌های گیاهی با استفاده از رابطه‌های ۱ تا ۳ محاسبه شد.

$$Chl.\ a = (12.25A663.2 - 2.79A646.8) \quad [۱]$$

$$Chl.\ b = (21.21A646.8 - 5.1\ A663.2) \quad [۲]$$

$$Car=[(1000A470-1.8\ Chl.a-85.02\ Chl.b)/198] \quad [۳]$$

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

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

جهت اندازه‌گیری فنل، ۰/۱ گرم از بافت گیاهی در ۱ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد سائیده عصاره حاصل به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق در تاریکی نگهداری شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در g×2000 سانتریفیوژ و از محلول رویی برای سنجش فنل‌ها استفاده شد. برای رسم منحنی استاندارد، غلظت‌های ۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۲۵ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر اسید گالیک تهیه و با استفاده از منحنی استاندارد گالیک اسید، غلظت فنل‌ها تخمین زده شد (Wagner, 1979).

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 طول‌موج ۴۳۰ نانومتر خوانده شد.

از کوئسترین به‌منظور رسم منحنی استاندارد استفاده شد و نتایج برحسب میلی‌گرم کوئسترین 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 درزمان آغاز گلدهی نمونه‌گیری صورت گرفت.

۰/۱ گرم از نمونه برگی 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 هموژنیزه گردید. سپس عصاره‌های حاصل در دور ۱۴۰۰۰g 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 اسکوربات پراکسیداز در اثر فعالیت APX در طول‌موج ۲۹۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Beckman Du۵۳۰) در مدت یک دقیقه اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم‌ها برحسب واحد آنزیم در مقدار پروتئین کل میلی‌گرم موجود در ۵۰ میکرولیتر عصاره گزارش شد.

تجزیه‌وتحلیل 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 موردبررسی به‌صورت برش‌دهی انجام شد.

نتایج و بحث

صفات رویشی گیاه همیشه‌بهار

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

جدول ۲. تجزیه واریانس بیوچار، تنش شوری و روی بر برخی صفت‌های رشدی و رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی گیاه همیشه‌بهار

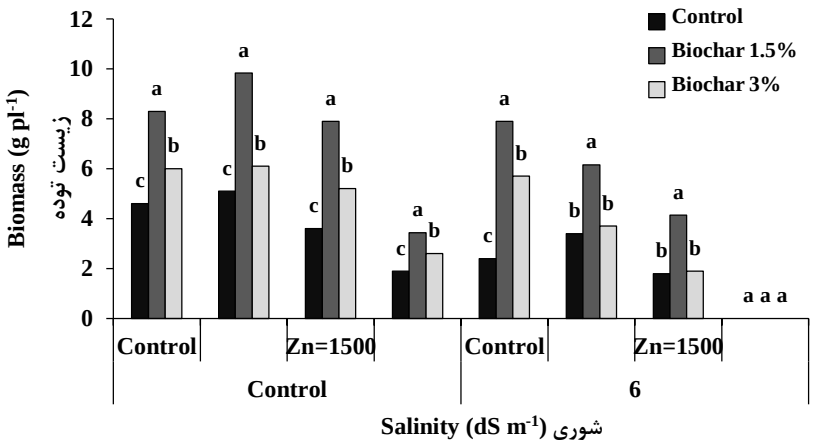
Table 2. Analysis of variance of some growth traits and photosynthetic pigments of marigold plants as affected by biochar, salt stress and Zn.

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی (df)	زیست‌توده Biomass	وزن خشک گل Flower dry weight	کلروفیل a Chla	کلروفیل b Chlb	کاروتنوئید Cartenoid
شوری Salinity (A)	1	94.39**	2.46**	303.57**	37.75**	27.82**
روی Zn (B)	3	79.11**	2.01**	90.47**	13.58**	14.76**
بیوچار Biochar (C)	2	59.96**	1.63**	7.93**	1.27**	0.32^{ns}
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	48	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 وns عدم اختلاف معنی‌دار را نشان می‌دهند.

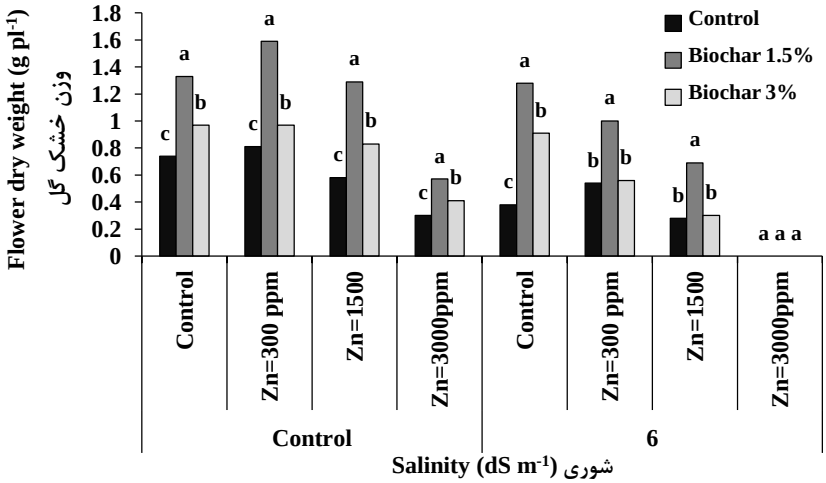
ns = non-significant; * = significant at 5% level; ** = significant at 1% level.

نتایج مقایسه میانگین در مطالعه حاضر نشان داد که با افزایش تنش شوری و افزایش روی از ۳۰۰ پی‌پی‌ام به بالا میزان زیست‌توده کل و وزن خشک گل همیشه‌بهار کاهش پیدا کرد (شکل ۱ و ۲).



شکل ۱. اثر متقابل شوری در بیوچار و روی بر زیست‌توده گیاه، در هر سطح روی، میانگین‌های دارای حروف مشترک به‌صورت برش دهی دارای اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون LSD نمی‌باشند.

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 بیوچار و روی بر وزن خشک گل، در هر سطح روی، میانگین‌های دارای حروف مشترک به‌صورت برش‌دهی دارای اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون LSD نمی‌باشند

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 پاسخ رشد به شوری دو فاز وجود دارد، فاز اول کاهش رشد، یک فرایند سریع‌تر است که به علت اثر اسمزی است. فاز دوم، روند بسیار آهسته‌تری است که به علت تجمع نمک در برگ‌ها، منجر به سمیت نمک در گیاهان می‌شود. ممکن است این سمیت منجر به مرگ برگ‌ها و کاهش سطح برگ‌های فتوسنتزی شود که تولید فرآورده‌های فتوسنتز را در گیاه کاهش می‌دهد و درنهایت عملکرد را تحت تأثیر قرار می‌دهد (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 بیماری‌زا مؤثر است (Kanayama and Kochetv,

2016). درحالی‌که مقدار اضافی آن‌ها در خاک موجب اختلالات متابولیکی و درنهایت بازدارندگی رشد در بیشتر گونه‌های گیاهی می‌شود. غلظت بالای روی، مانند سایر فلزات سنگین، برای گیاهان سمی است (Balashouri, 1995)، بااین‌حال 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 ازجمله 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 مورداستفاده قرار گرفته است (Lehmann, 2007). به‌طورکلی، 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 دسی زیمنس 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 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، بااین‌حال 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 a، b و کاروتنوئید

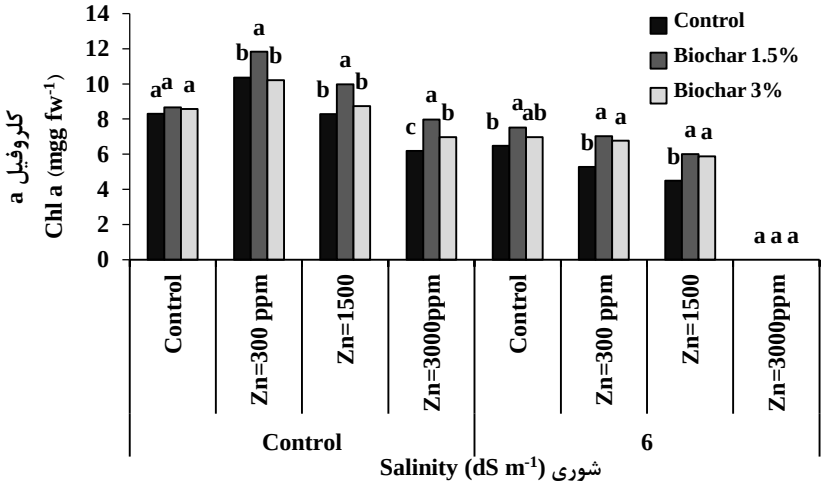
نتایج نشان داد که اثرات ساده شوری، روی، بیوچار و همچنین برهمکنش آن‌ها بر کلروفیل a و b در سطح احتمال یک درصد تأثیر معنی‌داری داشت (جدول ۲). کاهش مقدار کلروفیل در گیاهان تحت تنش فلزات سنگین و شوری می‌تواند به علت مهار مراحل مختلف سنتز کلروفیل و آسیب به سنتز برخی آنزیم‌ها باشد و نیز جایگزین شدن یون منیزیم مرکزی کلروفیل به‌وسیله 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، درحالی‌که 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، ۳/۷۹ میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ و کمترین میزان آن در سطح شوری ۶ دسی زیمنس 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 منیزیوم در شرایط تنش شوری سبب کاهش محتوای کلروفیل در گیاه می‌شود (Ahmad et al., 2012).

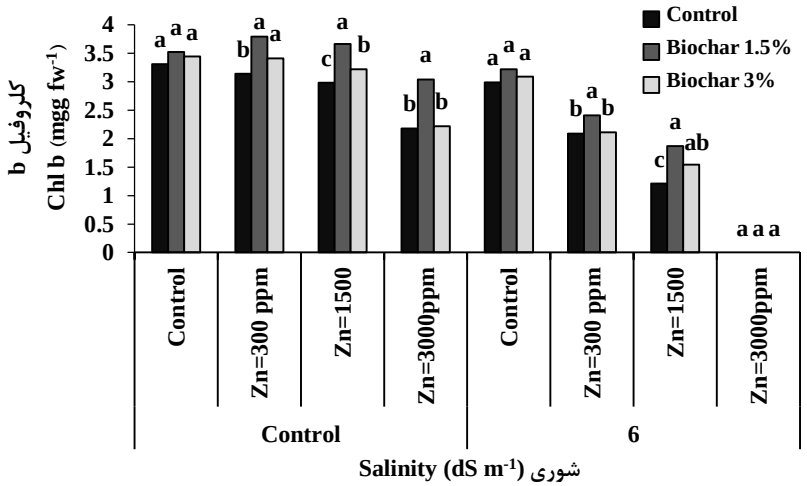
استفاده از بیوچار افزایش محتوای کلروفیل را به دنبال دارد که سبب افزایش در جذب منیزیم می‌شود که جزء مهمی از رنگ‌دانه کلروفیل است (Abeer et al., 2015). برخی از مطالعات نشان دادند بیوچار به‌واسطه تغییراتی که در

حاصلخیزی و افزایش ظرفیت آب قابل‌استفاده برای گیاه انجام می‌دهد، می‌تواند سبب افزایش میزان کلروفیل a در گیاه گردد. گیاه موردبررسی در مطالعه مذکور، ذرت بود (Sukaron et al., 2011).



شکل ۳. اثر متقابل شوری در بیوچار و روی بر کلروفیل a، در هر سطح روی، میانگین‌های دارای حروف مشترک به‌صورت 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 به‌صورت 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).

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

۳۰۰ پی‌پی‌ام زوی به ترتیب ۱۰/۳۶ و ۳/۷۹ میلی‌گرم بر گرم و کمترین آن‌ها در سطح ۳۰۰۰ پی‌پی‌ام به ترتیب ۶/۱۸ و ۲/۱۸ میلی‌گرم بر گرم گزارش شد (شکل‌های ۳ و ۴).

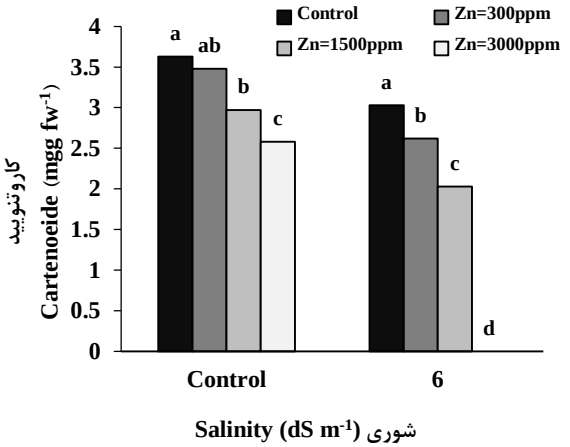
اثرات فلز سنگین روی بر محتوای کلروفیلی گیاه بسته به غلظت فلز متفاوت است. به‌طوری‌که غلظت پایین فلز روی (۳۰۰ پی‌پی‌ام) به دلیل نقش کوفاکتوری‌اش برای بسیاری از آنزیم‌های ضروری در مسیر بیوسنتز رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی، به‌عنوان محرک تولید برخی آنزیم‌ها مانند رداکتاز عمل کرده و به دنبال آن می‌تواند از تخریب رنگ‌دانه جلوگیری کند (Khoo et al., 2011). نتایج مطالعه حاضر با نتایج حاصل از مطالعه انجام‌شده در گیاه نعناع (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 محتوی کاروتنوئید در سطح یک درصد تأثیر معنی‌داری داشت (جدول ۲). با افزایش شدت تنش روی و شوری میزان کاروتنوئید برگ کاهش یافت. به‌طوری‌که بیشترین کاروتنوئید برگ در تیمار شاهد (بدون شوری و روی) ۳/۶۳ میلی‌گرم در گرم وزن تر برگ و کمترین آن در تیمار شوری ۶ دسی زیمنس بر متر به همراه ۱۵۰۰ پی‌پی‌ام روی ۲/۰۳ میلی‌گرم در گرم وزن تر برگ مشاهده شد که این اختلاف حدود ۴۴ درصد بود (شکل ۵).

کارتنوئیدها نقش‌های مهمی به‌عنوان رنگ‌دانه‌های کمکی جمع کننده نور، حفاظت در سیکل گزانتوفیل، ربایش رادیکال‌های آزاد، حفاظت در برابر پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی و جذب‌کننده‌ی گرده‌افشان‌ها و پراکنش بذرها دارند (Khoo et al., 2011). بااین‌حال نتایج مطالعه حاضر نشان داد که این آنتی‌اکسیدان غیر آنزیمی نتوانسته است فعالیت مثبت و قابل‌توجهی 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 برگ‌های گیاه شبدر قرمز با کاربرد بیوچار افزایش می‌یابد، بااین‌حال در مطالعه حاضر بیوچار در تنش و عدم تنش تأثیری بر میزان کارتنوئید برگ نداشت (جدول ۲)

آنتوسیانین، فنل و فلاونوئید

نتایج نشان داد اثرات ساده شوری، روی، بیوچار بر متابولیت‌های ثانویه موردمطالعه (آنتوسیانین، فنل و فلاونوئید) در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۳). برهمکنش‌های کل فاکتورهای موردمطالعه نیز اثر معنی‌داری بر آنتوسیانین گذاشت، درحالی‌که فنل تنها تحت تأثیر اثر متقابل روی در شوری و فلاونوئید تحت تأثیر اثر متقابل روی در شوری و بیوچار بر شوری قرار گرفت (جدول ۳).



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

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

به‌طورکلی تنش شوری محتوای آنتوسیانین را کاهش داد، تنش روی تا سطح ۳۰۰ پی‌پی‌ام سبب افزایش آنتوسیانین و از ۳۰۰ به بعد سبب کاهش آن شد، درحالی‌که کاربرد اصلاح‌کننده خاک (بیوچار) سبب بهبود آنتوسیانین برگ در سطوح مختلف تنش شوری و روی شد (شکل ۶). به‌طوری‌که بین بیشترین آنتوسیانین در تیمار عدم شوری، ۳۰۰ پی‌پی‌ام روی به همراه بیوچار ۱/۵ درصد و کمترین میزان آن در شوری ۶ دسی‌زیمنس بر متر به همراه ۱۵۰۰ پی‌پی‌ام 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

داود نیا (Fabriki and Davoodnia, 2018) انجام گرفت، تائید 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 دهند و برای جبران نقص در غلظت مولکول‌ها در طی دوره تنش، وارد عمل شوند (Gholinejad et al., 2014). بااین‌حال 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).

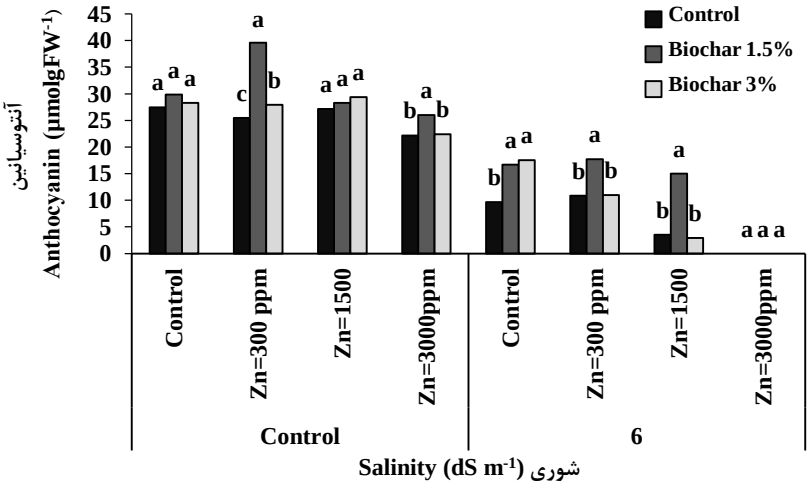
جدول ۳. تجزیه واریانس بیوچار، تنش شوری و روی بر برخی صفات بیوشیمیایی گیاه همیشه‌بهار

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**	0.0002ns	60.5ns
روی Zn (B)	3	0.13**	0.12**	14.44**	0.081**	2555.5**
بیوچار Biochar (C)	2	0.18**	0.01**	0.66**	0.014**	39.5ns
A×B	3	0.04**	0.068**	9.15**	0.52**	6419.5**
A×C	2	0.001**	0.001ns	0.003ns	0.00008ns	2.00ns
B×C	6	0.026**	0.001ns	0.11**	0.0005**	8.00ns
A×B×C	6	0.044**	0.001ns	0.03ns	0.002**	2.5ns
Error خطا	48	0.001	0.001	0.02	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.

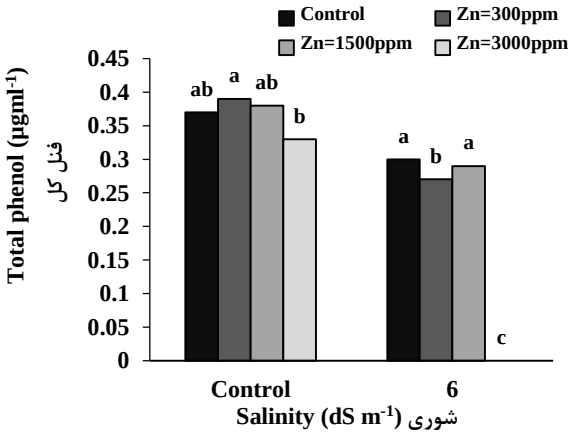


شکل ۶. اثر متقابل شوری در بیوچار و روی بر آنتوسیانین، در هر سطح روی، میانگین‌های دارای حروف مشترک به‌صورت برش دهی دارای اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون LSD نمی‌باشند

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

در شرایط عدم شوری و عدم مصرف بیوچار، 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 به‌طور متوسط حدود ۲۰ درصد بیش از آنتوسیانین موجود در سطح ۳۰۰۰ پی‌پی‌ام در شرایط مذکور بود (شکل ۶).

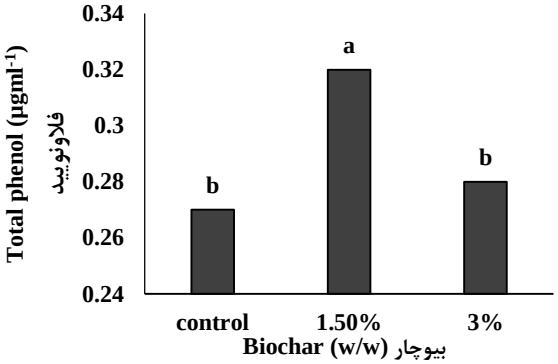
مصرف بیوچار مخصوصاً در سطح ۱/۵ درصد وزنی سبب افزایش آنتوسیانین، فنل کل و فلاونوئید شد (شکل‌های ۶، ۷ و ۸). استفاده از بیوچار در خاک به دلیل افزایش دسترسی عناصر غذایی در خاک و بهبود ویژگی‌های فیزیکی، زیستی و شیمیایی خاک شرایط رشد گیاه را بهبود بخشیده و مانع از رویارویی گیاه با اثرات سوء تنش می‌شود (Major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



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

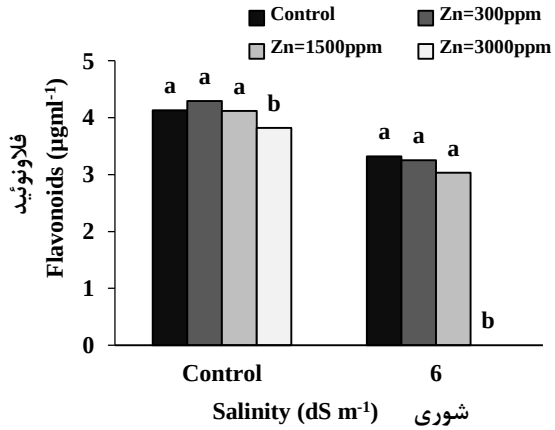
Fig.7. Effect of salinity and Zn on total phenol, In salinity levels, means with same letters as slicing are not significantly different by LSD test (p <0.05).

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. به‌طوری‌که بالاترین میزان فلاونوئید در تیمار عدم 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 دسی زیمنس 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 بیوچار 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 به‌صورت برش دهی دارای اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون LSD نمی‌باشند

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

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

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

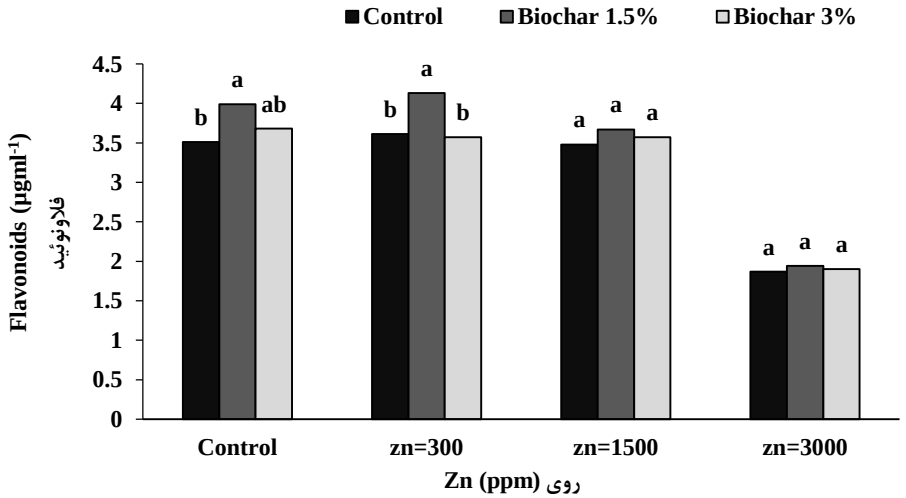
نتایج نشان داد اثرات ساده روی و بیوچار و نیز برهمکنش آن‌ها (به‌جز شوری در بیوچار) بر فعالیت آنزیم کاتالاز برگ در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۳).

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 قابل‌توجه در کاتالاز شد.

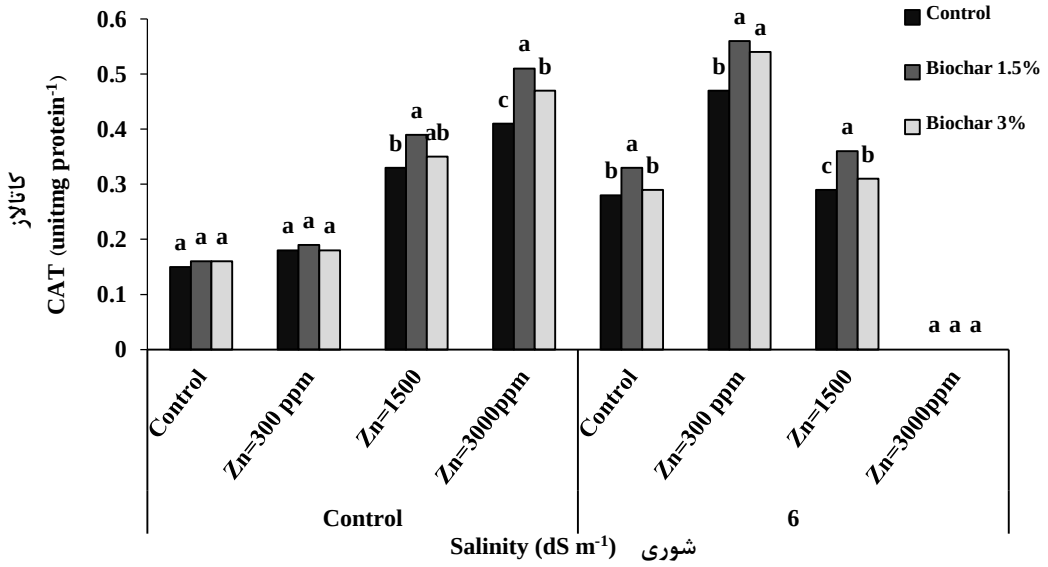
در این پژوهش گیاهانی که با بیوچار تیمار شده‌اند مقدار ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در آن‌ها افزایش یافته است که با نتایج شهباز و همکاران (Shahbaz et al., 2018) در گیاه آفتابگردان مطابقت دارد.

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.



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

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



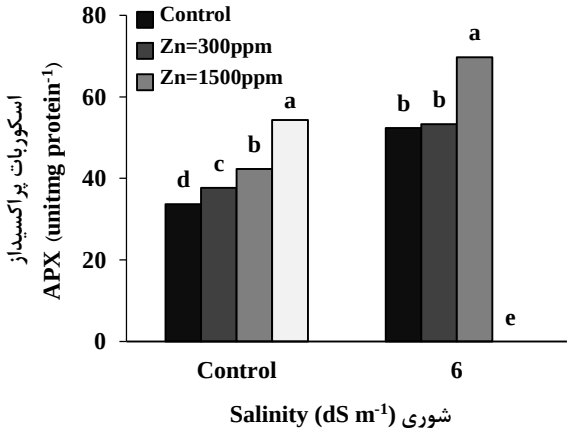
شکل ۱۱. اثر متقابل شوری، روی و بیوچار بر فعالیت آنزیم کاتالاز، در هر سطح روی، میانگین‌های دارای حروف مشترک به‌صورت برش دهی دارای اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون LSD نمی‌باشند

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)

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

آسکوربات 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). آسکوربات 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 بخصوص پراکسید هیدروژن عمل می‌کند؛ بنابراین خسارت ناشی از تنش اکسیداتیو را به کمترین مقدار می‌رساند (Gholinejad et al., 2014).

در شرایط شوری (۶ دسی زیمنس 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.



شکل ۱۲. اثر متقابل شوری و روی بر فعالیت آنزیم اسکوربات پراکسیداز، در هر سطح شوری، میانگین‌های دارای حروف مشترک به‌صورت 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).

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 صفت‌های رشدی و بیوشیمیایی مشاهده شد. به‌طوری‌که با افزایش شدت تنش شوری و روی صفات رشدی، رنگیزه‌های فتوسنتزی و متابولیت‌های ثانویه کاهش ولی میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت افزایش یافت؛ اما غلظت ۳۰۰ پی‌پی‌ام روی در شرایط تنش شوری سبب بهبود صفات رشدی و فیزیکوشیمیایی گیاه همیشه‌بهار گردید. بااین‌حال کاربرد ماده اصلاح‌کننده بیوچار 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 بیوچار برای مقابله با تنش شوری و فلز روی غلظت ۱/۵ درصد وزنی بیوچار بود؛ بنابراین در پژوهش حاضر غلظت ۳۰۰ پی‌پی‌ام روی و ۱/۵ درصد وزنی بیوچار به‌عنوان بهترین تیمار برای افزایش مقاومت به تنش شوری و روی مشخص شد

منابع

Abeer, H., Abdallah, E.F., Alqarawi, A.A., Egamberdieva, D., 2015. Induction of salt stresstolerance 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 quantites 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

Chakraborthy, G. S., 2010. Phytochemical screening of Calendula officinalislinn 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 rhizobactria 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 Ocimumbasilicum. 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/jcbn.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:1011903430385282 9

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, andanthocyanin 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 Calatheainsignis. Scientia Horticulturae. 176, 70-78. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.06.021