Environmental Sciences *(Environ. Sci.)* 2024, 22(4):625-642 **ISSN: 2588-6177**

Original Article

Effectiveness of Biochar Biofertilizer on Some Morphological, Physiological and Biochemical Traits of Marigold (*Calendula officinalis* L.) Under Cadmium Stress

Received: 2024.04.25
Accepted: 2024.07.07

Mahyar Gerami,[1]* Leila Dustdar Mahmoudabad,[1] Akram Ghorbanpour,[2] Mohadeseh Amiri[3]

[1] Department of Horticultural Science (Medicinal Plant), Sana Institute of Higher Education, Sari, Iran

[2] Department of Plant Sciences, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran

[3] Department of Range and Watershed Management, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

How to cite this article:
Gerami, M., Dustdar Mahmoudabad, L., Ghorbanpour, A. and Amiri, M., 2024. Effectiveness of Biochar Biofertilizer on Some Morphological, Physiological and Biochemical Traits of Marigold (Calendula officinalis L.) Under Cadmium Stress. Environ. Sci. 22(4): 625-642.

EXTENDED ABSTRACT

Introduction: Soil pollution by heavy metals, especially in industrial regions is one of the main environmental problems. Cadmium (Cd) is a heavy metal that causes oxidative stress in plants and has many destructive effects on product quality. Nowadays, various methods are used to reduce the negative effects of high concentrations of heavy metals in the soil. In this regard, using biochar is a cost-effective and environmentally-friendly method and its influence on the reduction of heavy metals bioavailability of soil is an important advantage. Biochar is a carbon-rich material obtained by pyrolysis of biomass, such as agricultural residues and manures in conditions without oxygen or with limited oxygen content.

Material and Methods: In this study, a factorial experiment was conducted in a completely randomized blocks design with three replications on Marigold (*Calendula officinalis* L.) medicinal plant with six levels of Cd (0, 1, 3, 5, 7, and 10 mg/l) and three levels of biochar (0, 1.5, and 3 w/w). The effect of experimental treatments was investigated separately and combined on the morphological (wet and dry weights of aerial parts and roots), physiological (the amount of chlorophyll a, chlorophyll b, total chlorophyll, and carotenoid), and biochemical (soluble sugar, catalase, peroxidase, and proline) characteristics of this medicinal plant. Means comparisons were done by Duncan's multiple range test at a probability level of 5%.

Results and Discussion: The results showed that different concentrations of Cd decreased the wet and dry weights of roots and aerial parts of the plant. The most reduction effect was related to the concentration of 10 mg/l of Cd. The interaction effect of biochar and Cd was significant only on the dry weight of aerial parts. The effect of stress caused by increasing the concentration of Cd on the plant's physiological processes was different. Considering that the first effect of Cd on the plant is the reduction of photosynthesis and chlorosis of the leaves, at the highest level of Cd, the amount of total chlorophyll decreased by 40% compared to the control sample, but the amount of carotenoid increased by 50% (p<0.05). The reduction of chlorophyll content under Cd stress can be due to oxidative damage and inhibition of different stages of chlorophyll synthesis. However, the increase in carotenoids in response to heavy metal stress occurs because these molecules, as part of the non-enzymatic antioxidant defense system, play a protective role against oxidative stress. In contrast, the use of biochar treatment caused a significant increase in the wet weight of aerial parts, the amount of chlorophyll *a* and carotenoid. Also, the interaction effect of the treatments indicated that at different levels of Cd, the characteristics of the dry weight of aerial parts, the amount of chlorophyll *b*, and the total chlorophyll increased with the increase in the biochar level. Among the investigated biochemical traits, the interaction effect of the treatments was significant only on the amount of soluble sugar (p<0.05) and catalase (p<0.01). This means that the absorption of Cd by biochar and the reduction of its toxicity effect on seedlings provided the conditions for more production of soluble sugar and catalase. In fact, biochar had high adsorption of Cd due to its high cation exchange capacity, high specific surface, and presence of functional groups.

Conclusion: In total, the results showed the biochar capacity to stabilize and inactivity Cd absorption. Therefore, the incorporation of biochar to soil can improve Cd bioavailability by plants in the phytoremediation, although the effect of type and plant variety on the amount of decreasing Cd stress should not be ignored.

Keywords: Biochar, Bioremediation, Cadmium, *Calendula officinalis*, Heavy metal

* **Corresponding Author Email Address:** mahyar.gerami@sana.ac.ir
DOI: 10.48308/envs.2024.1390

Copyright: © 2024 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

علوم محیطی، ۶۴۲-۶۲۵ : (۴) ۲۲، ۱۴۰۳ شاپا: ۶۱۷۷-۲۵۸۸

مقاله پژوهشی

اثربخشی کود زیستی بیوچار بر برخی از صفات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه همیشه‌بهار (*Calendula officinalis* L.) تحت تنش کادمیوم

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۲/۲۶
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۴/۱۷

مهیار گرامی[1]*، لیلا دوستدار محمودآباد[1]، اکرم قربانپور[2]، محدثه امیری[3]

[1] گروه باغبانی (گیاهان دارویی)، مؤسسه آموزش عالی سنا، ساری، ایران

[2] گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

[3] گروه مرتع و آبخیزداری، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

چکیده مبسوط

سابقه و هدف: آلودگی خاک به فلزات سنگین بویژه در مناطق صنعتی یکی از اصلی‌ترین مشکلات محیط‌زیستی به شمار می‌آید. کادمیوم یک فلز سنگین است که در گیاهان تنش اکسیداتیو ایجاد می‌کند و اثرات مخرب بسیاری بر کیفیت محصول دارد. امروزه روش‌های مختلفی جهت کاهش اثرات منفی غلظت‌های بالای فلزات سنگین موجود در خاک مورد استفاده قرار گرفته است. در این راستا، استفاده از بیوچار، روشی مقرون‌به‌صرفه و سازگار با محیط‌زیست است که تأثیر آن به منظور کاهش قابلیت دسترسی زیستی فلزات سنگین در خاک یک مزیت مهم به شمار می‌رود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، آزمایشی گلخانه‌ای به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با سه تکرار و با نمک کلرید کادمیوم در شش سطح (۰، ۱، ۳، ۵، ۷ و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر) و سه سطح بیوچار (۰، ۱/۵ و ۳ درصد وزنی) بر گیاه دارویی همیشه‌بهار (*Calendula officinalis* L.) انجام شد. تأثیر تیمارهای آزمایش به‌طور جداگانه و ترکیبی بر خصوصیات مورفولوژیک (وزن تر و وزن خشک اندام‌های هوایی و ریشه)، فیزیولوژیک (مقادیر کلروفیل *a*، کلروفیل *b*، کلروفیل کل و کاروتنوئید) و بیوشیمیایی (قند محلول، کاتالاز، پراکسیداز و پرولین) این گیاه دارویی مورد بررسی قرار گرفت. مقایسه میانگین‌ها، با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد صورت پذیرفت.

نتایج و بحث: نتایج نشان داد که غلظت‌های مختلف کادمیوم سبب کاهش وزن تر و خشک ریشه و اندام‌های هوایی گردید. بیشترین تأثیر کاهشی، مربوط به غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر کادمیوم بود. اثر متقابل بیوچار و کادمیوم فقط بر وزن خشک اندام‌های هوایی گیاه معنی‌دار شد. تأثیر تنش ناشی از افزایش غلظت کادمیوم بر فرآیندهای فیزیولوژیک گیاه متفاوت بود. به این ترتیب که با افزایش غلظت کادمیوم، روند کاهشی در محتوای کلروفیل و روند افزایشی در مقادیر کاروتنوئید و صفات بیوشیمیایی گیاه مشاهده شد. با توجه به اینکه اولین اثر کادمیوم بر گیاه، کاهش فتوسنتز و کلروز برگ‌ها می‌باشد، در بالاترین سطح کادمیوم، میزان کلروفیل کل نسبت به شاهد ۴۰ درصد کاهش، اما میزان کاروتنوئید ۵۰ درصد افزایش یافت ($p<0/05$). کاهش محتوای کلروفیل تحت تنش کادمیوم می‌تواند به‌دلیل آسیب‌های اکسیداتیو و بازدارندگی مراحل مختلف سنتز کلروفیل باشد. اما افزایش کاروتنوئیدها در مواجهه با تنش فلزات سنگین به این دلیل است که کاروتنوئیدها به‌عنوان مولکول‌های دخیل در سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی غیر آنزیمی، نقش حفاظتی در برابر تنش اکسیداتیو دارند. در مقابل، استفاده از تیمار بیوچار سبب افزایش معنی‌دار وزن تر اندام‌های هوایی، میزان کلروفیل *a* و کاروتنوئید گردید. همچنین، اثر متقابل تیمارها حاکی از این بود که در سطوح مختلف کادمیوم، با افزایش سطح بیوچار، وزن خشک اندام‌های هوایی، میزان کلروفیل *b* و کلروفیل کل روند افزایشی داشتند. از صفات بیوشیمیایی مورد بررسی، اثر متقابل تیمارها فقط بر میزان قند محلول ($p<0/05$) و کاتالاز ($p<0/01$) معنی‌دار شد. این یعنی جذب کادمیوم توسط بیوچار و کاهش اثر سمّیت آن روی گیاهچه‌ها، شرایط تولید بیشتر قند محلول و کاتالاز را فراهم نمود. در واقع، بیوچار به‌دلیل ظرفیت تبادل کاتیونی بالا، سطح ویژه بالا و وجود گروه‌های عاملی، جذب مناسبی از کادمیوم داشت.

نتیجه‌گیری: در مجموع، نتایج به‌دست آمده بیانگر توان بیوچار در تثبیت و غیرقابل جذب نمودن کادمیوم بود. از این‌رو، استفاده از بیوچار در خاک می‌تواند دسترسی زیستی کادمیوم توسط گیاه در فرآیند گیاه‌پالایی را بهبود بخشد، هر چند که تأثیر نوع و واریته گیاه بر میزان کاهش تنش کادمیوم نبایستی نادیده گرفته شود.

واژه‌های کلیدی: کادمیوم، فلز سنگین، بیوچار، زیست پالایی، گیاه همیشه‌بهار

استناد به این مقاله: *گرامی، م.، ل. دوستدار محمودآباد، ا. قربانپور و م. امیری. ۱۴۰۳. اثربخشی کود زیستی بیوچار بر برخی از صفات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه همیشه‌بهار (Calendula officinalis L.) تحت تنش کادمیوم. فصلنامه علوم محیطی. ۲۲(۴): ۶۲۵-۶۴۲.*

* **Corresponding Author Email Address:** mahyar.gerami@sana.ac.ir
DOI: 10.48308/envs.2024.1390

Copyright: © 2024 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

مقدمه

آلودگی و تخریب محیط‌زیست، از جمله نتایج صنعتی شدن جوامع بشری است. رایج‌ترین آلاینده‌های زیست‌محیطی، فلزات سنگین، باران‌های اسیدی و برخی سموم می‌باشند. فلزات سنگین در سال‌های اخیر به‌دلیل آلاینده بودنشان به‌شدت مورد توجه قرار گرفته‌اند (Biria *et al*., 2017) و تلاش بر آن بوده که تا حد امکان از ورودشان به چرخه طبیعت جلوگیری شود. در عین حال، کاربرد و البته تولید آن‌ها در صنایع امری اجتناب‌ناپذیر است (Qasemifar *et al*., 2020). این فلزات با جذب توسط ریشه گیاهان و انتقال به اندام‌هایی هوایی رشد و نمو گیاهان را تحت تأثیر قرار داده، موجب اختلال در متابولیسم، کاهش رشد، کیفیت و عملکرد آن‌ها می‌شوند (Mahmoudi *et al*., 2019). از طرفی، آلودگی گیاهان به این فلزات منجر به تهدید سلامت جوامع بشری از طریق انتقال به زنجیره‌های غذایی می‌شود (Bahmani *et al*., 2013). کادمیوم یکی از فلزات سنگین است که منبع اصلی آن فاضلاب‌های خانگی و صنعتی است. قابلیت جذب کادمیوم توسط گیاه و انتقال به اندام‌های هوایی، به‌دلیل دوام زیستی بالا در خاک و حلالیت بالا در آب، زیاد است (Baghaie, 2018). کادمیوم، مجموعه‌ای از تغییرات را در گیاهان در سطوح ژنتیکی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی ایجاد می‌کند که نشانه‌های بارز آن، کاهش رشد اندام‌ها و بافت‌ها، کلروز برگ و نکروزه شدن برگ و ریشه، کاهش وزن خشک گیاه و تغییر در متابولیسم کلروفیل می‌باشد (Shute and Macfie, 2006). به‌طور کلی یکی از مهم‌ترین اثرات فلزات سنگین، تحریک سنتز رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌باشد که منجر به تنش اکسیداتیو در سلول می‌گردد. به این ترتیب که کادمیوم، از طریق تشکیل کمپلکس با پروتئین‌ها، جانشینی یون‌های فلزی در غشای پلاسمایی و تغییر در سیستم آنتی‌اکسیدان، سبب ایجاد رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن، آسیب به پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها و DNA و در نهایت ایجاد تنش اکسیداتیو می‌شود (Nourbakhsh Rezaei *et al*., 2019). این ترکیبات بر بیان ژن‌ها نیز تأثیر گذاشته و بسیاری از فرآیندها مانند چرخه سلولی، رشد، مرگ برنامه‌ریزی شده و پاسخ به تنش‌های غیرزیستی را تغییر می‌دهند (Pourtabrizi *et al*., 2017). یکی از پاسخ‌های عمومی گیاهان به تنش کادمیوم، فعال شدن سیستم آنتی‌اکسیدان است که اگرچه در غلظت‌های زیاد کادمیوم سبب تحمل به این فلز نمی‌شود، ولی برای بقای گیاه مفید می‌باشد. با جذب و تجمع این فلز در گیاه، سیستم دفاعی گیاه فعال شده و رادیکال‌های آزاد زیادی تولید می‌شود، اما ممکن است در اثر افزایش و تداوم عامل تنش و در نتیجه افزایش بیش از حد میزان رادیکال‌های آزاد، مکان‌های جذب و اتصال این رادیکال‌ها توسط آنتی‌اکسیدان‌ها اشباع شود (Nourbakhsh Rezaei *et al*., 2019). برخی مکانیسم‌های سلولی بالقوه برای سمیت‌زدایی فلزات سنگین در گیاهان عالی عبارتند از: ممانعت از حرکت فلزات در ریشه به وسیله میکوریزا، اتصال به دیواره سلولی و ترشحات ریشه، برون شارش فعال به طرف آپوپلاست، درون شارش کاهش یافته به وسیله غشاء، انتقال و انباشتگی فلزات در واکوئل، کلاته شدن در سیتوسل به وسیله لیگاندهای گوناگون، ترمیم و حفاظت غشاء پلاسمایی تحت شرایط تنش (Akhavan Hezaveh and Dilamghani, 2013).

گیاه دارویی همیشه‌بهار (*Calendula officinalis* L.) متعلق به خانواده کاسنی (Asteraceae) یکی از پرکاربردترین و معروف‌ترین گیاهان در گیاه درمانی و طب سنتی می‌باشد که به منظور استفاده از عصاره آن پرورش می‌یابد. ماده مؤثره این گیاه در درمان بیماری‌های پوستی و التهابی کاربرد فراوانی دارد. گل‌های زرد یا نارنجی رنگ آن دارای اثرات درمانی ضد التهاب، ضد تشنج، میکروب‌کشی و التیام زخم (Mojtabavi and Darzi, 2018)، ضد ویروس، ضد تومور و آنتی‌اکسیدانی هستند. در حال حاضر از گل‌های گیاه همیشه‌سبز در کنترل سلول‌های سرطان سینه و کبد و درمان ایدز استفاده می‌شود (Pirzad

and Shokrani, 2020). نظر به اهمیت گیاه دارویی همیشه‌بهار و با توجه به اینکه آلودگی‌های محیط‌زیستی از جمله فلزات سنگین با تحت تأثیر قرار دادن مسیرهای سنتز متابولیت‌های ثانویه، سبب تغییرات قابل ملاحظه‌ای در کمّیت و کیفیت این متابولیت‌ها می‌شوند (Pourtabrizi *et al*., 2018)، ارائه روشی مطمئن که ضمن کاهش آلودگی، مقرون به صرفه و نسبتاً سریع باشد و اثرات جانبی نامطلوبی بر سلامت محیط‌زیست و سلامتی بشر نداشته باشد، ضروری به نظر می‌رسد (Biria *et al*., 2017). یکی از روش‌های مناسب در کشاورزی پایدار، استفاده از مواد آلی مانند بیوچار با هدف کاهش قابل ملاحظه در مصرف نهاده‌های شیمیایی می‌باشد (Wang *et al*., 2016). بیوچار، با بهبود حاصلخیزی خاک سبب افزایش رشد گیاه و تولید محصول می‌شود. این ماده در جذب و انتقال عناصر در گیاهان نیز مؤثر بوده و در گیاه پالایی کاربرد دارد (Saghafi *et al*., 2021). به‌دلیل این ویژگی‌ها، کاربرد بیوچار به‌عنوان اصلاح کننده خاک، ظرفیت جذب کلی خاک را بهبود بخشیده و بر انتقال و سرنوشت آلاینده‌ها تأثیر می‌گذارد. گروه‌های عاملی موجود در سطح بیوچار به طور مؤثری با آلاینده‌های خاک پیوند برقرار می‌نمایند که این امر سبب می‌شود بیوچار به‌عنوان یک جاذب مؤثر برای آلاینده‌های آلی و معدنی در آب و خاک عمل کند (Nabizadeh *et al*., 2019). از برتری‌های اصلی این روش دوستدار محیط‌زیست می‌توان به هزینه کم، کاهش پسماندهای شیمیایی، کارایی بالا، تولید جذب‌کننده‌های زیستی و امکان احیاء و استفاده مجدد از فلزات جذب شده برای سایر اهداف اشاره نمود (Mokarram-Kashtiban *et al*., 2019).

پژوهش‌های مختلفی پیرامون تأثیر بیوچار بر کاهش اثرات آسیب‌رسان کادمیوم صورت گرفته‌اند. Lu *et al*. (2017) در نتیجه کاربرد بیوچار چوب خیزران و بیوچار کاه برنج بر توزیع فرم‌های شیمیایی فلزات سنگین شامل کادمیوم، سرب، مس و روی در یک خاک آلوده گزارش نمودند که افزودن هر دو نوع بیوچار سبب افزایش اسیدیته خاک و به دنبال آن، کاهش تحرک و زیست‌فراهمی فلزات سنگین در خاک می‌گردد. Valizadeh Ghale Beig *et al*. (2021) در بررسی تأثیر کود زیستی بیوچار بر برخی خصوصیات مورفولوژیک و جذب فلزات کادمیوم و سرب در کاهو (*Lactuca sativa* L.) دریافتند که در سطح پنج گرم در کیلوگرم بیوچار، خاک به‌دلیل دارا بودن سطح ویژه بالا، با جذب کادمیوم و سرب در سطح خود، سبب کاهش جذب این دو عنصر و بهبود صفات مورفولوژیک گیاه شد. Borzoo *et al*. (2023) کارایی بیوچار را در جذب و تجمع کادمیوم در ساقه و ریشه گیاه آفتابگردان (*Helianthus annus* L.) و ضریب انتقال آن ثابت نمودند.

با توجه به مشکل آلودگی‌های محیط‌زیستی، مطرح شدن بحث‌های مربوط به پایداری و استفاده از نهاده‌هایی که سبب بهبود کارایی سیستم می‌شوند و نیز با توجه به کمبود اطلاعات جامع و مستند پیرامون واکنش رشدی و کیفی گیاه همیشه‌بهار نسبت به کاربرد کود زیستی بیوچار در سطوح مختلف، هدف مطالعه حاضر بررسی اثر بیوچار بر برخی خصوصیات مورفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاه همیشه‌بهار تحت تنش کادمیوم می‌باشد. در این مطالعه بر آنیم تا اثر سطوح مختلف کادمیوم و نیز سطوح مختلف بیوچار به منظور کاهش آسیب تنش کادمیوم را بر صفات رشدی، محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و میزان پرولین و قند محلول در گیاه همیشه‌بهار تعیین نماییم.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی تیمارها

ابتدا نشاءهای چهار برگی گیاه همیشه‌بهار، از مؤسسه تحقیقات اصلاح بذر و نهال واقع در کرج و زغال زیستی نیز از پارک علم و فناوری استان فارس تهیه شد. این آزمایش به صورت فاکتوریل با عامل نسبت‌های مختلف خاک و بیوچار در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با سه تکرار در گلخانه‌ای در شهرستان نمین واقع در استان اردبیل انجام

شد. کود زیستی بیوچار با سه سطح صفر، ۱/۵ و ۳ درصد وزنی و نمک کلرید کادمیوم ($CdCl_2.2.5H_2O$) در شش سطح صفر، ۱، ۳، ۵، ۷ و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر آب آبیاری جهت اعمال تنش به کار رفتند. ابتدا گلدان‌های پلاستیکی که کف آنها دارای چندین سوراخ بوده با آب مقطر استریل شده و هیپوکلریت سدیم ضدعفونی شدند. سپس، با توجه به گلدان‌های انتخاب شده (۱/۵ کیلوگرمی) نسبت‌های مورد نظر وزنی بیوچار با ترازوی دیجیتال وزن‌کشی شدند و پس از این که بطور کامل با خاک مخلوط شدند، اقدام به کاشت سه نشاء در هر گلدان گردید. نیاز تغذیه‌ای گیاه از طریق محلول هوگلند و بر حسب ظرفیت زراعی تأمین شد. آب آبیاری و محلول هوگلند به گونه‌ای اضافه شدند که آب-ها و محلول پس از خروج از گلدان در ظرف انتهای گلدان تجمع یافته تا چنانچه گیاهچه‌ها دچار کمبود آب و عناصر غذایی شد بتوانند از آب و محلول هوگلند داخل ظرف استفاده شدند. تیمار کادمیوم یک هفته پس از استقرار گیاه اعمال شد. با اعمال تیمارها به صورت هر ده روز یکبار، در مجموع گیاهان مورد مطالعه سه بار تیماردهی شدند. نهایتاً پس از دو ماه دوره رشد گیاهان، نمونه‌ها برداشت و جهت سنجش صفات مورفولوژیک (وزن تر و خشک اندام‌های هوایی و وزن تر و خشک ریشه)، رنگیزه‌های فتوسنتزی (مقدار کلروفیل *a*، کلروفیل *b* و کاروتنوئیدها)، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (کاتالاز و پراکسیداز)، قند محلول و پرولین به آزمایشگاه منتقل شدند.

سنجش رنگیزه‌های فتوسنتزی

جهت سنجش محتوای کلروفیل‌ها و کاروتنوئید از روش Arnon (1949) استفاده شد. ابتدا ۰/۱ گرم از برگ‌های جوان و هم‌سن از تکرارهای مختلف با استون ۸۰٪ در داخل هاون چینی ساییده شد. سپس حجم عصاره حاصل با استون به ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. عصاره حاصل به مدت سه دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شده و میزان جذب محلول حاصل با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۴۷۰، ۶۴۵ و ۶۶۳ نانومتر قرائت گردید. استون ۸۰٪ به‌عنوان محلول شاهد برای تنظیم صفر جذب نوری اسپکتروفتومتر به کار رفت. جهت انجام محاسبات مربوط به تعیین مقادیر کلروفیل *a*، کلروفیل *b*، کلروفیل کل و کاروتنوئیدها بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر از روابط زیر استفاده شد:

$$\text{Chl } a \text{ (mg/gfw)} = ((12.7 \times \text{A663}) - (2.69 \times \text{A645})) \times \text{V}/1000 \times \text{W} \quad (۱)$$

$$\text{Chl } b \text{ (mg/gfw)} = ((22.9 \times \text{A645}) - (4.93 \times \text{A663})) \times \text{V}/1000 \times \text{W} \quad (۲)$$

$$\text{Chl } T \text{ (mg/gfw)} = \text{Cl } a + \text{Ch } b = \big((20.2 \times \text{A645}) + (8.02 \times \text{A663}) \times \text{V}/1000 \times \text{W}\big) \quad (۳)$$

$$\text{Car (mg/gfw)} = (((1000\ \text{A470} - 1.82\ \text{Chl } a - 85.02\ \text{Chl } b) /198 \times \text{V}/1000 \times \text{W})) \quad (۴)$$

در روابط فوق، A663، A645 و A470 به ترتیب میزان جذب به میلی‌گرم بر لیتر در طول موج‌های ۶۶۳، ۶۴۵ و ۴۷۰ نانومتر می‌باشند. V حجم عصاره نهایی در استون ۸۰٪ و W وزن تر بافت گیاهی جهت عصاره‌گیری بر حسب گرم است.

سنجش میزان پرولین

حدود ۰/۲ گرم از برگ‌های تازه گیاه با ۵ میلی‌لیتر سولفوسالیسیلیک اسید سه درصد ساییده شد و به صورت هموژن در آمد. هموژن حاصل پس از انتقال به فالکون ۱۵ میلی‌لیتری، با اسید سولفوسالیسیلیک به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده و به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. سپس، دو میلی‌لیتر عصاره حاصل، دو میلی‌لیتر معرف نین هیدرین و دو میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال در یک فالکون، مخلوط و به مدت یک ساعت در بن ماری با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. جهت توقف

واکنش، نمونه‌ها سریعاً به ظرف محتوی آب و یخ به مدت دو دقیقه منتقل شدند، سپس به هر نمونه چهار میلی‌لیتر تولوئن اضافه و به مدت ۲۰-۱۵ ثانیه ورتکس شدند. پس از جداسازی فاز بالایی رنگی، جذب نوری آن در طول موج ۵۲۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر قرائت شد. غلظت پرولین نمونه‌ها با استفاده از منحنی استاندارد پرولین و رابطه زیر بر اساس وزن تر محاسبه گردید (Bates *et al*., 1973):

$$C = OD \times 123.42 - 3.74 \quad (۵)$$

که در آن؛ C غلظت پرولین برحسب میکروگرم در گرم وزن تر و OD میزان جذب در طول موج ۵۲۰ نانومتر می‌باشد.

سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

فعالیت آنزیم کاتالاز

برای سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز، مخلوط واکنش شامل ۵۰ میلی‌مولار بافر فسفات پتاسیم، ۱۵ میلی‌مولار آب اکسیژنه و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. با اضافه نمودن آب اکسیژنه به مخلوط، شدت جذب آن در طول موج ۲۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. یک واحد فعالیت آنزیمی، میزان آنزیمی است که یک میلی‌مول آب اکسیژنه را در یک دقیقه تجزیه کند. میزان فعالیت آنزیمی بر اساس غلظت آب اکسیژنه تجزیه شده و غلظت آب اکسیژنه مصرفی با استفاده از ضریب خاموشی معادل $40\ \mu M^{-1}cm^{-1}$ و رابطه $A = \varepsilon bc$ بر حسب میکرومول بر گرم بافت تازه در دقیقه محاسبه شد؛ که در آن؛ A شدت جذب نمونه، ε ضریب خاموشی، b عرض کوت معادل یک سانتی‌متر و c غلظت می‌باشد (Velikova *et al*., 2000).

فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز

جهت سنجش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز به روش Chance and Maehly (1995)، ۰/۱ گرم از بافت تازه گیاه با ازت مایع در هاون چینی ساییده شد و با اضافه نمودن پنج میلی‌لیتر بافر فسفات و انتقال به میکروتیوب، در دمای چهار درجه سانتی‌گراد با ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول واکنش برای خواندن فعالیت آنزیمی حاوی ۵۰ میلی‌مولار بافر فسفات، ۲۰ میلی‌مولار پراکسید هیدروژن، ۱۰ میلی‌مولار گایاکول و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود و بلافاصله تغییرات جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر قرائت شد. محلول بلانک حاوی تمام این موارد به‌جز عصاره آنزیمی بود. فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز با استفاده از قانون بیر-لامبرت و ضریب خاموشی $26/6\ mM^{-1}\ cm^{-1}$ محصول کاتالیز گایاکول پراکسیداز محاسبه و بر حسب میکرومول بر گرم وزن تر در دقیقه بیان شد.

اندازه‌گیری قندهای محلول

در سنجش قند محلول به روش McCready *et al*. (1950)، یک گرم نمونه خشک در میکروتیوب دو میلی‌لیتری توزین و با یک میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درصد به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس شد. سپس، به ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره حاصل، سه میلی‌لیتر محلول آنترون اضافه شد. مخلوط بدست آمده به مدت ۲۰ دقیقه در درجه حرارت ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد در حمام آب جوش قرار داده شد و میزان قندهای محلول به روش اسپکتروفتومتری در طول موج ۶۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

به منظور انجام مقایسات آماری، ابتدا توزیع نرمال و یا غیرنرمال داده‌ها با آزمون کولموگروف-اسمیرنوف بررسی و تبدیل داده‌های غیرنرمال به داده‌هایی با توزیع نرمال، مدنظر قرار گرفت. همگنی واریانس‌ها نیز به روش Levene بررسی شد. پس از برقراری شرایط مذکور، تجزیه واریانس و مقایسات میانگین با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS 9.1 انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد ($p<۰/۰۵$)، تجزیه واریانس داده‌ها بر اساس آزمایش فاکتوریل در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با سه تکرار و رسم نمودارها در نرم‌افزار Excel صورت گرفت.

نتایج و بحث

ضرایب همبستگی پیرسون بین صفات مختلف اندازه‌گیری شده مورفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی در جدول ۱ آمده است. از این جدول مشخص است که با افزایش وزن اندام‌های هوایی و زیرزمینی گیاه، مقادیر کلروفیل افزایش اما فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، مقدار کاروتنوئیدها، قند محلول و پرولین کاهش می‌یابند. با افزایش مقادیر کلروفیل نیز کاروتنوئیدها، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، قند محلول و پرولین کاهش اما با افزایش مقدار کاروتنوئیدها، این صفات افزایش می‌یابند. همچنین، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، میزان قند محلول و پرولین همبستگی مثبتی با هم دارند. در جدول ۲، نتایج تجزیه واریانس، بیانگر تأثیر معنی‌دار کود زیستی بیوچار بر برخی صفات مورفولوژیک (وزن تر و خشک اندام‌های هوایی) در سطح احتمال یک درصد بود. تجزیه واریانس اثر ساده کادمیوم نیز حاکی از اثر معنی‌دار آن بر کلیه صفات مورفولوژیک مورد مطالعه در سطح احتمال یک درصد بود. اثر متقابل کود زیستی بیوچار و کادمیوم فقط بر وزن خشک اندام‌های هوایی گیاه همیشه‌بهار در سطح پنج درصد معنی‌دار گزارش شد.

جدول ۱- ماتریس همبستگی صفات مورد بررسی

Table 1. Correlation matrix of studied attributes

	وزن تر اندام هوایی Wet weight of arial parts	وزن خشک اندام هوایی Dry weight of arial parts	وزن تر ریشه Wet weight of root	وزن خشک ریشه Dry weight of root	کلروفیل *a* Chlorophyll *a*	کلروفیل *b* Chlorophyll *b*	کلروفیل کل Total Chlorophyll	کاروتنوئید Carotenoid	قند محلول Soluble sugar	کاتالاز Catalase	پراکسیداز Peroxidase	پرولین Perolin
وزن تر اندام هوایی (Wet weight of arial parts)	1											
وزن خشک اندام هوایی (Dry weight of arial parts)	0.988	1										
وزن تر ریشه (Wet weight of root)	0.738	0.747	1									
وزن خشک ریشه (Dry weight of root)	0.752	0.775	0.954	1								
کلروفیل *a* (Chlorophyll *a*)	0.772	0.779	0.634	0.662	1							
کلروفیل *b* (Chlorophyll *b*)	0.676	0.649	0.515	0.461	0.847	1						
کلروفیل کل (Total Chlorophyll)	0.741	0.726	0.583	0.559	0.941	0.977	1					
کاروتنوئید (Carotenoid)	-0.689	-0.742	-0.657	-0.765	-0.732	-0.456	-0.585	1				
قند محلول (Soluble sugar)	-0.704	-0.758	-0.685	-0.783	-0.673	-0.347	-0.492	0.925	1			
کاتالاز (Catalase)	-0.531	-0.591	-0.579	-0.734	-0.644	-0.275	-0.434	0.882	0.86	1		
پراکسیداز (Peroxidase)	-0.496	-0.554	-0.623	-0.74	-0.523	-0.206	-0.342	0.846	0.838	0.875	1	
پرولین (Perolin)	-0.665	-0.718	-0.658	-0.786	-0.641	-0.322	-0.463	0.933	0.938	0.892	0.861	1

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر بیوچار بر برخی صفات مورفولوژیک گیاه همیشه‌بهار تحت تنش کادمیوم
Table 2. ANOVA of biochar effect on some morphological traits of marigold under the Cd stress

وزن خشک ریشه Dry weight of root	وزن تر ریشه Wet weight of root	وزن خشک اندام‌های هوایی Dry weight of arial parts	وزن تر اندام‌های هوایی Wet weight of arial parts	درجه آزادی (df)	تیمارها Treatments
0.016^{ns}	0.031^{ns}	0.084^{**}	3.410^{**}	2	بیوچار Biochar
0.193^{**}	3.287^{**}	0.840^{**}	18.128^{**}	5	کادمیوم Cadmium
0.01^{ns}	0.253^{ns}	0.022^{*}	0.394^{ns}	10	بیوچار×کادمیوم Biochar × Cadmium
0.009	0.255	0.008	0.194	36	خطا Error
18.088	19.864	12.264	13.381		ضریب تغییرات (٪) CV (%)

*, **Significant effect and ns show no significance effect at a probability level of 5% and 1%.

مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف کادمیوم بر وزن تر و خشک اندام‌های هوایی گیاه همیشه‌بهار نشان داد که با افزایش سطوح کادمیوم، مقادیر این دو صفت روند کاهشی معنی‌داری را نشان دادند. به گونه‌ای که در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر کادمیوم، وزن تر و خشک اندام‌های هوایی به ترتیب ۶۹/۶۳ و ۶۸/۸۵ درصد نسبت به نمونه شاهد کاهش یافتند. مقایسه میانگین اثر سطوح مختلف کادمیوم بر وزن تر و خشک ریشه نشان داد که با افزایش غلظت کادمیوم، مقادیر این صفات نیز روند کاهشی نشان دادند (جدول ۳). وزن خشک اندام‌های هوایی و زیرزمینی گیاه حاصل تثبیت و احیای دی‌اکسیدکربن به کربوهیدرات در نتیجه فرآیند فتوسنتز و تبدیل کربوهیدرات‌های حاصل به دیگر مولکول‌های زیستی تشکیل‌دهنده ساختار گیاه می‌باشد (Esfandiari and Rostami, 2016). لذا هر عاملی مانند تنش ناشی از فلزات سنگین که بر فتوسنتز و بیوسنتز سایر مولکول‌های زیستی مؤثر باشد، سبب کاهش رشد و وزن خشک بخش‌های مختلف گیاه می‌شود. از طرفی، کادمیوم با ایجاد اختلالات تغذیه‌ای و بر هم زدن تعادل آبی سبب کاهش وزن خشک گیاه می‌شود (Soltani *et al*., 2006). Minouei *et al*. (2008) طی مطالعه‌ای بر گیاه *Chlorophytum comosum* گزارش نمودند که در غلظت‌های بالای کادمیوم، ساختار اندامک‌هایی مثل کلروپلاست غیرطبیعی شده و در نتیجه تولید ماده خشک گیاه کاهش می‌یابد. کاهش وزن خشک ریشه و اندام‌های هوایی در مقادیر بالای کادمیوم توسط پژوهشگرانی نظیر Nourbakhsh Rezaei *et al*. (2019) و Kohansal Vajargah *et al*. (2022) گزارش شد. Esfandiari and Rostami (2016) نیز اظهار داشتند که کاهش تولید ماده خشک ارقام گندم در حضور کادمیوم حاکی از افت فعالیت مسیرهای متابولیسمی مانند چرخه کالوین است. در مورد کاهش وزن تر در ارتباط با سمّیت کلرید کادمیوم، Bahmani *et al*. (2013) بیان نمودند که این ماده سمّی با مختل نمودن مکانیسم‌های فیزیولوژیکی نرمال، اثرات منفی بر بیوماس دارد.

جدول ۳- مقایسه میانگین برخی صفات مورفولوژیک گیاه همیشه‌بهار تحت سطوح مختلف تنش کادمیوم
Table 3. Mean comparison of some morphological traits of marigold under levels of Cd stress

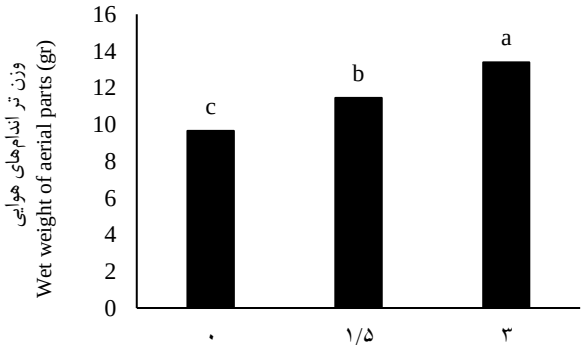
وزن خشک ریشه Dry weight of root	وزن تر ریشه Wet weight of root	وزن خشک اندام‌های هوایی Dry weight of arial parts	وزن تر اندام‌های هوایی Wet weight of arial parts	تیمارها Treatments
0.74 ± 0.05^{a}	3.36 ± 0.32^{a}	1.22 ± 0.11^{a}	5.63 ± 0.42^{a}	Cd0
0.66 ± 0.08^{ab}	3.10 ± 0.49^{ab}	0.92 ± 0.08^{b}	4.14 ± 0.63^{b}	Cd1
0.57 ± 0.09^{bc}	2.63 ± 0.41^{bc}	0.74 ± 0.11^{c}	3.31 ± 0.61^{c}	Cd2
0.46 ± 0.12^{cd}	2.24 ± 0.58^{dc}	0.60 ± 0.15^{d}	2.64 ± 0.71^{d}	Cd3
0.43 ± 0.10^{d}	2.17 ± 0.54^{dc}	0.51 ± 0.13^{d}	2.31 ± 0.69^{de}	Cd4
0.35 ± 0.12^{d}	1.76 ± 0.57^{d}	0.38 ± 0.11^{e}	1.71 ± 0.54^{e}	Cd5
0.137	0.716	0.126	0.624	LSD

Each column of means that have at least one letter in common were not significantly different.
Cd0: 0, Cd1: 1, Cd2: 3, Cd3: 5, Cd4: 7, and Cd5: 10 mg/l.

مقایسه میانگین اثر کود زیستی بیوچار بر وزن تر اندام‌های هوایی گیاه همیشه‌بهار بیانگر آن بود که به‌کارگیری سطح سه درصد وزنی کود بیوچار باعث افزایش وزن تر اندام‌های هوایی گردید که نسبت به نمونه شاهد، این روند افزایشی معنی‌دار بود (شکل ۱). تأثیر بیوچار بر رشد گیاه و وزن تر و خشک آن به عوامل مختلفی از جمله بافت خاک، وضعیت حاصلخیزی اولیه خاک، دمای خصوصیات فیزیکی و شیمیایی بیوچار، دمای تهیه آن و حتی به نوع گیاه بستگی دارد و می‌تواند سبب افزایش یا کاهش رشد گیاه شود (Kohansal Vajargah *et al*., 2022).

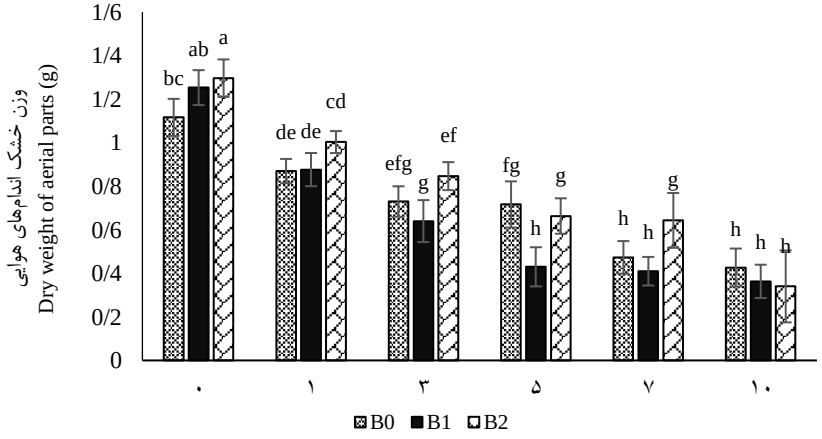
مقایسه میانگین اثر برهمکنشی کود زیستی بیوچار و کادمیوم بر وزن خشک اندام‌های هوایی گیاه همیشه‌بهار نشان داد که با افزایش بیوچار در سطوح ۱، ۳ و ۷ میلی‌گرم بر لیتر کادمیوم، میزان وزن خشک اندام‌های هوایی روند افزایشی داشت که این افزایش معنی‌دار است (شکل ۲).

تجزیه واریانس اثر ساده کود زیستی بیوچار و اثر ساده کادمیوم بر محتوای کلروفیلی (کلروفیل *a*، *b* و کل) و کاروتنوئیدها در گیاه همیشه‌بهار در سطح یک درصد معنی‌دار بود. تجزیه واریانس اثر متقابل کود زیستی بیوچار و کادمیوم نیز بر مقادیر کلروفیل *b* و کلروفیل کل در گیاه همیشه‌بهار معنی‌دار گزارش شد (جدول ۴).



شکل ۱- اثر ساده سطوح مختلف بیوچار بر وزن تر اندام‌های هوایی گیاه همیشه‌بهار (در هر تیمار حرف یا حروف مشترک نشانه عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد هستند)

Fig. 1- The simple effect of different levels of biochar on the wet weight of aerial parts in marigold (in each treatment, common letter(s) indicate the nonsignificant difference at 5% level)



شکل ۲- اثر متقابل سطوح مختلف بیوچار و کادمیوم بر وزن خشک اندام‌های هوایی در گیاه همیشه‌بهار (در هر تیمار حرف یا حروف مشترک نشانه عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد هستند)

Fig. 2- Interaction of different levels of biochar and cadmium on the dry weight of aerial parts of marigold (in each treatment, common letter(s) indicate the nonsignificant difference at 5% level)

جدول ۴- تجزیه واریانس اثر بیوچار بر رنگیزه‌های فتوسنتزی گیاه همیشه‌بهار تحت تنش کادمیوم
Table 4. ANOVA of biochar effect on photosynthetic pigments of marigold under Cd stress

کاروتنوئید Carotenoid	کلروفیل کل Total Chlorophyll	کلروفیل *b* Chlorophyll *b*	کلروفیل *a* Chlorophyll *a*	درجه آزادی (df)	تیمارها Treatments
0.004**	0.773**	0.417**	0.055**	2	بیوچار Biochar
0.014**	0.589**	0.181**	0.121**	5	کادمیوم Cadmium
0.0002ns	0.006*	0.007**	0.0006 ns	10	بیوچار×کادمیوم Biochar × Cadmium
0.0001	0.0018	0.0012	0.0008	36	خطا Error
4.9273	3.2510	4.2306	5.5267		ضریب تغییرات (٪) CV (%)

*, **Significant effect and ns show no significant effect at a probability level of 5% and 1%.

مقایسه میانگین اثر سطوح مختلف کادمیوم بر محتوای کلروفیل در گیاه همیشه‌بهار بیانگر آن بود که با افزایش غلظت کادمیوم، این صفات روند کاهشی معنی‌داری را نشان دادند، به گونه‌ای که کمترین مقدار کلروفیل کل به غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر کادمیوم با تقریباً ۰/۹۸ میلی‌گرم بر گرم بافت تر اختصاص داشت که نسبت به نمونه شاهد با ۱/۶۳ میلی‌گرم بر گرم بافت تر، روند کاهشی ۴۰ درصدی را نشان داد. بالعکس، میزان کاروتنوئیدها با افزایش غلظت کادمیوم روند افزایشی معنی‌داری نشان داد. بیشترین مقدار کاروتنوئید مربوط به غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر کادمیوم بود که با ۰/۳ میلی‌گرم بر گرم بافت تر، افزایش ۵۰ درصدی نسبت به نمونه شاهد داشت (جدول ۵). دلیل عدم تغییر معنی‌دار محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی در سطح پایین‌تر کادمیوم اعمال شده بر گیاه، وجود فرآیندهای محافظتی مانند آنتی‌اکسیدان‌ها و یا متصل شدن کادمیوم به پپتیدها می‌باشد که می‌تواند سیستم فتوسنتزی گیاه را تحت حفاظت قرار دهد (Shi *et al*., 2010). کاهش میزان کلروفیل‌ها تحت تنش کادمیوم با یافته‌های Rezaei *et al*. (2020) همخوانی دارد. افزایش میزان رنگدانه کاروتنوئید در گیاهان رشد یافته در بستر آلوده به فلزات سنگین در مطالعات Arenas-Lago *et al*. (2016) و Aghaei *et al*. (2021) نیز تأیید شد. کاروتنوئیدها علاوه بر نقش ساختمانی و جذب نور قادرند با فرونشاندن کلروفیل برانگیخته شده سبب ممانعت از تشکیل اکسیژن یکتایی شوند و از این‌رو دستگاه فتوسنتزی را از شروع پراکسیداسیون لیپیدی محافظت کنند (Rastgoo and Alemzadeh, 2011).

جدول ۵- مقایسه میانگین رنگیزه‌های فتوسنتزی گیاه همیشه‌بهار تحت سطوح مختلف تنش کادمیوم
Table 5. Mean comparison of photosynthetic pigments of marigold under levels of Cd stress

کاروتنوئید Carotenoid	کلروفیل کل Total Chlorophyll	کلروفیل *b* Chlorophyll *b*	کلروفیل *a* Chlorophyll *a*	تیمارها Treatments
0.2 ± 0.012^{e}	1.633 ± 0.133^{a}	0.997 ± 0.075^{a}	0.636± 0.064^{a}	Cd0
0.205 ± 0.014^{e}	1.572 ± 0.145^{a}	0.952 ± 0.091^{a}	0.62 ±0.06^{a}	Cd1
0.231 ± 0.011^{d}	1.428 ± 0.205^{b}	0.861 ± 0.151^{b}	0.567 ± 0.056^{b}	Cd2
0.259 ± 0.016^{c}	1.286 ± 0.23^{c}	0.765 ± 0.182^{c}	0.52 ±0.052^{c}	Cd3
0.277 ± 0.027^{b}	1.124 ± 0.205^{d}	0.704 ± 0.167^{d}	0.419 ±0.048^{d}	Cd4
0.3 ± 0.021^{a}	0.979 ± 0.182^{e}	0.635 ± 0.146^{e}	0.343 ±0.049^{e}	Cd5
0.017	0.061	0.049	0.040	LSD

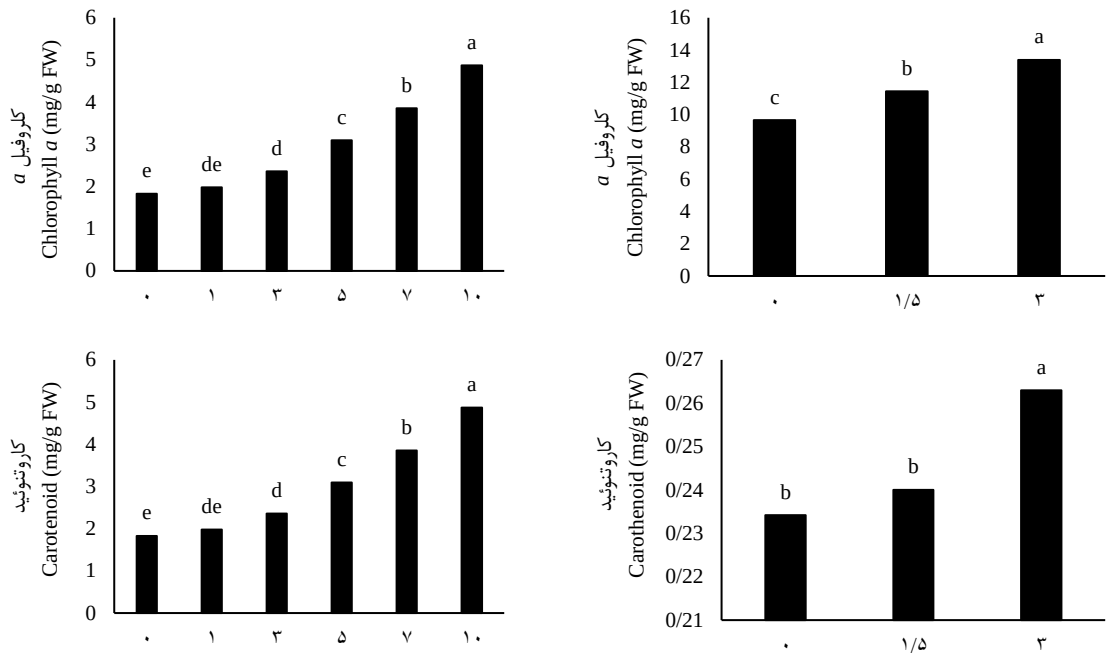
Each column of means that have at least one letter in common was not significantly different.
Cd0: 0, Cd1: 1, Cd2: 3, Cd3: 5, Cd4: 7, and Cd5: 10 mg/l.

بر اساس نتایج مقایسه میانگین اثر کادمیوم بر مقدار کلروفیل *a* (شکل ۳)، با افزایش کادمیوم، میزان کلروفیل *a* کاهش یافت که کمترین میزان آن به تیمار ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر کادمیوم اختصاص داشت. همچنین، با افزایش سطح بیوچار از صفر به سه درصد وزنی در تیمارهای فاقد کادمیوم، مقدار کلروفیل *a* افزایش یافت، اما افزایش آن بین دو سطح ۱/۵ و ۳ معنی‌دار نبود. مقایسه میانگین داده‌های مقادیر کاروتنوئید با افزایش سطوح کادمیوم و بیوچار به تنهایی، حاکی از افزایش معنی‌دار مقدار کاروتنوئید بود. البته، تفاوت بین سطوح اول کادمیوم و بیوچار نسبت به شاهد معنی‌دار نبود (شکل ۳). فرآیندهای فیزیولوژیک مانند فتوسنتز در گیاهان عالی به فلزات سنگین بسیار حساس هستند (Tanyolac *et al*., 2007). معمولاً اولین اثر کادمیوم بر گیاه، کاهش فتوسنتز و کلروز برگ‌هاست (Baryla *et al*., 2001). فلزات سنگین از عملکرد فتوسیستم‌های I و II ممانعت می‌نمایند که البته فتوسیستم II در مقایسه با فتوسیستم I حساس‌تر است (Aggarwal *et al*., 2012). دلیل کاهش مقدار کلروفیل *a* عموماً تداخل در متابولیسم رنگیزه‌هاست، زیرا فلزات سنگین سبب مهار بیوسنتز کلروفیل در سطح آنزیم پروتوکلروفیلید ردوکتاز و دلتا آمنیولولینیک اسید دهیدراتاز می‌گردند (Nikolić *et al*., 2008). از دیگر دلایل کاهش کلروفیل *a* تحت تنش کادمیوم، اختلال در تأمین یون‌های آهن و کلسیم برای سنتز کلروفیل و کمبود یون روی است که سبب بازدارندگی آنزیم‌هایی چون انیدراز کربنیک می‌شود (John *et al*., 2008). علاوه بر بازدارندگی مراحل مختلف سنتز کلروفیل و یا فعال شدن آنزیم کلروفیلاز، کاهش میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی تحت تأثیر تنش فلزات سنگین می‌تواند به دلیل آسیب‌های اکسیداتیو باشد (Aghaei *et al*., 2019).

با افزایش کادمیوم، میزان کاروتنوئید بر خلاف مقادیر کلروفیل *a* افزایش یافت. کاروتنوئیدها به‌عنوان یکی از مولکول‌های مؤثر در سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی غیر آنزیمی، نقش حفاظتی در برابر تنش اکسیداتیو دارند، از این‌رو، در مواجهه با تنش فلزات سنگین افزایش می‌یابند (Aghaei *et al*., 2019). همچنین مشخص شد که در صورت عدم وجود تنش کادمیوم، بیوچار به طور قابل ملاحظه‌ای مقدار کاروتنوئید را در برگ‌های گیاه همیشه‌بهار افزایش داد (شکل ۳). افزایش مقدار کاروتنوئید تحت تنش کادمیوم در مطالعه Gerami *et al*. (2018) بر گیاه مریم گلی (*Salvia officinalis* L.) و Akhavan Hezaveh and Dilamghani (2013) بر روی فلفل سبز (*Capsicum annum*) تأیید شد. طبق نظر El-Tayeb *et al*. (2006) این افزایش به‌دلیل نقش مهم این رنگیزه در سمّیت‌زدایی گونه‌های فعال اکسیژن است. زیرا تحت تنش‌های محیطی، ایجاد گونه‌های فعال اکسیژن بیش از توانایی گیاه برای برطرف نمودن آن است و در نتیجه سبب ایجاد صدمات اکسیداتیوی، اکسایش رنگیزه‌های فتوسنتزی و تخریب کلروپلاست می‌شوند (Laspina *et al*., 2005).

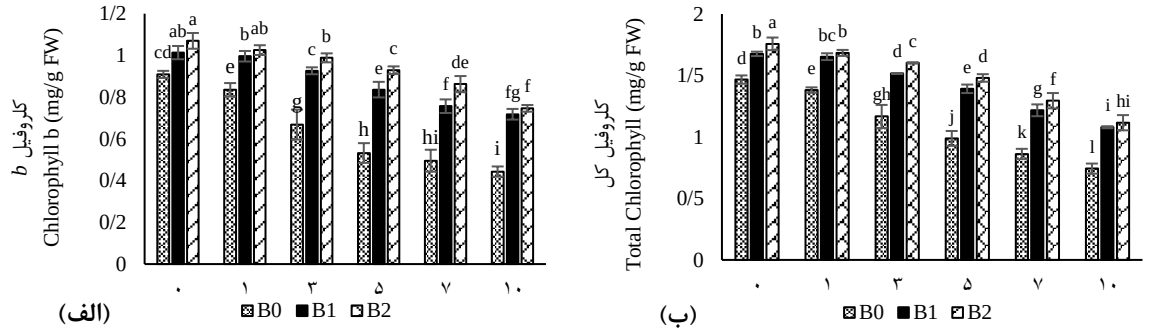
مقایسه میانگین اثر متقابل کود زیستی بیوچار و کادمیوم بر مقادیر کلروفیل *b* و کلروفیل کل در گیاه همیشه‌بهار نشان داد که در سطوح مختلف کادمیوم، با افزایش غلظت بیوچار، مقادیر کلروفیل *b* و کلروفیل کل روند افزایشی نشان دادند (شکل ۴). این بدین معنی است که بیوچار قادر به کاهش اثر منفی کادمیوم در گیاه شده است.

صفات بیوشیمیایی گیاه به طور معناداری تحت تأثیر سطوح تنش کادمیوم و تیمار بیوچار قرار دارند. اثر متقابل تیمارها فقط بر میزان قند محلول و کاتالاز به ترتیب در سطوح پنج و یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۶).



شکل ۳- اثر ساده سطوح مختلف کادمیوم و بیوچار بر کلروفیل *a* و کاروتنوئید در گیاه همیشه‌بهار (در هر تیمار حرف یا حروف مشترک نشانه عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد هستند)

Fig. 3- The simple effect of different levels of Cd and biochar on the chlorophyll *a* and carotenoid in marigold (in each treatment, common letter(s) indicate the nonsignificant difference at 5% level)



شکل ۴- اثر متقابل سطوح مختلف بیوچار و کادمیوم بر (الف) مقدار کلروفیل *b* و (ب) مقدار کلروفیل کل در گیاه همیشه‌بهار (در هر تیمار حرف یا حروف مشترک نشانه عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد هستند)

Fig. 4- The interaction effects of different levels of biochar and Cd on the chlorophyll *b* and total chlorophyll content of marigold (in each treatment, common letter(s) indicate the nonsignificant difference at 5% level)

جدول ۶- تجزیه واریانس اثر بیوچار بر صفات بیوشیمیایی ارزیابی شده در گیاه همیشه‌بهار تحت تنش کادمیوم

Table 6. ANOVA of biochar effect on biochemical traits evaluated in marigold under Cd stress

تیمارها Treatments	درجه آزادی (df)	پرولین Perolin	قند محلول Soluble sugar	کاتالاز Catalase	پراکسیداز Peroxidase
بیوچار Biochar	2	62.87 **	5857.17 **	10.97 **	0.769 **
کادمیوم Cadmium	5	109.13 **	13106.11 **	12.72 **	0.574 **
بیوچار×کادمیوم Biochar × Cadmium	10	1.2 ns	279.8 *	1.34 **	0.023 ns
ضریب تغییرات (٪) CV(%)		7.06	3.27	9.58	9.75

*, **Significant effect and ns show no significant effect at a probability level of 5% and 1%.

مقایسه میانگین اثر ساده تیمارها نشان داد که با افزایش سطح تیمارها، مقادیر پرولین، قند محلول، کاتالاز و پراکسیداز افزایش یافتند (جدول ۷). احتمالاً افزایش مقدار پرولین در برگ‌ها در همه غلظت‌های کادمیوم ناشی از سنتز از نو یا کاهش تجزیه یا هر دو باشد. پرولین با عمل به‌عنوان مولکول پایدارکننده پروتئین‌ها، سمّیت ناشی از فلز سنگین کادمیوم را کاهش می‌دهد (Shah and Dubey, 1997). همچنین، با جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدها، سلول‌ها را از آسیب‌های رادیکال آزاد محافظت نموده و محیط را احیا کننده‌تر نگه می‌دارد که به نفع سنتز فیتوکلاتین و به دام‌اندازی کادمیوم است (Metwally *et al*., 2003). یافته‌های این مطالعه در خصوص افزایش محتوای پرولین در راستای نتایج مطالعات Maghsoudi *et al*. (2021) و Alizadeh *et al*. (2024) می‌باشد که به کاهش اکسیداسیون آن نسبت داده می‌شود.

افزایش سطح بیوچار و نیز کادمیوم بر میزان قند محلول روند افزایشی داشت، به گونه‌ای که سطح ۱/۵ درصد وزنی بیوچار و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر کادمیوم بیشترین میزان قند را به خود اختصاص دادند (جدول ۷). تجمع قندهای محلول به گیاه کمک می‌کند تا بتواند ذخیره کربوهیدراتی خود را برای حفظ متابولیسم پایه تحت شرایط تنش، در حد مطلوبی نگه دارد (Bourang *et al*., 2019). در مطالعات Aghaei *et al*. (2019) و Aghaei *et al*. (2021) نیز مشخص شد که افزایش قندها نوعی مکانیسم مقاومت در برابر تنش کادمیوم می‌باشد. اثر ساده سطوح مختلف بیوچار و کادمیوم حاکی از روند افزایشی معنی‌دار در مقدار آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بود (جدول ۷). محققین مختلفی نظیر Pigna *et al*. (2010) نشان دادند که بین تحمل به تنش‌های اکسیداتیو که به‌دلیل تنش‌های محیطی از جمله فلزات سنگین ایجاد می‌شوند و افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاه ارتباطی قوی وجود دارد. بنابراین، برای مقابله با تنش اکسیداتیوی تغییر ظرفیت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدان نظیر کاتالاز و پراکسیداز ضروری می‌باشد (Viciedo *et al*., 2019). در مطالعه حاضر، بیوچار از طریق افزایش فعالیت کاتالاز سبب کاهش سمّیت فلز سنگین کادمیوم شد. کاتالاز از مهم‌ترین اجزای مکانیسم‌های محافظتی گیاه است که همراه با پراکسیداز در سم‌زدایی رادیکال‌های آزاد سمّی اکسیژن مشارکت دارد. کاتالاز موجب تجزیه آب اکسیژنه (H_2O_2) در گیاه می‌شود و افزایش آن حاکی از تخریب اکسیداتیو است (Mishra *et al*., 2006). افزایش میزان آنزیم کاتالاز با افزایش غلظت کادمیوم با مطالعات Gerami *et al*. (2018)، Baghaie (2018) و Rezaei *et al*. (2020) همسو می‌باشد. در مطالعه حاضر، افزایش تیمار کلرید کادمیوم فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز را نیز افزایش داد. این نتیجه با گزارش‌های Esfandiari and Rostami (2016) در خصوص تأثیر کادمیوم بر گندم رقم کوهدشت و Aghaei *et al*. (2019) پیرامون گیاه ریحان (*Ocimum basilicum* L.) مطابقت دارد. تنظیم و تعدیل اجزای سطوح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر پراکسیداز، پاسخ سازشی مهمی جهت افزایش مقاومت گیاه به تنش می‌باشد (Foyer *et al*., 1997).

در نبود بیوچار، با افزایش سطح کادمیوم مقدار پرولین و کاتالاز به طور معنی‌داری افزایش یافتند. نتایج مشابهی توسط Maghsoudi *et al*. (2021) در بررسی اثر کادمیوم بر گیاه اسفناج (*Spinacia oleracea* L.) گزارش شد.

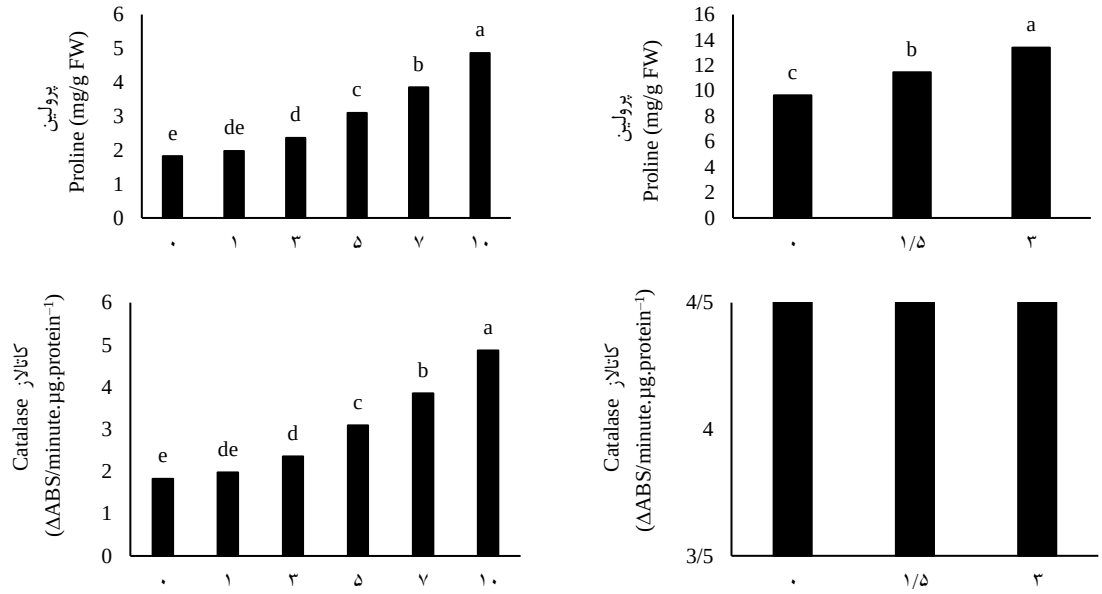
در هر یک از سطوح کادمیوم، افزایش سطح بیوچار، روند افزایشی منظمی بر مقادیر قند محلول و کاتالاز داشت و بیشترین افزایش در تیمار همزمان سه درصد وزنی بیوچار و ۱۰ میلی‌گرم کادمیوم مشاهده شد (شکل ۶). در حقیقت، جذب کادمیوم توسط بیوچار و کاهش اثر سمّیت آن روی گیاهچه‌ها، شرایط را برای تولید بیشتر قند محلول و کاتالاز فراهم نمود.

جدول ۷- مقایسه میانگین اثر ساده سطوح مختلف کادمیوم و بیوچار بر صفات بیوشیمیایی گیاه همیشه‌بهار

Table 7. Mean comparison of simple effect of different levels of Cd and biochar on the biochemical traits of marigold

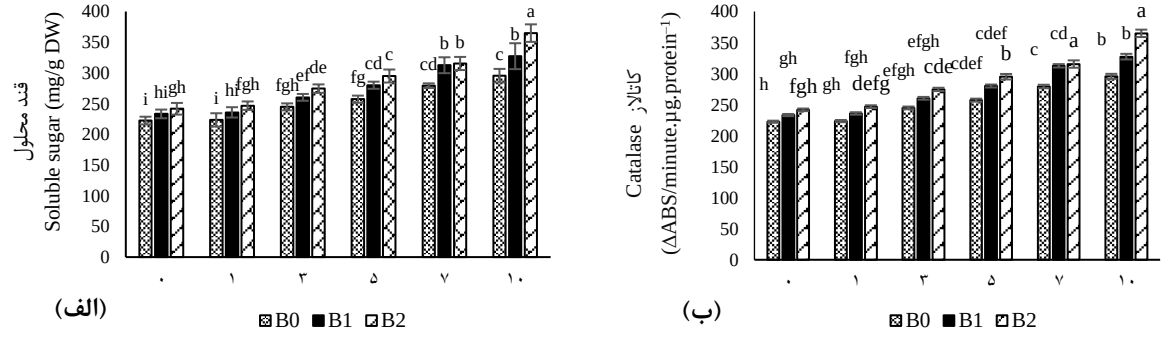
پراکسیداز Peroxidase (ΔABS/minute.µg.protein^{-1})	کاتالاز Catalase (ΔABS/minute.µg.protein^{-1})	قند محلول Soluble sugar (mg./g DW)	پرولین Perolin (µg/g FW)	تیمارها Treatments
1.15 ± 0.24^{b}	2.49 ± 0.86^{b}	253.74 ± 28.56^{c}	9.65 ± 3.08^{c}	B0
1.21 ± 0.24^{b}	2.59 ± 0.99^{b}	274.80 ± 38.04^{b}	11.45 ± 3.15^{b}	B1
1.54 ± 0.32^{a}	3.89 ± 1.73^{a}	289.64 ± 44.32^{a}	13.39 ± 3.83^{a}	B2
0.114	0.264	18.084	0.639	LSD
1.02 ± 0.13^{e}	1.82 ± 0.23^{e}	232.40 ± 10.68 ^{e}	7.81 ±1.57^{e}	Cd0
1.04 ± 0.12^{de}	1.98 ± 0.25^{de}	235.3 ± 12.66 ^{e}	8.20 ±1.55^{e}	Cd1
1.23 ± 0.26^{cd}	2.36 ± 0.32^{d}	259.79 ± 13.91 ^{d}	9.74 ±1.05^{d}	Cd2
1.35 ± 0.31^{bc}	3.09 ± 1.06^{c}	277.35 ± 17.78 ^{c}	12.62 ±2.22^{c}	Cd3
1.50 ± 0.24^{ab}	3.85 ± 1.62^{b}	302.34 ± 19.43 ^{b}	14.10 ± 2.19^{b}	Cd4
1.65 ± 0.23^{b}	4.87 ± 0.95^{a}	329.19 ± 33.09 ^{a}	16.50 ± 2.06^{a}	Cd5
0.199	0.460	14.073	1.112	LSD

Each column of means that have at least one letter in common was not significantly different.
B0: 0, B1: 1.5, B2: 3 w/w, Cd0: 0, Cd1: 1, Cd2: 3, Cd3: 5, Cd4: 7, and Cd5: 10 mg/l.



شکل ۵- اثر ساده سطوح مختلف کادمیوم و بیوچار بر پرولین و کاتالاز در گیاه همیشه‌بهار (در هر تیمار حرف یا حروف مشترک نشانه عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد هستند)

Fig. 5- The simple effect of different levels of Cd and biochar on the proline and catalase in marigold (in each treatment, common letter(s) indicate the nonsignificant difference at 5% level)



شکل ۶- اثر متقابل سطوح مختلف بیوچار و کادمیوم بر (الف) قند محلول و (ب) میزان فعالیت کاتالاز در گیاه همیشه‌بهار (در هر تیمار حرف یا حروف مشترک نشانه عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد هستند)

Fig. 6- The interaction effects of different levels of biochar and Cd on (a) soluble sugar and (b) catalase activity in marigold (in each treatment, common letter(s) indicate the nonsignificant difference at 5% level)

نتیجه‌گیری

این پژوهش با هدف بررسی تأثیر کود زیستی بیوچار بر برخی صفات مورفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاه همیشه‌بهار تحت تنش کادمیوم انجام شد و نتایج نشان داد که با افزایش غلظت کادمیوم، روند کاهشی در صفات مورفولوژیک شامل وزن‌های تر و خشک اندام‌های هوایی و ریشه و نیز میزان کلروفیل‌ها، اما روند افزایشی در صفات بیوشیمیایی گیاه و مقادیر کاروتنوئید مشاهده شد. در تیمار ترکیبی کادمیوم و بیوچار، وزن خشک اندام‌های هوایی و مقادیر کلروفیل b و کلروفیل کل افزایش یافتند. همچنین، سنتز پرولین، تجمع قندهای محلول و افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز و پراکسیداز در حضور کادمیوم سبب می‌شود تا گیاه از تنش این فلز سنگین آسیب کمتری ببیند. بنابراین، کودهای زیستی مانند بیوچار بهسازهای آلی مناسبی برای کاهش تنش ناشی از فلز سنگین کادمیوم می‌باشند. از این‌رو، شناسایی راهبردهای مؤثر در افزایش بازده کودهای شیمیایی و کاهش تلفات آن‌ها به منظور کنترل آلودگی‌های محیط‌زیستی و بهره‌گیری از مواد آلی مانند بیوچار ضروری به نظر می‌رسد. بی‌شک، انجام آزمایشات با دوره‌های طولانی به همراه تحلیل تغییرات فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیک خاک، منجر به صحت بیشتر مطالعات آتی خواهد شد.

سپاسگزاری

این مقاله از پایان‌نامه کارشناسی ارشد با عنوان "بررسی اثر زغال زیستی بر برخی خصوصیات رشدی و فیزیولوژیک گیاه همیشه‌بهار (*Calendula officinalis* L.) تحت تنش فلز سنگین کادمیوم" استخراج شده است. از تمامی اساتید محترم مؤسسه آموزش عالی سنا و مسئولین محترم گلخانه و آزمایشگاه کمال تشکر و قدردانی را داریم.

منابع

References

https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e26677

Arenas-Lago, D., Carvalho, L.C., Santos, E.S. and Abreu M.M., 2016. The physiological mechanisms underlying the ability of Cistus monspeliensis L. from São Domingos mine to withstand high Zn concentrations in soils. Ecotoxicology and environmental safety. 129, 219–227. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.03.041

Arnon, D.I., 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenol-oxidase in Beta vulgaris. Plant Physiology. 24(1), 1-15. https://doi.org/10.1104/pp.24.1.1

Baghaie, A.H., 2018. Interaction Effect of Municipal Waste Compost and Pistachio Residues Biochar on Decreasing Cadmium Stress in Shallot (A Case Study: Zarandieh Municipal Waste Compost). Journal of Health. 9(3), 277-290. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.29252/j.health.9.3.277

Bahmani, R., Bihamta, M.R., Habibi, D. and Forozesh, P., 2013. Evaluation of germination, root and shoot growth under cadmium stress for different bean genotypes (Phaseolus vulgaris L.). Agronomy and Plant Breeding. 8(4), 145-154. (In Persian with English abstract).

Baryla, A., Carrier, P., Franck, F., Coulomb, C., Sahut, C. and Havaux , M., 2001. Leaf chlorosis in

Aggarwal, A., Sharma, I., Tripathi, B.N., Munjal, A.K., Baunthiyal, M. and Sharma, V., 2012. Metal toxicity and photosynthesis. In: Itoh, S. Mohanty, P. Guruprasad, K.N. (Eds.), Photosynthesis: Overviews on Recent Progress and Future Perspectives. New Delhi, India: IK International Publishing House, pp. 229-236.

Aghaei, K., Rahkhosravani, B., Moghanlu, L. and Ghotbi Ravandi, A.A., 2019. Analysis of cadmium accumulation and its effects on some biochemical and physiological characters of basil plants. Plant Process and Function. 8(33), 107-122. (In Persian with English abstract).

Aghaei, K., Bouryaei, M. and Zamani, A., 2021. Study of cadmium contamination and its effects on some physiological and nutritional factors on alfalfa plants. Environmental Sciences. 18(4), 109-124. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.52547/ENVS.18.4.109

Akhavan Hezaveh, T. and Dilamghani, K., 2013. Effect of salicylic acid on biochemical constituents of pepper (Capsicum annuum L.) under cadmium stress. Research in Crop Sciences. 5(18), 109-124. (In Persian with English abstract).

Alizadeh, M.M., Gerami, M., Majidian, P. and Ghorbani, H.R., 2024. The potential application of biochar and salicylic acid to alleviate salt stress in soybean (Glycine max L.). Heliyon. 10, e26677.

oil seed rape plants (Brassica napus) grown on cadmium-polluted soil causes and consequences for photosynthesis and growth. Planta 212(5-6), 696-709. https://doi.org/10.1007/s004250000439

Bates, L.S., Waldren, R.P. and Teare, I.D., 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant and Soil. 39, 205-207. https://doi.org/10.1007/BF00018060

Biria, M., Moezzi, A.A. and Amerikhah, H., 2017. Effect of Sugarcane Bagasse Made Biochar on Maize Plant Growth, Grown in Lead and Cadmium Contaminated Soil. Water and Soil. 31(2), 609-626. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/jsw.v31i2.55832

Borzoo, A., Momayezi, M.R. and Nowroozi, A., 2023. Effect of biochar and supper absorbent on remediation of Cadmium by sunflower (Helianthus annuus L.) from contaminated soil. Food Safety and Processing. 2(3), 91-100. (In Persian with English abstract)

Bourang, Sh., Jahanbakhsh gedakahriz, S. and Ebadi, A., 2019. The effect of cadmium chloride and foliar application of iron and zinc on biochemical characteristics wheat under hydroponic conditions. Plant Process and Function. 8(29), 1-13. (In Persian with English abstract)

Chance, B. and Maehly, A.C., 1955. Assay of catalases and peroxidase. Methods in Enzymology. 2, 764-775. https://doi.org/10.1002/9780470110171.ch14

El-Tayeb, M.A., El-Enany, A.E. and Ahmed, N.I., 2006. Salicylic acid-induced adaptive response to copper stress in sunflower (Helianthus annuus L.). Plant Growth Regulation. 50, 191-199. https://doi.org/10.1007/s10725-006-9118-2

Esfandiari, E. and Rostami, N., 2016. Evaluation of Cd effects on growth and some oxidative stress parameters of wheat cultivars during seedling stage. Iranian Journal of Plant Biology. 27, 1-16. (In Persian with English abstract)

Foyer, C.H., Lopez-Oelgado, L., Dat, J.F. and Scott, I.M., 1997. Hydrogen peroxide and glutathione-associated mechanism of acclimatory stress tolerance and signaling. Physiologia Plantarum. 100, 241-254. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1997.tb04780.x

Gerami, M., Ghorbani, A. and Karimi, S., 2018. Role of salicylic acid pretreatment in alleviating cadmium-induced toxicity in Salvia officinalis L. Iranian Journal of Plant Biology. 10(1), 81-96. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22108/IJPB.2018.108633.1069

John, R., Ahmad, P., Gadgil, K. and Sharm, S., 2008. Effect of cadmium and lead on growth, biochemical parameters and uptake in Lemna polyrrhiza L. Plant, Soil and Environment. 54(6), 262-270. https://doi.org/10.17221/2787-PSE

Kohansal Vajargah, F., Paknejad, F., Mazhari, M., Khanmirzai, A. and Habibi, D., 2022. Evolution of ability of remediation heavy metal Cadmium by some of plant species and biochar in drought stress conditions. Environmental Stresses in Crop Sciences. 15(2), 443-458. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22077/escs.2020.3783.1913

Laspina, N.V., Groppa, M.D., Tomaro, M.L. and Benavides, M.P., 2005. Nitric oxide protects sunflower leaves against Cd-induced oxidative stress. Plant Sciences. 169(2), 323-330. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.02.007

Lu, K., Yang, X., Gielen, G., Bolan, N., Ok, Y.S., Niazi, N.K., Xu, S., Yuan, G., Chen, X., Zhang, X., Liu, D., Song, Z., Liu, X. and Wang, H., 2017. Effect of bamboo and rice straw biochar on the mobility and redistribution of heavy metals (Cd, Cu, Pb and Zn) in contaminated soil. Journal of Environmental Management. 186, 285-292. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.05.068

Maghsoudi, K., Ashrafi Dehkordi, E. and Mazloumi, S.M., 2021. The role of Brassinosteroids and Salicylic acid on spinach growth and cadmium accumulation under cadmium stress. Vegetable Sciences. 4(8), 15-33. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22034/IUVS.2021.139084.1125

Mahmoudi, F., Sheikhzadeh Mosaddegh, P., Zare, N. and Esmaielpour, B., 2019. Improvement of seed germination, growth and biochemical characteristics of Borage (Borago officinalis L.) seedlings with seed priming under cadmium stress conditions. Iranian Journal of Plant Biology. 11(1), 23-42. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22108/IJPB.2019.111889.1104

McCready, R., Guggolz, J., Silviera, V. and Owens, H., 1950. Determination of starch and amylose in vegetables. Analytical chemistry. 22(9), 1156-1158. https://doi.org/10.1021/ac60045a016

Metwally, A., Finkemeier., I., Georgi, M. and Dietz, K., 2003. Salicylic acid alleviates the cadmium toxicity in barley seedling. Plant Physiology. 132, 272-281. https://doi.org/10.1104/pp.102.018457

Minouei, S., Minaei Tehrani, D., Samiei, K. and Farivar, Sh., 2008. Study of the macroscopic and microscopic changes of the effect of cadmium on Chlorophytum comosum. Iranian Journal of Biology. 21(4), 737-747. (In Persian with English abstract)

Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R.D., Govindarajan, R., Kuriakose, S.V. and Prasad, M.N.V., 2006. Phytochelatin synthesis and response of antioxidant during cadmium stress in Bacopa monnieri L. Plant Physiology and Biochemistry. 44(1), 25-37. https://doi.org/10.1016/

j.plaphy.2006.01.007

Mojtabavi, K. and Darzi, M.T., 2018. Effects of vermicompost and nitroxin application on flower yield, yield components and essential oil quality of marigold (Calendula officinalis L.). Medicinal and Aromatic Plants Research. 33(6), 1034-1046. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22092/ijmapr.2018.115212.2119

Mokarram-Kashtiban, S., Mohsen Hosseini, S.M., Tabari Kouchaksaraei, M. and Younesi, H., 2019. Bioavailability of soil heavy metals as influenced by biochar and rhizosphere bacteria in the white willow (Salix alba L.) phytoremediation process. Applied Soil Research. 7(4), 196-211. (In Persian with English abstract).

Nabizadeh, S., Sadegh-Zadeh, F., Jalili, B. and Emadi, S.M., 2019. Adsorption of methylene blue using biochar, soil and treated soil with biochar from aqueous solutions. Water and Soil Conservation. 25(6), 281-292. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22069/JWSC.2019.14913.3002

Nikolić, N., Kojić., D., Pilopović., A., Pajević, S., Kristić, B., Borišev, M. and Orlivić, S., 2008. Response of hybrid poplar to cadmium stress: photosynthetic characteristic cadmium and proline accumulation antioxidant enzyme activity. Acta Biological Cracoviensia Series Botanical. 50(20), 95-101.

Nourbakhsh Rezaei, S.R., Shabani, L., Rostami, M. and Abdoli, M., 2019. The Effect of different concentrations of cadmium chloride on oxidative stress in shoot cultures of Lemon balm. Plant Productions. 42(4), 511-522. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22055/ppd.2019.24806.1567

Pigna, M., Cozzolino, V., Giandonato Caporale, A., Mora, M.L., Di Meo, V., Jara, A.A. and Violante, A., 2010. Effects of phosphorus fertilization on arsenic uptake by wheat grown in polluted soils. Journal of Soil Science and Plant Nutrition. 10(4), 428-442. https://doi.org/10.4067/S0718-95162010000200004

Pirzad, A. and Shokrani, F., 2020. Cultivation of Marigold Medicinal Plant. First ed. Urmia University Press. Urmia, Iran. (In Persian)

Pourtabrizi, S., Pourseyedi, S.H., Abdolshahi, R. and Nadernarjad, N., 2017. Effect of cadmium stress on gene expression and enzyme activity of glutathione reductase of milk thistle (Silybum marianum). Agricultural Biotechnology. 9(4), 39-50. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22103/JAB.2018.2013

Pourtabrizi, S., Pourseyedi, S.H., Abdolshahi, R. and Nadernarjad, N., 2018. Effect of cadmium stress on morphological and physiological traits of milk thistle (Silybum marianum). Plant Process and Function. 7(26), 185-198. (In Persian with English abstract)

Qasemifar, L., Golchin, A. and Rakhsh, F., 2020. Effect of inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and Rhizobium leguminosarum bv. trifolii on yield of Berseem Clover (Trifolium alexandrium) under cadmium stress. Soil Management and Sustainable Production. 9(4), 109-126. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22069/EJSMS.2020.16366.1877

Rastgoo, L. and Alemzadeh, A., 2011. Biochemical responses of Gouan (Aeluropus littoralis) to heavy metals stress. Australian Journal of Crop Science. 5(4), 375-383.

Rezaei, H., Arvin, S.M.J. and Oloumi, H., 2020. Changes on antioxidant system in cadmium-stressed tomato (Lycopersicum solanum L.) plants treated with nanosilica and 24-Epibrassinolide. Plant Process and Function. 9(36), 119-134. (In Persian with English abstract)

Saghafi, F., Ghanei-Bafghi, M.J. and Shirmardi, M., 2021. Investigating the effect of palm tree's waste biochar on concentration of elements, sodium adsorption ratio (SAR), and some saline soil's physical properties. Desert Ecosystem. 10(31), 85-94. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22052/DEEJ.2021.10.31.49

Shah, K. and Dubey, R.S., 1997. Effect of cadmium on proline accumulation and ribonuclease activity in rice seeding: role of proline as a possible enzyme protectant. Biologia Plantarum. 40, 121-130. https://doi.org/10.1023/A:1000956803911

Shi, G., Liu, C., Cai, Q., Liu, Q. and Hou, C., 2010. Cadmium accumulation and tolerance of two safflower cultivars in relation to photosynthesis and antioxidative enzymes. Bulletin of Environmental Contamination of Toxicology. 85(3), 256-263. https://doi.org/10.1007/s00128-010-0067-0

Shute, T. and Macfie, S.M., 2006. Cadmium and zinc accumulation in soybean threat to food safety? Science of the Total Environment. 371, 63-73. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.07.034

Soltani, F., Ghorbanali, M. and Manouchehri Kalantari, Kh., 2006. Effect of cadmium on photosynthetic pigments, sugars and malondialdehyde content in Brassica napus L. Iranian Journal of Biology. 19(2), 136-145. (In Persian with English abstract)

Tanyolaç, D., Ekmekçi, Y. and Ünalan, S., 2007. Changes in photochemical and antioxidant enzyme activities in maize (Zea mays L.) leaves exposed to excess copper. Chemosphere. 67(1), 89-98. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.09.052

Valizadeh Ghale Beig, A., Neamati, S.H., Emami, H. and Aroie, H., 2021. The effect of glayol biochar on some of morphological traits and heavy metals uptake in lettuce (Lactuca sativa L. cv Syaho). Iranian Journal of Horticultural Science. 51(4), 773-784. (In Persian with English abstract).

https://doi.org/10.22059/IJHS.2019.281235.1644

Velikova, V., Yordanov, I. and Edreva, A., 2000. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. Plant Science. 151, 59-66. https://doi.org/10.1016/S0168-9452(99)00197-1

Viciedo, D.O., de Mello Prado, R., Toledo, R.L., dos Santos, L.C.N., Hurtado, A.C., Nedd, L.L.T. and Gonzalez, L.C., 2019. Silicon supplementation alleviates ammonium toxicity in sugar beet (Beta vulgaris L.). Journal of Soil Science and Plant Nutrition. 19(2), 413-419. https://doi.org/10.1007/s42729-019-00043-w

Wang, J., Xiong, Z. and Kuzyakov, Y., 2016. Biochar stability in soil: meta-analysis of decomposition and priming effects. GCB Bioenergy. 8(3), 512-523. https://doi.org/10.1111/gcbb.12266