DOI: 10.22059/ijswr.2021.312806.668782

تحقیقات آب و خاک ایران، دوره ۵۲، شماره ۴، تیر ۱۴۰۰ (ص ۱۱۰۳-۱۰۹۱)

(علمی – پژوهشی)

Evaluation of Humic Acid Application Effect on Cadmium Phytoremediation Efficiency by *Calendula officinalis L.* in a Cadmium-Contaminated Calcareous Soil

VAHID REZA SAFFARI[1*], MAHBOUB SAFFARI[2]

1. Research and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University, Kerman, Iran
2. Department of Environment, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran.

(Received: Nov. 2, 2020- Revised: Feb. 15, 2021- Accepted: Feb. 19, 2021)

ABSTRACT

Low efficiency of phytoremediation process of some heavy metals in calcareous soils, due to low mobility of these elements, has led to a significant growth in research on the use of chelating agents and biostimulants to improve the efficiency of this process. In present study, the efficiency of cadmium (Cd) phytoremediation of *Calendula officinalis L.* was investigated in a Cd-spiked calcareous soil as affected by foliar and soil application of humic acid. For this purpose, in a greenhouse experiment, seedlings of *C. officinalis* were transferred to Cd-spiked soils (0, 50 and 100 mg kg^{-1}) and treated separately by soil (soil drench) and foliar (spraying plant leaves) application of humic acid at different levels (0, 10, 20 µM). The humic acid treatments were applied two weeks after transferring plant and eventually the various biochemical-physiological traits and phytoremediation indices of Cd in *C. officinalis* were measured at specific times. According to the results, in Cd-spiked soils, the *C. officinalis* had apparently a normal growth without any toxicity signs (chlorosis and necrosis symptoms), however with increasing the Cd levels, the dry weight biomass decreased and antioxidant enzymes activities (catalase, peroxidase, superoxide dismutase and ascorbate peroxidase) increased. Both foliar and soil humic acid application in Cd-spiked soils increased dry weight biomass, Cd concentration, and bioconcentration factor (BCF). Furthermore, the application of this organic substance obviously moderated the Cd stress since the antioxidant enzymes activities reduced compared to the control. Based on the results, the obtained translocation factor (TF) and BCF values of Cd, which were >1, indicated that this plant is a Cd-hyperaccumulator, which could extract Cd via phytoextraction mechanism. Generally, among the studied treatments, the application of 20 µM (especially soil drench application) had the best effect on increasing Cd phytoremediation efficiency in the studied soil.

Keywords: *Calendula officinalis L.* Plant, Calcareous Soil, Cadmium, Humic Acid, Phytoremediation.

[*]Corresponding Author's Email: safariv@uk.ac.ir

بررسی اثر کاربرد اسید هیومیک بر کارایی گیاه‌پالایی کادمیم توسط گیاه همیشه بهار در یک خاک آهکی آلوده به کادمیم

وحیدرضا صفاری[1*]، محبوب صفاری[2]

۱. پژوهشکده فناوری تولیدات گیاهی، دانشگاه شهید باهنر، کرمان، ایران.

۲. گروه پژوهشی محیط‌زیست، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۸/۱۲- تاریخ بازنگری: ۱۳۹۹/۱۱/۲۷- تاریخ تصویب: ۱۳۹۹/۱۱/۲۹)

چکیده

کارایی پایین فرایند گیاه‌پالایی برخی عناصر سنگین در خاک‌های آهکی، به دلیل تحرک پایین این عناصر، سبب شده است که تحقیقات در خصوص استفاده از عوامل کلات کننده و محرک‌های زیستی بر افزایش کارایی این فرایند، رشد چشمگیری داشته باشد. در مطالعه حاضر، پتانسیل گیاه‌پالایی کادمیم توسط گیاه همیشه بهار (*Calendula officinalis*) متاثر از کاربرد اسید هیومیک به صورت محلول پاشی و خاکی، در یک خاک آهکی آلوده به سطوح مختلف کادمیم مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور در آزمایشی گلخانه‌ای، نشاهای همیشه بهار به خاک‌های آلوده به کادمیم (۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) منتقل و سپس به طور جداگانه با کاربرد خاکی یا محلول پاشی اسید هیومیک در سطوح مختلف (۰، ۱۰و ۲۰ میکرومولار) تیمار شدند. تیمارهای اسید هیومیک دو هفته پس از انتقال گیاه اعمال و در نهایت ویژگی‌های مختلف بیوشیمیایی-فیزیولوژیکی اندازه‌گیری شد. بر اساس نتایج، در خاک‌های دارای آلودگی، علی رغم رشد ظاهرا طبیعی گیاهان بدون هیچگونه علائم سمیت (کلروز یا نکروز شدن)، با افزایش سطح کادمیم، زیست توده وزن خشک گیاه کاهش و فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی (کاتالاز، پراکسیداز، سوپر اکسید دسموتاز و آسکوربات پراکسیداز) افزایش یافت. کاربرد خاکی اسید هیومیک در خاک‌های دارای آلودگی باعث افزایش زیست توده وزن خشک، غلظت کادمیم و فاکتور غلظت بیولوژیکی کادمیم شد. همچنین، کاربرد اسید هیومیک، سبب کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی گیاهان شد، که نشان از تعدیل تنش کادمیم در گیاهان تیمار شده داشت. بر اساس نتایج، با توجه به بالا بودن مقادیر بالاتر از "یک" فاکتور انتقال و فاکتور غلظت بیولوژیکی، همیشه بهار به عنوان یک گیاه بیش انباشتگر کادمیم محسوب شده، که می‌تواند کادمیم را از طریق سازوکار گیاه استخراجی پالایش کند. به طور کلی، از بین تیمارهای مورد بررسی، استفاده از تیمار ۲۰ میکرومولار (به ویژه کاربرد خاکی) اسید هیومیک، بهترین تأثیر را در افزایش فرایند گیاه‌پالایی کادمیم در خاک آهکی مورد مطالعه داشت.

واژه های کلیدی: گیاه همیشه بهار، خاک آهکی، کادمیم، اسید هیومیک، گیاه‌پالایی.

مقدمه

آلودگی خاک به فلزات سنگین، به دلیل اثرات آن بر چرخه زیست‌محیطی و فعالیت‌های متابولیکی/ فیزیولوژیکی موجودات زنده، به عنوان یکی از مهمترین چالش‌های زیست‌محیطی دهه های اخیر شناخته شده است (Mahar *et al.*, 2016). یکی از فلزات سنگین با ویژگی سمیت بالا در خاک، کادمیم می باشد. آلودگی خاک‌ها به کادمیم می‌تواند در نتیجه فعالیت‌های صنعتی و کشاورزی ایجاد شود (Amini *et al.*, 2005).کادمیم می‌تواند با جلوگیری از جوانه زنی بذرها، فتوسنتز و فعالیت آنزیمی و متابولیسم، رشد گیاه را مختل کند (Wang *et al.*, 2015). همچنین مطالعات قبلی نشان داده است که کادمیم می‌تواند ساختار کلروپلاست را تغییر داده و باعث ایجاد پاسخ آنتی اکسیدان‌ها شود (Gill *et al.*, 2011). تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در گیاهان، یک واکنش رایج در برابر تنش‌های محیطی محسوب می‌شود (Caverzan *et al.*, 2016). با این حال، افزایش بیش از حد معمول ROS در غشای سلولی گیاهان می‌تواند به ساختار لیپیدها، کربوهیدرات‌ها و مولکول‌های اسید نوکلئیک آسیب رساند (You and Chan, 2015). بنابراین نیاز می‌باشد که سطوح ROS متعادل باشد، تا از آسیب اکسیداتیو سلولی جلوگیری کند. مطالعات انجام شده گوناگونی نشان داده است، که تنش‌های ناشی از وجود عناصر سنگین از جمله کادمیم سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی آکسیدانی (آسکوربات پراکسیداز

* نویسنده مسئول: safariv@uk.ac.ir

و کاتالاز) در گیاهان مختلف می‌شود (John *et al*., 2008; Luo *et al*., 2011; Ahmadvand *et al*., 2013; Esringü *et al*. (2016) در مطالعات خود گزارش کردند که کاربرد اسید هیومیک در گیاه ماشک، تحت تنش (شوری)، سبب کاهش آسیب‌پذیری غشا و کاهش میزان مالون دی آلدئید (به عنوان شاخصی از تنش درون سلولی) در گیاه می‌شود. همچنین Zhang *et al*. (2014) در مطالعه خود نشان دادند که کاربرد اسید هیومیک در گیاه ذرت، تحت تنش مواد غذایی، با تغییر در سیستم آنتی اکسیدانی گیاه، کاهش تجمع مالون دی آلدئید در گیاه را سبب می‌شود.

فلزات سنگین از جمله کادمیم، برخلاف آلاینده‌های آلی، زیست تخریب پذیر نیستند و دارای نیمه عمر طولانی می‌باشند، که بدین سبب، پالایش آنها در محیط زیست بسیار ضروری می‌باشد (Sarwar *et al*., 2017). روند افزایش آلودگی خاک‌ها به فلزات سنگین در محیط زیست، منجر به توسعه تحقیقات متعددی در خصوص روش‌های اصلاح خاک‌های آلوده به این عناصر شده است. تخریب خاک، هزینه بالا و عدم سادگی طراحی اجرای روش‌های فیزیکی و شیمیایی سبب شده است که تحقیقات وسیع‌تری در خصوص روش‌های پالایش بیولوژیکی انجام شود (Etim, 2012). گیاه‌پالایی به عنوان یک روش بیولوژیکی در نظر گرفته می‌شود که در آن از گیاهان سبز برای جذب آلاینده‌های مختلف از خاک، آب و رسوبات استفاده می‌شود. در این روش از گیاهانی استفاده می‌شود که از نظر ژنتیکی قادر به حذف، تبدیل و ایجاد ثبات در سطح بالایی از آلاینده‌ها هستند. استفاده از یک گیاه بیش انباشتگر، که قادر به جذب و تجمع مقادیر زیادی از آلاینده‌ها است، به عنوان یکی از اصلی‌ترین ارکان گیاه‌پالایی موفق معرفی می‌شود (Mahar *et al*., 2016). گیاهان بیش انباشتگر کادمیم، قادر به تجمع بیش از ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم کادمیم در شاخساره هستند که قادر می‌باشند بدون هیچ نشانه ای از سمیت، مقادیر زیادی از فلزات سنگین را از ریشه به شاخساره انتقال دهند (فاکتور انتقال >۱) (Li et al., 2016).

در سال‌های اخیر، استفاده از گیاهان زینتی بیش انباشتگر، به عنوان یک روش مفید برای پالایش خاک‌های آلوده پیشنهاد شده است (Liu *et al*., 2008). این گیاهان علاوه بر پالایش، می توانند نقش مهمی را در زیباسازی محیط داشته باشند. گل همیشه بهار (*Calendula officinalis L.*) گیاهی زینتی از خانواده *Asteraceae* است و در فضای سبز شهری ایران گیاهی رایج می‌باشد. مطالعات گذشته نشان داده است که همیشه بهار توانایی زیادی در گیاه‌پالایی برخی فلزات سنگین مانند سرب، کادمیم و روی دارد (Liu *et al*., 2010؛ Bai *et al*., 2010؛ Hristozkova *et al*., 2016).

یکی از عوامل موثر در فرایند گیاه‌پالایی موفق، قابلیت دسترسی مناسب فلزات سنگین در خاک می‌باشد. به دلیل قابلیت دسترسی پایین فلزات سنگین در خاک‌های آهکی، گیاهان بیش اندوز، کارایی مناسبی در فرایند گیاه‌پالایی فلزات سنگین ندارند (Martínez-Alcalá *et al*., 2009). بدین سبب، استفاده از ترکیبات کمپلکس کننده به منظور افزایش میزان جذب فلزات توسط گیاهان به عنوان یک راهکار موثر در نظر گرفته می‌شود (Agnello *et al*., 2014). در واقع در بسیاری از موارد، با استفاده از کلات کننده‌ها در خاک‌های آلوده، یک گیاه غیر بیش انباشتگر قادر به جذب مقادیر بالاتری از فلزات سنگین می‌باشد. بنابراین، استفاده از عوامل کمپلکس کننده فلزات، از جمله کمپلکس‌های مصنوعی یا غیر مصنوعی، به عنوان یکی از مناسب‌ترین روش‌ها به منظور افزایش قابلیت دسترسی فلزات و بهبود کارایی گیاه استخراجی فلزات سنگین معرفی می‌شود. در سال‌های اخیر، استفاده از ترکیبات آلی طبیعی، به عنوان کمپلکس کننده‌های موثر به منظور افزایش کارایی گیاه‌پالایی، به دلیل تجزیه بیولوژیکی و غیر سمی بودن نسبت به اسیدهای آلی مصنوعی، افزایش یافته است (Agnello *et al*., 2014). اسید هیومیک یکی از ترکیبات آلی با وزن مولکولی بالا و سازگار با محیط زیست است، که واحدهای اصلی آن حلقه‌های آروماتیک و زنجیره‌های آلکیل هستند، که طیف وسیعی از گروه‌های عاملی (COOH-، OH-، NH2- و ...) را دارا می‌باشد. این گروه‌های عاملی با تشکیل پیوندهایی با فلزات، جذب فلزات توسط گیاهان را افزایش می دهند (Angin *et al*., 2008). تشکیل کمپلکس‌های فلزی-هیومیک اسید در خاک‌های آلوده از تثبیت فلزات توسط ذرات رس جلوگیری کرده و آنها را به فرم‌های محلول تبدیل می‌کند. همچنین گزارش شده است که اسید هیومیک می‌تواند به عنوان تنظیم کننده رشد برای تنظیم سطح هورمون گیاهان مورد استفاده قرار گیرد و در نهایت رشد و مقاومت گیاه را در برابر تنش های محیطی بهبود بخشد (Nardi *et al*., 2002). Evangelou *et al*. (2004) در بررسی اثر کاربرد اسید هیومیک بر فرایند گیاه استخراجی کادمیم توسط گل توتون از خاک آلوده به کادمیم نشان دادند که کاربرد اسید هیومیک علی‌رغم اینکه اثر محسوسی بر کادمیم قابل دسترس خاک (استخراج شده با DTPA) نداشته است، اما سبب افزایش معنی‌دار کادمیم در گیاه (در بعضی موارد ۶۵٪ بیشتر) مورد مطالعه نسبت به نمونه شاهد شده است. این پژوهشگران دلیل این افزایش را علاوه بر کاهش pH خاک، به جذب اجزای کمپلکس شده کادمیم- اسید هیومیک (کاهش اندازه ماکرومولکول اسید هیومیک در نتیجه فعالیت میکروبی یا خودتخریبی اسید هیومیک) نسبت دادند. Vargas *et al*. (2016)

در بررسی کاربرد اسید هیومیک بر گیاه‌پالایی روی و مس به‌وسیله گیاه وتیور در یک خاک آلوده معدنی نشان دادند، که کاربرد اسید هیومیک به دلیل تشکیل کمپلکس محلول آلی-عنصر سبب افزایش غلظت مس در گیاه وتیور شده است. نتایج این پژوهشگران نشان داد که اسید هیومیک اثر محسوسی بر جذب روی نداشته و سبب کاهش انتقال روی و مس از ریشه به اندام هوایی گیاه شده است. این محققین نشان دادند که استفاده از گیاه وتیور به منظور گیاه استخراجی عناصر سنگین مذکور مناسب نبوده، اما استفاده همزمان اسید هیومیک و این گیاه می‌تواند در فرایند گیاه تثبتی عناصر سنگین مذکور در خاک‌های آلوده معدن موثر باشد. با توجه به مطالعات محدود از اثرات اسید هیومیک بر کارایی گیاه‌پالایی عناصر سنگین در خاک‌های آهکی، پژوهش حاضر با هدف بررسی اثرات محلول پاشی و یا کاربرد خاکی اسید هیومیک بر افزایش گیاه‌پالایی کادمیم و وضعیت بیوشیمیایی-فیزیولوژیکی گیاه همیشه بهار در یک خاک آهکی آلوده به کادمیم، انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

به منظور انجام این پژوهش، نمونه خاک سطحی (عمق ۳۰-۰ سانتی‌متر) از مزرعه تحقیقاتی واقع در دانشگاه شهید باهنر کرمان (بهار ۱۳۹۷) جمع آوری شد. خاک تهیه شده از الک دو میلی متری عبور داده شد و برخی از ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک مورد مطالعه با استفاده از روش‌های متداول تعیین شد. برخی از خصوصیات خاک مورد مطالعه در جدول (۱) نشان داده شده است. نمونه خاک جمع آوری شده به صورت جداگانه با عنصر کادمیم در سه سطح صفر، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم از منبع نیترات کادمیم ($Cd(NO_3)_2$) آلوده و به مدت چهار هفته در شرایط رطوبت مزرعه (FC) نگهداری شد. به منظور بررسی پتانسیل گیاه‌پالایی کادمیم توسط گیاه همیشه بهار و تأثیر اسید هیومیک بر این فرایند، آزمایش گلخانه ای به صورت کاملاً تصادفی در قالب طرح فاکتوریل (دو فاکتور: ۱- آلودگی کادمیم در سه سطح (صفر، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) و ۲- تیمار اسید هیومیک در پنج سطح (بدون کاربرد هیومیک اسید، کاربرد هیومیک اسید به صورت خاکی در سطح ۱۰ میکرومولار، کاربرد هیومیک اسید به صورت محلول پاشی در سطح ۱۰ میکرومولار، کاربرد هیومیک اسید به صورت خاکی در سطح ۲۰ میکرومولار، کاربرد هیومیک اسید به صورت محلول پاشی در سطح ۲۰ میکرومولار) با سه تکرار انجام شد (جدول ۲). بذرهای همیشه بهار (رقم جیتانا (Gitana)) مورد مطالعه در پژوهش حاضر، از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه و مورد استفاده قرار گرفتند. ابتدا نشا گیاهان همیشه بهار (در مرحله چهار برگی) که در محیط پرلیت کوکوپیت تهیه شده بودند، به گلدان‌های حاوی خاک‌های آلوده (دو کیلوگرم خاک در هر گلدان) به کادمیم منتقل شدند. دو هفته پس از انتقال نشاها به گلدان‌ها، گیاهان توسط تیمارهای اسید هیومیک (ساخته شده توسط شرکت Carl Roth GmbH ؛ حاوی ۳۰-۴۰ درصد اسید هیومیک) به صورت کاربرد خاکی و یا محلول پاشی در سطوح مختلف (۰ ، ۱۰ ، ۲۰ میکرومولار در هر کیلوگرم خاک یا محلول پاشی در هر گلدان)، پنج بار در طول دوره رشد گیاه در فواصل هفت روزه تیمار (مجموعا برای هر تیمار یک لیتر از سطوح، در طول دوره ۳۵ روزه) شدند. گیاهان به مدت ۱۲ هفته با آب مقطر تحت شرایط بهینه گلخانه (دمای روزانه ۲۵ تا ۲۸ درجه سلسیوس و دمای شبانه ۱۴ تا ۱۶ درجه سلسیوس، رطوبت ۷۵٪، تناوب روشنایی:تاریکی ۸:۱۶) آبیاری شدند تا رطوبت حد ظرفیت مزرعه نمونه‌های خاک حفظ شود. دو هفته پس از پایان اعمال تیمارهای اسید هیومیک، از شاخه‌های گیاهان نمونه برداری شد و فعالیت‌های آنزیمی شامل آنزیم‌های سوپراکسید دسموتاز (SOD) ، پراکسیداز (POD)، کاتالاز (CAT) و آسکوربات پراکسیداز (APX) و همچنین پراکسید هیدروژن (H_2O_2)) و مالون دی آلدئید (MDA) مورد بررسی قرار گرفت. روش اندازه گیری این پارامترها در مطالعه قبلی نویسندگان توضیح داده شده است (Baniasadi *et al.*, 2018). در پایان آزمایش، پنج هفته پس از پایان تیمارهای اسید هیومیک، ریشه و اندام گیاه برداشت شد (پس از اتمام ۱۲ هفته از شروع آزمایش) و وزن خشک گیاهان اندازه گیری گردید. بدین منظور، ابتدا اندام‌های هوایی و ریشه گیاهان با آب مقطر شست و شو گردید و در دمای ۶۵ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت خشک شد. جهت اندازه گیری غلظت کادمیم در اندام هوایی و ریشه گیاهان، نمونه‌ها در درون کوره (°C ۵۵۰) خاکستر شده و در اسید کلریدریک دو مولار حل و غلظت کادمیم توسط دستگاه اسپکتروفتومتر جذب اتمی (Varian SpectrAA-10) اندازه گیری شد (Chapman and Pratt, 1978). پس از تعیین غلظت کادمیم در گیاهان، فاکتور انتقال (TF) و فاکتور غلطت بیولوژیکی اندام هوایی اندام هوایی (BCFs) و ریشه (BCFr) کادمیم با استفاده از روابط زیر (Amin *et al.*, 2018) محاسبه شد تا پتانسیل گیاه‌پالایی همیشه بهار و تأثیر کاربرد اسید هیومیک بر این شاخص‌ها مشخص شود.

$$TF = \frac{Cd(shoot)}{Cd\ (root)}$$

$$BCFs = \frac{Cd(shoot)}{Cd\ (soil)}$$

$$BCFr = \frac{Cd(root)}{Cd\ (soil)}$$

در این معادلات، Cd (shoot)، Cd (root) و Cd (soil) به ترتیب مقادیر غلظت کادمیم در اندام هوایی (میلی‌گرم بر کیلوگرم)، غلظت کادمیم در ریشه (میلی‌گرم بر کیلوگرم) و غلظت کادمیم در خاک (میلی‌گرم بر کیلوگرم)، می‌باشند.

تجزیه و تحلیل واریانس (ANOVA) و مقایسه میانگین تیمارهای مختلف با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح آماری پنج درصد با استفاده از نرم افزار SAS (SAS 9.1) انجام شد و نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel رسم شدند.

جدول ۱- برخی خصوصیات شیمیایی و فیزیکی خاک مورد مطالعه

خصوصیت	مقدار	خصوصیت	مقدار
پ‌هاش	۷/۶	ماده آلی (٪)	۱/۲
کربنات کلسیم معادل (٪)	۱۸/۶	ظرفیت تبادل کاتیونی ($Cmol\ (+)\ kg^{-1}$)	۲۱
نیتروژن کل (٪)	۰/۲۱	کادمیم کل ($mg\ kg^{-1}$)	*N.D
فسفر قابل دسترس ($mg\ kg^{-1}$)	۲۱	کادمیم عصاره‌گیری شده با DTPA ($mg\ kg^{-1}$)	N.D
پتاسیم قابل دسترس ($mg\ kg^{-1}$)	۱۸۳	آهن عصاره‌گیری شده با DTPA ($mg\ kg^{-1}$)	۶/۵
بافت خاک	لومی	مس عصاره‌گیری شده با DTPA ($mg\ kg^{-1}$)	۰/۸
قابلیت هدایت الکتریکی ($dS\ m^{-1}$)	۵/۳	منگنز عصاره‌گیری شده با DTPA ($mg\ kg^{-1}$)	۷/۲

***غیر قابل تشخیص توسط دستگاه**

جدول ۲- علائم اختصاری هر تیماردر مطالعه حاضر

علائم	تیمار	علائم	تیمار	علائم	تیمار
P1H1	Cd0+HA0	P2H1	Cd50+HA0	P3H1	Cd100+HA0
P1H2	Cd0+HA10(خاکی)	P2H2	Cd50+HA10(خاکی)	P3H2	Cd100+HA10(خاکی)
P1H3	Cd0+HA10 (محلول پاشی)	P2H3	Cd50+HA10 (محلول پاشی)	P3H3	Cd100+HA10 (محلول پاشی)
P1H4	Cd0+HA20(خاکی)	P2H4	Cd50+HA20(خاکی)	P3H4	Cd100+HA20(خاکی)
P1H5	Cd0+HA20 (محلول پاشی)	P2H5	Cd50+HA20 (محلول پاشی)	P3H5	Cd100+HA20 (محلول پاشی)

Cd0، Cd50، Cd100: به ترتیب سطوح کادمیم صفر، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم

HA0، HA10، HA20: به ترتیب مقادیر صفر، ۱۰ و ۲۰ میکرومولار اسید هیومیک

خاکی و محلول پاشی: به ترتیب کاربرد هیومیک اسید در خاک و محلول پاشی

نتایج و بحث

وزن خشک ریشه و اندام هوایی

نتایج حاصل از تجزیه واریانس اثرات اصلی و برهمکنش سطوح آلودگی کادمیم و تیمارهای اسید هیومیک بر وزن خشک ریشه و اندام هوایی همیشه بهار نشان از معنی‌دار بودن منابع تغییرات در سطوح یک و پنج درصد از آزمون آماری دانکن داشت (جدول ۳). شکل (۱) وزن خشک ریشه و اندام هوایی همیشه بهار، تحت تاثیر سطوح مختلف کادمیم و تیمارهای مختلف اسید هیومیک را نشان می‌دهد. استفاده از سطوح مختلف کادمیم به طور معنی-داری باعث کاهش هر دو پارامتر وزن خشک ریشه و اندام هوایی در مقایسه با نمونه‌های خاک بدون کاربرد کادمیم (در تمام سطوح تیمار) شد. کاهش زیست توده گیاهی، به عنوان یک نتیجه از کاربرد کادمیم، می‌تواند به تجمع این عنصر در دیواره سلولی و ورود آن به سیتوپلاسم و در نهایت مختل شدن متابولیسم طبیعی سلول مربوط باشد (Yadav, 2010). همچنین، کاهش تقسیم سلولی و مهار رشد سلول را می‌توان از دیگر دلایل کاهش زیست توده گیاه همیشه بهار تحت تنش کادمیم دانست (Ehlert *et al.*, 2009). Gomes *et al.* (2013) بیان کردند که جذب کادمیم توسط ریشه و در نتیجه تجمع آن در گیاه باعث کاهش جذب و توزیع سایر عناصر ضروری در گیاه می‌شود، که منجر به کاهش زیست توده گیاه خواهد شد. در مطالعه حاضر، استفاده از اسید هیومیک (در هر دو کاربرد خاکی و محلول پاشی) در هر دو سطح ۱۰ و ۲۰ میکرومولار در تمام نمونه‌های خاک باعث افزایش وزن خشک ریشه همیشه بهار در مقایسه با نمونه بدون استفاده از اسید هیومیک شد، که در برخی موارد این تفاوت معنی‌دار نبود. اطلاعات کمی در مورد چگونگی تاثیر مواد هومیکی بر رشد گیاه شناخته شده است. برخی از محققان بر تأثیر این ترکیبات بر زیست فراهمی عناصر غذایی خاک و برخی دیگر بر تأثیر مستقیم آنها بر سوخت و ساز گیاه تمرکز کرده‌اند (Mora *et al.*, 2010). اسید هیومیک ممکن است بتواند از طریق تأثیر بر متابولیسم نیتروژن و کربن، بر رشد گیاه تأثیر بگذارد (Schiavon *et al.*, 2010). همچنین بیان شده است که این ماده ممکن است که بر

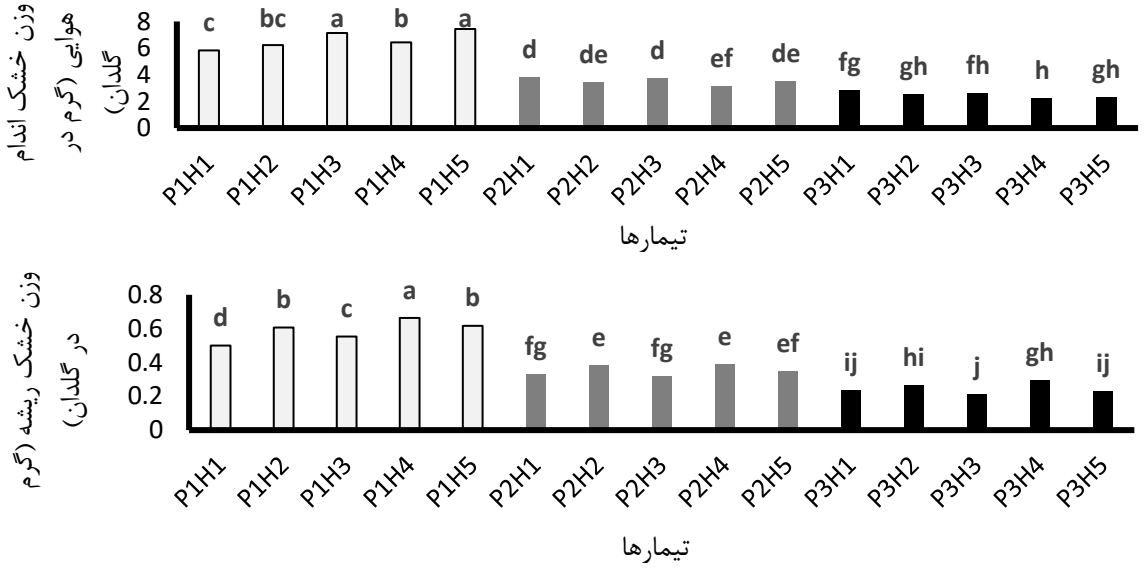
فعالیت پمپ ریشه H + -ATPase و توزیع نیترات در شاخه های ریشه تأثیر بگذارد، و به تبع آن توزیع سیتوکینین‌ها، پلی‌آمین‌ها و اسید آبسیزیک را تغییر داده و رشد شاخه‌ها را تحت تأثیر قرار دهد (Mora *et al*., 2010).

جدول ۳- تجزیه واریانس اثرات سطوح مختلف کادمیم و تیمار اسید هیومیک بر وزن خشک گیاه، غلظت کادمیم، فاکتور انتقال و فاکتور غلظت بیولوژیکی (هوایی و ریشه) کادمیم

منبع تغییرات	DF	میانگین مربعات						
		وزن خشک اندام هوایی	وزن خشک ریشه	غلظت کادمیم اندام هوایی	غلظت کادمیم ریشه	فاکتور انتقال	فاکتور غلظت بیولوژیکی اندام هوایی	فاکتور غلظت بیولوژیکی ریشه
کادمیم	۲	۶۸/۸**	۰/۴۵۸**	۱۷۷۷۵۶/۸**	۹۲۰۲۴/۲**	۴/۹۹**	۲۷/۳۶**	۱۷/۰۷**
تیمار اسید هیومیک	۴	۰/۵**	۰/۰۱۴**	۲۶۷۸**	۷۵۱/۳**	۰/۰۱	۰/۵۱**	۰/۱۴**
تیمار اسید هیومیک×کادمیم	۸	۰/۵**	۰/۰۰۲*	۷۸۹**	۲۵۸/۹**	۰/۰۲	۰/۱۶**	۰/۰۴**
خطا	۳۰	۰/۰۸	۰/۰۰۰۷	۸۶/۴	۴۵/۸	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۰۸
ضریب تغییرات (٪)	-	۶/۸	۶/۷۴	۸/۰۳	۷/۹	۱۶/۰۵	۸/۷۳	۷/۸۴

**و * به ترتیب نشان دهنده معنی‌داری در سطح یک درصد و سطح پنج درصد از آزمون دانکن DF: درجه آزادی

Tahir *et al*. (2011) گزارش دادند که استفاده از ۶۰ میلی‌گرم در کیلوگرم اسید هیومیک در خاک باعث افزایش ارتفاع گیاه، وزن تر و خشک شاخه‌های گندم و غلظت نیتروژن در گیاه شده است. با این حال، هیچ تاثیری بر غلظت فسفر و پتاسیم گیاه نداشت. این محققان گزارش دادند که استفاده از ۹۰ میلی‌گرم در کیلوگرم اسید هیومیک، اثرات منفی بر رشد گیاه، جذب عناصر غذایی گیاه و غلظت عناصر غذایی داشته است. Mora *et al*. (2010) بیان داشتند که رشد بیش از حد ریشه، یکی از اصلی‌ترین اثرات اسید هیومیک است که این مواد از طریق تعادل هورمونی و جذب برخی مواد مغذی بر رشد گیاه تأثیر می‌گذارد. تجمع اسید هیومیک در ریزوسفر گیاهان می‌تواند با افزایش در دسترس بودن مواد مغذی و/یا مولکول‌های تنظیم کننده رشد، رشد ریشه را تحریک کند (Asli and Neuman, 2010). مقایسه کاربرد محلول پاشی و کاربرد اسید هیومیک خاک بر رشد گوجه فرنگی (Yildirim, 2007) و فلفل (Karakurt *et al*., 2009)، نشان داد که استفاده از هر دو تیمار اسید هیومیک باعث افزایش عملکرد گیاهان مذکور شده است، اگرچه استفاده از محلول پاشی اثرات بهتری بر رشد گوجه فرنگی داشت. در مطالعه حاضر، کاربرد اسید هیومیک در خاک نسبت به محلول پاشی اثرات محسوس‌تری بر رشد گیاه در شرایط تنش داشت. فعالیت‌های شبه هورمونی اسید هیومیک و افزایش جذب عناصر غذایی به دلیل افزایش نفوذپذیری سلول (Zandonadi *et al*., 2007) می‌تواند از دلایل مهم تأثیرات مثبت اسید هیومیک بر رشد گیاه همیشه بهار، تحت تنش کادمیم باشد.

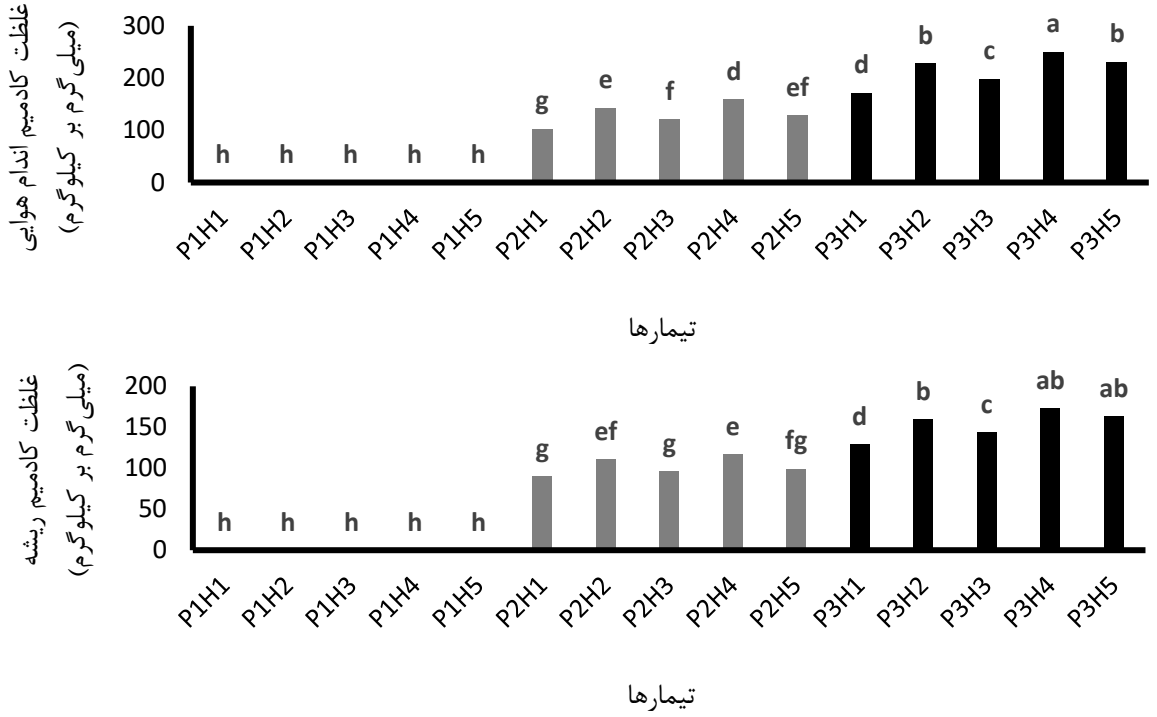


شکل ۱- تاثیر تیمارهای مختلف بر وزن خشک اندام هوایی و ریشه گیاه همیشه بهار (علائم اختصاری هر تیمار در جدول (۲) آورده شده است. میانگین‌های دارای حروف مشترک بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد اختلاف آماری معنی‌داری ندارند)

غلظت کادمیم

بر اساس نتایج تجزیه واریانس اثر اصلی سطوح آلودگی کادمیم، تیمار اسید هیومیک و برهمکنش آنها بر غلظت کادمیم در اندام هوایی و ریشه‌ها در سطح یک و پنج درصد از آزمون دانکن معنی-دار بود (جدول ۳). استفاده از کادمیم در حضور و عدم حضور اسید هیومیک به طور قابل توجهی غلظت و جذب کادمیم را در

ریشه و اندام هوایی گیاه در مقایسه با عدم وجود آلودگی کادمیم افزایش داد (شکل ۲). بر اساس نتایج، همیشه بهار توانست ۱۷۰ تا ۲۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم کادمیم را در بافت‌های خود تجمع دهد، که بسیار بالاتر از حد طبیعی است (۵ تا ۲۵ میلی‌گرم در کیلوگرم) و حد مسمومیت (۲۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) کادمیم در گیاهان (Kabata-Pendias, 2010) می‌باشد. بیشترین میزان غلظت کادمیم در اندام هوایی گیاه (۲۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) در تیمار P3H4 مشاهده شد. مقادیر بالاتر از ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم در بافت اندام هوایی گیاه همیشه بهار، نشان از پتانسیل بالای این گیاه در فرایند گیاه‌پالایی دارد. استفاده از اسید هیومیک در هر دو سطح کادمیم باعث افزایش غلظت کادمیم در ریشه و اندام هوایی شد که در تیمار کاربرد خاکی حاوی ۲۰ میکرومولار اسید هیومیک نسبت به سایر تیمارها بارزتر بود. Angin *et al.* (2008) در تحقیقی به بررسی تأثیر اسید هیومیک بر گیاه‌پالایی سرب و بور توسط گیاه وتیور پرداختند. این پژوهشگران گزارش دادند که اسید هیومیک هیچ تاثیری بر غلظت سرب در بخش‌های اندام هوایی وتیور ندارد، اما در نتیجه استفاده از اسید هیومیک، محتوای سرب ریشه افزایش یافته است. آنها دلیل احتمالی این مشاهده را افزایش نفوذپذیری غشای پلاسمای ریشه دانستند که در نهایت باعث افزایش انتقال فلز می‌شود. آنها همچنین اظهار داشتند که مقدار مناسب اسید هیومیک برای تصفیه گیاه به میزان آلودگی سرب بستگی دارد. Topcuoğlu (2013) گزارش داد که اسید هیومیک در سطح دو درصد باعث افزایش غلظت فلزات سنگین در اندام هوایی و کاهش رشد توتون شده است. Khan *et al.* (2006) اظهار داشتند که تأثیر اسید هیومیک بر رشد گیاه به میزان آلودگی فلزات در خاک بستگی دارد. از آنجا که سطح بالایی از آلودگی خاک وجود دارد که بسیار سمی است، استفاده از اسید هیومیک ممکن است با افزایش تحرک فلزات در خاک و فراهمی زیستی آن برای گیاهان، سمیت را افزایش دهد.

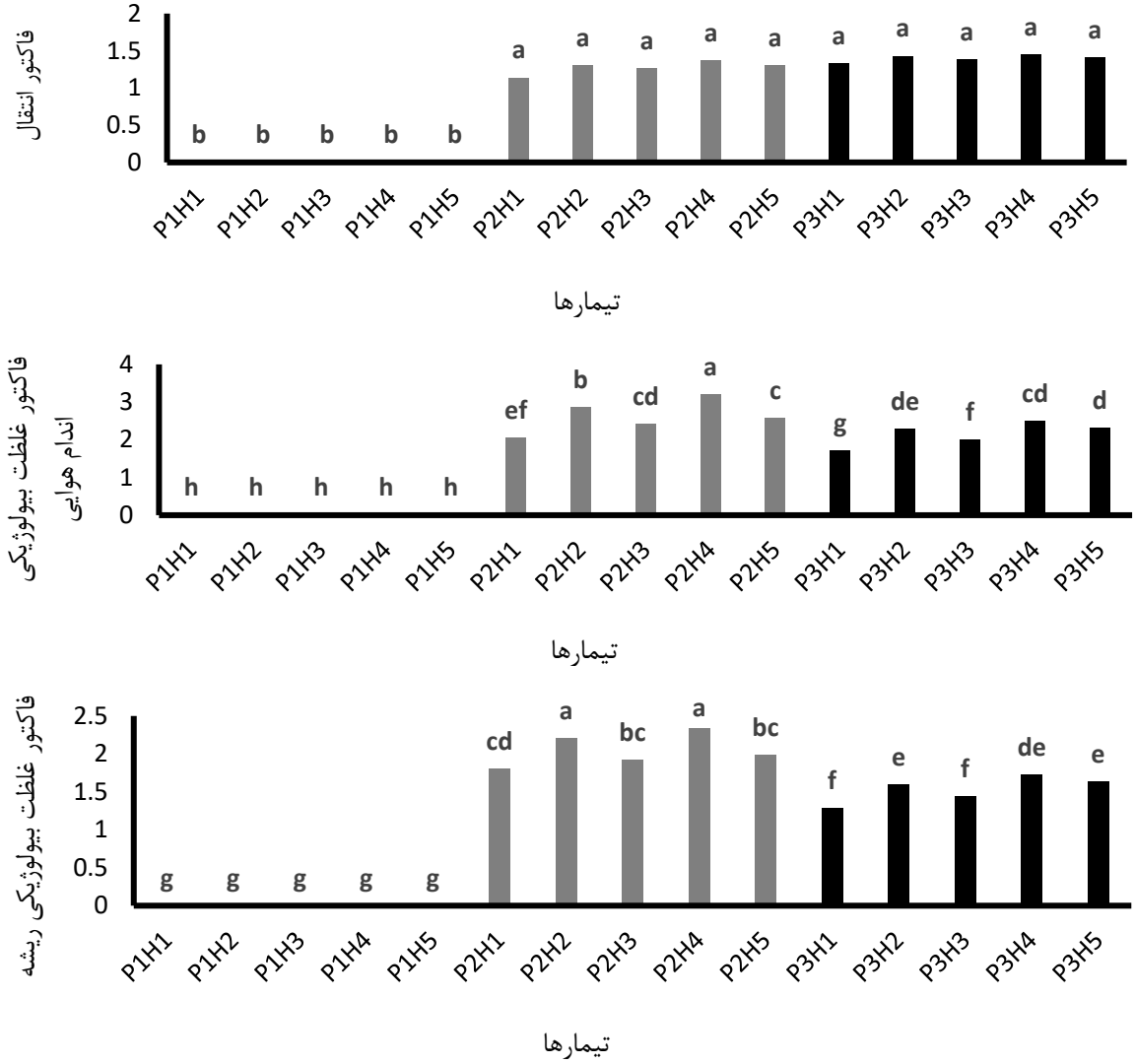


شکل ۲- تاثیر تیمارهای مختلف بر غلظت کادمیم اندام هوایی و ریشه گیاه (علائم اختصاری هر تیمار در جدول (۲) آورده شده است. میانگین‌های دارای حروف مشترک بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد اختلاف آماری معنی‌داری ندارند)

فاکتور انتقال (TF) و فاکتور غلظت بیولوژیکی (BCF) کادمیم

بر اساس نتایج تجزیه واریانس، فاکتور غلظت بیولوژیکی کادمیم در هر دو بخش ریشه و اندام هوایی به طور معنی‌داری (سطح پنج درصد آزمون دانکن) تحت تأثیر سطح کادمیم، تیمار اسید هیومیک و برهمکنش آنها قرار گرفت (جدول ۳). همچنین فاکتور انتقال کادمیم به طور معنی‌داری تحت تاثیر اثر اصلی کادمیم قرار گرفت. بر اساس نتایج (شکل ۳)، مقادیر TF در تمام نمونه‌های خاک در حضور و عدم وجود اسید هیومیک بالاتر از یک بود. ارزیابی BCF در تمام نمونه‌های آلوده میزان این فاکتور را در حضور و عدم وجود اسید هیومیک بالاتر از "یک" نشان داد (شکل ۴). تأثیر تیمارهای اسید هیومیک بر BCF، سبب افزایش این فاکتور شد، که بیشترین افزایش در تیمار P2H4 مشاهده شد

(شکل ۳). بر اساس مطالعات گذشته، گیاهان با BCF و TF بالای "یک" دارای پتانسیل گیاه استخراجی و گیاهان با TF کمتر از "یک" و BCF بالای "یک"، دارای پتانسیل تثبیت گیاهی بالایی هستند (Yoon *et al*., 2006). با توجه به نتایج پژوهش حاضر، و TF و BCF بالاتر از "یک" و غلظت کل کادمیم بالاتر از ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم، گیاه همیشه بهار را می‌توان به عنوان یک گیاه بیش انباشتگر کادمیم با سازوکار گیاه استخراجی معرفی کرد. با توجه به طبقه بندی بیش انباشتگرها، گیاهانی با حداقل TF "یک" (و همچنین تجمع بیش از ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) به عنوان گیاهان بیش انباشت کننده کادمیم تعریف می شوند (Li *et al*., 2016). Yoon *et al*. (2006) بیان کردند، فقط گونه‌هایی از گیاهان که مقادیر BCF و TF در آنها بیش از "یک" است، توانایی استفاده برای فرایند گیاه استخراجی را دارند. با توجه به نتایج (شکل ۴)، می‌توان بیان نمود که همیشه بهار یک گیاه با توانایی مناسب جهت گیاه استخراجی کادمیم است و استفاده از اسید هیومیک به خصوص در سطح ۲۰ میکرومولار به صورت کاربرد خاکی، می‌تواند به طور قابل توجهی موجب افزایش BCF و TF شود.



شکل ۳- تاثیر تیمارهای مختلف بر فاکتور انتقال کادمیم (TF) و فاکتور غلظت بیولوژیکی ریشه (BCFr) و اندام هوایی (BCFs) کادمیم (علائم اختصاری هر تیمار در جدول (۲) آورده شده است. میانگین‌های دارای حروف مشترک بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد اختلاف آماری معنی‌داری ندارند)

مقادیر پراکسید هیدروژن، مالون دی آلدئید و آنزیم‌های آنتی اکسیدانی

براساس مقادیر تجزیه واریانس اثرات اصلی آلودگی کادمیم و تیمارهای اسید هیومیک بر میزان پراکسید هیدروژن و مالون دی آلدئید، نتایج نشان از اختلاف آماری در سطح پنج درصد از آزمون دانکن داشت (جدول ۴). با افزایش سطح کادمیم (تیمار P2H3 و

P3H1)، مقادیر هر دو پارامتر پراکسید هیدروژن و مالون دی آلدئید در مقایسه با تیمار بدون استفاده از کادمیم (P1H1) افزایش قابل توجهی نشان دادند (جدول ۵). مقایسه میانگین اثرات سطوح آلودگی کادمیم و تیمار اسید هیومیک بر مقادیر مالون دی آلدئید و پراکسید هیدروژن (شکل۴) نشان داد که با افزایش سطح آلودگی، خصوصیات مذکور افزایش معنی‌داری داشتند. در طرف مقابل، کاربرد اسید هیومیک (به ویژه کاربرد خاکی) سبب افزایش مقادیر پراکسید هیدروژن شده، اما اثر محسوس مشخصی بر مقادیر مالون دی آلدئید نشان نداد. کاهش رشد و همچنین تولید ROS، به دلیل تنش اکسیداتیو تحت تنش کادمیم، باعث افزایش محتوای پراکسید هیدروژن و مالون دی آلدئید می‌شود که توسط محققین مختلف گزارش شده است (Meng *et al*., 2009; Zhang *et al*., 2009; Ehsan *et al*., 2014).

جدول ۴- تجزیه واریانس اثرات سطوح مختلف کادمیم و تیمار اسید هیومیک بر مقادیر پرولین، مالون دی آلدئید، پراکسید هیدروژن و برخی آنزیم‌های آنتی اکسیدانی

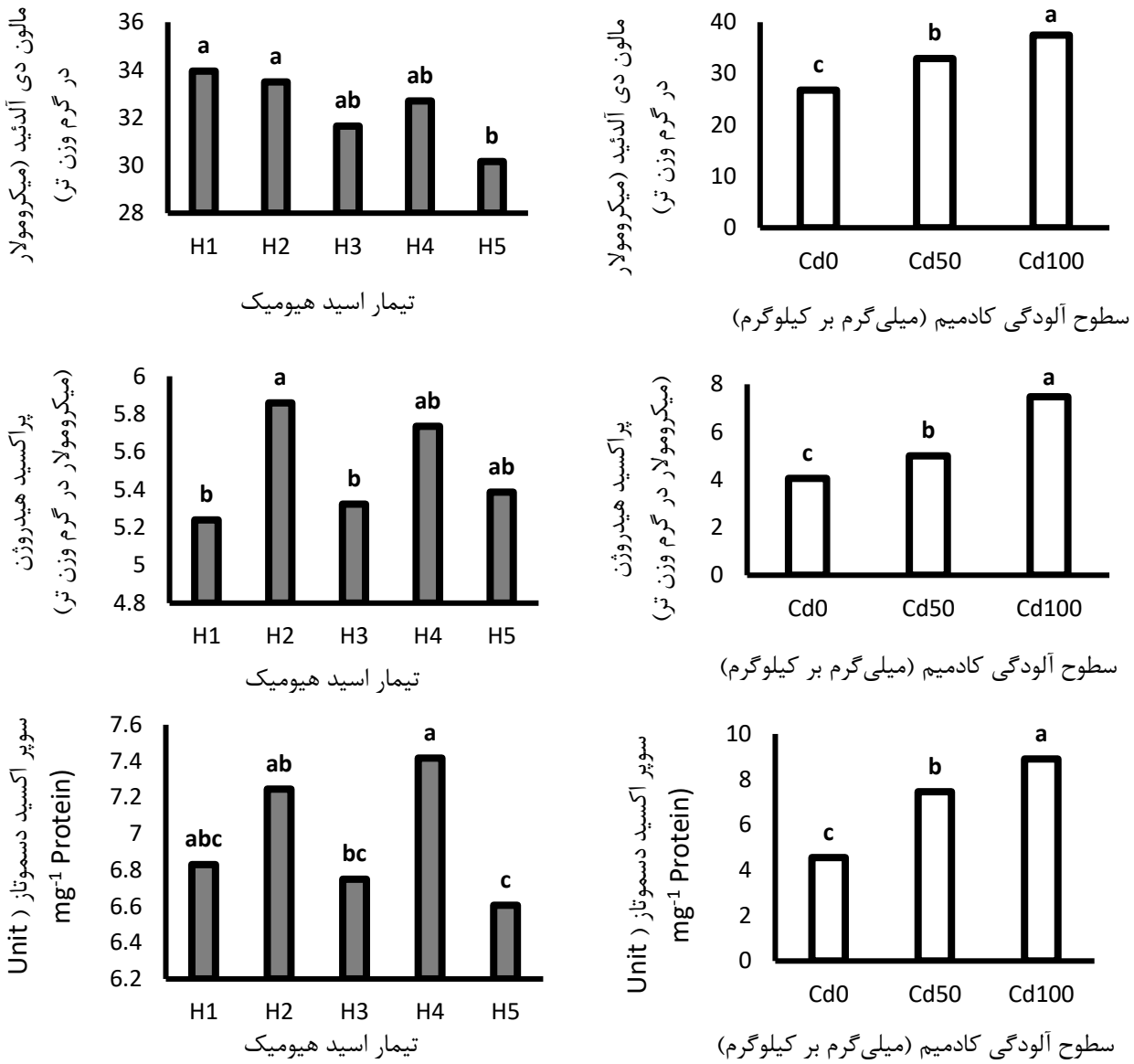
منبع تغییرات		میانگین مربعات					
	DF	مالون دی آلدئید	پراکسید هیدروژن	سوپر اکسید دسموتاز	کاتالاز	پراکسیداز	آسکوربات پراکسیداز
کادمیم	۲	۴۳۴/۷۷**	۴۶/۷۲**	۷۳/۲۵**	۲۶۹/۵**	۵/۲۸**	۳۹۵**
تیمار اسید هیومیک	۴	۲۰/۸۱**	۰/۶۶**	۱/۰۶**	۶/۹۵**	۰/۲۰**	۲/۸۷**
تیمار اسید هیومیک×کادمیم	۸	۱/۲۶	۰/۱۸	۰/۱۷	۲/۶۱**	۰/۰۵**	۱/۴۴**
خطا	۳۰	۴/۲۶	۰/۱۲	۰/۲۰	۰/۲۱	۰/۰۰۴	۰/۲۴
ضریب تغییرات (٪)	-	۶/۳۷	۶/۵۳	۶/۵۳	۷/۲۷	۷/۲۰	۷/۵۱

**و * به ترتیب نشان دهنده معنی‌داری در سطح یک درصد و سطح پنج درصد از آزمون دانکن DF: درجه آزادی

جدول ۵- تاثیر تیمارها بر پرولین، پراکسید هیدروژن، مالون دی آلدئید و برخی آنزیم‌های اکسیدانی گیاه

تیمار	مالون در آلدئید (میکرومولار در گرم وزن تر)	پراکسید هیدروژن (میکرومولار در گرم وزن تر)	سوپر اکسید دسموتاز (Unit mg^{-1} Protein)	کاتالاز ($\mu mol\ min^{-1}$ mg^{-1} Protein)	پراکسیداز ($\mu mol\ min^{-1}$ mg^{-1} Protein)	آسکوربات پراکسیداز (μmol min^{-1} mg^{-1} Protein)
P1H1	۲۷/۳۱gh	۴/۰۸g	۴/۵۲f	۲/۹۱h	۰/۴۲gh	۲/۰۹f
P1H2	۲۸/۴۸gh	۴/۱۵fg	۴/۷۲f	۲/۰۱i	۰/۴۷gh	۲/۵۳f
P1H3	۲۵/۶۲h	۳/۹۱g	۴/۵۸f	۱/۷۰i	۰/۳۶h	۲/۲۵f
P1H4	۲۷/۴۸gh	۴/۳۲eg	۴/۶۲f	۲/۴۱hi	۰/۵۴gh	۲/۶۵f
P1H5	۲۴/۸۹h	۳/۸۱g	۴/۳۴f	۱/۸۱i	۰/۳۶h	۲/۸۵f
P2H1	۳۴/۷۵be	۴/۷۴df	۷/۳۳de	۵/۲۲g	۰/۸۴f	۴/۸۲de
P2H2	۳۳/۶۵ce	۵/۲۲d	۷/۸۳cd	۶/۷۳e	۱/۰۱e	۵/۴۲d
P2H3	۳۲/۶۴ef	۴/۸۲de	۷/۱۳de	۵/۵۲fg	۰/۷۲f	۴/۲۱e
P2H4	۳۳/۳۴df	۵/۱۲d	۸/۱۳c	۷/۹۳d	۱/۰۷e	۶/۷۵c
P2H5	۳۰/۲۴fg	۵/۰۷d	۶/۸۳e	۶/۱۲ef	۰/۸۱f	۴/۱۲e
P3H1	۳۹/۷۷a	۷/۳۳bc	۸/۶۳bc	۸/۴۳d	۱/۲۵d	۱۲/۳۵a
P3H2	۳۸/۳۷ab	۷/۸۳ab	۹/۱۸ab	۱۱/۴۵b	۱/۶۶b	۱۳/۱۶a
P3H3	۳۶/۶۶ad	۷/۲۳bc	۸/۵۴bc	۹/۸۴c	۱/۴۳c	۱۲/۵۵a
P3H4	۳۷/۲۶ac	۸/۱۳a	۹/۴۹a	۱۲/۷۵a	۱/۹۷a	۱۲/۷۷a
P3H5	۳۵/۳۵be	۶/۸۳c	۸/۶۳bc	۱۰/۷۴b	۱/۷۳b	۱۱/۰۱b

در هر ستون، میانگین‌های دارای حروف مشترک بر اساس آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح پنج درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.
علائم اختصاری هر تیمار در جدول (۲) آورده شده است



شکل ۴- مقایسه میانگین اثرات سطوح آلودگی کادمیم و تیمار اسید هیومیک بر مقادیر کمی مالون دی آلدئید، پراکسید هیدروژن و سوپراکسید دسموتاز (علائم اختصاری تیمار هیومیک اسید در جدول (۲) آورده شده است).

در شرایط عادی (بدون تنش)، تعادل محسوسی بین تولید گونه‌های اکسیژن واکنش پذیر (ROS) و فعالیت مکانیسم‌های کاهش دهنده ROS در گیاهان وجود دارد. اما در تنش‌های محیطی این تعادل از بین رفته و باعث ایجاد تنش اکسیداتیو در گیاهان می‌شود (Jaleel *et al*., 2009). همچنین، زمانی که گیاهان در معرض شرایط تنش قرار می گیرند، معمولاً ساختار لیپیدی خود را تغییر می‌دهند. پراکسیداسیون ناشی از استرس لیپید غشایی نشان دهنده آسیب سلولی و مقدار مالون دی آلدئید تولید شده در طی این فرآیند به عنوان شاخص آسیب اکسیداتیو در نظر گرفته می‌شود (Demiral and Türkan, 2005)، که افزایش قابل توجه در میزان مالون دی آلدئید در سطوح مختلف کادمیم می تواند مربوط به افزایش پراکسیداسیون لیپید باشد. استفاده از اسید هیومیک در شرایط عدم آلودگی کادمیم (P1H2) باعث افزایش پراکسید هیدروژن و مالون دی آلدئید شد که از نظر آماری معنی‌دار نبود (جدول ۵). از طرف دیگر، استفاده از اسید هیومیک در حضور آلودگی کادمیم باعث کاهش میزان مالون دی آلدئید شد (اگرچه از نظر آماری در برخی تیمارها معنی‌دار نبود)، که می‌تواند به دلیل تأثیر اسید هیومیک بر فعالیت آنزیم‌های مهم آنتی اکسیدانی مانند کاتالاز و پراکسیداز باشد. تحقیقات قبلی حاکی از آن می‌باشد که تشکیل ترکیبات پیچیده بین اسید هیومیک و یون‌های غیر آلی، تأثیر اسید هیومیک بر تنفس و فتوسنتز و شبیه سازی متابولیسم اسید نوکلئیک و فعالیت هورمونی مانند اسید هیومیک از جمله عوامل موثر در تحریک رشد گیاه توسط اسید هیومیک (Nardi *et al*., 2002) است که

می‌تواند یکی از دلایل کاهش پراکسید هیدروژن و مالون دی آلدئید باشد.

تجزیه و تحلیل واریانس اثر اصلی سطوح کادمیم، تیمارهای اسید هیومیک و برهمکنش آنها (به استثنا آنزیم سوپراکسید دسموتاز) بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز در گیاه همیشه بهار، اختلاف معنی‌داری را در سطح یک و پنج درصد از آزمون دانکن نشان داد (جدول ۴). همچنین، به دلیل عدم اثرات معنی‌دار برهمکنش آلودگی کادمیم و تیمار اسید هیومیک بر مقدار آنزیم سوپراکسید دسموتاز (جدول ۴)، اثرات منابع تغییرات مذکور به تنهایی بر مقادیر این آنزیم رسم شد (شکل ۴)، که بر این اساس، با افزایش مقادیر آلودگی، مقادیر این آنزیم افزایش نشان داد، اما کاربرد تیمار اسید هیومیک فقط با کاربرد خاکی این ماده افزایش نشان داد و با کاربرد محلول پاشی کاهش یافت. بر اساس فعالیت متوسط آنزیم های مورد مطالعه، تغییرات سطح کادمیم در حضور و عدم وجود اسید هیومیک قابل توجه نبود. افزایش سطح کادمیم از ۵۰ به ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، به طور قابل توجهی، همه آنزیم‌های آنتی اکسیدان مورد مطالعه را افزایش داد (P2H1 و P3H1). تحقیقات قبلی نشان داده است که تنش‌های محیطی ناشی از آلودگی فلزات سنگین، می‌تواند برخی از فعالیتهای آنزیمهای آنتی اکسیدان را افزایش دهد (Sytar *et al.*, 2013؛ Saffari and Saffari, 2020). با افزایش مقدار پراکسید هیدروژن در گیاه به دلیل تنش کادمیم، نیاز به مهار این نوع ROS افزایش یافته و در نتیجه افزایش سوپراکسید دسموتاز مشاهده شد (جدول ۵). طبق تحقیقات قبلی، فعال شدن چندین آنزیم مانند سوپراکسید دسموتاز، گلوتاتیون ردوکتاز و کاتالاز یا آنتی اکسیدان‌های غیر آنزیمی می‌تواند سم زدایی گونه‌های فعال اکسیژن سلول‌ها تحت استرس، را سبب شود (Blokhina *et al.*, 2003). تغییرات در آنزیم‌های آنتی اکسیدان مورد مطالعه در هر دو سطح کادمیم متفاوت بود، به طوری که با افزایش سطوح کاربرد اسید هیومیک، فعالیت این آنزیم‌ها افزایش نشان داده است.

نتیجه‌گیری

قابلیت دسترسی کم فلزات سنگین در خاک‌های آهکی، یکی از معضلات عمده در فرآیند گیاه‌پالایی این دسته از خاک‌ها می‌باشد. به منظور افزایش کارایی جذب فلزات سنگین توسط گیاهان پالاینده این عناصر، استفاده از عوامل کلات کننده، می‌تواند راهکاری موثر محسوب گردد. استفاده از عوامل کلات کننده سنتزی در بهبود دسترسی فلزات سنگین در خاک، اگرچه با نتایج قابل قبولی همراه است، اما می‌تواند عوارض منفی بسیاری بر گیاهان و میکروارگانیسم‌های خاک وارد کند. بنابراین، استفاده از کلات کننده‌های آلی طبیعی مانند اسید هیومیک ترجیح داده می‌شود. کمپلکس شدن (تشکیل کمپلکس پایدار با یونهای فلزی) و ویژگی کلات کنندگی مواد هیومیک باعث شده است که آنها عملکردی دوگانه در اکوسیستم خاک داشته باشند. بنابراین، در این مطالعه، تلاش شد تا رفتار اسید هیومیک (خواص کمپلکس یا کلاته) بر جذب کادمیم توسط گیاه همیشه بهار در یک خاک آهکی آلوده به کادمیم بررسی شود. بر اساس نتایج، گیاه همیشه بهار توانایی بالایی در برابر سطوح بالای کادمیم (۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم)، بدون هیچ نشانه ای از سمیت، نشان داد. بر اساس مقادیر BCF و TF بزرگتر از "یک" و همچنین تجمع کادمیم بیشتر از ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم، این گیاه از طریق مکانیزم گیاه استخراجی یک بیش انباشتگر کادمیم معرفی می‌شود و توانایی بالایی در جذب کادمیم دارد. کاربرد هر دو روش خاکی و محلول پاشی اسید هیومیک باعث بهبود زیست توده گیاه، غلظت و جذب کادمیم و شاخص‌های گیاه‌پالایی و افزایش فعالیت‌های آنتی اکسیدانی شد. به نظر می رسد که کاربرد اسید هیومیک در خاک، نقش کلات کنندگی در جذب کادمیم داشته است. از طرف دیگر، استفاده از محلول پاشی اسید هیومیک به دلیل افزایش کارایی جذب کادمیم در گیاه همیشه بهار، به مانند یک شبه هورمون عمل کرده است. به طور کلی، نتایج نشان داد که استفاده از اسید هیومیک نه تنها جذب کادمیم توسط همیشه بهار را افزایش می‌دهد، بلکه باعث ایجاد تنش کمتری در مقایسه با تیمارهای شاهد می شود. در بین تیمارهای مورد مطالعه، کاربرد اسید هیومیک به صورت خاکی در سطح ۲۰ میکرومولار، نسبت به سایر تیمارها، بیشترین اثر را در گیاه‌پالایی کادمیم در گیاه همیشه بهار داشت.

سپاس‌گزاری

نویسندگان این پژوهش، از پژوهشکده فناوری تولیدات گیاهی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، به دلیل حمایت‌های مالی انجام گرفته در این طرح، نهایت قدردانی و تشکر را دارد.

"هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد"

REFERENCES

Agnello, A. C., Huguenot, D., Van Hullebusch, E. D., and Esposito, G. (2014). Enhanced phytoremediation: A review of low molecular weight organic acids and surfactants used as amendments. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 44, 2531-2576.

Ahmadvand, S., Bahmani, R., Habibi, D., and Forouzesh, P. (2013). Investigation of cadmium chloride effect on growth parameters and some physiological characteristics in bean (*Phaseolus Vulgaris* L.) seedlings. *Journal of Agronomy and Plant Breeding*, *8*(4), 167-182.

Amini, M., Khademi, H., Afyuni, M., and Abbaspour, K. C. (2005). Variability of available cadmium in relation to soil properties and landuse in an arid region in Central Iran. *Water, Air, and Soil Pollution*, 162(1–4), 205–218.

Angin, I., Turan, M., Ketterings, Q. M., and Cakici, A. (2008). Humic acid addition enhances B and Pb phytoextraction by vetiver grass (*Vetiveria zizanioides* (L.) Nash). *Water, Air, and Soil Pollution*, 188(1–4), 335–343.

Asli, S., and Neumann, P. M. (2010). Rhizosphere humic acid interacts with root cell walls to reduce hydraulic conductivity and plant development. *Plant and Soil*, 336(1), 313–322.

Baniasadi, F, Saffari, V. R., and Moud, A. (2018). Physiological and growth responses of *Calendula officinalis* L. plants to the interaction effects of polyamines and salt stress. *Scientia Horticulturae*, 234, 312–317.

Blokhina, O., Virolainen, E., and Fagerstedt, K. V. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: A review. *Annals of Botany*, 91, 179-194.

Caverzan, A., Casassola, A., and Brammer, S. P. (2016). Antioxidant responses of wheat plants under stress. *Genetics and Molecular Biology*, 39(1), 1–6.

Chapman, H.D. and Pratt, R.F. (1978). Methods analysis for soil, plant and water. University of California Division, Agriculture Sciences, pp. 60-62.

Demiral, T., and Türkan, I. (2005). Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, 53(3), 247–257.

Ehlert, C., Maurel, C., Tardieu, F., and Simonneau, T. (2009). Aquaporin-mediated reduction in maize root hydraulic conductivity impacts cell turgor and leaf elongation even without changing transpiration. *Plant Physiology*, 150(2), 1093–1104.

Ehsan, S., Ali, S., Noureen, S., Mahmood, K., Farid, M., Ishaque, W., Shakoor, M. B., and Rizwan, M. (2014). Citric acid assisted phytoremediation of cadmium by *Brassica napus* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 106, 164–172.

Esringü, A., Kaynar, D., Turan, M., and Ercisli, S. (2016). Ameliorative effect of humic acid and plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) on Hungarian vetch plants under salinity stress. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, *47*(5), 602-618.

Etim, E. E. (2012). Phytoremediation and Its Mechanisms: A Review. *International Journal of Environment and Bioenergy*, 2(3), 120–136.

Evangelou, M. W., Daghan, H., and Schaeffer, A. (2004). The influence of humic acids on the phytoextraction of cadmium from soil. *Chemosphere*, *57*(3), 207-213.

Gill, S. S., Khan, N. A., and Tuteja, N. (2011). Differential cadmium stress tolerance in five indian mustard (*Brassica juncea* L) cultivars: An evaluation of the role of antioxidant machinery. *Plant Signaling and Behavior*, 6(2), 293–300.

Gomes, M. P., Marques, T. C. L. L. S. e. M., and Soares, A. M. (2013). Cadmium effects on mineral nutrition of the Cd-hyperaccumulator *Pfaffia glomerata*. *Biologia (Poland)*, 68(2), 223–230.

Hristozkova, M., Geneva, M., Stancheva, I., Boychinova, M., and Djonova, E. (2016). Contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in attenuation of heavy metal impact on *Calendula officinalis* development. *Applied Soil Ecology*, 101, 57–63.

Jaleel, C. A., Riadh, K., Gopi, R., Manivannan, P., Inès, J., Al-Juburi, H. J., Chang-Xing, Z., Hong-Bo, S., and Panneerselvam, R. (2009). Antioxidant defense responses: Physiological plasticity in higher plants under abiotic constraints. *Acta Physiologiae Plantarum*, 31, 427-436.

John, R., Ahmad, P., Gadgil, K., and Sharma, S. (2008). Effect of cadmium and lead on growth, biochemical parameters and uptake in *Lemna polyrrhiza* L. *Plant Soil and Environment*, *54*(6), 262.

Kabata-Pendias, A. (2010). Trace Elements in Soils and Plants, 4th edition, CRC Press Boca Raton, FL, USA.

Karakurt, Y., Unlu, H., Unlu, H., and Padem, H. (2009). The influence of foliar and soil fertilization of humic acid on yield and quality of pepper. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B: Soil and Plant Science*, 59(3), 233–237.

Khan, S., Cao, Q., Chen, B. D., and Zhu, Y. G. (2006). Humic acids increase the phytoavailability of Cd and Pb to wheat plants cultivated in freshly spiked, contaminated soil. *Journal of Soils and Sediments*, 6(4), 236–242.

Li, X., Zhang, X., Yang, Y., Li, B., Wu, Y., Sun, H., and Yang, Y. (2016). Cadmium accumulation characteristics in turnip landraces from China and assessment of their phytoremediation potential for contaminated soils. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1862.

Liu, J. N., Zhou, Q. X., Sun, T., Ma, L. Q., and Wang, S. (2008). Identification and chemical enhancement of two ornamental plants for phytoremediation. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 80(3), 260–265.

Liu, J., Zhou, Q., and Wang, S. (2010). Evaluation of chemical enhancement on phytoremediation effect of Cd-contaminated soils with *Calendula Officinalis* L. *International Journal of Phytoremediation*, 12(5), 503–515.

Luo, H., Li, H., Zhang, X., and Fu, J. (2011). Antioxidant responses and gene expression in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) under cadmium stress. *Ecotoxicology*, *20*(4), 770-778.

Mahar, A., Wang, P., Ali, A., Awasthi, M. K., Lahori, A. H., Wang, Q., Li, R., and Zhang, Z. (2016). Challenges and opportunities in the phytoremediation of heavy metals contaminated soils: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 126, 111-121.

Martínez-Alcalá, I., Clemente, R., and Bernal, M. P. (2009). Metal availability and chemical properties in the rhizosphere of *lupinus albus* L. growing in a high-metal calcareous soil. *Water, Air, and Soil Pollution*, 201(1–4), 283–293.

Meng, H., Hua, S., Shamsi, I. H., Jilani, G., Li, Y., and Jiang, L. (2009). Cadmium-induced stress on the seed germination and seedling growth of *Brassica napus* L., and its alleviation through exogenous plant growth regulators. *Plant Growth Regulation*, 58(1), 47–59.

Mora, V., Bacaicoa, E., Zamarreño, A. M., Aguirre, E., Garnica, M., Fuentes, M., and García-Mina, J. M. (2010). Action of humic acid on promotion of cucumber shoot growth involves nitrate-related changes associated with the root-to-shoot distribution of cytokinins, polyamines and mineral nutrients. *Journal of Plant Physiology*, 167(8), 633–642.

Nardi, S., Pizzeghello, D., Muscolo, A., and Vianello, A. (2002). Physiological effects of humic substances on higher plants. *Soil Biology and Biochemistry*, 34, 1527-1536.

Saffari, V. R., and Saffari, M. (2020). Effects of EDTA, citric acid, and tartaric acid application on growth, phytoremediation potential, and antioxidant response of *Calendula officinalis* L. in a cadmium-spiked calcareous soil. *International Journal of Phytoremediation*, 22:11, 1204-1214.

Sarwar, N., Imran, M., Shaheen, M. R., Ishaque, W., Kamran, M. A., Matloob, A., Rehim, A., and Hussain, S. (2017). Phytoremediation strategies for soils contaminated with heavy metals: Modifications and future perspectives. *Chemosphere*, 171, 710-721.

Schiavon, M., Pizzeghello, D., Muscolo, A., Vaccaro, S., Francioso, O., and Nardi, S. (2010). High molecular size humic substances enhance phenylpropanoid metabolism in maize (*Zea mays* L.). *Journal of Chemical Ecology*, 36(6), 662–669.

Sytar, O., Kumar, A., Latowski, D., Kuczynska, P., Strzałka, K., and Prasad, M. N. V. (2013). Heavy metal-induced oxidative damage, defense reactions, and detoxification mechanisms in plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35(4), 985-999.

Tahir, M. M., Khurshid, M., Khan, M. Z., Abbasi, M. K., and Kazmi, M. H. (2011). Lignite-derived humic acid effect on growth of wheat plants in different soils. *Pedosphere*, 21(1), 124–131.

Topcuoğlu, B. (2013). Effects of humic acids on the phytoextraction efficiency of sludge applied soil. *International Journal of Chemical, Environmental and Biological Sciences*, 1(1), 1–4.

Vargas, C., Pérez-Esteban, J., Escolástico, C., Masaguer, A., and Moliner, A. (2016). Phytoremediation of Cu and Zn by vetiver grass in mine soils amended with humic acids. *Environmental Science and Pollution Research*, *23*(13), 13521-13530.

Wang, L., Cui, X., Cheng, H., Chen, F., Wang, J., Zhao, X., Lin, C., and Pu, X. (2015). A review of soil cadmium contamination in China including a health risk assessment. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(21), 16441–16452.

Yadav, S. K. (2010). Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South African Journal of Botany*, 76(2), 167–179.

Yildirim, E. (2007). Foliar and soil fertilization of humic acid affect productivity and quality of tomato. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B: Soil and Plant Science*, 57(2), 182–186.

Yoon, J., Cao, X., Zhou, Q., and Ma, L. Q. (2006). Accumulation of Pb, Cu, and Zn in native plants growing on a contaminated Florida site. *Science of the Total Environment*, 368(2–3), 456–464.

You, J., and Chan, Z. (2015). ROS regulation during abiotic stress responses in crop plants. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1092.

Zandonadi, D. B., Canellas, L. P., and Façanha, A. R. (2007). Indolacetic and humic acids induce lateral root development through a concerted plasmalemma and tonoplast H^+ pumps activation. *Planta*, 225(6), 1583–1595.

Zhang, F., Zhang, H., Wang, G., Xu, L., and Shen, Z. (2009). Cadmium-induced accumulation of hydrogen peroxide in the leaf apoplast of *Phaseolus aureus* and *Vicia sativa* and the roles of different antioxidant enzymes. *Journal of Hazardous Materials*, 168(1), 76–84.

Zhang, L., Lai, J., Gao, M., and Ashraf, M. (2014). Exogenous glycinebetaine and humic acid improve growth, nitrogen status, photosynthesis, and antioxidant defense system and confer tolerance to nitrogen stress in maize seedlings. *Journal of Plant Interactions*, *9*(1), 159-166.