University of Birjand

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

تنشهای محیطی در علوم زراعی
Environmental Stresses In Crop Sciences

Vol. 17, No. 3, pp. 523-547 (Fall 2024)

https://doi.org/10.22077/ESCS.2024.6100.2195

Original article

Reducing the effects of soil heavy metal pollution in *Vicia villosa* L. by using biochar, trichoderma and phosphorus fertilizer management

E. Jam[1], S. Khomari[2*], A. Ebadi[2], E. Goli-Kalanpa[3], A. Gavidel[4]

1. *Ph.D. Student in Crop Physiology, Department of Plant Production and Genetics Engineering, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran*
2. *Professor in Crop Physiology, Department of Plant Production and Genetics Engineering, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran*
3. *Associate Professor in Soil Chemistry and Fertility, Department of Soil Science Engineering, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran*
4. *Associate Professor in Soil Biology, Department of Soil Science Engineering, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran*

Received 8 February 2023; Accepted 3 June 20232

Extended abstract

Introduction

Heavy metal contamination in soil refers to the excessive accumulation of elements called heavy metals, which are capable of causing significant levels of biological toxicity. These metals, in concentrations higher than of tolerable threshold of plants, often cause metabolic disorders, inhibition of growth and physiological process and eventually lead to death of plants. Lead (Pb) and zinc (Zn), as the two common coexisting mineral heavy metals around the world, accumulate in the soil due to mining activity and can adversely affect the crop productivity, the agro-ecosystem components and ultimately the human and environmental health. Biochar, as a potent soil amendment agent, is often obtained by pyrolysis of agricultural organic wastes such as crop residues under low oxygen pressure condition. Trichoderma harzianum, as a plant growth promoter, has capability in stimulating plant growth under varying environmental stresses and therefore, inoculation of plant roots with this fungus could be a conceivable approach to cope with the heavy metal stress. Hairy vetch (Vicia villosa Roth) is a winter annual forage species that shows better growth performance than the other forage legumes such as alfalfa or clover under the severe environmental conditions, especially winter frost and drought.phosphorus supplementation and their interactions on the growth, physiology and P, Pb and Zn uptake by hairy vetch in heavy metal-polluted soil.

Materials and methods

The experiment was carried out in the greenhouse of Faculty of Agriculture and Natural Resources of Mohaghegh Ardabili University as a factorial experiment based on a completely randomized design (CRD) in three replications. Heavy metal contaminated soil was collected from wheat fields around Angouran village (Angouran Rural District, Angouran District, Mahneshan County, Zanjan Province, Iran), downstream of the Zanjan's lead and zinc processing plant (Calcimin® Co.; 36°34'13.2"N 47°37'21.4"E), from a depth of about 0 to 25 cm. Two levels of biochar application (non-biochar control, 5% peanut hull-derived biochar), two levels of Trichoderma inoculation (non-inoculation control and

* Corresponding author: Saeid Khomari; E-Mail: saeid.khomari@gmail.com

© 2024, The Author(s). Published by University of Birjand. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0).

inoculation with conidial suspension) and three levels of P supplementation (0P, non-supplementation; 11P, 11 mg $P.kg^{-1}$ and 22P, 22 mg $P.kg^{-1}$) were applied as the three experimental factors. The feedstock of peanut hull (PH) used in the present experiment were purchased from the local market. After thorough washing, PHs were air-dried and then well ground with a lab-scale mill and sieved using a 100 mesh sieve size. T. harzianum Rifai - T22 isolate acquired from the Laboratory of Plant Pathology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili was revived on PDA (potato dextrose agar) medium and further incubated for at least one week at 28 °C. This experiment was conducted in an open-air vegetation yard with mean day/night temperatures of 25/17 °C, respectively. The experiment lasted for 50 days, in the period from May 16, 2020 (sowing the seeds) until July 5, 2020 (final sampling). In each plastic pot (25 cm in diameter × 20 cm in height), pre-filled with the pot mixture according to the treatments, 20 surface-sterilized hairy vetch (*Vicia villosa* Roth., Local landrace from Ardabil, Iran) seeds were sown and irrigated with tap water (EC = 0.21 dS m-1 and pH = 7.2) to 100% field capacity. Throughout the experiment, all the pots were re-irrigated when the soil water content dropped to 70% of the field capacity.

Results and discussion

Application of biochar and Trichoderma fungus at not using phosphorus (P0), resulted in higher aerial biomass. Trichoderma fungus alone or with P11 level had a better result in increasing plant height. The concentration of chlorophyll a was in highest level by biochar combined Trichoderma, and P0 phosphorus applied, as well as the application of Trichoderma caused the highest concentration of chlorophyll b. The changes in relative leaf water content ranged from 85.5 to 90.5% among the treatment combinations. Phosphorus consumption at the maximum level (P22) showed the same effect in improving leaf protein compared to the P0 level. Moderate phosphorus consumption (P11) combined with biochar and Trichoderma caused the highest soluble sugar content. The highest proline content of leaves was obtained by using Trichoderma without applying biochar and phosphorus. The use of biochar alone or with Trichoderma could improve the amount of phosphorus absorption as much as the use of phosphorus fertilizer alone. Combined application of biochar and Trichoderma fungus with P11 and P22 fertilizer levels increased phosphorus absorption by 41.6% and 22.3% respectively compared to P0 level. Trichoderma fungus had no significant effect on the amount of Pb and Zn absorption in the aerial parts, but biochar significantly reduced their absorption in the aerial parts of Hairy vetch plants.

Conclusion

Based on the results, the application of biochar alone or in combination with Trichoderma fungus improved the vegetative traits and physiological characteristics, including increasing the concentration of photosynthetic pigments, the relative content of leaf water and soluble sugar, the content of protein and proline in the cluster flower vetch. Phosphorus absorption increased significantly when using biochar and Trichoderma. It seems that biochar helps to increase photosynthesis by creating suitable conditions in soil porosity, humidity, increasing cation exchange capacity and reducing the concentration of heavy elements, with better absorption of elements and thus improving plant growth and development. Trichoderma fungus with biological control increases the availability of elements including phosphorus by increasing the transfer of sugar and amino acids and creating induction resistance and stimulating the growth of beneficial microorganisms, and by making changes in the physiological characteristics, it increases the resistance of the plant against the stress of heavy elements.

Keywords: Elements uptake, Hairy vetch, Peanut-hull derived biochar, Shoot biomass, Shoot height, Soil pollution

تنش‌های محیطی در علوم زراعی
Environmental Stresses in Crop Sciences
جلد هفدهم، شماره سوم، پائیز ۱۴۰۳

https://doi.org/10.22077/ESCS.2024.6100.2195

مقاله پژوهشی

کاهش اثرات آلایندگی فلزات سنگین خاک در گیاه ماشک گل خوشه‌ای با کاربرد بیوچار، تریکودرما و مدیریت کود فسفر

الهام جم[۱]، سعید خماری[۲*]، علی عبادی‌خزینه‌قدیم[۲]، اسماعیل گلی‌کلانپا[۳]، اکبر قویدل[۴]

۱. دانشجوی دکتری رشته فیزیولوژی گیاهان زراعی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه محقق اردبیلی
۲. پروفسور رشته فیزیولوژی گیاهان زراعی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه محقق اردبیلی
۳. دانشیار رشته شیمی و حاصلخیزی خاک دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه محقق اردبیلی
۴. دانشیار رشته میکروبیولوژی خاک دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه محقق اردبیلی

مشخصات مقاله

واژه‌های کلیدی:
آلودگی خاک
زیست‌توده
غلظت کلروفیل
پروتئین برگ
جذب عناصر
محتوی قند محلول

تاریخ دریافت:
۱۴۰۱/۱۱/۱۹

تاریخ پذیرش:
۱۴۰۲/۰۳/۱۳

تاریخ انتشار:
پائیز ۱۴۰۳
۱۷(۳): ۵۲۳-۵۴۷

چکیده

آلودگی فلزات سنگین در خاک موضوعی است که در سال‌های اخیر موردتوجه زیادی قرار گرفته و بالأخص در سال‌های اخیر با توسعه اقتصادی شاهد افزایش رهاسازی فلزات سنگین در محیط‌زیست بالأخص زمین‌های زراعی هستیم. این پژوهش به‌منظور بررسی اثرات کاربرد بیوچار، مایه‌کوبی با سوسپانسیون قارچ تریکودرما و مدیریت عنصر فسفر بر برخی صفات مورفوفیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و جذب عناصر در گیاهچه‌های ماشک گل‌خوشه‌ای رشد یافته در خاک‌آلوده به عناصر سنگین سرب و روی اجرا شد. آزمایش با کاربرد دو سطح بیوچار (شاهد و کاربرد بیوچار)، دو سطح مایه‌کوبی تریکودرما (شاهد و مایه‌کوبی با سوسپانسیون قارچ) و سه سطح کود فسفر (عدم مصرف یا شاهد و مصرف ۱۱ و ۲۲ میلی‌گرم فسفر بر کیلوگرم خاک به ترتیب) به‌صورت طرح فاکتوریل کاملاً تصادفی در سه تکرار اجرا شد. در شرایط عدم مصرف کود فسفر (شاهد) کاربرد بیوچار و قارچ تریکودرما زیست‌توده اندام هوایی بالاتری به دست آمد. قارچ تریکودرما به‌تنهایی و یا با مصرف ۱۱ میلی گرم فسفر نتیجه بهتری در افزایش ارتفاع بوته داشت. غلظت کلروفیل a با کاربرد بیوچار توأم با تریکودرما در بالاترین میزان خود بود، همچنین بدون کاربرد فسفر، کاربرد تریکودرما بالاترین غلظت کلروفیل b را موجب شد. تغییرات در محتوی نسبی آب برگ در محدوده ۸۵/۵ تا ۹۰/۵ درصد در بین ترکیبات تیماری متغیر بود. مصرف ۲۲ میلی گرم فسفر اثر یکسان در بهبود پروتئین برگ در مقایسه با عدم مصرف فسفر نشان داد. مصرف فسفر در حد ۱۱ میلی گرم توأم با کاربرد بیوچار و تریکودرما بالاترین محتوی قند محلول را موجب شد. بیشترین محتوی پرولین برگ با کاربرد تریکودرما بدون اعمال بیوچار و فسفر به دست آمد. کاربرد بیوچار به‌تنهایی و یا با تریکودرما نیز توانست میزان جذب فسفر را به‌اندازه مصرف کود فسفر بهبود بخشد. قارچ تریکودرما تأثیر معنی‌دار در میزان جذب سرب و روی اندام هوایی نداشت، اما بیوچار به‌طور معنی داری باعث کاهش جذب آن‌ها در اندام هوایی ماشک گل‌خوشه‌ای شد.

مقدمه

با پیشرفت‌های چشمگیر صنعتی، روزبه‌روز شاهد افزایش رهاسازی عناصر مختلف در محیط‌زیست و زمین‌های زراعی هستیم (Solgi et al., 2012). زباله‌های خانگی، آلاینده‌های صنعتی، آب‌های سطحی حاصل از بارندگی، آفت‌کش‌ها، کودهای شیمیایی، زباله‌های شهری معدنکاری، ذوب فلزات، کاربردهای زمینی لجن فاضلاب و سایر فعالیت‌های انسانی منجر به آلودگی گسترده فلزات در خاک شده است (Medynska-Juraszek et al. 2020). آلودگی فلزات سنگین در خاک به تجمع بیش‌ازحد عناصر موسوم به فلزات سنگین ازجمله سرب و روی در خاک اشاره دارد که قادر به ایجاد سطوح معنی‌داری از سمیت زیستی هستند (Sun et al., 2014; Emamverdian et al., 2015). این فلزات در

* نگارنده پاسخگو: سعید خماری. پست الکترونیک: saeid.khomari@gmail.com

غلظت‌های بالاتر از آستانه قابل‌تحمل، اغلب موجب بروز اختلالات متابولیک و بازدارندگی رشد و نمو و تأثیر بر فعالیت‌های فیزیولوژیکی در بسیاری از گونه‌های گیاهی شده و درنهایت باعث نابودی کامل گیاه می‌شوند (Nik et al., 2012). برای کاهش اثرات منفی و مخرب این عناصر موجود در خاک استفاده از بیوچار (زغال زیستی)، روش تقریباً جدیدی در جهت کاهش سمیت فلزات سنگین محسوب می شود (Arefi, 2015; Hejazi Zadeh et al., 2016; Abdulwahhab and Şeker, 2019). بیوچار محصولی غنی از کربن است که طی تجزیه حرارتی زیست‌توده‌های آلی از قبیل انواع چوب‌ها، کودها، برگ‌ها، کاه و کلش و همچنین پسماندهای کشاورزی در شرایط فشار اکسیژن پایین تحت عنوان آذرکافت (پیرولیز) تولید می‌گردد (Lehmann et al., 2006). بیوچار با داشتن ساختاری متخلل، سطح ویژه بالا و توانایی بالقوه در جذب مواد آلی محلول، گازها و مواد مغذی غیر آلی، زیستگاهی مناسب و ایده‌ال برای رشد و تکثیر ریز جانداران خاکزی مفید در رشد و نمو گیاهان به شمار می‌رود (Lehmann et al., 2011).

توانایی بالای این ماده در ترسیب کربن، بهبود ظرفیت تبادل کاتیونی، چرخه، جذب و نگهداری عناصر غذایی و جلوگیری از آبشویی آن‌ها و همچنین جذب فلزات سمی و سنگین ازجمله سرب و روی منجر اصلاح کمیت و کیفیت خاک و افزایش حاصلخیزی خاک شده و درنهایت رشد و عملکرد را بهبود می‌بخشد (Tammeorg et al., 2017; Kibue et al., 2018; Bielska et al., 2018).

از طرفی گونه‌های قارچی تریکودرما (*Trichoderma* spp.) ازجمله ریزجانداران مفیدی هستند که از طریق برقراری ارتباط با ریشه گیاهان در منطقه ریزوسفر سبب بهبود رشد و نمو گیاه می‌گردند (Sharma et al., 2012). قارچ تریکودرما با کنترل زیستی تنش‌های محیطی ازجمله تنش فلزات سنگین موجب بهبود رشد و عملکرد گیاهان می‌گردد (Arriagada et al., 2009). برابر مطالعات انجام‌یافته مشخص شد که سویه‌های مختلف تریکودرما سبزینگی برگ را بهبود و افزایش محتوای کلروفیل با جذب بیشتر انرژی و ذخایر کربن بالاتر موجب افزایش رشد و نمو در گیاه می‌گردد (Bai et al., 2009).

عنصر فسفر بعد از نیتروژن پرمصرف‌ترین عنصر ضروری برای رشد و نمو گیاهان محسوب می‌شود فسفر در فتوسنتز، توسعه ریشه، تأمین انرژی، تولید قند و تجزیه آن، تولید اسیدهای نوکلئیک، نقل‌وانتقال مواد مغذی در داخل گیاه، انتقال خصوصیات ژنتیکی و تنظیم فرآیندهای سوخت‌وساز دخالت دارد. علاوه بر این‌ها، فسفر موجب افزایش استحکام اندام‌های هوایی، افزایش اندام‌های زایشی و بهبود محصول اقتصادی گیاه می‌شود (Singh et al., 2011; Sharma et al., 2012). طبیعت اراضی زراعی و باغی در اکثر زمین‌های کشاورزی ایران عمدتاً به‌صورت آهکی بوده و این امر موجب شده است که علی‌رغم مصرف مقادیر قابل‌توجه از این نهاده شیمیایی در امر زراعت، عمدتاً کودهای شیمیایی فسفره از کارایی کمتری در این خاک‌ها برخوردار باشند .اگرچه غلظت کل فسفر معمولاً در خاک زیاد است، ولی در مقایسه با سایر عناصر غذایی تحرک و قابلیت جذب کمتری برای گیاه دارد. این عنصر به دلیل تثبیت شدن در سطح ذرات خاک (که می‌تواند ناشی از غلظت بالای فلزات سنگین باشد) به‌صورت غیرقابل‌دسترس برای ریشه گیاهان درمی‌آید (Lavakush et al. 2014; Zhu et al., 2011). در اصلاح خاک‌های آلوده به فلزات سنگین ازجمله سرب، غیرمتحرک نمودن این عنصر به‌وسیله برخی ترکیبات آلی و غیرآلی که اصطلاحاً اصلاح‌کننده نامیده می‌شوند جزو روش‌های متداول محسوب می‌شود. ترکیبات فسفردار ازجمله این اصلاح‌کننده‌ها به شمار می‌روند (Abbaspour et al., 2017). استفاده از منابع فسفات‌دار در تثبیت شیمیایی سرب، تکنیکی است که به‌صورت گسترده در تثبیت سرب از محلول آب‌وخاک‌های آلوده به کار گرفته‌شده و از درجه اعتبار بالایی نیز برخوردار است .کاربرد کودهای حاوی فسفر از طریق تشکیل کانی‌های کم محلول، سرب تبادلی را در خاک کاهش داده و در نتیجه جذب این عناصر سنگین در ریشه و اندام‌های هوایی گیاه کاهش می‌یابد (Amouzgar et al., 2014).

گیاه ماشک گل خوشه‌ای (*Vicia villosa* L.) اغلب به‌منظور اصلاح خاک مورد کشت قرار گرفته و در محدوده وسیعی از انواع خاک‌های با بافت و ساختمان متنوع می‌روید. این گیاه در زراعت به‌صورت مالچ زنده بقولات در تعداد زیادی از کشورها شناخته می‌شود. از ویژگی‌های مثبت این گیاه توانایی تثبیت نیتروژن توسط ریشه‌ها، رشد سریع اندام‌های هوایی آن و پوشش سطح زمین با مهار علف‌های هرز، جلوگیری از فرسایش آبی و بادی خاک، افزایش خلل و فرج خاک در بوم‌نظام‌های پایدار کشاورزی به شمار می‌روند (Hagh Shenas et al., 2016). این آزمایش به‌منظور بررسی امکان کشت و تولید محصول علوفه‌ای دارای توجیه

اقتصادی جهت ترفیع نیاز تغذیه‌ای دام در خاک‌آلوده به فلزات سنگین با مدیریت مطلوب بیوچار، قارچ تریکودرما و سطوح مختلف کود فسفر با بررسی فراسنجه‌های رشدی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی ماشک گل خوشه‌ای رشد یافته در یک نمونه خاک‌آلوده به فلزات سنگین سرب و روی اجرا شد.

مواد و روش‌ها

محل اجرا در گلخانه دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه محقق اردبیلی به‌صورت طرح فاکتوریل کاملاً تصادفی در سه تکرار بود. فاکتورهای آزمایش شامل بیوچار در دو سطح عدم کاربرد و کاربرد، تریکودرما در دو سطح عدم کاربرد و کاربرد و فسفر به فرم سوپرفسفات تریپل و بر اساس P_2O_5 در ۳ سطح شاهد (عدم کاربرد)، مصرف ۱۱ میلی‌گرم فسفر بر کیلوگرم خاک و مصرف ۲۲ میلی‌گرم فسفر در کیلوگرم خاک بود. بیوچار به کار گرفته‌شده در این پژوهش از پودر پوسته میوه بادام‌زمینی در کوره الکتریکی مدل ۱۱۰۰ درجه سانتی‌گراد با دقت دمایی ۱۰± درجه سانتی‌گراد داخل ظروف سفالی درب دار در شرایط عدم وجود اکسیژن دمای ۴۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۵ دقیقه تهیه شد. همچنین سوسپانسیون حاوی اسپورها (حدود یک میلیون اسپور در میلی‌لیتر) و هیف‌های گونه قارچی *Trichoderma harzianum* در این تحقیق استفاده شد. بذر ماشک گل خوشه‌ای (توده محلی اردبیل) تهیه گردید. از خاک مزارع گندم اطراف معدن سرب و روی انگوران (مجتمع فرآوری سرب و روی کالسیمین) واقع در شهرستان دندی، استان زنجان نمونه‌برداری انجام گرفت (جدول ۱). بعد از مشاهده نتایج تجاوز مقادیر سرب و روی از حد مجاز آلودگی (به ترتیب ۷۵ و ۳۶۰ پی پی ام) و حصول اطمینان از آلودگی (جدول ۲)، خاک نمونه‌برداری شده به‌عنوان محیط رشد گیاهچه‌های ماشک گل خوشه‌ای انتخاب شد.

جدول ۱. برخی خصوصیات فیزیکو شیمیایی خاک **Table 1. Some Physicochemical properties of soil**

pH اسیدیته	EC هدایت الکتریکی	Texture بافت	Sand شن	Clay رس	Silt سیلت	P Olsen فسفر اولسن	K ext. پتاسیم
	dS m^{-1}		2-0.05	<0.002	0.05-0.002	mg kg^{-1}	
			----------%----------			-------	-------
8.12	1.13	Clay loam لوم رسی	32	39	29	15.8	375

OC کربن آلی	OM مواد آلی	CEC ظرفیت تبادل کاتیونی	N total نیتروژن کل
%	%	meq 100 g^{-1} soil	%
0.68	1.74	19.5	0.09

جدول ۲. میزان فلزات سنگین قابل‌جذب موجود در خاک انتخاب‌شده

Table 2. The amount of DTPA-extractable heavy metals in the selected soil

Element عناصر	Co کبالت	Cd کادمیوم	Cu مس	Mn منگنز	Zn روی	Ni نیکل	F آهن	Pb سرب
میزان Amounts (mg kg^{-1})	0.34	0.84	3.82	4.32	64.0	1.7	2.9	12.4

جهت اختلاط بیوچار با خاک، مقدار ۲ کیلوگرم خاک برای تمامی گلدان‌ها در نظر گرفته شد. سپس ۲۰۰ گرم بیوچار برای هر گلدان طبق فرمول زیر استفاده شد.

$$W=(P/100) \times 2000 \quad [۱]$$

W: وزن موردنیاز بیوچار در هر گلدان (گرم)، P: درصد بیوچار

تعداد ۲۰ عدد بذر ماشک گل خوشه‌ای در هر گلدان با عمق ۲ سانتی‌متر کشت شد. دو هفته بعد از کشت (مرحله دوبرگی اقدام به تنک کردن گیاهچه‌ها شد و ۱۴ عدد گیاهچه نهایی برای اندازه‌گیری صفات در هر گلدان باقی ماند. برای کنترل شرایط گلخانه از قبیل دما، عناصر غذایی، آبیاری و تنظیم محیطی نور به‌طور روزانه در طول دوره‌ی رشد گیاهچه

دمای حداقل و حداکثر گلخانه ثبت گردید. طی دو مرحله (۱ و ۲ هفته بعد از کاشت) کود اوره محلول به مقدار ۵ میلی‌لیتر (طبق بررسی عناصر غذایی خاک و نیاز گیاه) به همراه آب آبیاری به گلدان‌ها اضافه و سوسپانسیون تریکودرما با غلظت یک میلیون اسپور در هر میلی‌لیتر هم در دو مرحله موقع کاشت و یک هفته پس از کاشت به مقدار ۵۰ سی‌سی برای هر گلدان تحت تیمار اعمال گردید. برای آبیاری، از توزین گلدان‌ها و محاسبه ظرفیت زراعی خاک استفاده گردید و در طول دوره رشد گیاهچه‌ها در هر مرحله تا افت به سطح ۶۰٪ ظرفیت زراعی، آبیاری صورت گرفت. صفات مورفولوژیکی و بیولوژیکی موردبررسی در آزمایش عبارت بودند از:

سرعت سبز شدن که طبق فرمول رابرتز و الیس برآورد شد .تعداد برگچه، ارتفاع بوته و طول ریشه با انتخاب سه بوته از هر گلدان و میانگین‌گیری ثبت شد. برای اندازه‌گیری زیست‌توده ساقه، نمونه‌ها در آون ۸۰ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شدند و سپس با ترازوی حساس توزین گردید. اندازه‌گیری محتوای نسبی آب برگ با روش ریچی و همکاران (Ritchie et al., 1990) از روی اختلاف وزن اشباع، وزن تر و وزن خشک برگچه‌ها و غلظت کلروفیل‌های a و b به روش آرنون (Arnon, 1967) با استفاده از رو شناور استونی و سانتریفوژ و قرائت با اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. به‌منظور سنجش پروتئین محلول کل روش برادفورد (Bradford, 1976) با استفاده از رو شناور فسفات پتاسیمی و معرف برادفورد و قرائت با اسپکتروفتومتر و برای اندازه‌گیری قند محلول روش آنترون (معرف آنترون-اسید سولفوریک) با جوشاندن پودر گیاهی در اسید داخل حمام آبی و قرائت با اسپکتروفتومتر بکار رفت. پرولین نمونه‌های برگی نیز با استفاده از معرف نین هیدرین به روش بیتز و همکاران (Bates et al., 1973) اندازه‌گیری شد. به‌منظور اندازه‌گیری عناصر در اندام هوایی، پس از تهیه مقدار موردنیاز ماده خشک گیاهی اندام هوایی در آون ۷۰ درجه به مدت ۲۴ ساعت و تهیه عصاره لازم، سنجش مقادیر عنصر فسفر در آزمایشگاه خاکشناسی از طریق تهیه عصاره گیاهی و استفاده از معرف کمپلکس زرد و قرائت با اسپکتروفتومتر و مقادیر سرب و روی در اندام هوایی توسط دستگاه جذب اتمی در آزمایشگاه مرکزی دانشگاه زنجان اندازه‌گیری و ثبت گردید.

تجزیه واریانس داده‌های آماری پس از آزمون مفروضات تجزیه واریانس (نرمال بودن داده‌ها و یکنواختی واریانس خطاهای آزمایشی) با نرم‌افزار STATISTICA 13 انجام‌گرفته و مقایسات میانگین توسط آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال پنج درصد انجام یافت. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده گردید.

نتایج و بحث

سرعت سبز شدن گیاهچه

اثر اصلی بیوچار و تریکودرما در سطح احتمال یک درصد، اثر اصلی فسفر مکمل و اثرات متقابل بیوچار × فسفر و بیوچار × تریکودرما × فسفر در سطح احتمال پنج درصد بر سرعت سبز شدن گیاهچه ماشک علوفه‌ای معنی‌دار گردید (جدول ۳). مقایسات میانگین برهمکنش سه‌جانبه نشان داد که بالاترین سرعت سبز شدن گیاهچه (۰/۱۸۲ گیاه در روز) از تیمار ترکیبی کاربرد بیوچار و قارچ تریکودرما با مصرف 11 میلی گرم کود فسفر به دست آمد. کمترین میزان این صفت (۰/۱۳۸ گیاه در روز) نیز در شرایط عدم اعمال فاکتورها (شاهد) ثبت شد (جدول ۴). اختلاف بین این دو ترکیب تیماری برابر ۲۴/۲ درصد بود. مشخص شد با کاربرد بیوچار به‌تنهایی یا توأم با قارچ تریکودرما و فسفر افزایش معنی‌داری در سرعت سبز شدن گیاهچه ماشک گل‌خوشه‌ای در خاک‌آلوده به فلزات سنگین روی و سرب به وجود آمد. اگرچه عرب بافرانی و همکاران (Arab Baferani et al., 2020) بیان داشتند که بیوچار تأثیر معنی‌داری بر جوانه‌زنی و سبز شدن گیاهچه در گیاه گلرنگ نداشته اما مطالعه یوسفی و همکاران (Yousefi et al., 2019) نشان داده استفاده از زغال زیستی (بیوچار)، قارچ تریکودرما و سطوح کودی (NPK) بر درصد رشد گیاهچه عادی و سرعت جوانه‌زنی در ذرت اثر مثبت و معنی‌دار داشته است. رضالو و همکاران (Rezalou et al., 2020) نیز گزارش کردند که تیماردهی بذر با قارچ تریکودرما باعث بهبود مؤلفه‌های رشدی گیاه به‌ویژه در مراحل استقرار و رشد اولیه آن می‌شود. بهبود درصد جوانه‌زنی و ظهور گیاهچه می‌تواند به دلیل تأثیر قارچ تریکودرما در افزایش تولید برخی از هورمون‌ها به‌ویژه جیبرلین و همچنین تولید و رهاسازی برخی از آنزیم‌های خارج سلولی به‌ویژه آمیلاز باشد (Kaymak et al., 2009). به نظر می‌رسد در شرایط مصرف بیوچار و قارچ تریکودرما به توجه به اثرات آن‌ها در تبادل کاتیونی عناصر و جذب مواد آلی به لحاظ بهبود وضعیت جذب عناصر در خاک نیاز به مصرف کود فسفر در مقادیر بالاتر نیست، از طرفی با تأثیر این

مواد در تقلیل اثرات مخرب عناصر سنگین، امکان بهبود سرعت سبز شدن گیاهچه فراهم می‌شود.

تعداد برگچه در گیاهچه

اثرات اصلی بیوچار، قارچ تریکودرما و کود فسفر هر سه در سطح احتمال یک درصد تأثیر معنی‌دار روی این صفت داشتند. در بین اثرات متقابل عوامل آزمایش نیز، برهمکنش دوجانبه بیوچار × فسفر و سه‌جانبه بیوچار × تریکودرما × فسفر در سطح احتمال یک درصد تأثیر معنی‌دار بر تعداد برگچه در بوته نشان دادند (جدول ۳).

مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بیشترین تعداد برگچه بدون اختلاف آماری معنی‌دار متعلق به ترکیبات تیماری کاربرد بیوچار در شرایط عدم مصرف کود فسفر و عدم اعمال قارچ تریکودرما و تیمار مایه‌کوبی تریکودرما توأم با مصرف ۱۱ میلی گرم فسفر از فسفر بدون کاربرد بیوچار بود (به ترتیب با ۴۷/۴ و ۴۸ برگچه در بوته) (جدول ۴). کاربرد بیوچار به‌تنهایی باعث افزایش ۲۵/۸ درصدی این صفت در مقایسه با تیمار شاهد شد. کاربرد بیوچار و قارچ تریکودرما به‌صورت توأم تفاوت معنی‌داری تأثیر معنی‌دار روی تعداد برگچه در بین سطوح کود فسفر نشان ندادند. افزایش تعداد برگ در گونه‌های گیاهی مختلف با کاربرد بیوچار با اثرگذاری متفاوت توسط محققین گزارش شده است (Carter et al., 2013) در این آزمایش قارچ تریکودرما تأثیر معنی‌دار بر تعداد برگچه نداشت، اما بیوچار و یا مصرف کود فسفر تأثیر معنی‌دار روی این صفت نشان دادند که این امر می‌تواند ناشی از اثرات بیوچار بر وضعیت جذب عناصر و توسعه رشد ریشه ناشی از کاربرد فسفر بالأخص در اوایل رشد گیاه و زمان رویشی آن باشد.

ارتفاع بوته

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها حاکی از تأثیر معنی‌دار بیوچار، قارچ تریکودرما و کود فسفر در سطح احتمال یک درصد بر صفت ارتفاع بوته ماشک گل‌خوشه‌ای بود. برهمکنش بیوچار × تریکودرما و تریکودرما × فسفر نیز هر دو در سطح احتمال یک درصد تأثیر معنی‌دار بر این صفت داشتند (جدول ۳).

جدول ۳. تجزیه واریانس صفات مورفولوژیکی ماشک گل خوشه‌ای رشد یافته در خاک‌آلوده به فلزات سنگین با کاربرد بیوچار، تریکودرما و فسفر

Table 3. Analysis of morphological charastericticts of vicia villosa in contaminated soil with heavy metals and application of biochar, Trichoderma and phosphorus

منابع تغییر S.O.V	درجه آزادی d.f	سرعت سبز شدن گیاهچه Seedling emergence rate	تعداد برگچه number of leaflets	ارتفاع بوته shoot height	طول ریشه Root length	زیست‌توده اندام هوایی Shoot Biomass
تکرار Replication(R)	2	0.0001 *	19.47	0.93	19.41 *	0.008*
بیوچار Biochar (B)	1	0.003 **	103.37 **	17.92 **	4.19	0.156**
تریکودرما *Trichoderma* (T)	1	0.001 **	59.29 **	16.54 **	1.07	0.055**
فسفر Phosphorus (P)	2	0.0002 *	59.74 **	10.11 **	44.5 **	0.089**
بیوچار×تریکودرما B × T	1	0.00007	3.04	8.87 **	115.8**	0.018**
بیوچار×فسفر B × P	2	0.0001 *	74.68 **	0.52	12.11 *	0.003
تریکودرما×فسفر T × P	2	0.00009	0.18	12.99 **	1.84	0.008
بیوچار×تریکودرما×فسفر B×T×P	2	0.0002 *	74.00 **	1.79	2.87	0.024**
خطا Error	22	0.0004	6.95	0.83	2.94	0.002

بدون علامت، **و *به ترتیب نشانگر عدم معنی‌داری و معنی‌دار بودن در سطح آماری ۱ و ۵٪

Unsigned, ** and * indicate insignificance and significance at the statistical level of 1 and 5%, respectively

جدول ۴. مقایسه میانگین اثرات سه‌جانبه بیوچار × تریکودرما × فسفر بر روی صفات مورفوفیزیولوژیکی در ماشک گل خوشه‌ای رشد یا فته در خاک‌آلوده به فلزات سنگین

Table4. mean compoarison of Biochar × Trichoderma × phosphorus interaction effects on morphophysiological traits of *vicia villosa* grown in contaminated soil with heavy metal

Treatments فاکتورهای آزمایش					زیست‌توده
بیوچار Biochar	تریکودرما Trichoderma	فسفر Phosphorus	سرعت سبز شدن Seedling emergence rate	تعداد برگچه Leaflet number	اندام هوایی shoot biomass
			day^{-1}		gr
B_0	T_0	P_0	0.138±0.002 ^{i}	35.555 ±0.39 ^{d}	0.847 ± 0.002 ^{d}
		P_{11}	0.143±0.003 ^{hi}	45.500 ±0.50 ^{ab}	0.983± 0.004 ^{cd}
		P_{22}	0.147±0.002 ^{hi}	38.111 ±1.02 ^{d}	0.900± 0.003 ^{d}
	T_1	P_0	0.150±0.002 ^{hi}	44.500 ±3.80 ^{abc}	0.920 ± 0.002 ^{d}
		P_{11}	0.152±±0.002 ^{ghi}	47.111 ±2.009 ^{a}	1.170± 0.002 ^{bcd}
		P_{22}	0.152±0.004 ^{ghi}	37.000 ±0.67 ^{d}	1.010± 0.005 ^{cd}
B_1	T_0	P_0	0.161±0.004 $^{c-f}$	48.000 ±0.00 ^{a}	0.930± 0.004 ^{abc}
		P_{11}	0.159±0.002 ^{fgh}	42.178 ±0.50 ^{bc}	1.193± 0.001 ^{a}
		P_{22}	0.156±0.00 $^{f-i}$	40.900 ±0.00 ^{c}	1.137± 0.00 ^{ab}
	T_1	P_0	0.167±0.003 ^{bc}	44.678 ±0.67 ^{abc}	1.117± 0.003^{bcd}
		P_{11}	0.182±0.002 ^{a}	45.689 ±0.02 ^{ab}	1.157± 0.002 ^{a}
		P_{22}	0.170±0.00 ^{b}	46.667 ±0.65 ^{a}	1.087± 0.00 ^{ab}

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک در هر ستون با استفاده از آزمون،LSD فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال 5% می‌باشند. بعد از علامت ±خطای استاندارد قرار دارد.

B_0 :عدم کاربرد بیوچار(شاهد)، B_1 :کاربرد بیوچار ۱۰٪ وزنی خاک، T_0: عدم کاربرد تریکودرما (شاهد)، T_1: کاربرد تریکودرما؛ P_0 : عدم کاربرد فسفر (شاهد)، P_{11} : کاربرد ۱۱ میلی گرم فسفر بر کیلوگرم خاک، P_{22} : کاربرد 22 میلی گرم فسفر بر کیلوگرم خاک

Means with at least one common letter in each column using LSD test have no significant difference at the 5% probability level. After the sign ± is the standard error.

B_0 = non-use of biochar (control), B_1= use of biochar (10% of soil weight) T_0 = non-use of Trichoderma (control), T_1= use of trichoderma, P_0 = non-use of phosphorous (control), P_{11} = use of phosphorous (11mg.kg^{-1} soil), P_{22} = use of phosphorous (22 mg.kg^{-1} soil)

مقایسه میانگین بیوچار × تریکودرما نشان داد که بالاترین ارتفاع بوته متعلق به ترکیب تیماری کاربرد بیوچار و قارچ تریکودرما به‌صورت توأم بود (۳۷/۶ سانتی‌متر). همچنین با کاربرد قارچ تریکودرما و مصرف میزان ۱۱ میلی‌گرم فسفر در کیلوگرم خاک، ارتفاع بوته افزایش معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد نشان داد، به‌طوری‌که اختلاف این دو ترکیب تیماری برابر ۱۰/۲ درصد بود (جدول ۵).

کاربرد توأم بیوچار و قارچ تریکودرما نیز منجر به افزایش ۷/۳ درصدی ارتفاع بوته ماشک گل‌خوشه‌ای در مقایسه با تیمار شاهد شد. کاربرد قارچ تریکودرما به‌تنهایی و بالأخص توأم با مصرف ۱۱ میلی گرم فسفر نتایج بهتری در افزایش ارتفاع بوته گیاهچه ماشک گل خوشه‌ای رشد یافته در خاک‌آلوده به عناصر سرب و روی نشان داد. مطالعات نشان داده است عناصر سنگین ازجمله سرب با کاهش تقسیم سلولی، موجب کاهش رشد طولی در بوته می‌شود (Hussain et al., 2107). بااین‌حال محققین گزارش دادند که بهبود ارتفاع بوته با مصرف بیوچار ممکن است به دلیل کاهش جذب عناصر سنگین در ریشه و شاخساره هنگام حضور بیوچار در خاک باشد (Danish et al., 2019). فیضی و همکاران (Feizi et al., 2021) اظهار داشتند که استفاده از بیوچار در شرایط تنش سرب موجب بهبود ارتفاع بوته و قطر ساقه گردید. سبحانی و همکاران (Sobhani et al., 2021) گزارش کردند که کاربرد بیوچار و قارچ میکوریزا به‌صورت تنهایی و توأم باهم منجر به بهبود صفات رویشی در گیاه گندم شد. دلایل این امر به اثرات بلندمدت بیوچار بر بهبود ویژگی‌های خاک، کاهش تبخیر آب و نگهداری رطوبت در محیط ریشه و افزایش رشد ریشه‌های مویی عنوان شد که در نتیجه آن امکان دسترسی گیاه به عناصر غذایی بهبود می‌یابد (Sobhani et al., 2021). از طرفی بهبود رشد و نمو اندام هوایی ازجمله ارتفاع بوته در نتیجه مایه‌کوبی قارچ تریکودرما به‌واسطه همزیستی با ریشه گیاه در منطقه ریزوسفر، اثر بر وضعیت جذب عناصر و بهبود سبزینگی برگ با افزایش فتوسنتز می‌تواند توأم با کاربرد بیوچار منجر به افزایش رشد رویشی گیاه شود.

جدول ۵. مقایسه میانگین اثرات دوجانبه تریکودرما × بیوچار بر ارتفاع بوته در ماشک گل خوشه‌ای رشد یافته در خاک‌آلوده به فلزات سنگین

Table 5. mean comparison of Trichoderma × Phosphorus interaction effectss on plant height of vicia villosa in contaminated soil with heavy metals

فاکتورهای آزمایش Treatments		ارتفاع بوته shoot height (cm)
بیوچار Biochar	تریکودرما Trichoderma	
B_0	T_0	34.86 ± 0.35 [b]
B_1		35.27 ± 0.39 [b]
B_0	T_1	35.22 ± 0.52 [b]
B_1		37.62 ± 0.67 [a]

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک در هر ستون با استفاده از آزمون،LSD فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال 5% می‌باشند.
بعد از علامت ± خطای استاندارد قرار دارد.
B_0: عدم کاربرد بیوچار (شاهد)، B_1 :کاربرد بیوچار ۱۰٪ وزنی خاک، T_0: عدم کاربرد تریکودرما (شاهد)، T_1: کاربرد تریکودرما

Means with at least one common letter in each column using LSD test have no significant difference at the 5% probability level. After the sign ± is the standard error
B_0 = non-use of biochar (control), B_1= use of biochar (10% of soil weight) T_0 = non-use of Trichoderma (control), T_1= use of trichoderma

طول ریشه اصلی

کود فسفر در سطح احتمال یک درصد بر طول ریشه ماشک گل خوشه‌ای اثر معنی‌دار داشت. در بین اثرات متقابل فاکتورها نیز، برهمکنش بیوچار × تریکودرما در سطح احتمال یک درصد و اثرمتقابل بیوچار × فسفر در سطح احتمال یک درصد تأثیر معنی‌دار بر طول ریشه در گیاهچه ماشک گل‌خوشه‌ای نشان داد (جدول ۳).

مقایسه میانگین برهمکنش دوجانبه بیوچار × تریکودرما نشان داد که بالاترین طول ریشه متعلق به ترکیب تیماری کاربرد بیوچار و عدم کاربرد قارچ تریکودرما بود (۲۶/۹ سانتی متر)، درحالی‌که کمترین میزان این صفت (۲۲/۷ سانتی‌متر) از عدم کاربرد بیوچار و تریکودرما (تیمار شاهد) به دست آمد. مقایسه میانگین اثرات متقابل بیوچار و کود فسفر نیز نشان داد که با مصرف ۱۱ میلی گرم کود فسفر چه در شرایط کاربرد و چه عدم کاربرد بیوچار، ارتفاع گیاهچه ماشک گل‌خوشه‌ای (به ترتیب با ۲۶/۶ و ۲۶/۴ سانتی‌متر) به‌طور معنی‌داری در مقایسه با سایر ترکیبات تیمار و بالأخص تیمار شاهد (عدم کاربرد بیوچار و فسفر با طول ریشه ۲۱/۲ سانتی‌متر) افزایش یافت، به‌طوری‌که اختلاف بین ترکیب تیماری برتر با تیمار شاهد برابر ۲۰/۴ درصد بود (جدول ۶).

ازآنجایی‌که ریشه اولین اندامی است که در معرض تنش عناصر سنگین ازجمله سرب و روی قرار می‌گیرد، غلظت زیاد این عناصر در خاک سبب می‌شود ریشه‌ها کوتاه، ضعیف و کم‌حجم شوند (Teymouri et al., 2021). کاهش رشد و تقسیم سلولی اندام ساقه و ریشه ازجمله اثرات سوء عناصر سنگین ازجمله سرب است (Hussain et al., 2107). در مطالعه فیضی و همکاران (Feizi et al., 2021) استفاده از بیوچار با کاهش قابلیت و مقدار جذب عناصر سنگین موجب افزایش رشد ریشه و حجم آن شد. وجود فیزیکی توده‌های میسیلیومی از تریکودرما در ریزوسفر به‌نوبه خود به‌صورت ضمیمه‌ای برای ریزوسفر نرمال از گیاهان به خدمت گرفته می‌شود یا منجر به توسعه روابط قارچ - گیاه مشابه تشریح یافته برای قارچ مایکوریزا می‌گردد.

جدول ۶. مقایسه میانگین اثرات دوجانبه بیوچار × فسفر بر طول ریشه در ماشک گل خوشه‌ای رشد یافته در خاک‌آلوده به فلزات سنگین

Table 6. mean comparison of Biochar × Phosphorus interaction effects on root length of vicia villosa grown in contaminated soil with heavy metal

فاکتورهای آزمایش Treatments		طول ریشه Root length (cm)
بیوچار Biochar	فسفر Phosphorus	
B_0	P_0	33.99 ± 0.14 [d]
	P_{11}	35.69 ± 0.09 [c]
	P_{22}	35.5 ± 0.11 [c]
B_1	P_0	36.91 ± 0.17 [ab]
	P_{11}	37.84 ± 0.07 [a]
	P_{22}	34.50 ± 0.17 [d]

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک در هر ستون با استفاده از آزمون،LSD فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال 5% می‌باشند.
بعد از علامت ±خطای استاندارد قرار دارد.
B_0 :عدم کاربرد بیوچار (شاهد)، B_1 :کاربرد بیوچار ۱۰٪ وزنی خاک؛ P_0 : عدم کاربرد فسفر(شاهد)، P_{11} : کاربرد ۱۱ میلی گرم فسفر بر کیلوگرم خاک، P_{22} : کاربرد 22 میلی گرم فسفر بر کیلوگرم خاک

Means with at least one common letter in each column using LSD test have no significant difference at the 5% probability level. After the sign ± is the standard error.
B_0 = non-use of biochar (control), B_1= use of biochar (10% of soil weight) P_0 = non-use of phosphorous (control), P_{11} = use of phosphorous (11mg.kg^{-1} soil), P_{22} = use of phosphorous (22 mg.kg^{-1} soil)

زیست‌توده اندام هوایی

اثرات اصلی عوامل آزمایش (بیوچار، قارچ تریکودرما و کود فسفر) هر سه در سطح احتمال یک درصد روی صفت زیست‌توده اندام هوایی معنی‌دار بود (جدول ۳). در بین اثرات

متقابل فاکتورها نیز برهمکنش بیوچار × تریکودرما در سطح احتمال یک درصد تأثیر معنی‌دار روی این صفت داشت. این صفت در سطح احتمال یک درصد تحت تأثیر برهمکنش سه‌جانبه عوامل آزمایشی قرار گرفت (جدول ۳). بیشترین زیست‌توده اندام هوایی (۱/۱۹ گرم در گلدان) با مصرف ۱۱ میلی گرم کود فسفر توأم با کاربرد بیوچار به دست آمد، هرچند کاربرد قارچ تریکودرما در همین سطح از فسفر نیز نتایج مشابه نشان داد. در این آزمایش مقادیر زیست‌توده ساقه بین ۰/۸ تا ۱/۲ گرم در گلدان بود و ترکیب تیماری کاربرد بیوچار × عدم کاربرد تریکودرما × مصرف ۱۱ میلی گرم کود فسفر ، در مقایسه با شاهد توانست ۲۸/۶ درصد مقدار این صفت را افزایش دهد. کاربرد بیوچار و قارچ تریکودرما توأماً در شرایط عدم مصرف فسفر (شاهد) نیز زیست‌توده بالاتری را موجب شدند و مصرف کود فسفر به‌تنهایی تأثیر چندانی نسبت به شاهد روی این صفت نداشت (جدول ۴). افزایش زیست‌توده اندام هوایی با کاربرد بیوچار در مقایسه در گیاهان مختلف توسط محققین گزارش شده است (Tanure et al., 2019; Rahimi et al., 2018). بیوچار از طریق بهبود خصوصیات فیزیکی خاک من‌جمله تخلخل، تهویه و رطوبت خاک و همچنین بهبود نسبی ظرفیت تبادل کاتیونی، ضمن کاهش غلظت عناصر سنگین موجب بهبود صفات رویشی در گیاه گردیده است (Biriya et al., 2017). قارچ تریکودرما از طریق برقراری ارتباط با ریشه گیاهان در منطقه ریزوسفر در نقش افزاینده رشد گیاه موجب بهبود رشد و نمو و افزایش زیست‌توده در گیاه می‌شوند (Sharma et al., 2012). این ریزجانداران با استقرار در ریشه گیاهان و تولید اسیدهای آمینه، ویتامین‌ها و مواد افزاینده رشد سبب افزایش رشد و عملکرد محصولات زراعی می‌شوند (Lavakush et al., 2014).

محتوای نسبی آب برگ (RWC)

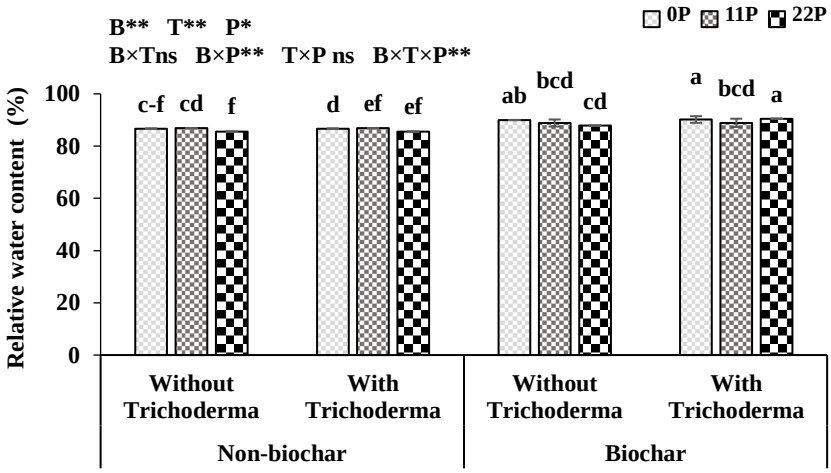
اثرات اصلی بیوچار، قارچ تریکودرما و کود فسفر هر سه در سطح احتمال یک درصد تأثیر معنی‌دار بر محتوی نسبی آب برگ داشتند. در بین اثرات دوجانبه برهمکنش قارچ تریکودرما × فسفر در سطح احتمال پنج درصد تأثیر معنی‌دار روی این صفت گذاشت. اثرات متقابل سه‌جانبه عوامل آزمایشی نیز تأثیر معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد روی محتوی نسبی آب برگ نشان داد (جدول ۷).

نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بالاترین محتوی نسبی آب برگ (۹۰/۵ درصد) با کاربرد توأم بیوچار و قارچ تریکودرما و مصرف بالاترین سطح از کود فسفر (۲۲ میلی گرم بر کیلوگرم خاک) به دست آمد. کاربرد بیوچار به‌تنهایی و یا توأم با اعمال قارچ تریکودرما نیز محتوی نسبی آب برگ بالاتری در مقایسه با سایر ترکیبات تیماری نشان دادند. (شکل ۱).

در این آزمایش اعمال ترکیبات مختلف تیماری منجر به ایجاد تغییرات معنی‌دار در محتوی نسبی آب برگ در گیاهچه‌های ماشک گل خوشه‌ای رشد یافته در خاک‌آلوده به فلزات سنگین شد، بااین‌حال میزان این صفت در محدوده ۸۵/۵ تا ۹۰/۵ درصد متغیر بود. کاهش محتوی نسبی آب برگ به‌طور آشکارا اولین علامت تنش محدودیت آب در گیاهان است. فلزات سنگین ازجمله سرب سبب اختلال و کاهش در جذب آب در گیاه می‌شود (Islam et al., 2008) این افزایش در ظرفیت نگهداری آب در خاک به علت داشتن ساختار متخلخل آن و قابلیت جذب بالای آب توسط بیوچار عنوان شده است (Artiola et al., 2012; Basso et al., 2013). در این آزمایش مشخص شد که بیوچار با ایجاد ساختار متخلل در خاک و بهبود وضعیت آب – خاک و عنصر فسفر از طریق افزایش و توسعه رشد ریشه و امکان جذب آب در منطقه وسیعی از ریزوسفر بالأخص در شرایط مایه‌کوبی می‌تواند ضمن افزایش جذب آب، محتوی نسبی آب برگ را نیز بهبود بخشد.

میزان کلروفیل a

میزان کلروفیل a به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر عوامل آزمایش قرار گرفت، چنانچه اثرات اصلی بیوچار، قارچ تریکودرما و کود فسفر هر سه در سطح احتمال یک درصد تأثیر معنی‌دار روی این صفت داشتند. در بین اثرات متقابل عوامل آزمایش نیز، برهمکنش دوجانبه بیوچار×فسفر و تریکودرما×فسفر و نیز برهمکنش سه‌جانبه بیوچار× تریکودرما × فسفر در سطح یک درصد تأثیر معنی‌دار بر محتوی کلروفیل a گیاهچه‌های ماشک گل خوشه‌ای نشان دادند (جدول ۷).



شکل ۱. مقایسه میانگین اثرات متقابل بیوچار × قارچ تریکودرما × فسفر بر محتوی نسبی آب برگ گیاهچه ماشک گل خوشه‌ای رشد یافته در خاک‌آلوده به فلزات سنگین. ns، ** و * به ترتیب نشانگر عدم معنی‌داری و معنی‌دار بودن در سطح آماری ۱ و ۵٪. میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک در هر نمودار با استفاده از آزمون،LSD فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال 5% می‌باشند. B: بیوچار، T: تریکودرما، P: فسفر؛ P_0: عدم کاربرد فسفر(شاهد)، P_{11}: کاربرد ۱۱ میلی گرم فسفر بر کیلوگرم خاک، P_{22}: کاربرد ۲۲ میلی گرم فسفر بر کیلوگرم خاک.

Fig. 1. mean comparison of biochar × Trichoderma fungus × phosphorus interaction effects on the relative water content of the leaves of vicia villosa seedling in the contaminated soil with heavy metals. Means with at least one common letter in each chart using LSD test have no significant difference at the 5% probability level. ns, ** and * indicate insignificance and significance at the statistical level of 1 and 5%, respectively. B= Biochar, T= Trichoderma, P= Phosphorous; P_0 = non-use of phosphorous (control), P_{11} = use of phosphorous (11mg.kg^{-1} soil), P_{22} = use of phosphorous (22 mg.kg^{-1} soil)

جدول ۷. تجزیه واریانس صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی ماشک گل خوشه‌ای رشد یافته در خاک‌آلوده به فلزات سنگین با کاربرد بیوچار، تریکودرما و فسفر

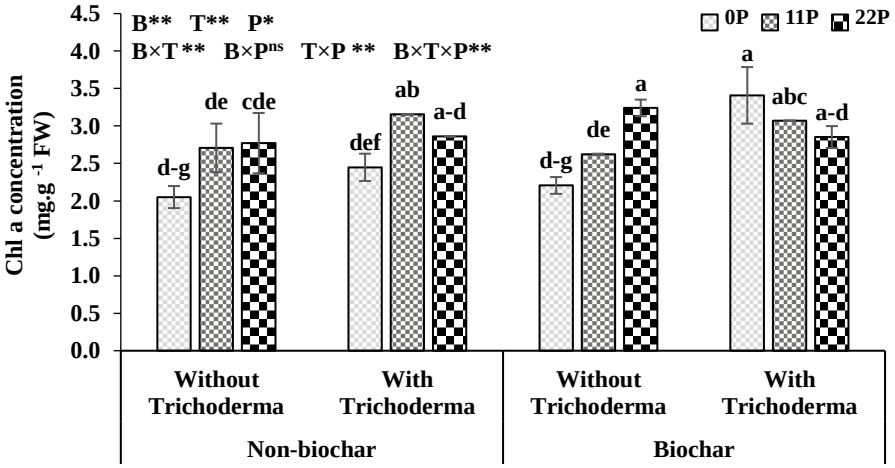
Table 7. Analysis of variance of physiological & biochemical characteristics of *Vicia villosa* L in contaminated soil with heavy metals and application of biochar, *Trichoderma* and phosphorus

منابع تغییر S.O.V	درجه آزادی d.f.	محتوای نسبی آب برگ RWC	غلظت کلروفیل a Chl a con.	غلظت کلروفیل b Chl b con.	پروتئین برگ Leaf protein	قند محلول برگ LSC	پرولین برگ Leaf proline content
تکرار Replication(R)	2	0.2	0.011	0.002	12.62	250.9**	1287
بیوچار Biochar (B)	1	70.1 **	0.495*	3.602**	79.8 **	972.8*	63415**
تریکودرما *Trichoderma* (T)	1	4.6 **	1.207**	0.704**	64.53 **	725.2**	8244*
فسفر Phosphorus (P)	2	7.5 **	0.587**	0.002	21.59 *	3956.2**	6803*
بیوچار×تریکودرما B × T	1	0.6	0.027	0.120	31.92*	767.8**	10185**
بیوچار×فسفر B × P	2	1.2	0.310**	0.291**	1.05	2043.2**	5420*
تریکودرما×فسفر T × P	2	2.7 *	0.691**	5.371**	19.76*	1803.2**	3423
بیوچار×تریکودرما×فسفر B×T×P	2	3.5 **	0.315**	0.042	1.35	8446.9**	4972*
خطا Error	22	0.5	0.046	0.033	5.11	47.2	1221

بدون علامت، **و * به ترتیب نشانگر عدم معنی‌داری و معنی‌دار بودن در سطح آماری ۱ و ۵٪

Unsigned, ** and * indicate insignificance and significance at the statistical level of 1 and 5%, respectively.

مقایسه میانگین‌های برهمکنش سه‌جانبه عوامل آزمایش نشان داد که بالاترین محتوی کلروفیل a در شرایط کاربرد بیوچار و قارچ تریکودرما بدون مصرف کود فسفر به دست آمد (۳/۴۱ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) و به دنبال تیمار برتر، ترکیبات تیماری کاربرد بیوچار و مصرف بالاترین سطح کود فسفر (۲۲ میلی گرم بر کیلوگرم) بدون اعمال تریکودرما و مصرف ۱۱ میلی گرم فسفر با کاربرد تریکودرما و بدون مصرف بیوچار قرار داشتند (به ترتیب با ۳/۲۴ میلی‌گرم بر گرم وزن تر و ۳/۱۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) (شکل ۲). عدم کاربرد بیوچار و قارچ تریکودرما در شرایط عدم مصرف کود فسفر (تیمار شاهد) نیز کمترین میزان کلروفیل a را در گیاهچه ماشک گل خوشه‌ای (۲/۰۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) را نشان داد (شکل ۲).



شکل ۲. مقایسه میانگین بیوچار × قارچ تریکودرما × فسفر بر غلظت کلروفیل a گیاهچه ماشک گل خوشه‌ای در خاک‌آلوده به فلزات سنگین. ns، ** و * به ترتیب نشانگر عدم معنی‌داری و معنی‌دار بودن در سطح آماری ۱ و ۵٪. میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک در هر نمودار با استفاده از آزمون LSD فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال 5% می‌باشند. B: بیوچار، T: تریکودرما، P: فسفر؛ P_0: عدم کاربرد فسفر(شاهد)، P_{11}: کاربرد ۱۱ میلی گرم فسفر بر کیلوگرم خاک، P_{22}: کاربرد 22 میلی گرم فسفر بر کیلوگرم خاک.

Fig. 2. mean comparison of biochar × Trichoderma fungus × phosphorus interaction effects on the chl. a concentration of the leaves of *vicia villosa* seedling in the contaminated soil with heavy metals. Means with at least one common letter in each chart using LSD test have no significant difference at the 5% probability level. ns, ** and * indicate insignificance and significance at the statistical level of 1 and 5%, respectively. B= Biochar, T= Trichoderma, P= Phosphorous; P_0 = non-use of phosphorous (control), P_{11} = use of phosphorous (11mg.kg^{-1} soil), P_{22} = use of phosphorous (22 mg.kg^{-1} soil).

میزان کلروفیل b

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها حاکی از تأثیر معنی‌دار بیوچار و قارچ تریکودرما و عدم تأثیر کود فسفر بر میزان کلروفیل b در گیاهچه ماشک گل‌خوشه‌ای بود، به‌طوری‌که اثرات اصلی این عوامل بر روی این صفت در سطح احتمال یک درصد کاملاً معنی‌دار شد (جدول ۴). در بین اثرات متقابل فاکتورها نیز، برهمکنش بیوچار × فسفر و تریکودرما × فسفر هر دو در سطح احتمال یک درصد تأثیر معنی‌دار بر میزان کلروفیل b در گیاهچه ماشک گل خوشه‌ای نشان دادند، بااین‌حال اثرات سه‌جانبه فاکتورها به لحاظ آماری تأثیر معنی‌دار بر روی این صفت نداشتند (جدول ۷).

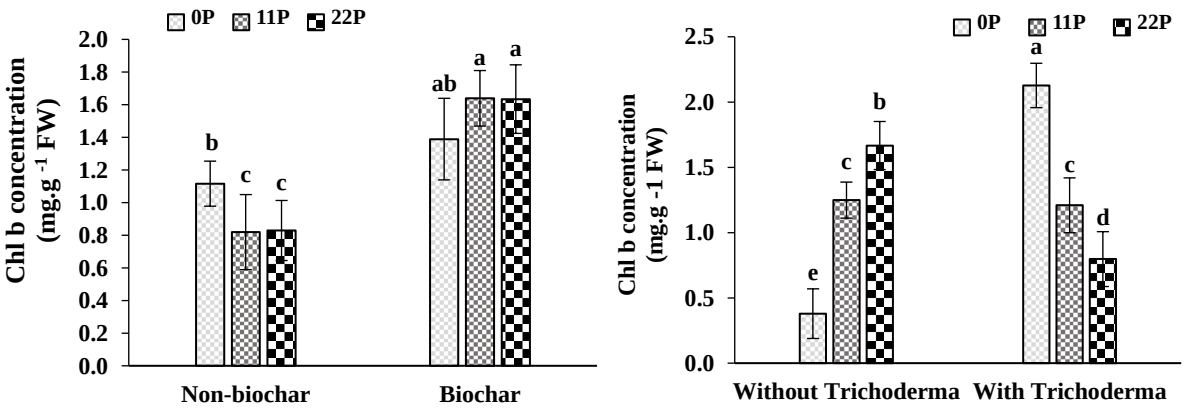
مقایسه میانگین برهمکنش دوجانبه بیوچار × فسفر نشان داد که بالاترین میزان کلروفیل b متعلق به ترکیب تیماری کاربرد بیوچار و مصرف کود فسفر به‌صورت توأم بود، هرچند مصرف کود فسفر در مقادیر مختلف به لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری نسبت به یکدیگر در این ترکیبات تیماری نشان ندادند (هر دو با غلظت ۱/۶۴ میلی‌گرم بر گرم وزن تر)، درحالی‌که کمترین میزان این صفت در شرایط عدم کاربرد بیوچار در سطوح مختلف کود فسفر به دست آمد (شکل ۴). مقایسه میانگین برهمکنش قارچ تریکودرما و فسفر بر میزان کلروفیل b نتایج نشان داد کاربرد قارچ تریکودرما در شرایط عدم مصرف کود فسفر بالاترین میزان این صفت را موجب شد

(۲/۱۳ میلی‌گرم بر گرم وزن‌تر) و مصرف بالاترین سطح کود فسفر در شرایط عدم کاربرد تریکودرما قرار گرفت (۱/۶۷ میلی گرم بر گرم وزن تر) (شکل ۳).

در شرایط محیطی تنش‌زا از دلایل کاهش غلظت کلروفیل و تخریب آن، اختلال و نقصان فعالیت آنزیم کلروفیلاز که در سنتز کلروفیل درگیر است، عنوان شده است. القای کلروز و نکروز برگ جلوگیری از سنتز کلروفیل از اثرات مخرب فلزات سنگین بر روی گیاهان محسوب می‌شود (Etesami et al., 2018, Islam et al., 2008). از طرفی تولیدات گونه‌های فعال اکسیژنی در این شرایط به کلروپلاست آسیب می‌رساند اثر سرب در کاهش معنی‌دار محتوی کلروفیل a، b و کلروفیل کل در گندم به اثبات رسیده است (Tohidi Moghadam et al., 2018). گزارش شده است فلز سنگین سرب از سنتز کلروفیل و در نتیجه فرآیند فتوسنتز جلوگیری کرده و نهایتاً گیاه با کاهش رشد و نمو مواجه می‌گردد (Hussain et al., 2107).

مقدار پروتئین کل محلول برگ

اثرات اصلی بیوچار و قارچ تریکودرما در سطح احتمال یک درصد و کود فسفر در سطح احتمال یک درصد روی این صفت معنی‌دار بودند. در بین اثرات متقابل فاکتورها نیز، برهمکنش بیوچار × تریکودرما و تریکودرما × فسفر هر دو در سطح احتمال یک درصد تأثیر معنی‌دار بر پروتئین برگ نشان دادند، بااین‌حال اثرات سه‌جانبه فاکتورها به لحاظ آماری تأثیر معنی‌دار بر روی این صفت نداشت (جدول ۷).

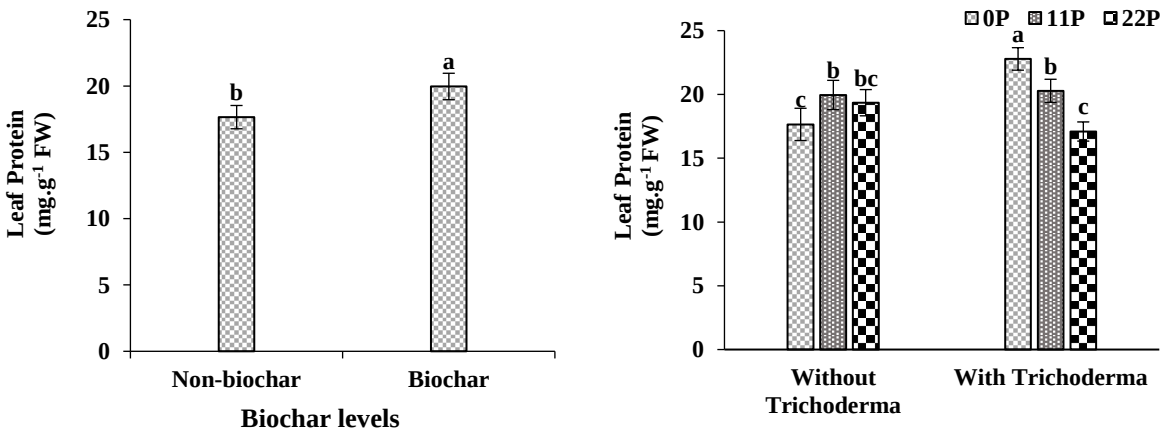


شکل ۳. مقایسه میانگین بیوچار×کود فسفر و قارچ تریکودرما×کود فسفر بر محتوی کلروفیل b گیاهچه ماشک گل خوشه‌ای در خاک‌آلوده به فلزات سنگین. میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک در هر نمودار با استفاده از آزمون LSD فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ٪۵ می‌باشند. B: بیوچار، T: تریکودرما، P: فسفر؛ P0: عدم کاربرد فسفر(شاهد)، P_{11}: کاربرد ۱۱ میلی گرم فسفر بر کیلوگرم خاک، P_{22}: کاربرد ۲۲ میلی گرم فسفر بر کیلوگرم خاک.

Fig. 3. mean comparison of biochar × Trichoderma fungus × phosphorus interaction effects on the chl. b concentration of the leaves of *vicia villosa* seedling in the contaminated soil with heavy metals. Means with at least one common letter in each chart using LSD test have no significant difference at the 5% probability level. ns, ** and * indicate insignificance and significance at the statistical level of 1 and 5%, respectively. B= Biochar, T= Trichoderma, P= Phosphorous; P_0 = non-use of phosphorous (control), P_{11} = use of phosphorous (11mg.kg^{-1} soil), P_{22} = use of phosphorous (22 mg.kg^{-1} soil).

مقایسه میانگین اثر اصلی بیوچار نشان داد که کاربرد بیوچار بالاترین محتوی پروتئین برگ (۲۰ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) و عدم کاربرد آن کمترین میزان این صفت (۱۷/۶ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) را موجب شدند. مقایسه میانگین قارچ تریکودرما و کود فسفر نشان داد که بالاترین محتوی پروتئین برگ (۲۲/۸ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) با کاربرد قارچ تریکودرما بدون مصرف کود فسفر به دست آمد و به دنبال آن ترکیب تیماری کاربرد تریکودرما و مصرف سطح متوسط از کود فسفر قرار گرفت. کمترین میزان این صفت (۱۷/۰ میلی گرم بر گرم وزن تر) نیز متعلق به کاربرد تریکودرما با مصرف بالاترین سطح از کود فسفر بود. بر اساس مقایسه میانگین تیمارهای مختلف قارچ تریکودرما و کود فسفر مشخص شد

که بالاترین محتوی پروتئین برگ (۱۱/۹ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) با کاربرد قارچ تریکودرما و مصرف ۱۱ میلی گرم کود فسفر به دست آمد. مصرف کود فسفر در بالاترین سطح چه به هنگام مصرف و چه عدم کاربرد تریکودرما اثر یکسان بر محتوی پروتئین ریشه داشت. کمترین میزان این صفت (۸/۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) نیز متعلق به تیمار شاهد (عدم کاربرد تریکودرما و کود فسفر) بود (شکل ۴).



شکل ۴. مقایسه میانگین اثرات اصلی بیوچار و اثرات متقابل فسفر مکمل و قارچ تریکودرما بر پروتئین برگ در گیاهچه‌های ماشک گل خوشه‌ای رشد یافته در خاک‌آلوده به فلزات سنگین. میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک در هر نمودار با استفاده از آزمون LSD فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ می‌باشند. B: بیوچار، T: تریکودرما، P: فسفر؛ P0: عدم کاربرد فسفر(شاهد)، P_{11}: کاربرد ۱۱ میلی گرم فسفر بر کیلوگرم خاک، P_{22}: کاربرد ۲۲ میلی گرم فسفر بر کیلوگرم خاک.

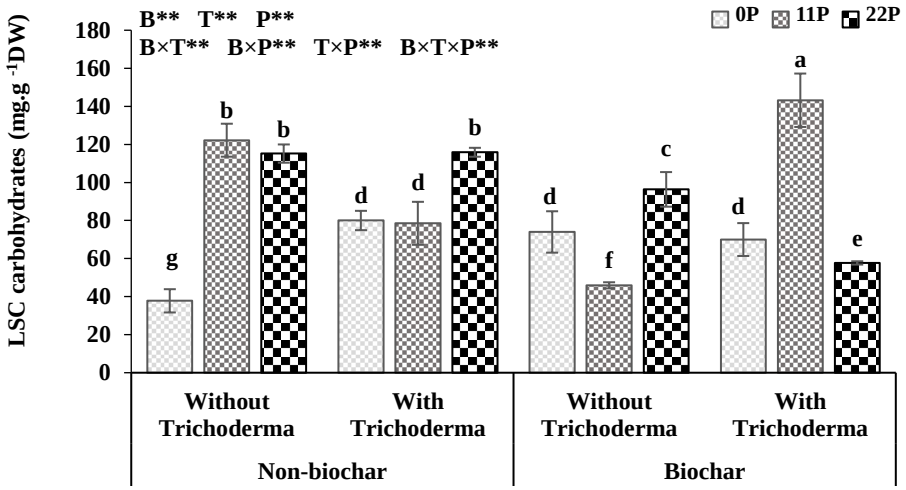
Fig. 4. Mean comparison of the main effects of biochar and phosphorus × *Trichoderma* interaction effects on the leaf protein concentration of *vicia villosa* seedling in the contaminated soil with heavy metals. Means with at least one common letter in each chart using LSD test have no significant difference at the 5% probability level. ns, ** and * indicate insignificance and significance at the statistical level of 1 and 5%, respectively. B= Biochar, T= Trichoderma, P= Phosphorous; P_0 = non-use of phosphorous (control), P_{11} = use of phosphorous (11mg.kg^{-1} soil), P_{22} = use of phosphorous (22 mg.kg^{-1} soil).

علوفه ماشک‌ها برای دام‌ها مناسب بوده و میزان پروتئین آن در زمان مناسب برداشت در حدود ۱۵ تا ۲۰ درصد است (Karimi 2007). گزارش شده است که تحت شرایط تنش‌زا محیطی، هنگامی‌که گونه‌های فعال اکسیژنی ازجمله پراکسید هیدروژن تولید می‌شود، پروتئین‌های ضد سمیت ازجمله گلوتاتیون اس ترانسفراز (GST)، گلوتاتیون متصل به فرمالدهید دهیدروژناز (FALDH) و پراکسیداز به‌وسیله مایه‌کوبی تریکودرما به‌صورت آنزیم‌های مهارکننده عمل و نقش مرکزی در حفاظت از سلول در برابر خسارت اکسیداتیو بازی کنند. (Dixon et al., 2002). کاربرد بیوچار در زراعت گندم باعث افزایش درصد پروتئین دانه گندم شد. نتیجه‌گیری شد که این امر ناشی از توانایی بیوچار در تأمین عناصر غذایی به‌ویژه نیتروژن که در ساختار اسیدآمینه‌های تشکیل‌دهنده پروتئین بکار می‌روند، مؤثر باشد. کاربرد بیوچار تأثیر معنی دار و مثبت بر بهبود پروتئین محلول برگ و ریشه در گیاه اسپرس رشد یافته در خاک‌آلوده به عناصر سنگین سرب و روی نشان داد (Sobhani et al., 2021).

مقدار قند محلول برگ

اثرات اصلی بیوچار و قارچ تریکودرما هر دو در سطح احتمال یک بر صفت محتوی قند محلول برگ معنی‌دار بود، اما اثر سطوح مختلف کود فسفر به لحاظ آماری روی این صفت معنی‌دار نبود. در میان اثرات متقابل دوجانبه برهمکنش بیوچار × قارچ تریکودرما، بیوچار × کود فسفر و تریکودرما × فسفر نیز تأثیر معنی‌دار روی این صفت در سطح احتمال یک درصد نشان دادند، همچنین برهمکنش سه‌جانبه عوامل آزمایشی یعنی بیوچار × تریکودرما × فسفر نیز تأثیر معنی‌دار بر محتوی قند محلول برگ در ماشک گل خوشه‌ای در سطح احتمال یک درصد نشان داد (جدول ۷). بر اساس مقایسات میانگین سه‌جانبه عوامل آزمایش (بیوچار، تریکودرما و فسفر)

مشخص شد که بالاترین محتوی قند محلول برگ (۱۴۳/۲ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک) در تیمار ترکیبی مصرف ۱۱ میلی گرم کود فسفر و کاربرد توأم بیوچار و قارچ تریکودرما به دست آمد. کمترین محتوی قند محلول برگ (۳۷/۷۸ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک) نیز در شرایط عدم کاربرد بیوچار و قارچ تریکودرما و عدم مصرف کود فسفر (تیمار شاهد) مشاهده شد (شکل ۵).



شکل ۵. مقایسه میانگین اثرات متقابل بیوچار × قارچ تریکودرما × فسفر بر قند محلول برگ گیاهچه ماشک گل خوشه‌ای رشد یافته در خاک‌آلوده به فلزات سنگین. ns، ** و * به ترتیب نشانگر عدم معنی‌داری و معنی‌دار بودن در سطح آماری ۱ و ۵٪. میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک در هر نمودار با استفاده از آزمون LSD فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال 5% می‌باشند. B: بیوچار، T: تریکودرما، P: فسفر؛ P_0: عدم کاربرد فسفر(شاهد)، P_{11}: کاربرد ۱۱ میلی گرم فسفر بر کیلوگرم خاک، P_{22}: کاربرد 22 میلی گرم فسفر بر کیلوگرم خاک.

Fig. 5. Mean comparison of the Biochar × *Trichoderma* × Phosphorus interaction effects on the leaf soluble carbohydrate of *vicia villosa* seedlin in the soil contaminated with heavy metals. Means with at least one common letter in each chart using LSD test have no significant difference at the 5% probability level. ns, ** and * indicate insignificance and significance at the statistical level of 1 and 5%, respectively. B= Biochar, T= Trichoderma, P= Phosphorous; P_0 = non-use of phosphorous (control), P_{11} = use of phosphorous (11mg.kg^{-1} soil), P_{22} = use of phosphorous (22 mg.kg^{-1} soil).

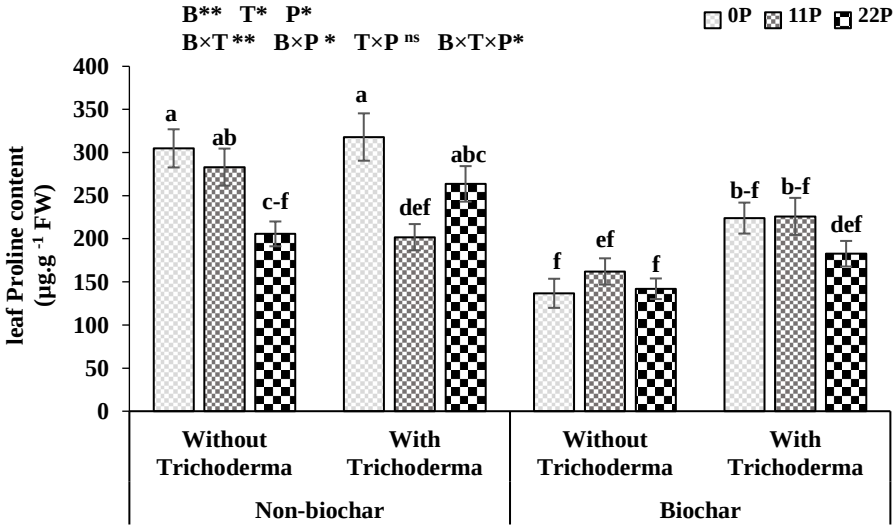
کاربرد بیوچار به‌عنوان یک راهبرد ساده و ارزان در افزایش قندهای محلول در گیاه رشد یافته تحت شرایط تنش ناشی از عناصر سنگین سرب گزارش شد. قارچ تریکودرما از طریق سازوکارهای خاصی مانند افزایش انتقال قند و اسیدهای آمینه در ریشه گیاهان موجب ایجاد مقاومت القائی در برابر تنش و کنترل زیستی بیماری‌های خاکزی می‌شوند (Lehmann, 2007). تحقیقات متعدد اثبات کرده است که گونه‌های مختلف قارچ‌های تریکودرما با کنترل زیستی (بیوکنترلی) با افزایش انتقال قند و اسیدآمینه‌ها در ریشه گیاهان و ایجاد مقاومت القایی در برابر تنش‌های مختلف محیطی در بهبود رشد و نمو گیاهان اثرات سودمند و معنی دار ایجاد می‌کند (Mazhabi et al., 2011).

مقدار پرولین آزاد برگ

محتوی پرولین برگ به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر عوامل آزمایش قرار گرفت، چنانچه اثرات اصلی بیوچار در سطح احتمال یک درصد و قارچ تریکودرما و کود فسفر هر دو در سطح احتمال پنج درصد تأثیر معنی‌دار روی این صفت داشتند. در بین اثرات متقابل عوامل آزمایش نیز، به جزء برهمکنش دوجانبه تریکودرما × فسفر سایر اثرات دوجانبه عوامل آزمایشی یعنی بیوچار × تریکودرما (در سطح احتمال یک درصد) و بیوچار × فسفر (در سطح احتمال پنج درصد) و همچنین برهمکنش سه‌جانبه بیوچار × تریکودرما × فسفر در سطح احتمال پنج درصد تأثیر معنی‌دار بر محتوی پرولین

برگ در گیاهچه‌های ماشک گل خوشه‌ای نشان دادند (جدول ۷).

مقایسه میانگین‌های برهمکنش سه‌جانبه عوامل آزمایش نشان داد که بالاترین محتوی پرولین برگ (۳۱۸ میکروگرم بر گرم وزن تر) در شرایط کاربرد قارچ تریکودرما بدون مصرف کود فسفر و بیوچار به دست آمد، بااین‌حال این ترکیب تیماری با تیمار شاهد به لحاظ آماری اختلاف معنی‌دار نشان نداد. کمترین محتوی پرولین برگ بدون اختلاف معنی‌دار آماری متعلق به ترکیبات تیماری کاربرد بیوچار و عدم کاربرد تریکودرما در هر سه سطح از کود فسفر بود به‌طوری‌که این ترکیبات در مقایسه با تیمار برتر باعث کاهش بیش از دو برابری محتوی پرولین در اندام برگ گیاهچه‌های ماشک گل خوشه‌ای شدند. نتایج نشان داد که مصرف کود فسفر توأم با کاربرد بیوچار باعث کاهش محتوی پرولین و اضافه شدن قارچ تریکودرما به ترکیب تیماری باعث افزایش این صفت گردید (شکل ۶).



شکل ۶. مقایسه میانگین اثرات متقابل بیوچار × قارچ تریکودرما و بیوچار × فسفر بر میزان پرولین برگ گیاهچه ماشک گل خوشه‌ای رشد یافته در خاک‌آلوده به فلزات سنگین. ns، ** و * به ترتیب نشانگر عدم معنی‌داری و معنی‌دار بودن در سطح آماری ۱ و ۵٪. میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک در هر نمودار با استفاده از آزمون LSD فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال 5% می‌باشند. B: بیوچار، T: تریکودرما، P: فسفر؛ P_0: عدم کاربرد فسفر(شاهد)، P_{11}: کاربرد ۱۱ میلی گرم فسفر بر کیلوگرم خاک، P_{22}: کاربرد 22 میلی گرم فسفر بر کیلوگرم خاک.

Fig. 6. mean comparison of the biochar × Trichoderma and biochar × phosphorus interaction effects on the leaf proline content of *vicia villosa* seedling in the contaminated soil with heavy metals. Means with at least one common letter in each chart using LSD test have no significant difference at the 5% probability level. ns, ** and * indicate insignificance and significance at the statistical level of 1 and 5%, respectively. B= Biochar, T= Trichoderma, P= Phosphorous; P_0 = non-use of phosphorous (control), P_{11} = use of phosphorous (11mg.kg^{-1} soil), P_{22} = use of phosphorous (22 mg.kg^{-1} soil).

در افزایش پرولین، لازمه تنظیم اسمزی مرهون اسیدهای آمینه محلول (آلانین و اسید گلوتامیک) و قندها هستند گزارش‌ها حاکی از این است که در نتیجه افزایش در تجمع پرولین، اسیدهای آمینه آزاد، محتوی عناصر مغذی، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت تحمل گیاهان به تنش غیرزنده بهبود یافت. بررسی‌ها نشان می‌دهد مواد شیمیایی عمده‌ای از ترکیبات آلی مانند فنل‌ها، آمیدها و اسید بنزوییک با افزودن بیوچار به خاک اضافه می‌شود که در افزایش متابولیت‌های ثانویه مؤثر است. اثرات مثبت کاربرد بیوچار در افزایش مقاومت گیاه به تنش‌های محیطی در نتیجه اصلاح خاک و افزایش تبادل کاتیونی عناصر به‌خوبی مشخص شده است، از طرفی نقش قارچ تریکودرما در کاهش اثرات مخرب تنش‌ها در گیاهان نیز به‌خوبی شناخته شده است، به نظر می‌رسد کاربرد توأم این فاکتور در خاک‌های آلوده به فلزات سنگین نیز می‌تواند از طریق افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه و افزایش پرولین به‌عنوان تسهیل‌کننده اثر تنش‌ها عمل نماید (Petruccellii et al., 2015).

جذب فسفر در اندام هوایی

اثرات اصلی عوامل آزمایشی یعنی بیوچار، قارچ تریکودرما و کود فسفر هر سه در سطح یک درصد بر صفت جذب فسفر ساقه تأثیر معنی‌دار داشتند. برهمکنش سه‌جانبه عوامل آزمایشی بیوچار × تریکودرما × فسفر نیز تأثیر معنی‌دار برجذب فسفر ساقه در ماشک گل خوشه‌ای در سطح احتمال یک درصد نشان داد (جدول ۸).

جدول ۸. تجزیه واریانس جذب عناصر در ماشک گل خوشه‌ای رشد یافته در خاک‌آلوده به فلزات سنگین با کاربرد بیوچار، تریکودرما و فسفر

Table 8. Analysis of variance of elements concentration for *Vicia villosa* L. in contaminated soil with heaevy metals with application of biochar, Trichoderma and phosphorus

S.O.V	منابع تغییر	میزان فسفر اندام هوایی Phosphorus cocentration of shoot	میزان سرب اندام هوایی Pb concentration of shoot	میزان روی اندام هوایی Zn concentration of shoot
Replication	تکرار	0.003	3.14	91
Biochar (B)	بیوچار	1.257 **	3366.2 **	228709 **
Trichoderma (T)	تریکودرما	0.053 **	625.5 **	25199 **
Phosphorus (P)	فسفر(P)	0.927 **	376.0 **	11494 **
B × T	بیوچار × تریکودرما	0.017	264.4 **	28923 **
B × P	بیوچار × فسفر	0.146 **	340.1 **	10231 **
T × P	تریکودرما × فسفر	0.072 **	39.50	1107
B × T × P	بیوچار × تریکودرما × فسفر	0.105 **	35.67	3073 *
Error	خطا	0.006	13.38	751

بدون علامت، ** و * به ترتیب نشانگر عدم معنی‌داری و معنی‌دار بودن در سطح آماری ۱ و ۵٪

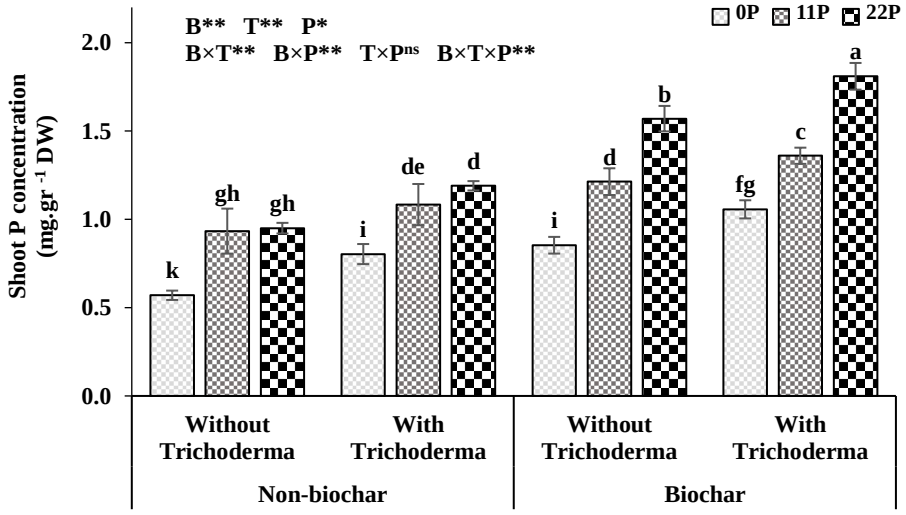
Unsigned, ** and * indicate insignificance and significance at the statistical level of 1 and 5%, respectively

بر اساس مقایسات میانگین سه‌جانبه عوامل آزمایش، بالاترین جذب فسفر ساقه (۱/۸۱۰ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک گیاه در هر گلدان) با مصرف بالاترین سطح کودی فسفر (۲۲ میلی گرم بر کیلوگرم خاک) و کاربرد توأم بیوچار و قارچ تریکودرما به دست آمد. کاربرد بیوچار با سطح کودی ۲۲ میلی گرم فسفر بدون اعمال قارچ تریکودرما نیز به دنبال تیمار برتر قرار داشت (۱/۵۷۰ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک گیاه در هر گلدان). کمترین جذب فسفر در ساقه نیز تیمار شاهد ثبت شد (شکل ۷).

در کلیه ترکیبات تیماری مشاهده شد که مصرف ۲۲ میلی‌گرم فسفر بر کیلوگرم خاک باعث افزایش زیاد در فسفر قابل‌جذب ساقه در ماشک گل خوشه‌ای شد. کاربرد توأم بیوچار و قارچ تریکودرما به همراه سطوح کودی ۱۱ و ۲۲ میلی گرم فسفر نیز در مقایسه با عدم مصرف فسفر به ترتیب باعث افزایش ۴۱/۶ و ۲۲/۳ درصدی جذب فسفر شد. در شرایط عدم مصرف کود فسفر نیز کاربرد بیوچار بالأخص توأماً با قارچ تریکودرما توانست میزان جذب فسفر ساقه بالاتری را نسبت به مصرف کود فسفر به‌تنهایی داشته باشد.

اثرگذاری بیوچار در بسیاری از واکنش‌های شیمیایی و بیولوژیک در خاک و به دنبال آن بهبود جذب عناصر غذایی توسط ریشه گیاه توسط محققین گزارش شده است (Nabaei et al., 2020). گزارش شده است که بیوچار با افزایش قابلیت جذب عناصر ضروری ازجمله فسفر، باعث افزایش عملکرد در بسیاری از گیاهان می‌شود. عناصر غذایی ضروری موجود در بیوچار می‌تواند نقش سازنده و مهم در اصلاح خاک داشته (Sun et al., 2020) و ضمن بهبود احتباس عناصر غذایی، موجب افزایش جذب آن‌ها شود (Tammeorg et al., 2017; Kibue et al., 2018; Abbas et al., 2020). وجود توده‌های میسیلیومی از تریکودرما در ریزوسفر منجر به توسعه روابط قارچ - گیاه می گردد و توسعه ریشه‌های همزیست با قارچها باعث افزایش سطح و مساحت آن‌ها برای جذب بیشتر عناصر می‌شود (Bielska et al., 2018). توانایی حل‌کنندگی فسفات

غیرقابل محلول خاک و افزایش قابلیت دسترسی عناصر غذایی از طریق حلالیت و کلاته شدن عناصر معدنی و نیز افزایش کارایی جذب عناصر غذایی از مزیت‌های گونه‌های تریکودرما محسوب می‌شود (Lehmann, 2007; Kapri and Tewari, 2010). در مطالعه صلاحی استاد و همکاران (Salahi Ostad et al., 2021) روی گیاه ریحان، بیشترین میزان جذب عناصر فسفر، پتاسیم و نیتروژن با کاربرد قارچ تریکودرما مشاهده شد. پاکروان اصل و همکاران (Pakravane Asl et al., 2015) با مطالعه بر روی گیاه ماشک گزارش دادند که غلظت و جذب فسفر در گیاه می‌تواند در نتیجه بالا بودن میزان فسفر در خاک از طریق مصرف آن به‌طور معنی‌دار افزایش یابد. با توجه به اثرات مثبت بیوچار در تبادل کاتیونی عناصر و اصلاح خاک از طریق کاهش اثرات مخرب عناصر سنگین و از طرفی نقش قارچ تریکودرما در بهبود افزایش جذب عناصر ضروری گیاه افزایش جذب عنصر فسفر در اندام‌های هوایی با کاربرد این عناصر دور از انتظار نخواهد بود، از طرفی کاربرد عنصر فسفر در کنار این فاکتورها عامل مهمی در افزایش جذب این عنصر می‌تواند باشد.



شکل ۷. مقایسه میانگین اثرات متقابل بیوچار × قارچ تریکودرما × فسفر بر میزان جذب فسفر ساقه گیاهچه ماشک گل خوشه‌ای در خاک‌آلوده به فلزات سنگین. ns، ** و * به ترتیب نشانگر عدم معنی‌داری و معنی‌دار بودن در سطح آماری ۱ و ۵٪. میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک در هر نمودار با استفاده از آزمون LSD فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال 5% می‌باشند. B: بیوچار، T: تریکودرما، P: فسفر؛ P_0: عدم کاربرد فسفر(شاهد)، P_{11}: کاربرد ۱۱ میلی گرم فسفر بر کیلوگرم خاک، P_{22}: کاربرد 22 میلی گرم فسفر بر کیلوگرم خاک.

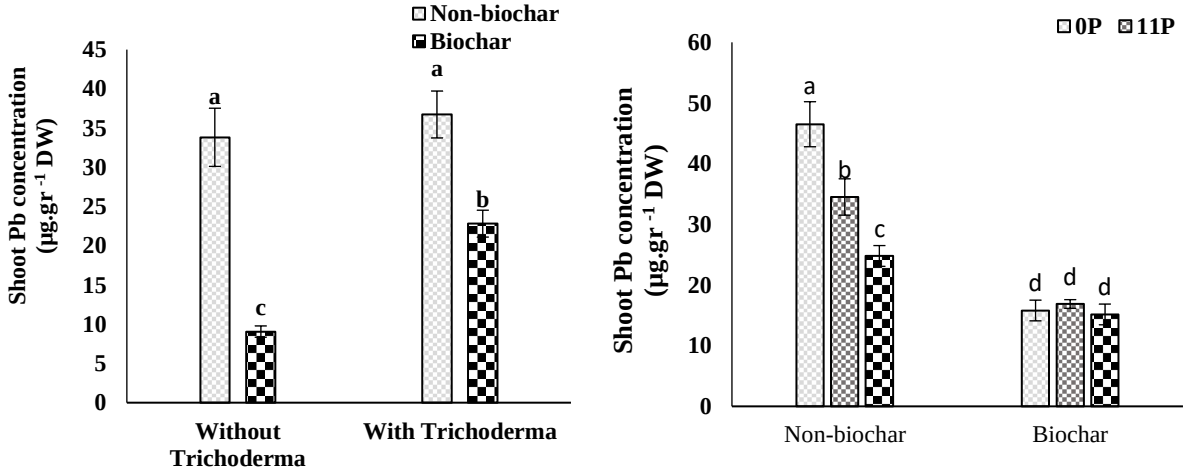
Fig. 7. mean comparison of the biochar × Trichoderma and biochar × phosphorus interaction effects on the shoot uptake of phosphorus of *vicia villosa* in the contaminated soil with heavy metals. Means with at least one common letter in each chart using LSD test have no significant difference at the 5% probability level. ns, ** and * indicate insignificance and significance at the statistical level of 1 and 5%, respectively. B= Biochar, T= Trichoderma, P= Phosphorous; P_0 = non-use of phosphorous (control), P_{11} = use of phosphorous (11mg.kg^{-1} soil), P_{22} = use of phosphorous (22 mg.kg^{-1} soil).

انتقال سرب به اندام هوایی

اثرات اصلی بیوچار، قارچ تریکودرما و کود فسفر هر سه در سطح احتمال یک درصد تأثیر معنی‌دار روی این صفت داشتند. همچنین در بین اثرات دوجانبه برهمکنش بیوچار × تریکودرما و بیوچار × فسفر هر دو در سطح احتمال یک درصد تأثیر معنی‌دار بر میزان جذب سرب در ساقه ماشک گل خوشه‌ای نشان دادند (جدول ۸). نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که در بین ترکیبات تیماری بیوچار × تریکودرما بالاترین جذب سرب در ساقه به میزان ۳۶/۷ میکروگرم بر گرم وزن خشک گیاه در هر گلدان متعلق به تیمار ترکیبی کاربرد قارچ تریکودرما بدون اعمال بیوچار بود، این ترکیب تیماری ازلحاظ آماری اختلاف معنی‌دار با تیمار شاهد نداشت. کمترین میزان جذب سرب نیز با کاربرد بیوچار بدون اعمال

قارچ تریکودرما به دست آمد (۹/۰۶ میکروگرم بر گرم وزن خشک گیاه در هر گلدان) (شکل ۸).

بر طبق گزارش‌های آژانس حفاظت محیط‌زیست، مهم‌ترین عنصر آلاینده در ایران سرب است ازآنجایی‌که ورود سرب به زنجیره غذایی مانند سایر فلزات سنگین موجود در خاک، می‌تواند تهدیدات مخربی را برای سلامت انسان و حیوانات به دنبال داشته باشد (Fahimirad and Hatami 2017)، اصلاح خاک‌های آلوده به سرب اجتناب‌ناپذیر است. ایجاد اختلال و کاهش جذب مواد معدنی ازجمله اثرات سوء فلز سرب در گیاه است (Daneshfar et al., 2018; Teymouri et al., 2021; Tohidi Moghadam et al., 2018; Etesami et al., 2018). با جذب و تجمع سرب در بافت‌های گیاهی، فعالیت‌های حیاتی گیاه یعنی فتوسنتز، تنفس و تغذیه دچار اختلال شده و درنهایت منجر به کاهش عملکرد گیاه می‌شود (Zhou et al., 2018). بااین‌حال تفاوت در تجمع سرب در بین گیاهان، ارقام، ژنوتیپ‌های گونه و حتی اندام‌های گیاهی (ریشه، شاخه و برگ)، تفاوت ویژگی‌های تحمل، جذب و انتقال آن‌ها را نشان می‌دهد (Peng et al., 2012).



شکل ۸. مقایسه میانگین اثرات متقابل بیوچار × قارچ تریکودرما و بیوچار × فسفر بر میزان جذب سرب ساقه گیاهچه ماشک گل خوشه‌ای در خاک‌آلوده به فلزات سنگین. میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک در هر نمودار با استفاده از آزمون LSD فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال 5% می‌باشند. B: بیوچار، T: تریکودرما، P: فسفر؛ P_0: عدم کاربرد فسفر(شاهد)، P_{11}: کاربرد ۱۱ میلی گرم فسفر بر کیلوگرم خاک، P_{22}: کاربرد 22 میلی گرم فسفر بر کیلوگرم خاک

Fig. 8. mean comparison of the biochar × Trichoderma and biochar × phosphorus interaction effects on the shoot pb uptake of *vicia villosa* in the contaminated soil with heavy metals. Means with at least one common letter in each chart using LSD test have no significant difference at the 5% probability level. B= Biochar, T= Trichoderma, P= Phosphorous; P_0 = non-use of phosphorous (control), P_{11} = use of phosphorous (11mg.kg^{-1} soil), P_{22} = use of phosphorous (22 mg.kg^{-1} soil).

کاربرد بیوچار در خاک، با توجه به افزایش حضور گروه‌های عاملی کربوکسیل، فنولیک و هیدروکسیل که دارای اکسیژن سطحی‌اند، قادر است آلایندگی حاصل از عنصر سنگین را کاهش دهند. مکانیسم‌های دخیل در تثبیت فلزات سنگین با کاربرد بیوچار از طریق تأثیر بر خصوصیات خاک مانند pH یا ظرفیت تبادل کاتیونی و تبادل فلز، ایجاد کمپلکس با گروه‌های مختلف عاملی در بیوچار و تثبیت این عناصر عنوان شده است (Medynska-Juraszek et al., 2020). در مطالعه اثر بیوچار بر رشد گیاه ذرت در خاک‌آلوده به عناصر سنگین کادمیوم و سرب گزارش شد کاربرد بیوچار منجر به تثبیت و غیر قابل‌جذب کردن سرب و کادمیوم در خاک شد (Biriya et al., 2017). جلالی و همکاران (Jalali et al., 2020) نیز گزارش دادند که کاربرد بیوچار در بوته‌های سورگوم تحت تنش سرب، موجب انباشت بیشتر سرب در

اندام‌های گیاهی شد. ثابت شده است که قارچ تریکودرما بر روی تنش‌های مختلف زیستی از طریق کنترل زیستی اثرگذار است (Arriagada et al., 2009). تحریک رشد ریشه، کنترل عوامل بیماری‌زای گیاهی از طریق تولید آنتی‌بیوتیک‌ها، القاء مقاومت سیستمیک و بهبود سلامت گیاهان، توانایی حل‌کنندگی فسفات غیرقابل محلول خاک و افزایش قابلیت دسترسی عناصر غذایی از طریق حلالیت و کلاته شدن عناصر معدنی و در نتیجه بهبود حاصلخیزی خاک و نیز افزایش کارایی جذب عناصر غذایی از مزیت‌های گونه های تریکودرما در سیستم بیوکنترلی آن‌ها محسوب می‌شود (Lehmann, 2007; Kapri and Tewari, 2010; Mazhabi et al., 2011). از روش‌های دیگر در کاهش قابلیت دسترسی سرب در خاک‌های آلوده به این عنصر، غیرمتحرک نمودن سرب توسط برخی ترکیبات آلی و غیرآلی است. ازجمله این اصلاح‌کننده‌ها می‌توان به ترکیبات و مواد فسفردار اشاره نمود (Abbaspour et al., 2017). طی آزمایشی کاربرد قارچ و کود فسفره به‌صورت توأم بیشترین تأثیر را بر کاهش سرب تبادلی خاک دارا بودند (Amouzgar et al., 2015).

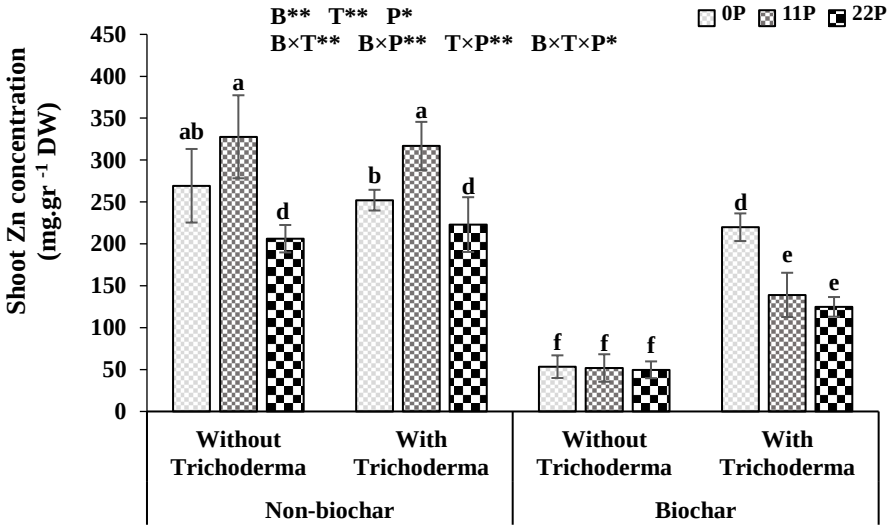
نتایج نشان داد که کاربرد یا عدم کاربرد قارچ تریکودرما تأثیر معنی‌دار در میزان جذب سرب در ساقه ماشک گل خوشه‌ای نداشت، بااین‌حال کاربرد بیوچار به‌طور معنی‌داری باعث کاهش میزان جذب سرب در ساقه شد، هرچند کاربرد توأم با قارچ تریکودرما باعث کاهش تأثیر آن در کاهش میزان جذب سرب در ساقه ماشک گل‌خوشه‌ای شد.

انتقال روی به اندام هوایی

اثرات اصلی عوامل آزمایش بر میزان جذب عنصر روی در ساقه گیاهچه‌های ماشک گل خوشه‌ای معنی‌دار بود، به‌طوری که کاربرد بیوچار، قارچ تریکودرما هر دو در سطح احتمال یک درصد و مصرف فسفر در سطح احتمال پنج درصد تأثیر معنی دار روی این صفت داشتند. به لحاظ آماری اثرات متقابل دوجانبه عوامل آزمایش در سطح احتمال یک درصد و اثرات سه‌جانبه در سطح احتمال پنج درصد تأثیر معنی‌دار بر میزان جذب روی در ساقه نشان دادند (جدول ۸).

بر اساس مقایسات میانگین سه‌جانبه ترکیبات تیماری مشخص شد که بالاترین میزان جذب عنصر روی در ساقه ماشک گل خوشه‌ای در شرایط عدم مصرف بیوچار و قارچ تریکودرما در سطوح عدم کاربرد و کاربرد ۱۱ میلی گرم فسفر به دست آمد، درحالی‌که کمترین میزان این صفت در شرایط کاربرد بیوچار و قارچ تریکودرما با مصرف سطوح مختلف کود فسفر مشاهده شد. کاربرد بیوچار در سطوح مختلف کود فسفر کمترین میزان جذب عنصر روی در ساقه را داشت (بین ۴۹ تا ۵۴ میکروگرم بر گرم وزن خشک گیاه در هر گلدان)، درحالی‌که بالاترین میزان جذب متعلق به ترکیبات تیماری عدم کاربرد بیوچار در سطوح عدم کاربرد و کاربرد ۱۱ میلی گرم فسفر در هر دو شرایط کاربرد قارچ تریکودرما به دست آمد (۲۵۲ تا ۳۲۷ میکروگرم بر گرم وزن خشک گیاه در هر گلدان) (شکل ۹).

به‌طورمعمول عناصر سرب و روی دو عنصر سنگین با بیشترین میزان در جهان هستند که در خاک به‌واسطه فعالیت معدنی تجمع یافته و می‌توانند اثرات مخرب بر تولید محصولات زراعی، اجزاء اکوسیستم زراعی و درنهایت سلامت بشر و محیط‌زیست داشته باشند. امروزه روش‌های مختلفی برای کاهش اثرات منفی و مخرب فلزات سنگین موجود در خاک مورداستفاده قرار می‌گیرد. در این راستا، استفاده از بیوچار، روش تقریباً جدیدی در جهت کاهش سمیت فلزات سنگین به شمار می‌رود (Arefi, 2015; Hejazi Zadeh et al., 2016; Abdulwahhab and Şeker, 2019). توانایی بالای این ماده در جذب فلزات سمی و سنگین منجر به اصلاح کمیت و کیفیت خاک و افزایش حاصلخیزی خاک شده و درنهایت رشد و عملکرد را بهبود می‌بخشد (Tammeorg et al., 2017; Kibue et al., 2018; Bielska et al., 2018). نتایج نشان داد که کاربرد بیوچار بالاترین میزان تأثیر ازنظر کاهش جذب عنصر روی توسط ساقه در ماشک گل خوشه‌ای را به خود اختصاص داد، بااین‌حال تغییرات معنی‌داری ازنظر این صفت در بین ترکیبات تیماری مختلف قابل‌مشاهده بود. در شرایط کاربرد قارچ تریکودرما در سطوح مختلف از کود فسفر شاهد افزایش جذب روی در اندام هوایی ماشک گل‌خوشه‌ایی بودیم.



شکل ۹. مقایسه میانگین اثرات متقابل بیوچار × قارچ تریکودرما × فسفر بر میزان جذب روی ساقه گیاهچه ماشک گل خوشه‌ای در خاک‌آلوده به فلزات سنگین. ns، ** و * به ترتیب نشانگر عدم معنی‌داری و معنی‌دار بودن در سطح آماری ۱ و ۵٪. میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک در هر نمودار با استفاده از آزمون LSD فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال 5% می‌باشند. B: بیوچار، T: تریکودرما، P: فسفر؛ P_0: عدم کاربرد فسفر(شاهد)، P_{11}: کاربرد ۱۱ میلی گرم فسفر بر کیلوگرم خاک، P_{22}: کاربرد 22 میلی گرم فسفر بر کیلوگرم خاک.

Fig. 9. mean comparison of the biochar × Trichoderma and biochar × phosphorus interactions on the shoot zn uptake of *vicia villosa* seedling in the contaminated soil with heavy metals. Means with at least one common letter in each chart using LSD test have no significant difference at the 5% probability level. ns, ** and * indicate insignificance and significance at the statistical level of 1 and 5%, respectively. B= Biochar, T= Trichoderma, P= Phosphorous; P_0 = non-use of phosphorous (control), P_{11} = use of phosphorous (11mg.kg^{-1} soil), P_{22} = use of phosphorous (22 mg.kg^{-1} soil).

نتیجه‌گیری نهایی

با کاربرد بیوچار توأم با قارچ تریکودرما حتی در شرایط عدم کاربرد کود فسفر امکان بهبود خصوصیات رویشی ازجمله سرعت سبز شدن، تعداد برگ، طول ریشه و زیست‌توده اندام هوایی وجود دارد همچنین کاهش اثرات منفی عناصر سنگین سرب و روی بر روی صفات رویشی ماشک گل‌خوشه‌ای با کاربرد بیوچار و قارچ تریکودرما امکان‌پذیر خواهد بود. ازنظر خصوصیات فیزیولوژیکی، کاربرد بیوچار و اعمال مایه‌کوبی با سوسپانسیون قارچ تریکودرما منجر به بهبود غلظت رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی حتی در شرایط عدم مصرف کود فسفر گردید. همچنین در خصوص محتوای نسبی آب برگ و قند محلول برگ و ارتفاع بوته کاربرد بیوچار و قارچ تریکودرما در سطوح مختلف کود فسفر تأثیر معنی‌دار در بهبود این صفات نشان دادند. محتوی پروتئین و پرولین برگ با کاربرد بیوچار و به‌ویژه مایه‌کوبی با سوسپانسیون قارچ تریکودرما در بالاترین مقدار خود نسبت به تیمار شاهد بود. کاربرد توأم بیوچار و قارچ تریکودرما به همراه مصرف ۱۱ و ۲۲ میلی گرم فسفر در مقایسه با عدم مصرف فسفر به ترتیب باعث افزایش ۴۱/۶ و ۲۲/۳ درصدی جذب فسفر شد.

منابع

Abbas, S., Javed, M.T., Shahid, M., Hussain, I., Haidera, M.Z., Chaudhary, H.J., Tanwir, K., Maqsood, A., 2020. Acinetobacter sp. SG-5 inoculation alleviates cadmium toxicity in differentially Cd tolerant maize cultivars as deciphered by improved physio-biochemical attributes, antioxidants and nutrient physiology. Plant Physiology and Biochemistry. 155, 815-827. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.08.024

Abbaspour, F., Asghari, H.R., Rezvani Moghadam, P., Abbasdokht, H., Shabahang, J., Beig Babaei, A., 2017. Effects of biochar on soil fertility and water use efficiency in black seed (*Nigella sativa* L.) under water stress conditions. Journal of Crop Plants Research of

Iran. 17, 52-39. [In Persian with English summary]. https://doi.org/10.22067/GSC.V17I1.63344

Abdulwahhab, Q.R., Şeker, C., 2019. Effect of biochar applications on soil aggregation status. International Soil Congress, 17–19 June, Ankara,Turkey.

Amouzgar, M., Abbaspour, A., Shahsavari, Sh. Asghari, H.R., parsaian, M., 2014. Effects of phosphorous fertilizers and arbuscular mycorrhiza fungi fymbiosis with sunflower on Pb availability in a contaminated soil. Journal of Soil and Water Sciences (Agricultural Sciences and Techniques and Natural Resources). 19(74), 39-50. [In Persian with English summary]. https://doi.org/10.18869/acadpub.jstnar.19.74.4

Arab Baferani, Z., Qanei Bafghi, M.J., Shirmardi, M., 2019. The effect of pistachio leaf waste biochar on the growth characteristics of safflower plant. Journal of Soil Management and Sustainable Production. 10(3), 73-93. [In Persian with English summary]. https://doi.org/10.22069/ejsms.2021.17831.1937

Arefi, A., 2015. Effect of inoculation of mycorrhiza fungi, sewage black mud and produced biochar on soil cadmium absorption under maize cultivation. Master Thesis, Isfahan University of Technology. [In Persian with English summary].

Arnon, D.I., 1967. Photosynthetic activity of isolated chloroplasts. Physiological Review. 47(3), 317-58. https://doi.org/10.1152/physrev.1967.47.3.317

Arriagada, C., Aranda, E., Sampedro, I., Garcia-Romera, I., Ocampo, J.A., 2009. Contribution of the saprobic fungiTrametes versicolor and Trichoderma harzianum and the arbuscular mycorrhizal fungi Glomus deserticola and G. claroideum to arsenic tolerance of Eucalyptus globulus. Bioresour Technol. 100, 24. 6250-6257. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.07.010

Artiola, J.F., Craig R., Robert, F., 2012. Effects of a biochar-amended alkaline soil on the growth of Romaine lettuce and bermudagrass. Soil Science 177, 561-570. https://doi.org/10.1097/SS.0b013e31826ba908

Bai, C., He, X., Tang, H., Zhao, L., 2009. Spatial distribution of arbuscular mycorrhizal fungi, glomalin and soil enzymes under the canopy of *Astragalus adsurgens* Pall. in the Mu Us sandland, China. Soil Biology and Biochemistry. 41, 941-947. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.02.010

Basso, A.S., Miguez, F.E., Laird, D.A., Horton, R., Westgate, M., 2013. Assessing potential of biochar for increasing water-holding capacity of sandy soils. Gcb Bioenergy, 5(2), 132-143. https://doi.org/10.1111/gcbb.12026

Bates, L.S., Waldren, R.P. 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

Bielska, L., Skulcov, L., Neuwirthova, N., Cornelissen, G., Hale, S. E., 2108. Sorption, bioavailability and ecotoxic effects of hydrophobic organic compounds in biochar amended soils. Science Of The Total Environment. 624, 78-86. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.098

Biriya, M., Moezi, A.A., Ameri Khah, H., 2016. Effect of Sugercan bagasse,s biochar on maize plant growth, grown in lead and cadmium contaminated soils. Water and Soil Journal (Agricultural Sciences and Industries), 31(2), 626-609. [In Persian with English summary]. https://doi.org/10.22067/jsw.v31i2.55832

Bradford, M.M. 1967. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 72, 248-54. https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999

Carter, S., Shackley, S., Sohi, S., Suy, T., Haefele, S., 2013. The impact of biochar application on soil properties and plant growth of pot grown lettuce (*Lactuca sativa*) and cabbage (*Brassica chinensis*). Agronomy. 3, 404–418. https://doi.org/10.3390/agronomy3020404

Daneshfar, A.H., Asgharzadeh, N.A., Ostad, S., Khoshrou, B., 2018. The role of Rhizophagus irregularis in inhibiting lead absorption by sunflower. Journal of Agricultural Sciences and Sustainable Production. 28(1), 37-50. [In Persian with English summary].

Danish, S., Tahir, F.A., Rasheed M.K., Ahmad, N., Ali M.A., Kiran, S., Younis, U., Irshad, I., Butt, B., 2019. Effect of foliar application of Fe and banana peel waste biochar on growth, chlorophyll content and accessory pigments

synthesis in spinach under chromium (IV) toxicity. Open Agriculture, 4, 381-390. https://doi.org/10.1515/opag-2019-0034

Dixon, R.A., Achnine, L., Kota, P., Liu, C.J., Reddy, M.S.S.,Wang, L.J., 2002. The phenylpropanoid pathway and plant defence- a genomics perspective. Molecular Plant Pathology. 3, 371-390. https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2002.00131.x

Emamverdian, A., Ding, Y., Mokhberdoran, F., Xie, Y., 2015. Heavy metal stress and some mechanisms of plant defense response. The Scientific World Journal 215, 1 –18. https://doi.org/10.1155/2015/756120

Etesami, H., 2018. Bacterial mediated alleviation of heavy metal stress and decreased accumulation of metals in plant tissues: mechanisms and future prospects. Ecotoxicology and Environmental safety. 147, 175-191. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.08.032

Fahimirad, S., Hatami, M., 2017. Heavy metal-mediated changes in growth and phytochemicals of edible and medicinal plants. In: Ghorbanpour, M., Varma, A. (eds) Medicinal Plants and Environmental Challenges. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-68717-9_11

Feizi, Kh., Amirinejad, A.A., Qobadi, M., 2021. Investigation of the effects of biochar and salicylic acid on reducing lead stress in basil (*Ocimum basilicum* L.). Iran Water and Soil Research. 52(2), 547-539. [In Persian with English summary]. https://doi.org/10.22059/ijswr.2020.313282.668795

Hagh shenas, A., Ahmadi, A.R., Dehsorkhi, A., 2016. Evaluation of living mulch application of common vetch on yield and yield components of maize (SC.704 cultivar). Applied Research of Plant Ecophysiology. 2, 89-104. [In Persian with English summary]. http://arpe.gonbad.ac.ir/article-1-142-en.pdf

Hejazi Zadeh, A., Gholamalizadeh Ahangar, A., Ghorbani, M., 2016. Effect of biochar on lead and cadmium absorption of sewage black mud of paper factories by sunflower. Water and Soil Science. 26, 259-271. [In Persian with English summary]. https://journals.tabrizu.ac.ir/article_4893.html

Hussain, I., Siddique, A., Ashraf, M., Rasheed, R., Ibrahim, M., Iqbal, M., Akbar, S., Imran, M., 2017. Does exogenous application of ascorbic acid modulate growth, photosynthetic pigments and oxidative defense in okra (*Abelmos chusesculentus* L.) under lead stress? Acta Physiologiae Plantarum. 39, 144–151. https://doi.org/10.1007/s11738-017-2439-0

Islam, E., Liu, D., Li, T., Yang, X., Jin, X., Mahmood, Q., Tian, S., Li, J. 2008. Effect of Pb toxicity on leaf growth, physiology and ultrastructure in the two ecotypes of *Elsholtzia argyi*. Journal of Hazardous Materials. 154 (1-3), 914-926. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.10.121

Jalali, S.A., Zaafarian, F., Ha,ssanpour, Abbasian, A., 2020. The ability of phytoremediation of lead by sorghum (*Sorghum bicolor* L.) under the application of biochar and salicylic acid. Iranian Plant Sciences. 52(4), 223-233. [In Persian with English summary]. https://doi.org/10.22059/ijfcs.2020.311800.654763

Kapri, A., Tewari, L., 2010. Phosphate solubilization potential and phosphatase activity of rhizospheric Trichoderma spp. Brazilian Journal of Microbiology, 41, 787-795. https://doi.org/10.1590/S1517-83822010005000001

Kaymak, H.C., Guvenc, I., Yarali, F., Donmez, M.F., 2009. The effects of bio-priming with PGPR on germination of radish (*RaphanSKus sativus* L.) seeds under saline conditions. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 33, 173-179. https://doi.org/10.3906/tar-0806-30

Kibue, G.W., 2018. Use of biochar for increased crop yields and reduced climate change impacts from agricultural ecosystems: Chinese farmer's perception and adoption strategy. African Journal of Agricultural Research. 13, 1063–1070. https://doi.org/10.5897/AJAR2018.13037

Lavakush, Janardan, Y., Verma, J.P., Jaiswal, D.K., Kumar, A., 2014. Evaluation of PGPR and different concentration of phosphorus level on plant growth, yield and nutrient content of rice (*Oryza sativa*). Ecological Engineering, 62: 123-128. https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2013.10.013

Lehmann, J., Rillig, M.C., Thies, J., Masiello C.A., Hockaday, W.C., Crowley, D., 2011. Biochar effects on soil biota–A review. Soil

Biology and Biochemistry, 43, 1812–1836. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.04.022

Lehmann, J., 2007. Bio-energy in the black. J. Frontiers in Ecology and the Environment. 5(7), 381-387. https://doi.org/10.1890/1540-9295(2007)5[381:BITB]2.0.CO;2

Lehmann, J., Gaunt, J., Rondon, M., 2006. Bio-char sequestration in terrestrial ecosystems: a review. Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change, 11, 403-427. https://doi.org/10.1007/s11027-005-9006-5

Mazhabi, M., Nemati, H., Rouhani, H., Tehranifar, A., Moghadam, E.M., Kaveh, H., Rezaee, A., 2011. The effect of Trichoderma on polianthes qualitative and quantitative properties. Journal of Animal and Plant Sciences. 21, 617-621.

Medynska, J., Rivier, P.A., Rasse, D. p., Joner, E.J., 2020. Biochar affects heavy metal uptake in plants through interactions in the rhizosphere. Applied Sciences. 10(15), 5105. https://doi.org/10.3390/app10155105

Nabaei, S.M., Hassandokht, M.R.,Abdossi,V., Ardakani, M.R., 2020. Effects of biochar application under organic and chemical nutritionton yield, some morpho-physiological and nutritional traits of tomato cv. Izmir. Iranian Journal of Horticultulal Science, 51(1), 177-188. https://doi-org/10.22059/ijhs.2020.286003.1686

Nik, M.M., Islam, M.M., Riasmi, Y., 2012. Heavy metal uptake and translocation by *Jatropha curcas* L. in sawdust sludge contaminated soils. Australian Journal of Crop Science, 6, 891-898.

Pakravan Asl, S., Valizadeh, Gh.R., Samadi, A., Alizadeh, Kh., Asghari, J., 2014. The effects of phosphate fertilizer residues on phosphorus absorption, white flower vetch yield and some physicochemical properties of soil in cold rainy conditions. Journal of Iran Rainfed Agriculture, 4(1), 75-96. [In Persian with English summary]. https://doi.org/10.22092/idaj.2015.102249

Peng, X., Yang, B., Deng, D., Dong, J., Chen, ZH., 2012. Lead tolerance and accumulation in three cultivars of Eucalyptus urophylla XE. grandis: implication for phytoremediation. Environmental Earth Sciences, 67, 1515-1520. https://doi:10.1007/s12665-012-1595-1

Petruccelli, R., Bonetti, A., Traversi, M., Faraloni, L.,Valagussa, M., Pozzi, A., 2015. Influence of biochar application on nutritional quality of tomato (*Lecopersicom esculentum*). Crop and Pasture Science, 66, 747-755. https://doi.org/10.1071/CP14247

Rahimi, T., Moezi, A.A., Hojjati, S., 2017. Effect of biochar and nickel levels on concentration of nickel and some micronutrients in corn. Journal of Soil Research (Soil and Water Sciences), 32(4), 536-528. [In Persian with English summary]. https://doi.org/10.22092/ijsr.2019.118560

Rezalou, Z., Shahbazi, S., Askari, H., 2020. Biopriming with Trichoderma on Germination and vegetative characteristics of sweet corn, sugar beet and wheat. Iranian Journal of Seed Science and Technology, 8, 199-210. https://doi.org/10.22034/ijsst.2018.121197.1182

Ritchie, S.W., Nguyen, H.T. and Holaday, A.S. (1990), Leaf Water Content and Gas-Exchange Parameters of Two Wheat Genotypes Differing in Drought Resistance. Crop Science, 30, 105-111. https://doi.org/10.2135/cropsci1990.0011183X003000010025x

Salahi Ostad, M., Abedi, B., Selahnarzi, Y, 2021. Effect of Trichoderma harzianum on growth characteristics and absorption of some elements in basil under drought stress. Environmental Stresses in Agricultural Sciences, 14(4), 1017-1027. [In Persian with English summary]. https://doi.org/10.22077/escs.2020.3441.1861

Sharma, P, Patel, A.N., Saini, M.K., Deep, S., 2012. Field demonstration of Trichoderma harzianum as a plant growth promoter in wheat (*Triticum aestivum* L.). Journal of Agricultural Science, 4, 65-73. https://doi.org/10.5539/jas.v4n8p65

Singh, A., Parmar, N., Kuhad C, K., 2011. Bioaugmentation, biostimulation and biocontrol. Springer, Berlin, Germany, Vol. 10. https://doi.org/10.1007/978-3-642-19769-7

Sobhani, S.M.A., Alavi Fazel, M., Ardakani, M.R., Modhaj, A., Lak, Sh., 2021. Evaluation of yield changes and yield components of wheat (*Triticum aestivum* L.) under changing conditions of biochar and mycorrhiza. Journal of Plant production Sciences. 11(1), 63-75. [In Persian with English summary]. https://doi.org/10.2./jpps.2021.684939

Solgi, E., Esmaili-Sari, A., Riyahi-Bakhtiari, A., Hadipour, M., 2012. Soil contamination of metals in the three industrial estates, Arak, Iran.

Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 88, 634-638.

Sun, C., Jiang, L.Q., Zhang, W.J., 2014. A review on heavy metal contamination in the soil worldwide: Situation, impact and remediation techniques. Environmental Skeptics and Critics. 3, 24-38.

Tammeorg, P., Bastos, A., Jeffery, S., Rees, F., Garber, E.R., 2017. Biochars in soils: towards the required level of scientific understanding. Journal of Environmental Engineering and Landscape Management. 25, 192-207. https://doi:10.3846/16486897.2016.1239582

Tanure, M.M.C., da Costa, L.M., Huiz, H.A., Fernandes, R.B.A., Cecon, P.R., Junior, J.D.P., da Luz, J.M.R., 2019. Soil water retention, physiological characteristics, and growth of maize plants in response to biochar application to soil. Soil and Tillage Research. 192, 164-173. https://doi.org/10.1016/j.still.2019.05.007

Teymouri, A., Amiri Nejad, A.A., Qobadi, M., 2021. The role of biochar and salicylic acid on reducing lead stress in sage plant (*Salvia officinallis* L.). Soil-plant relationship. 12(1), 108-95. [In Persian with English summary]. https://doi.org/10.47176/jspi.12.1.20161

Tohidi Moghadam, H.R., Donath, T.W., Ghooshchi, F., Sohrabi, M., 2018. Investigating the probable consequences of super absorbent polymer and mycorrhizal fungi to reduce detrimental effects of lead on wheat (*Triticum aestivum* L.). Agronomy Research, 16, 286-296. https://doi.org/10.15159/AR.18.009

Yousefi, M.A., Kamkar, B., Garkhlo, J., 2018. Changes in corn seed quality (hybrid KSC 704) in different treatments of fertilizer, biochar and Trichoderma inoculation in mother plant. Iranian Seed Science and Technology Journal. 8(1), 160-145. [In Persian with English Summary]. https://doi.org/10.22034/ijsst.2019.110802.1098

Zhou, J., Zhang Z. Zhang Y. Wei Y., Jiang Z., 2018. Effects of lead stress on the growth, physiology, and cellular structure of privet seedlings. PLoS ONE, 13. https://doi.org/10.22034/ijsst.2019.110802.1098

Zhu, F., Qu, L., Hong, X., Sun, X., 2011. Isolation and characterization of a phosphate-solubilizing halophilic bacterium Kushneria sp. YCWA18 from Daqiao Saltern on the coast of Yellow Sea of China. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2011, 1-6. https://doi.org/10.1155/2011/615032