آماده انتشار

تأثیر زغال زیستی بر بهبود برخی صفات مورفوفیزیولوژیک و بیوشیمیایی لوبیا چشم‌بلبلی (*Vigna unguiculata* L.) کشت‌شده در خاک آلوده به کروم

مشخصات نویسندگان:

شریفه السادات نبوی[۱]، همت‌اله پیردشتی[*۲]، فردین صادق‌زاده[۳]، یاسر یعقوبیان[۴]

۱. دانشجوی دکتری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران. رایانامه: sharifa.nabavi@gmail.com

۲. نویسنده مسئول، استاد دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران. رایانامه: h.pirdashti@sanru.ac.ir

۳. دانشیار دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران. رایانامه: fardin.upm@gmail.com

۴. استادیار دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران. رایانامه: y.yaghoubian@yahoo.com

Sharifeh Alsadat Nabavi[1], Hemmatollah Pirdashti[*2], Fardin Sadegh-Zadeh[3], Yasser Yaghoubian[4]

1.Ph.D. Student of Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Iran. E-mail: sharifa.nabavi@gmail.com

2. Corresponding Author, Prof. of Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Iran. E-mail: h.pirdashti@sanru.ac.ir

3. Associate Prof. of Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Iran. E-mail: fardin.upm@gmail.com

4. Assistant Prof. of Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Iran. E-mail: y.yaghoubian@yahoo.com

چکیده

سابقه و هدف: کروم در غلظت‌های بالا به عنوان یک آلاینده اصلی و عنصر سنگین سبب بسیاری از مشکلات زیست‌محیطی شده و زنجیره غذایی را آلوده می‌سازد. در گیاهان، اثرات سمی کروم نیز مشهود است و سبب تأخیر در جوانه‌زنی، آسیب و کاهش رشد ریشه، زیست‌توده و ارتفاع گیاه، اختلالات فتوسنتزی، کاهش عملکرد دانه و درنهایت مرگ گیاه می‌شود. در سال‌های اخیر استفاده از اصلاح‌کننده‌های آلی مانند زغال زیستی در خاک‌های آلوده به فلزات سنگین با عملکرد قابل‌توجه در تثبیت فلزات سنگین در خاک و آب مورد توجه قرار گرفته است. از این‌رو، پژوهش حاضر به منظور بررسی استفاده از سطوح مختلف زغال زیستی تولید شده از کاه برنج جهت کاهش اثرات منفی این فلز در گیاه لوبیا چشم‌بلبلی (*V. unguiculata* L.) اجرا شد.

مواد و روش‌ها: پژوهش به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری در سال ۱۴۰۲ انجام شد. تیمارها شامل زغال زیستی (صفر، ۱، ۲ و ۴ درصد وزنی) و کروم (صفر، ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و با سه تکرار بودند. در این آزمایش قطر ساقه، ارتفاع بوته، وزن خشک ریشه و اندام هوایی، کلروفیل a و b و کاروتنوئید، نشت الکترولیت، پراکسید هیدروژن و فعالیت دو آنزیم کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز اندازه‌گیری شدند.

یافته‌ها: بر اساس یافته‌ها برهم‌کنش کاربرد سطوح زغال زیستی در غلظت‌های مختلف کروم به غیر از صفت قطر ساقه، در سایر صفات معنی‌دار بود. افزایش غلظت کروم اثر منفی بر صفات مورد بررسی نشان داد ولی استفاده از زغال زیستی اثرات منفی آن را کاهش داده و همواره بهترین عملکرد صفات مورفولوژیک و فیزیولوژیک در تمامی سطوح کروم در سطح ۴ درصد وزنی زغال زیستی مشاهده شد. به‌طوری‌که استفاده از سطح زغال زیستی ۴ درصد وزنی، صفات فیزیولوژیک شامل غلظت کلروفیل‌های a و b و کاروتنوئید و استحکام غشاء را به ترتیب به میزان ۹۲/۸۸، ۹۵/۲۷، ۹۵/۳۶ و ۳۶/۹۴ درصد افزایش داد. در مقایسه، فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز و تولید پراکسید هیدروژن را به میزان ۴/۸۸، ۵۳/۶۸ و ۳۴/۲۵ درصد کاهش داد. بین فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز و تولید پراکسید هیدروژن با وزن خشک اندام هوایی همبستگی منفی و معنی‌داری (به ترتیب **۰/۸۹-، **۰/۸۵- و **۰/۸۱-) مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: به‌طورکلی، افزایش غلظت کروم در خاک به‌صورت منفی تمامی صفات مورفوفیزیولوژیک و بیوشیمیایی مورد مطالعه را تحت تأثیر قرار داد و بالعکس استفاده از سطوح مختلف زغال زیستی اثرات منفی کروم را تعدیل کرد. غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم کروم بیشترین اثر منفی را ایجاد کرد و در تمامی سطوح کروم، همواره ۴ چهار درصد وزنی زغال زیستی بهترین نتایج را با توجه به پارامتر مورد ارزیابی به همراه داشت. بر اساس یافته‌های تحقیق حاضر، زغال زیستی می‌تواند رشد گیاه لوبیا چشم‌بلبلی را در شرایط تنش کروم به‌طور قابل‌توجهی بهبود بخشد.

واژه‌های کلیدی:

اصلاح خاک، تنش اکسیداتیو، فعالیت آنزیمی، فلزات سنگین، قطر ساقه

مقدمه

مسئله آلودگی خاک‌ها به فلزات سنگین، از جمله مشکلات عمده زیست‌محیطی در جوامع است که علاوه بر اثرات زیان‌بار بر جوامع گیاهی و جانوری خاک و آلودگی آب‌های زیرزمینی از طریق آبشویی، کاهش رشد، عملکرد و کیفیت محصول و سرانجام به خطر افتادن سلامتی افراد جامعه را به همراه دارد (۱). کروم (Cr) با چگالی ۷/۱۹ (گرم بر سانتی‌متر مکعب)، از مشکل‌سازترین فلزات سنگین با چندین حالت اکسایشی است که مهم‌ترین آن‌ها کروم سه و شش ظرفیتی هستند (۲). کروم شش

ظرفیتی به دلایلی چون سمیّت، قابلیت جهش‌زایی، سرطان‌زایی و ناهنجاری در جنین؛ برای سلامت عمومی و اکوسیستم خطرناک‌تر است (۳). کروم در غلظت‌های بالا به‌عنوان یک آلاینده اصلی برای محیط‌زیست عمل می‌کند. منابع طبیعی و همچنین فعالیت‌های مختلف انسانی مسئول انتشار کروم در خاک، هوا و آب هستند که در نهایت منجر به آلودگی کروم در سطح جهان شده‌اند (۴). از مصارف کروم می‌توان به تهیه آلیاژها، پارچه‌بافی، چاپ، رنگرزی، عکاسی، تهیه کاغذ دیواری، تهیه مواد منفجره، ساخت کبریت، اجناس لاستیکی، سیمان‌سازی، چرم‌سازی و آبکاری فلزات اشاره کرد (۵). قرارگیری در معرض کروم شش ظرفیتی سبب ایجاد تنش اکسیداتیو به دلیل تولید رادیکال‌های آزاد می‌شود که فرآیندهای مورفوفیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاه را در سطوح بافتی و سلولی تغییر می‌دهد (۶).

در سال‌های اخیر استفاده از اصلاح‌کننده‌های آلی همچون زغال زیستی در خاک‌های آلوده به فلزات سنگین به دلیل عملکرد بی‌نظیر آن در تثبیت فلزات سنگین در خاک و آب موردتوجه قرار گرفته است (۷ و ۸). زغال زیستی ماده‌ای متخلخل و کربنی است که از طریق پیرولیز زیست‌توده‌های گیاهی تولید می‌شود. کربن موجود در زغال زیستی به صورت منبع بلندمدت کربن ذخیره یا جایگزین کربن فسیلی در تولید صنعتی می‌شود (۹). ماهیت قلیایی زغال زیستی می‌تواند باعث کاهش غلظت قابل جذب عناصر سنگین فلزی در خاک شود. مقادیر بالاتر pH پس از افزودن زغال زیستی می‌تواند منجر به رسوب فلزات سنگین در خاک شود (۱۰). زغال زیستی همچنین می‌تواند تحرک فلزات سنگین را کاهش و حالت ردوکس (اکسیداسیون و احیاء) آنها را تغییر دهد. به‌عنوان مثال، افزودن زغال زیستی کروم شش ظرفیتی را به فرم کم تحرک‌تر سه ظرفیتی تبدیل می‌کند (۱۱). کاربرد زغال زیستی همچنین تولید، تجمع زیست‌توده و فعالیت فتوسنتزی گیاهان کشت‌شده در خاک‌های آلوده به فلزات را از طریق تنظیم سازوکارهای مختلف بیوشیمیایی و فیزیولوژیک افزایش می‌دهد و همچنین تشکیل گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) را با فعال کردن تولید آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی مانند آسکوربات پراکسیداز (APX)، کاتالاز (CAT)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و پراکسیداز (POX) از بین می‌برد (۱۲).

بر اساس گزارش‌ها، حبوبات و گیاهان روغنی می‌توانند فلزات سنگینی همچون کروم را از خاک جذب و در بافت خود انباشته کنند (۱۳). پژوهش‌های متعدد نشان داده‌اند که گیاه لوبیا چشم‌بلبلی (*V. unguiculata* L.) توانایی بالقوه‌ای در خصوص جذب و انباشت کروم از خاک‌های آلوده دارد (۱۴، ۱۵، ۱۶ و ۱۷).

با توجه به اینکه کروم یک فلز سنگین خطرناک است که منابع آب و خاک را به شدت آلوده می‌کند و یک تهدید زیست‌محیطی جدی به شمار می‌آید (۱۸)؛ پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر افزودن زغال زیستی بر برخی صفات مورفوفیزیولوژیک و همچنین چگونگی القای تنش اکسیداتیو در گیاه زراعی لوبیای چشم‌بلبلی در مقادیر مختلف کروم اجرا شد.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری و در سال ۱۴۰۲ به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام گرفت.

خاک مورد آزمایش: نمونه‌های خاک پس از تهیه، هوا خشک شده و از الک ۲ میلی‌متری عبور داده شدند. برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی از جمله بافت خاک (۱۹)، pH در گل اشباع (۲۰)، قابلیت هدایت الکتریکی در عصاره گل اشباع (۲۱)، کربن آلی (۲۲) و کربنات کلسیم (۲۳) تعیین شدند (جدول ۱).

جدول ۱- برخی مشخصات فیزیکی- شیمیایی خاک مورد آزمایش

Table 1- Some physical and chemical characteristics of the tested soil

بافت خاک Soil texture	اسیدیته pH	هدایت الکتریکی EC (dSm^{-1})	کربن آلی (٪) Organic carbon (%)	کربنات کلسیم (٪) Carbonate calcium (%)	نیتروژن (٪) N (%)	فسفر P ($mg\ kg^{-1}$)	پتاسیم K ($mg\ kg^{-1}$)
لوم-رسی Clay-loam	۷/۷۴	۰/۹۹	۱/۲	۷	۰/۵	۱۲	۳۰۰

تهیه زغال زیستی: ابتدا کاه از مزرعه برنج جمع‌آوری و پس از هوا خشک و خرد شدن، به مدت ۴ ساعت در دمای ۴۰۰ درجه سانتی‌گراد در کوره بدون حضور اکسیژن پیرولیز شد. این فرآیند با استفاده از یک کوره طراحی‌شده در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری انجام گرفت. برخی ویژگی‌های زغال زیستی (جدول -۲) شامل چگالی (۲۴)، قابلیت هدایت الکتریکی، pH، کربن، نیتروژن، فسفر و پتاسیم کل اندازه‌گیری شدند (۲۵).

جدول ۲- برخی ویژگی‌های زغال زیستی مورد استفاده در آزمایش

Table 2- Some characteristics of biochar used in the experiment

چگالی Density ($gr\ cm^{-3}$)	هدایت الکتریکی EC (dSm^{-1})	اسیدیته pH	کربن (٪) C (%)	نیتروژن (٪) N (%)	فسفر P ($mg\ kg^{-1}$)	پتاسیم K ($mg\ kg^{-1}$)
۰/۵۱	۷/۰۲	۹/۲	۵۵/۰۶	۱/۵۳	۵۸۰	۱۵۷۹

کاشت بذر و اعمال تیمارها: سطوح کروم و زغال زیستی مورد استفاده در این آزمایش به ترتیب شامل صفر، ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۵ میلی‌گرم در کیلوگرم و صفر، ۱، ۲ و ۴ درصد وزنی بودند. به منظور دستیابی به سطوح مورد نظر، مقادیر مورد نیاز نمک دی‌کرومات پتاسیم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب حل شده و روی مقدار ۳ کیلوگرم خاک و سطوح زغال زیستی موردنظر اسپری شد و پس از آن که در یک ظرف بزرگ به خوبی مخلوط شدند به گلدان‌های ۳ کیلوگرمی منتقل و به مدت ۴ هفته جهت ایجاد برهم‌کنش‌های بین کروم، زغال زیستی و خاک در شرایط رطوبتی ظرفیت زراعی در گلخانه قرار داده شدند تا تعادل لازم بین آن‌ها برقرار شود. کوددهی گلدان‌ها بر اساس مقادیر توصیه‌شده در آزمون خاک شامل سوپرفسفات تریپل، سولفات پتاسیم (قبل کشت) و اوره (۳ مرحله پس از کشت) به ترتیب ۱۰۰، ۸۰ و ۳۰۰ کیلوگرم در هکتار انجام گرفت که به ترتیب برای هر گلدان معادل ۲، ۱/۶ و ۶ گرم بود. گیاه زراعی مورد استفاده در این پژوهش، لوبیا چشم‌بلبلی رقم مشهد (تهیه‌شده از مرکز تحقیقات حبوبات دزفول) بود. پس از ضدعفونی، تعداد ۱۰ عدد بذر در عمق ۴ سانتی‌متری در گلدان‌های از پیش آماده کشت شدند. گلدان‌ها در گلخانه‌ای با شرایط نور طبیعی و دمای ۲۰/۲۸ (روز/ شب) قرار گرفته و به صورت روزانه، دستی و بر اساس رطوبت ظرفیت زراعی با استفاده از درصد

رطوبت اشباع و بافت خاک آبیاری شدند. همچنین، برای گلدان‌ها از زیر گلدانی استفاده شد تا در صورت خروج آب زهکشی مجدداً به خاک گلدان اضافه گردد. در ادامه گیاهچه‌ها در مرحله ۴ برگی تنک شده و به ۴ بوته در هر گلدان کاهش یافتند.

اندازه‌گیری صفات مورد بررسی

در انتهای رشد رویشی گیاه (BBCH 50) صفات قطر و ارتفاع بوته، رنگدانه‌ها، نشت الکترولیت، پراکسید هیدروژن و آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز اندازه‌گیری شدند. قطر ساقه با استفاده از یک کولیس دیجیتال (مدل Guanglu) اندازه‌گیری و بر اساس واحد میلی‌متر گزارش شد. ارتفاع بوته نیز با استفاده از یک خط‌کش اندازه‌گیری گردید. پس از تفکیک اندام هوایی و ریشه از یکدیگر، نمونه‌ها به مدت ۷۲ ساعت در آون با دمای ۷۰ سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از رسیدن به وزن خشک ثابت با استفاده از ترازوی حساس ۰/۰۰۱ (HR-100i) ساخت کشور ژاپن وزن شدند. همچنین، به‌منظور اندازه‌گیری کلروفیل‌های a و b و کاروتنوئید، تعداد شش عدد نمونه برگی پانچ شده از آخرین برگ‌های توسعه‌یافته گیاه، برداشت و در هشت میلی‌لیتر متانول قرار داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی و در دمای اتاق قرار گرفتند. سپس میزان جذب نوری محلول حاصل در طول‌موج‌های ۶۶۵/۲، ۶۵۲/۴ و ۴۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Analytic jena- SPEKOL 1300) قرائت و ثبت شدند. در انتها مقادیر کلروفیل a (Chl_a)، b (Chl_b) و کاروتنوئید به ترتیب با استفاده از روابط ۱ تا ۳ محاسبه شدند (۲۶).

$$\text{Chl a } (\mu g/ml) = 16.72\ A_{665.2} - 9.16\ A_{652.4} \quad (1)$$

$$\text{Chl b } (\mu g/ml) = 34.09\ A_{652.4} - 15.28\ A_{665.2} \quad (2)$$

$$\text{Carotenoid } (\mu g/ml) = (1000\ A_{470} - 1.63\ \text{Chl a} - 104.96\ \text{Chl b})/221 \quad (3)$$

جهت اندازه‌گیری نشت الکترولیت، نمونه‌های برگی از آخرین برگ‌های توسعه‌یافته گیاه در فالکن حاوی ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر قرار گرفته و پس از گذشت ۲۴ ساعت هدایت الکتریکی هر نمونه با استفاده از دستگاه EC متر (CON 410) اندازه‌گیری شد (EC_1). در ادامه، فالکن‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دستگاه بن‌ماری در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده و پس از سرد شدن مجدداً هدایت الکتریکی نمونه‌ها ثبت شدند (EC_2). سپس درصد نشت الکترولیت با استفاده از رابطه ۴ محاسبه شد (۲۷).

$$\text{درصد نشت الکترولیت} = EC_1/EC_2 \times 100 \quad (4)$$

به منظور سنجش شاخص‌های بیوشیمیایی، پس از پایان دوره رشد رویشی و پیش از مرحله گلدهی از آخرین برگ‌های توسعه‌یافته گیاه نمونه برگی تهیه و در ورقه‌های فویل آلومینیمی قرار داده شده و در نیتروژن مایع قرار گرفتند و تا زمان انجام آزمایش‌های مربوطه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. قرائت این پارامترها نیز با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Analytic jena- SPEKOL 1300) در طول‌موج‌های مورد نظر انجام شدند.

اندازه‌گیری آنزیم‌ها

کاتالاز: جهت استخراج محلول آنزیمی کاتالاز، ۰/۵ گرم از نمونه برگی با استفاده از نیتروژن مایع هضم و سپس مقدار ۵ میلی‌لیتر بافر فسفات حاوی EDTA ۰/۵ مولار به آن اضافه و سانتریفیوژ شد (۲۸). محلول آنزیمی حاصله به روش ابی و همکاران (۱۹۸۴) با

افزودن پراکسید هیدروژن و بافر فسفات آماده شده و قرائت در طول‌موج ۲۴۰ نانومتر در مدت ۱ دقیقه ثبت شد. فعالیت آنزیمی با محاسبه میزان پراکسید هیدروژن تجزیه‌شده به واسطه آنزیم محاسبه شد (۲۹).

پراکسید هیدروژن: برای این منظور پس از هضم نمونه برگی با استفاده از نیتروژن مایع به ۰/۲ گرم از آن محلول ۰/۱ درصد تری کلرواستیک اسید (وزنی–حجمی) اضافه و سانتریفیوژ شدند. پس از افزودن بافرفسفات و یدید پتاسیم به محلول آنزیمی به‌دست‌آمده میزان جذب در طول موج ۳۹۰ نانومتر قرائت شد (۳۰).

سوپراکسید دیسموتاز: سنجش فعالیت این آنزیم به ترتیب با کمک ۱- بافر فسفات حاوی EDTA، متیونین و NBT و ۲- بافر ریبوفلاوین بر اساس روش بوچمپ و فریدروویچ (۱۹۷۱) در طول‌موج ۵۶۰ نانومتر انجام شد (۳۱).

تجزیه‌وتحلیل داده‌ها: ابتدا آزمون نرمال بودن داده‌ها با استفاده از روش کولموگروف–اسمیرنوف انجام و سپس محاسبات آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS (نسخه۲۲) صورت گرفت. در ادامه، میانگین‌ها بر اساس آزمون حداقل تفاوت معنی‌داری (LSD) در سطح احتمال ۵ درصد مقایسه و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel انجام شد.

نتایج و بحث

صفات مورفولوژیک: با توجه به نتایج آنالیز واریانس داده‌ها، اثر سطوح مختلف زغال زیستی و کروم بر صفات مورفولوژیک لوبیا چشم‌بلبلی معنی‌دار بودند. بین تیمارهای بکاررفته به غیر از صفت قطر ساقه در سایر صفات برهم‌کنش معنی‌داری مشاهده شد (جدول ۳).

جدول ۳- نتایج آنالیز واریانس اثر سطوح زغال زیستی بر برخی صفات مورفولوژیک لوبیا چشم‌بلبلی کشت‌شده در خاک آلوده به کروم

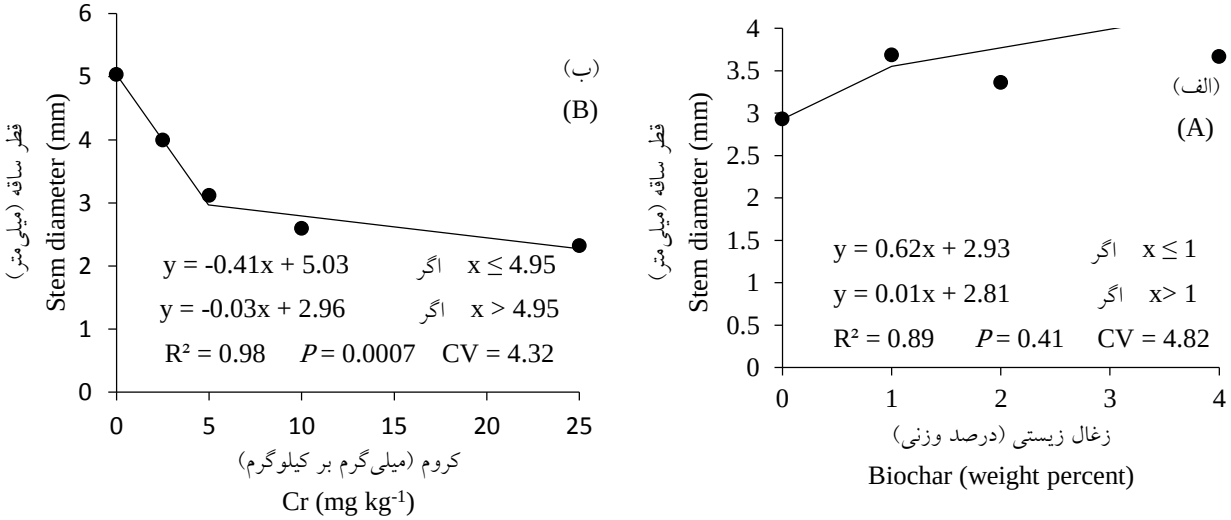
Table 3- Variance analysis of the effect of biochar levels on some morphological traits of cowpea grown in Cr-contaminated soil

		میانگین مربعات Mean of square				
منابع تغییرات (S.O.V)	درجه آزادی (df)	قطر ساقه (Stem diameter)	ارتفاع بوته (Plant height)	وزن خشک (Dry weight)		
				اندام هوایی (Shoot)	ریشه (Root)	کل (Total)
زغال زیستی (B)	3	1.87**	178.56**	245.62**	64.32**	557.63**
کروم (Cr)	4	14.75**	152.18**	343.5**	28.12**	564.6**
زغال زیستی × کروم (B × Cr)	12	0.19ns	5.55*	2.93*	0.51*	2.88*
خطای آزمایش (E)	40	0.16	2.21	1.38	0.24	1.20
ضریب تغییرات (٪) CV (%)		11.83	6.79	8.7	8.83	5.72

**، *، ns به ترتیب معنی‌داری در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد و غیر معنی‌دار

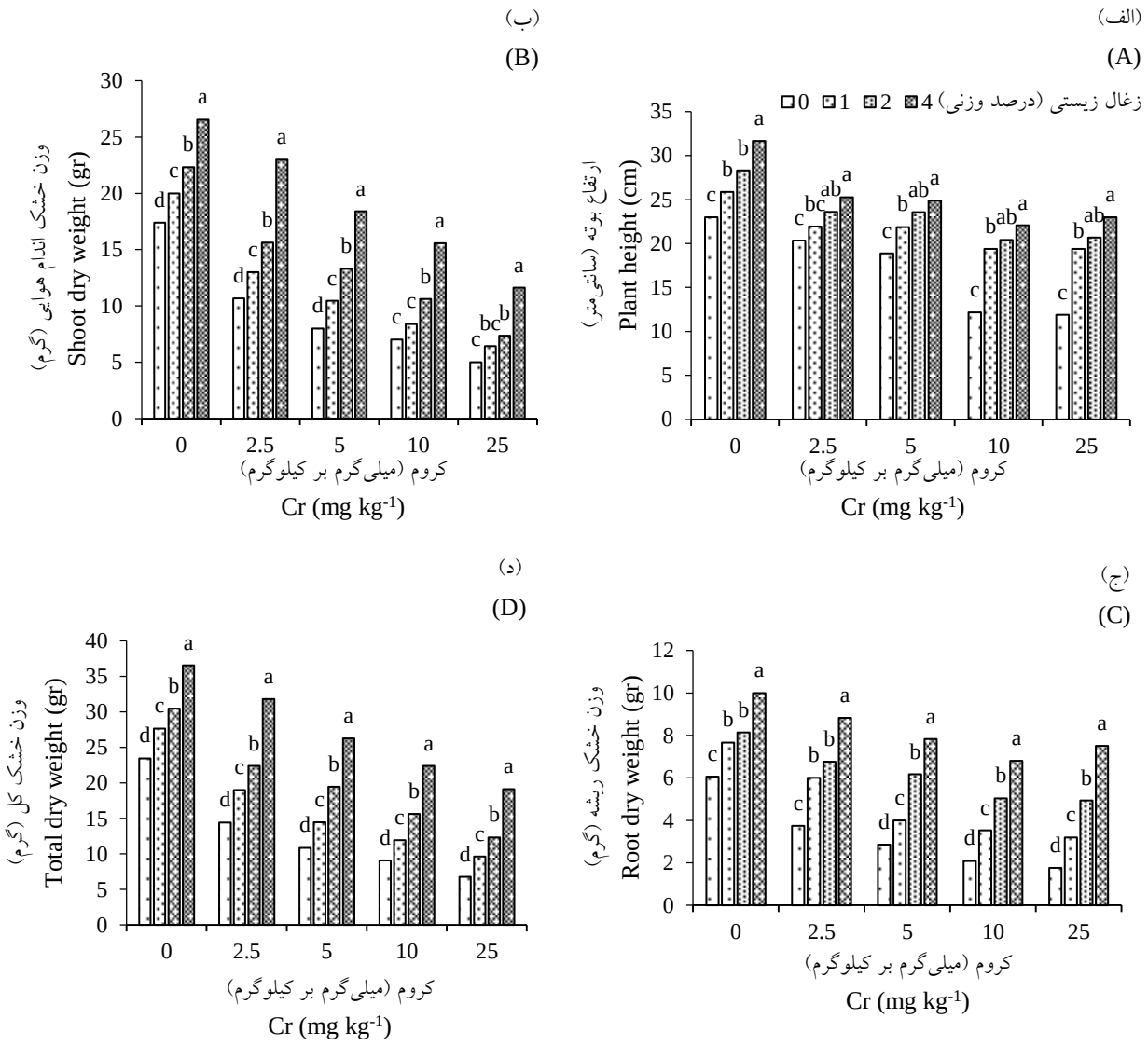
**, *, ns Significant differences at 1% and 5% levels and non-significant difference, respectively

بر اساس یافته‌ها با افزودن سطوح زغال زیستی و کروم، روند تغییرات قطر ساقه به‌صورت دوتکه‌ای و با ضرایب تبیین به ترتیب ۰/۸۹ و ۰/۹۸ بود. قطر ساقه به ترتیب با افزایش سطح زغال زیستی با شیب مثبت (ابتدا ۰/۶۲+ و سپس ۰/۰۱۵+) افزایش و کروم با شیب منفی (ابتدا ۰/۴۱– و سپس ۰/۰۳۴–) کاهش یافت. بیشترین قطر ساقه (۵/۵ میلی‌متر) در تیمار زغال زیستی ۴ درصد وزنی به دست آمد که نسبت به شاهد و سطح کروم ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به ترتیب ۱۶/۶۰ و ۶۳/۶۳ درصد بیشتر بود (شکل ۱–الف و ب). همچنین مقایسه میانگین اثر سطوح زغال زیستی بر صفات مورفولوژیک دیگر نشان دهنده این بود که بیشترین ارتفاع بوته با ۳۱/۶۶ سانتی‌متر (شکل ۲–الف)، وزن خشک اندام هوایی با ۲۱/۵۵ گرم در گلدان (شکل ۲–ب)، ریشه با ۷/۹۶ گرم در گلدان (شکل ۲–ج) و کل با ۲۹/۵۲ گرم در گلدان (شکل ۲–د) همواره در گلدان‌های تیمار سطح زغال زیستی ۴ درصد وزنی و کروم صفر به دست آمد. در مقابل، کمترین میزان در تیمارهای سطح ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم کروم و زغال زیستی صفر با ۶۲/۴۷، ۵۵/۴۱، ۵۸/۵ و ۵۶/۲۴ درصد کاهش (به ترتیب ۱۷/۲۵ سانتی‌متر، ۸۱/۱۵، ۸۲/۳۲ و ۶۱/۴۷ گرم) مشاهده شد.



شکل ۱- اثر سطوح زغال زیستی (الف) و کروم (ب) بر قطر ساقه

Fig.1. Effect of biochar (A) and Cr (B) levels on stem diameter



شکل ۲- برش‌دهی برهم‌کنش سطوح زغال زیستی و کروم بر ارتفاع بوته (الف) و وزن خشک اندام هوایی (ب)، ریشه (ج) و کل بوته (د). در هر سطح کروم میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه، تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) ندارند.

Fig. 2. Interaction slicing of biochar and Cr levels on plant height (A), shoot (B), root (C) and total dry weight (D). At each Cr level, the means with the same letter(s) are not significantly different at the 5% level based on the least significant difference (LSD) test.

به نظر می‌رسد افزودن زغال زیستی منجر به افزایش دسترسی به مواد غذایی (۳۲)، افزایش ظرفیت نگهداری آب در خاک و همچنین تماس ریشه با خاک از طریق کمک به توسعه سامانه ریشه‌ای (۷) می‌گردد. افزون بر این، زغال زیستی سرشار از مواد معدنی از جمله کربن معدنی، منیزیم و کلسیم است که بر رشد و مورفولوژی گیاه اثر مثبتی دارد (۳۳). در مقایسه، فلزات سنگین با اثر منفی که بر رشد و فتوسنتز دارند، به صورت غیرمستقیم زیست‌توده گیاهی را متأثر می‌سازند (۳۴). سمیت کروم نیز از طریق ایجاد تنش اکسیداتیو بر چندین فرآیند فیزیولوژیک همانند فسفوریلاسیون، فتوسنتز و سایر فعالیت‌های آنزیمی تأثیر

می‌گذارد. از میان صفات مورد اندازه‌گیری می‌توان وزن خشک اندام هوایی و ریشه را به عنوان یک معیار حساسیت گیاه در برابر تنش کروم در خاک در نظر گرفت (۳۵). کاهش رشد اندام هوایی و زیست‌توده خشک به دلیل سمیت کروم در گونه‌های مختلف گیاهی از جمله گندم، ماش، اسفناج، خردل، آفتابگردان و غیره نیز گزارش شده است (۳۶، ۳۷ و ۳۸).

صفات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی: با توجه به نتایج آنالیز واریانس داده‌ها، اثر اصلی زغال زیستی و کروم در تمامی صفات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی توانست تفاوت معنی‌داری را در سطح ۱ درصد ایجاد کند. برهم‌کنش دو عامل تنها بر مقدار کلروفیل b و فعالیت دو آنزیم کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۴).

جدول ۴- نتایج آنالیز واریانس اثر سطوح زغال زیستی بر برخی صفات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی لوبیا چشم‌بلبلی کشت‌شده در خاک آلوده به کروم

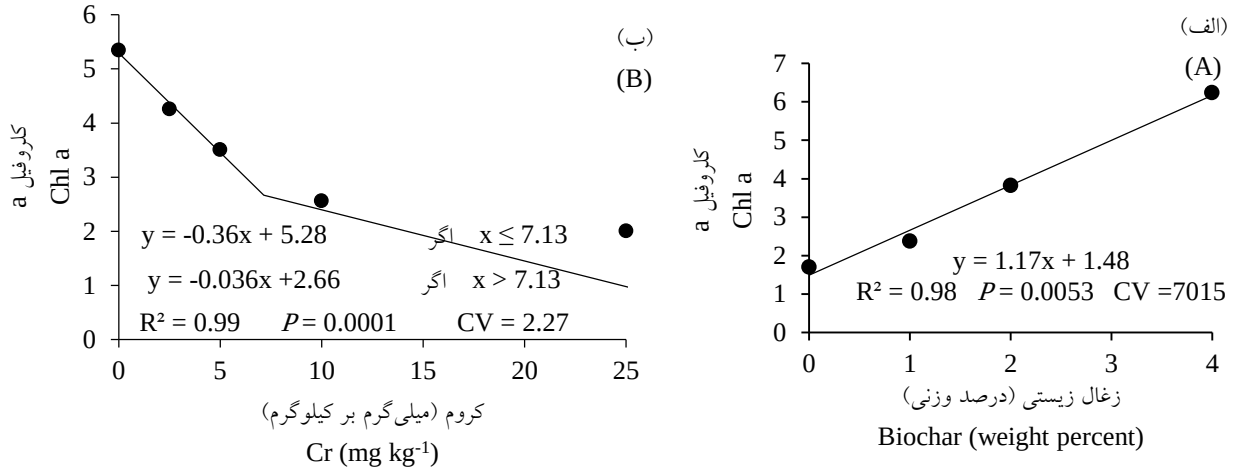
Table 4- Variance analysis of the effect of biochar levels on some physiological and biochemical traits of cowpea grown in Cr-contaminated soil

		میانگین مربعات Mean of square						
منابع تغییرات (S.O.V)	درجه آزادی (df)	کلروفیل a (Chl a)	کلروفیل b (Chl b)	کاروتنوئید (Carotenoid)	نشت الکترولیت (Electrolyte leakage)	پراکسید هیدروژن (Hydrogen peroxide)	کاتالاز (Catalase)	سوپراکسید دیسموتاز (Superoxide dismutase)
زغال زیستی (B)	3	60.57**	11.55**	5.18**	4209.26**	0.07**	1.32**	0.27**
کروم (Cr)	4	21.22**	25.35**	1.58**	6187.54**	0.65**	1.69**	0.97**
زغال زیستی × کروم (B × Cr)	12	0.77ns	2.3**	0.04ns	205.58ns	0.01ns	0.07**	0.01**
خطای آزمایش (E)	40	0.7	0.012	0.09	124.35	0.008	0.0009	0.006
ضریب تغییرات (٪) CV (%)		23.66	5.42	25.83	20.72	15.2	4.75	5.05

**، *، ns به ترتیب معنی‌داری در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد و غیر معنی‌دار

**, *, ns Significant differences at 1% and 5% levels and non-significant difference, respectively

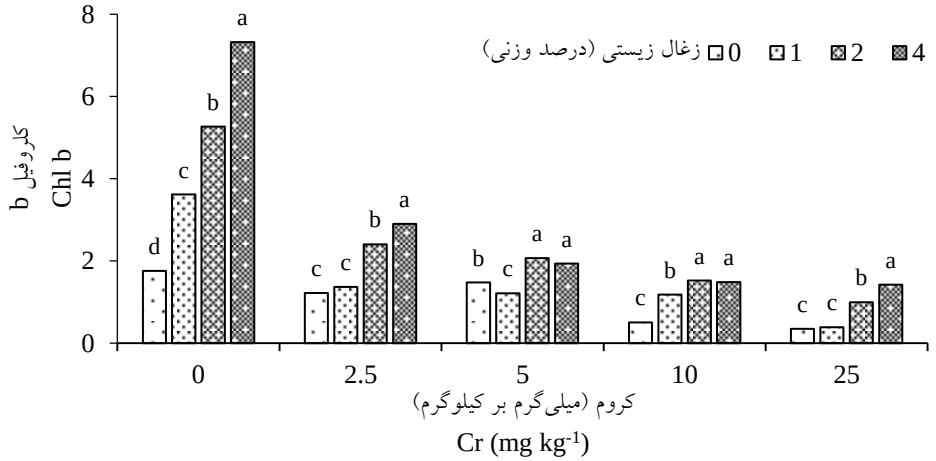
رنگدانه‌ها: روند پاسخ محتوای کلروفیل a به افزایش سطوح زغال زیستی و کروم به ترتیب به صورت خطی (R^2 =۰/۹۸) و دوتکه‌ای (R^2 =۰/۹۹) بود. محتوای این رنگدانه پاسخ مثبتی (شیب‌خط ۱/۱۷+) به افزایش مقدار زغال زیستی نشان داد. در مقایسه، افزایش غلظت کروم تأثیر منفی و معنی‌داری (با شیب‌خط ۰/۳۶۷- و سپس ۰/۳۶۸-) بر این رنگدانه داشت (شکل ۳). محتوای این رنگدانه به ترتیب در سطح ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم کروم و زغال زیستی ۴ درصد وزنی کمترین و بیشترین (۰/۶ و ۹) مقدار را داشت که نسبت به تیمار شاهد به ترتیب ۹۲/۸۸ و ۶۴/۵۱ درصد کاهش و افزایش را نشان داد.



شکل ۳- اثر سطوح زغال زیستی (الف) و کروم (ب) بر محتوای کلروفیل a

Fig. 3. Effects of biochar (A) and Cr (B) levels on chlorophyll a content

با توجه به مقایسه میانگین داده‌ها (شکل ۴)، همواره سطح ۴ درصد وزنی زغال زیستی در تمامی سطوح کروم بالاترین محتوای کلروفیل b (به ترتیب ۷/۳، ۲/۹، ۱/۹، ۱/۴۸ و ۱/۴۲) را دارا بود. با افزایش سطح کروم محتوای کلروفیل b کاهش یافت و کمترین میزان در سطح ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم و بدون کاربرد زغال زیستی (۰/۳۴) مشاهده شد به این صورت که نسبت به سطح ۴ درصد وزنی زغال زیستی و شاهد به ترتیب ۹۵/۲۷ و ۸۰/۲۹ درصد کمتر بود.

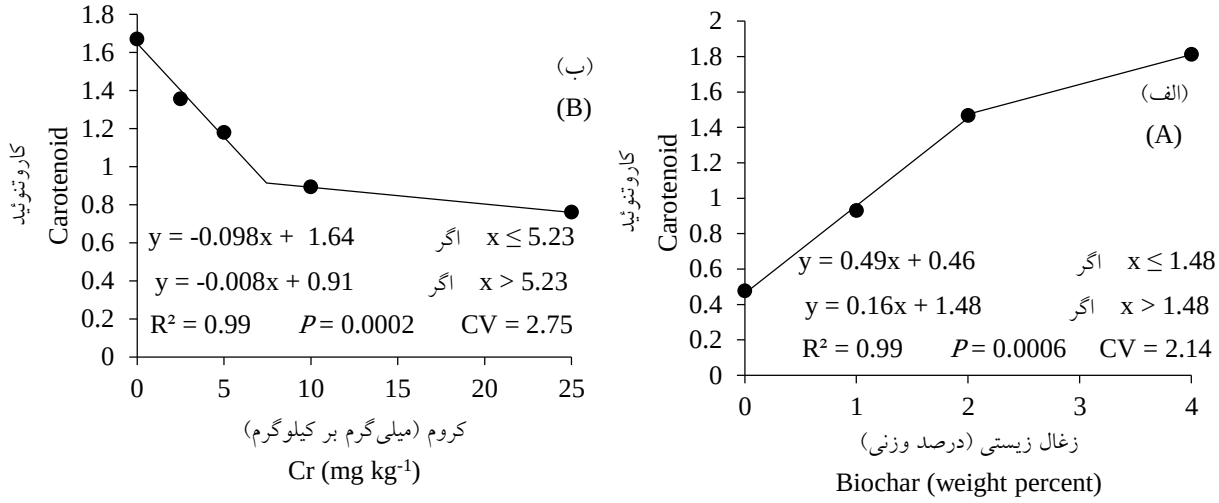


شکل ۴- برش‌دهی برهم‌کنش سطوح زغال زیستی و کروم بر محتوای کلروفیل b. در هر سطح کروم میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه، تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) ندارند.

Fig. 4. Interaction slicing of biochar and Cr levels on chlorophyll b content. At each Cr level, the means with the same letter(s) are not significantly different at the 5% level based on the least significant difference (LSD) test.

کاروتنوئید: روند پاسخ این پارامتر به افزایش سطح زغال زیستی و کروم از مدل دوتکه‌ای (هر دو با R^2 =۰/۹۹) تبعیت کرد. افزایش سطح زغال زیستی موجب افزایش محتوای کاروتنوئید (با شیب‌خط ۰/۴۹۵ و سپس ۰/۱۶۸) و افزایش غلظت کروم روند کاهشی و منفی (با شیب‌خط ۰/۰۹۸- و سپس ۰/۰۰۹-) را نشان داد (شکل ۵). محتوای این رنگدانه نیز در دو تیمار سطح

۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم کروم و زغال زیستی ۴ درصد وزنی به ترتیب کمترین و بیشترین (۰/۱ و ۲/۴) مقدار را نشان دادند که به ترتیب نسبت به شاهد ۹۵/۳۶ و ۶۶/۲ درصد کاهش و افزایش داشتند.

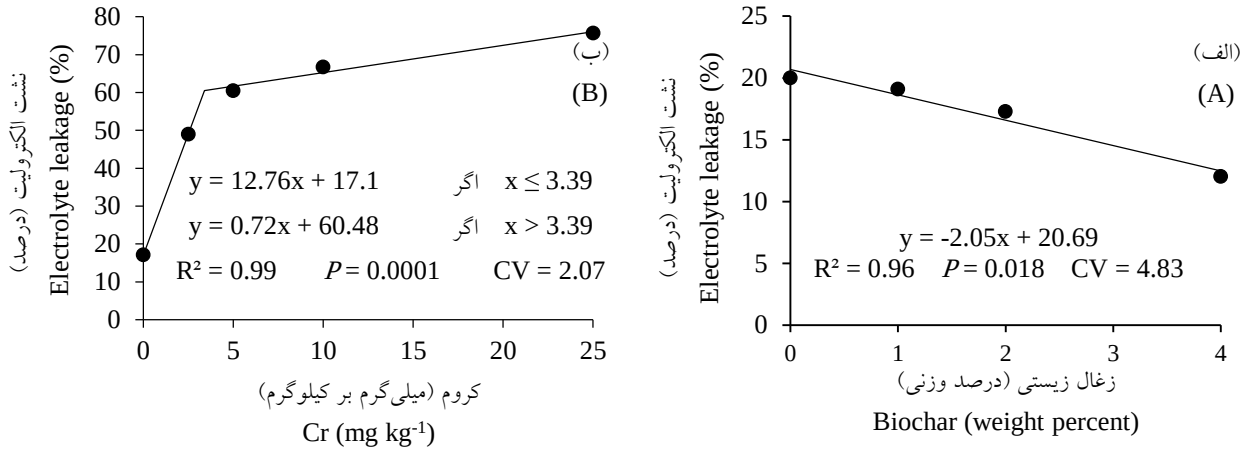


شکل ۵- اثر سطوح زغال زیستی (الف) و کروم (ب) بر محتوای کاروتنوئید

Fig. 5. Effect of biochar (A) and Cr (B) levels on carotenoid content

کاهش محتوای کلروفیل ناشی از سمیت کروم می‌تواند به دلیل ایجاد تغییر در ساختار کلروپلاست، جلوگیری از سنتز رنگدانه و همچنین تجزیه کلروفیل ناشی از افزایش فعالیت کلروفیلاز و تولید گونه‌های فعال اکسیژن باشد (۳۹). در میان مولکول‌های آنتی‌اکسیدان در سامانه دفاعی گیاه در برابر آسیب اکسیداتیو، کاروتنوئیدها در از بین بردن گونه‌های فعال اکسیژن بسیار مؤثر هستند و از سلول محافظت می‌کنند (۴۰)، بنابراین کاهش محتوای رنگدانه‌ها طی تنش به ضرر گیاه تمام خواهد شد. انواع زغال زیستی اصلاح‌کننده بسیار مهمی برای خاک هستند زیرا نه‌تنها منبع غنی از بسیاری از عناصر غذایی مهم مانند کربن، نیتروژن و گوگرد هستند که با سرعت‌های متفاوتی آزاد شده و حاصلخیزی را تحت تأثیر قرار می‌دهند (۴۱) بلکه با افزایش ظرفیت نگهداری آب در خاک و تماس ریشه با خاک از طریق کمک به توسعه سامانه ریشه‌ای (۶) درمجموع به بهبود پارامترهای رشد از جمله محتوای رنگدانه گیاه کمک می‌کنند.

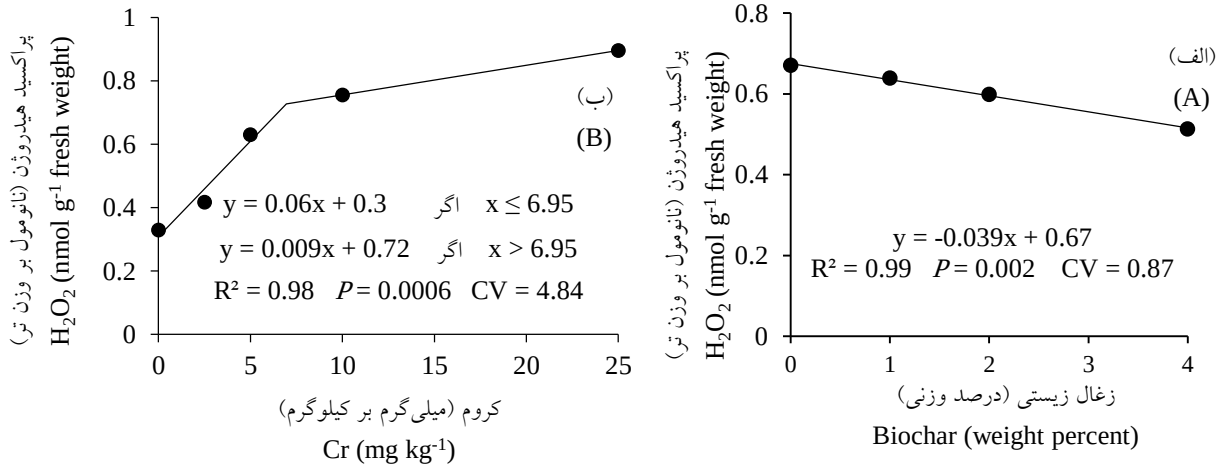
نشت الکترولیت: با توجه به نتایج تجزیه واریانس (جدول ۴) تنها اثرات ساده زغال زیستی و کروم بر نشت الکترولیت معنی‌دار شد. با افزایش سطح زغال زیستی نشت الکترولیت به صورت خطی (۰/۹۶ $= R^2$ و شیب‌خط ۲/۰۵-) کم شد، اما افزایش غلظت کروم به صورت یک مدل دوتکه‌ای (۰/۹۹ $= R^2$) و (با شیب‌خط ۱۲/۷۷۶ و سپس ۰/۷۲) مقدار این صفت را افزایش داد. بیشترین میزان نشت در سطح کروم ۲۵ میلی‌گرم در کیلوگرم (۹۳/۷۱ درصد) مشاهده شد که نسبت به تیمارهای ۲۵ میلی‌گرم در کیلوگرم کروم همراه زغال زیستی ۴ درصد وزنی و شاهد به ترتیب ۳۶/۹۴ و ۷۳/۷۱ درصد افزایش نشان داد (شکل ۶). به نظر می‌رسد نشت الکترولیت در برابر غلظت کروم بسیار حساس بوده و با اندازه‌گیری آن می‌توان برآوردی از میزان آسیب غشایی ناشی از تنش فلز کروم را به دست آورد. افزایش نشت الکترولیت می‌تواند ناشی از تحریک تولید گونه‌های فعال اکسیژن باشد (۸۷). افزایش نشت الکترولیت ناشی از سمیت کروم در اسفناج (۴۲) و ارقام برنج (۳۸) نیز پیش‌تر گزارش شده بود.



شکل ۶- اثر سطوح زغال زیستی (الف) و کروم (ب) بر درصد نشت الکترولیت

Fig. 6. Effect of biochar (A) and Cr (B) levels on electrolyte leakage percent

پراکسید هیدروژن: بر اساس نتایج تجزیه واریانس (جدول ۴) تنها اثرات اصلی سطوح زغال زیستی و کروم بر میزان پراکسید هیدروژن در گیاه معنی‌دار بود. با افزایش میزان کاربرد زغال زیستی تولید پراکسید هیدروژن با یک روند خطی (۰/۹۹= R^2 و شیب‌خط ۰/۰۳۹-) کم شد. پاسخ پراکسید هیدروژن به افزایش سطح کروم از یک مدل دوتکه‌ای (R^2 =۰/۹۸) با شیب‌خط (ابتدا ۰/۰۶ و سپس ۰/۰۰۹) پیروی کرد. بیشترین میزان تولید پراکسید هیدروژن (۰/۶۷ نانو مول بر وزن تر) در تیمار کروم سطح ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم ثبت شد که نسبت به تیمارهای شاهد و زغال زیستی ۴ درصد وزنی به ترتیب ۶۵/۳۸ و ۶۷/۵۷ درصد افزایش نشان داد (شکل ۷).



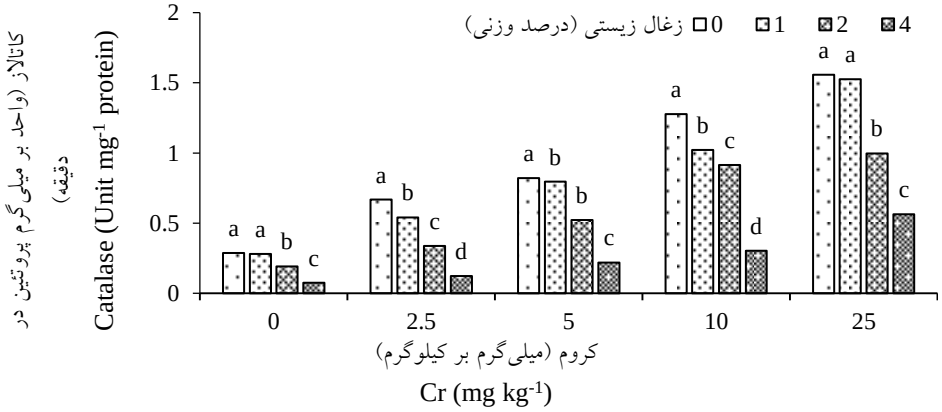
شکل ۷- اثر سطوح زغال زیستی (الف) و کروم (ب) بر تولید پراکسید هیدروژن

Fig. 7. Effect of biochar (A) and Cr (B) levels on hydrogen peroxide **production**

پراکسید هیدروژن نقشی کلیدی در فرآیندهای سلولی دارد و در اندامک‌هایی چون میتوکندری، کلروپلاست و پراکسی‌زوم تولید می‌شود. این گونه فعال اکسیژن در مقادیر اندک نقش پیام‌رسان را ایفاء می‌کند اما به دنبال تنش و ایجاد مقادیر بالاتر سبب ایجاد مسمومیت در سلول می‌گردد. میزان این ماده در گیاه از جمله شاخص‌های مهم در ارزیابی شدت تنش می‌باشد

که طی حضور فلزات سنگین افزایش می‌یابد (۴۳). در پژوهش مشابهی در کاهو میزان تولید این ماده از ۰/۹ در سطح صفر کروم به ۱/۲۹ میکرو مول بر گرم در بالاترین سطح کروم (۱۵ میلی‌گرم بر لیتر) رسید (۴۴).

کاتالاز: اثرات اصلی و برهم‌کنش زغال زیستی و کروم بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز کاملاً معنی‌دار بود (جدول ۴). مطابق شکل ۱۱ گیاهانی که تحت غلظت‌های بالای کروم قرار گرفته بودند از فعالیت بالاتر آنزیم کاتالاز برخوردار بودند. با این حال، استفاده از زغال زیستی در تمامی سطوح کروم فعالیت کاتالاز را کاهش داد. در تمام سطوح کروم به ترتیب سطح زغال زیستی ۴ درصد وزنی و عدم استفاده از زغال زیستی همواره کمترین و بیشترین میزان تولید این آنزیم را داشتند. بیشترین میزان تولید این آنزیم در سطح کروم ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم و عدم کاربرد زغال زیستی (۱/۵۵ واحد آنزیمی بر میلی‌گرم پروتئین در دقیقه) مشاهده شد که نسبت به سطح زغال زیستی ۴ درصد وزنی و شاهد (۰/۰۷ و ۰/۲ واحد آنزیمی بر میلی‌گرم پروتئین در دقیقه) به ترتیب ۹۵/۱۲ و ۸۱/۵۶ درصد بیشتر بود.



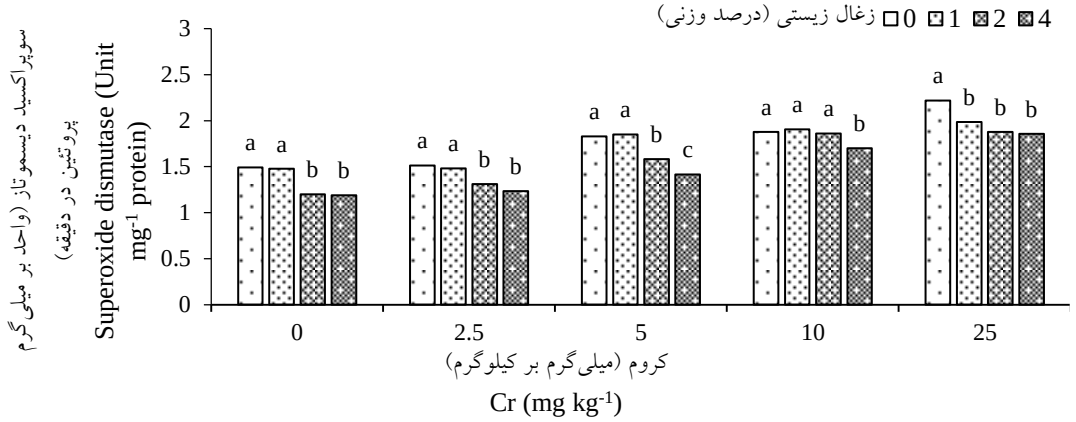
شکل ۸- برش‌دهی برهم‌کنش سطوح زغال زیستی و کروم بر تولید کاتالاز. در هر سطح کروم میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه، تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) ندارند.

Fig. 8. Interaction slicing of biochar and Cr levels on catalase production. At each Cr level, the means with the same letter(s) are not significantly different at the 5% level based on the least significant difference (LSD) test.

کاتالاز از جمله آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی مهمی می‌باشد که از تولید گونه‌های فعال اکسیژن ممانعت به عمل می‌آورد. در پژوهش حاضر نیز با توجه به نتایج به دست آمده (شکل ۸)، با افزایش سطح کروم میزان تولید پراکسید هیدروژن (نوعی از گونه‌های فعال اکسیژن) نیز افزایش یافت که گواه آسیب وارده به سلول‌ها می‌باشد. بنابراین افزایش سطح کروم موجب بیشتر شدن فعالیت آنزیم کاتالاز می‌گردد که ناشی از افزایش تولید رادیکال‌های آزاد است (۴۵). از سویی، زغال زیستی ابتدا خواص خاک را بهبود می‌بخشد و با ایجاد محیطی پایدار برای ریشه‌ها مانع از بروز اثرات منفی ناشی از تنش اکسیداتیو می‌گردد (۴۶).

سوپراکسید دیسموتاز: بر اساس تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۴)، اثرات اصلی و برهم‌کنش سطوح زغال زیستی و کروم بر میزان تولید سوپراکسید دیسموتاز تفاوت معنی‌داری را نشان دادند. همچنین در مقایسه میانگین داده‌ها، همواره با افزایش سطح کروم میزان تولید سوپراکسید دیسموتاز افزایش یافت و بالاترین میزان تولید آن (۲/۲۱ واحد آنزیمی بر میلی‌گرم پروتئین در دقیقه) در سطح ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم کروم و عدم استفاده از زغال زیستی مشاهده شد که نسبت به سطح زغال زیستی ۴

درصد وزنی و شاهد (۱/۴ و ۱/۱ واحد آنزیمی بر میلی‌گرم پروتئین در دقیقه) به ترتیب ۴۶/۳۲ و ۳۲/۸ درصد افزایش نشان داد. در تمامی غلظت‌های کروم خاک، سطح زغال زیستی ۴ درصد وزنی همیشه کمترین میزان تولید این آنزیم را نشان داد (شکل ۹).



شکل ۹- برش‌دهی برهم‌کنش سطوح زغال زیستی و کروم بر تولید آنزیم سوپراکسید دیسموتاز. در هر سطح کروم میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه، تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) ندارند.

Fig. 9. Interaction slicing of biochar and Cr levels on superoxide dismutase production. At each Cr level, the means with the same letter(s) are not significantly different at the 5% level based on the least significant difference (LSD) test.

سوپراکسید دیسموتاز اولین ماده در خط دفاعی گیاه در برابر تنش‌ها می‌باشد. این آنزیم سبب تبدیل رادیکال‌های سوپراکسید به پراکسید هیدروژن شده که در ادامه به آب و اکسیژن تجزیه می‌شود (۴۷)؛ بنابراین گیاه با استفاده از این سامانه آنزیمی با آسیب وارده ناشی از فلز سنگین مقابله می‌کند (۴۸). همچنین، کاربرد زغال زیستی در خاک می‌تواند سازوکار دفاع آنتی‌اکسیدانی قدرتمندی را در برابر گونه‌های فعال اکسیژن به وجود آورد (۴۹). به‌علاوه، ویژگی‌های مثبت ناشی از کاربرد زغال زیستی را همچنین می‌توان به کاهش جذب کروم در گیاه از طریق جذب سطحی، رسوب و یا تشکیل کمپلکس روی زغال زیستی نسبت داد که منجر به افزایش رشد گیاه می‌گردد (۵۰). سطح زغال زیستی معمولاً دارای بار منفی است، اما بارهای سطحی مثبت نیز وجود دارند (۵۱). اثر بهبود مشاهده شده ناشی از کاربرد زغال زیستی می‌تواند با جذب کروم (سه و شش ظرفیتی) در سطوح باردار زغال زیستی از طریق جاذبه‌های الکترواستاتیک مرتبط باشد (۵۲). در فرآیند کاهش فراهمی زیستی کروم اجزای معدنی زغال زیستی شامل فسفات‌ها و کربنات‌ها (۵۳) و گروه‌های عاملی حاوی اکسیژن و هیدروژن (۵۰) دخیل هستند. زغال زیستی همچنین از طریق اهدای الکترون، فرم خطرناک شش ظرفیتی کروم را به فرم با تحرک و انحلال‌پذیری کمتر سه ظرفیتی احیاء می‌کند (۵۴).

همبستگی صفات بیوشیمیایی: بر اساس یافته‌ها (جدول ۵) بین وزن خشک و تولید پراکسید هیدروژن، فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در گیاه همبستگی منفی و معنی‌داری (به ترتیب $r=-۰/۸۱۱^{**}$، $r=-۰/۸۴۷^{**}$ و $r=-۰/۸۹۳^{**}$) مشاهده شد. همچنین همبستگی بین تولید پراکسید هیدروژن و فعالیت دو آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز مثبت و معنی‌دار (به ترتیب با ضریب همبستگی $r=۰/۸۶۱^{**}$ و $r=۰/۸۶۷^{**}$) بود. این یافته نشان می‌دهد که این آنزیم‌ها به صورت هماهنگ در پاسخ به تنش اکسیداتیو عمل می‌کنند.

جدول ۵- ضرایب همبستگی بین صفات مورد مطالعه و وزن خشک اندام هوایی در لوبیا چشم‌بلبلی

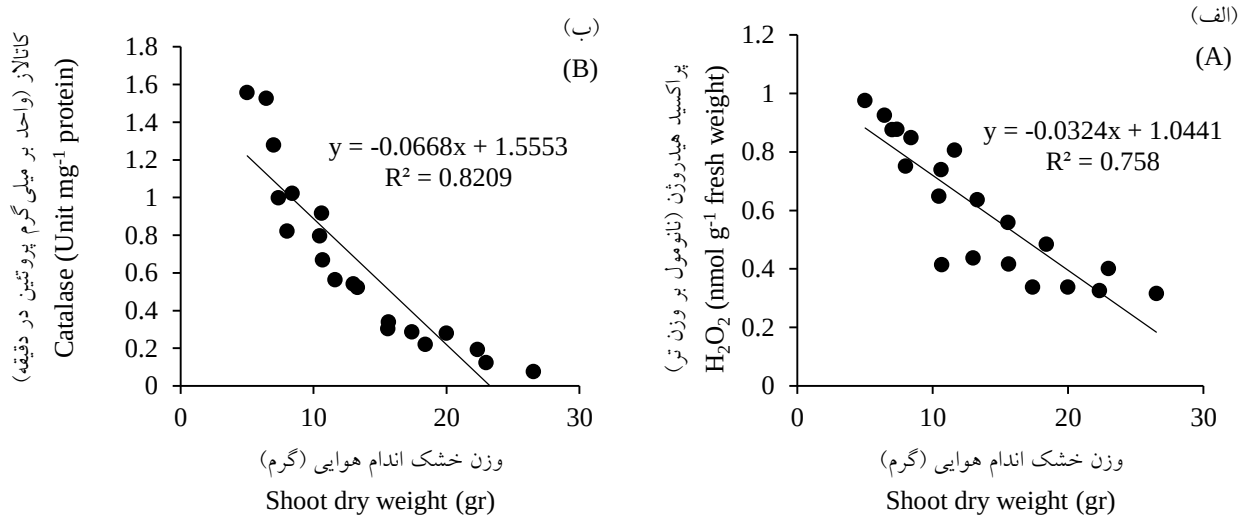
Table 5- Correlation coefficients between studied traits and shoot dry weight in cowpea

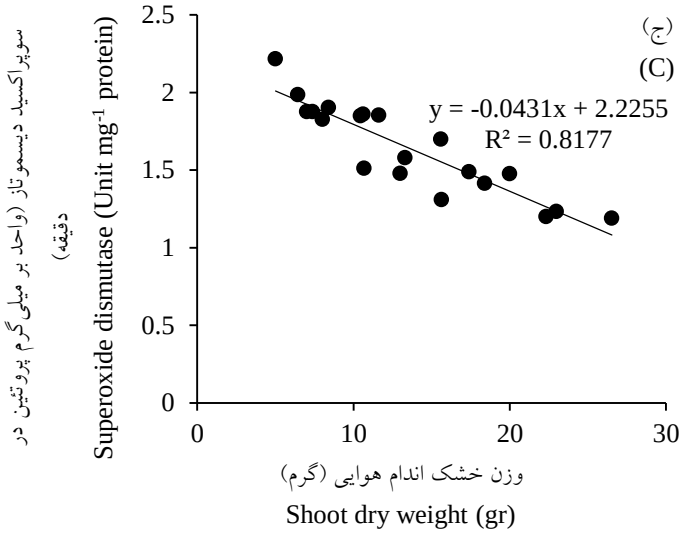
پارامتر (Parameter)	وزن خشک اندام هوایی (SDW)	کاتالاز (CAT)	سوپراکسید دیسموتاز (SOD)	پراکسید هیدروژن (H_2O_2)
وزن خشک اندام هوایی (SDW)	1			
کاتالاز (CAT)	-0.89**	1		
سوپراکسید دیسموتاز (SOD)	-0.85**	0.85**	1	
پراکسید هیدروژن (H_2O_2)	-0.81**	0.87**	0.86**	1

**، *، ns به ترتیب معنی‌داری در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد و غیر معنی‌دار

**, *, ns Significant differences at 1% and 5% levels and non-significant difference, respectively

بر اساس یافته‌ها، یک رابطه خطی کاهشی بین وزن خشک گیاه و میزان تولید پراکسید هیدروژن (R^2 =۰/۷۵۸ و شیب‌خط ۰/۰۳۲۴-) مشاهده شد (شکل ۱۰-الف). رابطه بین وزن خشک گیاه و فعالیت آنزیم کاتالاز نیز خطی و کاهشی (۰/۸۲= R^2 و شیب‌خط ۰/۰۶۶۸-) بود (شکل ۱۰-ب). شیب منفی نشان دهنده این است که با کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز، وزن خشک گیاه افزایش می‌یابد. همچنین بین وزن خشک گیاه و فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز نیز یک رابطه خطی کاهشی (۰/۸۱۷۷= R^2 و شیب‌خط ۰/۰۴۳۱-) مشاهده شد (شکل ۱۰-ج) و این احتمالاً به این دلیل است که انرژی به‌جای آنکه صرف تولید آنزیم‌ها شود صرف تجمع ماده خشک در گیاه شده است.





شکل ۱۰- رابطه رگرسیونی بین وزن خشک و تولید پراکسید هیدروژن (الف) و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز (ب) و سوپراکسید دیسموتاز (ج)

Fig. 10. The regression relationship between the production of hydrogen peroxide (A) and the activity of catalase (B) and superoxide dismutase (C)

پراکسید هیدروژن تولید شده ناشی از تنش در سیتوپلاسم، به سرعت توسط آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی تجزیه می‌شود و بخشی از آن وارد فضای آپوپلاستی می‌شود (۵۵). افزایش غلظت این ماده در این دو مکان در مرحله اول سبب افزایش فعالیت کاتالاز و سپس سوپراکسید دیسموتاز می‌گردد (۵۶). به‌علاوه، کاربرد زغال زیستی محتوای گونه‌های اکسیژن فعال را در گیاه کاهش می‌دهد که تأثیر مثبتی بر محصولات زراعی دارد (۵۷)، نتایج تحقیق حاضر نیز مؤید این نکته می‌باشند (شکل ۷). همچنین با افزایش سطوح زغال زیستی، مطابق شکل ۸ و ۹ فعالیت دو آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز نیز به صورت معنی‌داری روند کاهشی را نشان داد که دلالت بر تعدیل شرایط تنش برای گیاه دارد.

نتیجه‌گیری کلی

افزایش غلظت کروم در خاک به صورت منفی تمامی صفات مورفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی مورد مطالعه در گیاه لوبیا چشم‌بلبلی را تحت تأثیر قرار داد. اثرات سمی کروم در غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم نسبت به سایر سطوح چشمگیرتر بود. در مقایسه، در تمامی سطوح کروم همواره سطح ۴ درصد وزنی زغال زیستی بهترین نتایج را با توجه به پارامتر مورد ارزیابی به همراه داشت. به کارگیری این سطح زغال زیستی توانست صفات مورفولوژیک شامل قطر ساقه، ارتفاع بوته، وزن خشک اندام هوایی، ریشه و کل بوته را بهبود بخشد. این سطح زغال زیستی توانست صفات فیزیولوژیک شامل کلروفیل‌های a و b و کاروتنوئید را به میزان ۹۲/۸۸، ۹۵/۲۷، ۹۵/۳۶ درصد و همچنین استحکام غشاء را به میزان حدود ۳۷ درصد افزایش دهد. در مقایسه، فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز و تولید پراکسید هیدروژن را به میزان ۴/۸۸، ۵۳/۶۸ و ۳۴/۲۵ درصد کاهش داد. نتایج همچنین حاکی از وجود همبستگی منفی بین فعالیت دو آنزیم کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز و تولید پراکسید هیدروژن با وزن خشک اندام هوایی (به ترتیب **۰/۸۹-، **۰/۸۵- و **۰/۸۱-) بودند. در مجموع، نتایج بیانگر نقش کارآمد زغال زیستی به عنوان یک اصلاح‌کننده خاک و همچنین کاهش تنش ناشی از کروم در گیاه لوبیا چشم‌بلبلی بود. با

توجه به کارکرد خوب زغال زیستی در پژوهش حاضر پیشنهاد می‌شود که از گیاهان بومی با قابلیت گیاه‌پالایی کروم و همچنین از مزایای همزیستی ریزجانداران با این گیاهان نیز به منظور افزایش این پتانسیل در جهت پاکسازی این فلز سنگین از خاک‌های آلوده استفاده شود.

سپاسگزاری

به این وسیله از دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری برای حمایت‌های مالی در مراحل اجرای این پژوهش کمال تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

منابع

1. Mauskar, J.M. (2007). Cadmium-An Environment Toxicant central pollution control Board, Ministry of Environment and Forests, Government of India, parivesh Bhawan, East Arjun Nagar. Delhi.
2. Gosh, M., & Singh, S. (2005). Comparative uptake and pytoextraction study of soil induced chromium by accumulator and high biomass weed species. *Applied Ecology and Environmental Research*, 3(2), 67-69.
3. Yu, X.Z., & Gu, J.D. (2008). The role of EDTA in phytoextraction of hexavalent and trivalent chromium by two willow trees. *Ecotoxicology,* 17(3), 143-152.
4. Srivastava, D., Tiwari, M., Dutta, P., Singh, P., Chawda, K., Kumari, M., & Chakrabarty, D. (2021). Chromium stress in plants: toxicity, tolerance and phytoremediation. *Sustainability,* 13, 4629.
5. Richard, J., Lewis, S.R., and Wiley, J. (2001). Hawleys condensed chemical dictionary fourteenth edition.
6. Zulfiqar, F., Moosa, A., Ferrante, A., Darras, A., Ahmed, T., Jalil, S., & El Sabagh, A. (2024). Melatonin seed priming improves growth and physio-biochemical aspects of *Zinnia elegans* under salt stress. *Scientia Horticulturae*, 323, 112495.
7. Cheng, Q., Huang, Q., Khan, S., Liu, Y., Liao, Zh., Li, G., & Sikok, Y. (2016). Adsorption of Cd by peanut husks and peanut husk biochar from aqueous solutions. *Ecological Engineering*, 87, 240-245.
8. Wang, Zh., Shen, F., Shen, D., Jiang, Y., & Xiao, R. (2017). Immobilization of Cu^{2+} and Cd^{2+} by earthworm manure derived biochar in acidic circumstance. *Journal of Environmental Sciences*, 53, 293-300.
9. Conte, P. (2021). Annual Reports on NMR Spectroscopy. Chapter Three - Applications of fast field cycling NMR relaxometry. Pp, 141-188.
10. Wu, W., Yang, M., Feng, Q., McGrouther, K., Wang, H., Lu, H., & Chen, Y. (2012). Chemical characterization of rice straw-derived biochar for soil amendment. *Biomass and Bioenergy,* 47, 268-276.
11. Choppala, G.K., Bolan, N.S., Megharaj, M., Chen, Z., & Naidu, R. (2012). The influence of biochar and black carbon on reduction and bioavailability of chromate in soils. *Journal of Environmental Quality,* 41, 1175-1184.
12. Haider, F., Wang, X., Farooq, M., Hussain, S., Cheema, S.A., Ain, N., Virk, A.L., Ejaz, M., Janyshova, U., & Liqun, C. (2022). Biochar application for the remediation of trace metals in contaminated soils: Implications for stress tolerance and crop production. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 230, 113165.
13. Kar, S., & Prasad, R. (2020). Adverse Effects of Chromium, Cadmium and Zinc on the Growth and Metabolic Activities of Pulse Crops and their Key Management Strategies: A Review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 9(4), 48-63.
14. Singh, J., Hembram, P., & Basak, J. (2014). Potential of Vigna unguiculata as a phytoremediation plant in the remediation of Zn from contaminated soil. *American Journal of Plant Sciences*, 5, 1156-1162.
15. Oliveira, M.L.J., Araujo, A.S.F.D., & Melo, W.J.D. (2015). Chromium in soil organic matter and cowpea after four consecutive annual applications of composted tannery sludge. *Revista Brasileira de Ciencia do Solo*, 39, 297-302.

16. De-Sousa, R.S., Nunes, L.A.P.L., Lima, A.B.D., Melo, W.J.D., Antunes, J.E.L., & Araujo, A.S.F.D. (2018). Chromium accumulation in maize and cowpea after successive applications of composted tannery sludge. *Acta Scientiarum Agronomy*, 40, e3536.
17. Aliku, C.B., & Aliku, O.O. (2022). Enhanced phytoremediation of chromium contaminated soil using cowpea. Proceedings of the Forty-fourth AMOP Technical Seminar, Environment and Climate Change Canada, Ottawa, ON, Canada. 553-562.
18. Kumar, P., & Chauhan, M.S. (2019). Adsorption of chromium (VI) from the synthetic aqueous solution using chemically modified dried water hyacinth roots. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 7(4): 103218.
19. Bouyoucos, G.J. (1962). Hydrometer method improved for making particle size analyses of soils. *Agronomy Journal,* 54, 464-465.
20. Thomas, G.W. (1996) Soil pH and soil acidity. p. 475-490. In D.L. Sparks et al., (eds) Methods of Soil Analysis. Part 3- *ASA*, Madison. WI.
21. Rhoades, J.D. (1996). Salinity: Electrical Conductivity and total dissolved solids. In: Methods of Soil Analysis (eds. D.L. Sparks et al.). Pp. 417-436. Part 3 part 3-American Society of Agronomy. Madison. WI.
22. Walkley, A., & Black, I.A. (1934). An examination of method for determining soil organic matter and proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science,* 37, 29-37.
23. Loeppert, R.H., & Suarez, D.L. (1996). Carbonate and gypsum. In: Sparks, D.L. (eds). Methods of Soil Analysis. Part 3. 3rd ed. *SSSA,* Madison, Wisconsin. 437-474.
24. Song, W., & Guo, M. (2012). Quality variations of poultry litter biochar generated at different pyrolysis temperatures. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis,* 94, 138-145.
25. Rajkovich S., Enders A., Hanley K., Hyland C., Zimmerman A. R., & Lehmann J. (2012). Corn growth and nitrogen nutrition after additions of biochars with varying properties to a temperate soil. *Biology and Fertility of Soils,* 48(3), 271-284.
26. Porra, R.J. (2002). The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. *Photosynthesis Research,* 73(1), 149-156.
27. Lutts, S., Kinet, J.M., & Bouharmont, J. (1995). Changes in plant response to NaCl during development of rice (*Oryza sativa* L.) varieties differing in salinity resistance. *Journal of Experimental Botany,* 46, 1843-1852.
28. Sairam, R.K., Veerabhadra Rao, K., & Srivastava, G.C. (2002). Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Plant Science,* 163(5), 1037-1046.
29. Abi, H. (1984). Catalase in vitro. Method of Enzymology. 105, 121-126.
30. Sergive, I., Alexieva, V., & Karanov, E. (1997). Effect of spermine, atrazine and combination between them on some endogenous protective systems and stress markes in plants. *Bulgarian Academy of Sciences,* 51, 121-124.
31. Beauchamp, C., & Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry,* 44(1), 276-287.
32. Lupo, Y., & Moshelion, M. (2024). The balance of survival: comparative drought response in wild and domesticated tomatoes. *Plant Science,* 339, 111928.
33. Taratima, W., Kunpratum, N., & Maneerattanarungroj, P. (2023). Effect of salinity stress on physiological aspects of pumpkin (*Cucurbita moschata* Duchesne. 'Laikaotok') under hydroponic condition. *Asian Journal of Agriculture and Biology*, 2, 202101050.
34. Shanker, K.A., Cervantes, C., Loza-Taversa, H., & Avudainayagam, S. (2005) Chromium toxicity in plants. *Environment International,* 31, 739-753.

35. Iqbal, M.Z., Saeeda, S., & Shafiq, M. (2001). Effects of chromium on an important arid tree (*Caesalpinia pulcherrima*) of Karachi city, Pakistan. *Ekologia Bratislava,* 20, 414-422.
36. Ali, S., Rizwan, M., Bano, R., Bharwana, S.A., Rehman, M.Z., Hussain, M.B., & Al- Wabel, M.I. (2018). Effects of biochar on growth, photosynthesis, and chromium (Cr) uptake in *Brassica rapa* L. under Cr stress. *Arabian Journal of Geosciences*, 11, 507.
37. Sehrish, A.K., Aziz, R., Hussain, M.M., Rafiq, M.T., Rizwan, M., Muhammad, N., Rafiq, M. K., Sehar, A., Din, udJ., Al-Wabel, M.I., & Ali, S. (2019). Effect of poultry litter biochar on chromium (Cr) bioavailability and accumulation in spinach (*Spinacia oleracea*) grown in Cr-polluted soil. *Arabian Journal of Geosciences*, 12, 57.
38. Wakeel, A., Xu, M., & Gan, Y. (2020). Chromium-induced reactive oxygen species accumulation by altering the enzymatic antioxidant system and associated cytotoxic, genotoxic, ultrastructural, and photosynthetic changes in plants. *International Journal of Molecular Sciences,* 21, 728.
39. Ali, H., Khan, Kh., & Sajad, M. (2013). Phytoremediation of heavy metals Concepts and applications. *Chemosphere*, 91, 869-881.
40. McElroy, J.S., & Kopsell, D.A. (2009). Physiological role of carotenoids and other antioxidants in plants and application to turfgrass stress management. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 37, 327-333.
41. Mukherjee, A.A., & Zimmerman, R. (2013). Organic carbon and nutrient release from a range of laboratory-produced biochars and biochar-soil mixtures. *Geoderma,* 193(1), 122-130.
42. Sami, H., Ashraf, K., Sultan, K., Alamri, S., Abbas, M., Javied, S., & Zaman, Q. (2023). Remediation potential of biochar and selenium for mitigating chromium-induced stress in spinach to minimize human health risk. *South African Journal of Botany*, 163, 2347-249.
43. Subrahamamyam, D. (2008). Effects of chromium toxicity on leaf photosynthetic characteristics and oxidative changes in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Photosynthetica*, 46(3), 339-345.
44. Azarmi, R., & Majnooni, Z. (2023). The interaction effect of chromium and fulvic acid on the morphological and physiological traits of lettuce (*Lactuca sativa* L.) in hydroponic condition. *Journal of Vegetation Science,* 6(2), 123-134.
45. Shafi, M., Bakht, J., Hassan, M.J., Raziuddin, M., & Zhang, G. (2009). Effect of cadmium and salinity stresses on growth and antioxidant enzyme activities of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology,* 82, 772-776.
46. Amami, R., Ibrahimi, K., Sher, F., Milham, P.J., Khriji, D., Annabi, H.A., Abrougui, Kh., & Chehaibi, S. (2022). Effects of conservation and standard tillage on soil physico-chemical properties and overall quality in a semi-arid agrosystem. *Soil Research*, 60, 485-496.
47. Asoda, K. (1994). Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissue. In causes of photooxidative stress and amelioration of defense system in plant. (Eds.): Foyer CH, and Mullineaux PM. CRC Press, Boca Raton, Pp.77-104.
48. Shu, X., Yin, L., Zhang, Q., & Wang, W. (2012). Effect of Pb toxicity on leaf growth, antioxidant ant enzyme activities, and photosynthesis in cuttings and seedlings of *Jatropha curcas* L. *Environmental science and pollution research international*, 19(3), 893-902.
49. Suliman, W., Harsh, J.B., Abu-Lail, N.I., Fortuna, A.M., Dallmeyer, I., & Garcia-Perez, M. (2017). The role of biochar porosity and surface functionality in augmenting hydrologic properties of a sandy soil. *Science of the Total Environment,* 574, 139-147.
50. Patra, J.M., Panda, S.S., & Dhal, N.K. (2017). Biochar as a low-cost adsorbent for heavy metal removal: A review. *International Journal of Research in BioSciences*, 6, 1-7.
51. Park, J.H., Choppala, G.K., Bolan, N.S., Chung, J.W., & Chuasavathi, T. (2011). Biochar reduces the bioavailability and phytotoxicity of heavy metals. *Plant and Soil*, 348, 439-451.
52. Inyang, M., Gao, B., Pullammanappallil, P., Ding, W., & Zimmerman, A.R. (2010). Biochar from anaerobically digested sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, 101, 8868-8872.

53. Ahmad, M., Rajapaksha, A.U., Lim, J.E., Zhang, M., Bolan, N., Mohan, D., Vithanage, M., Lee, S.S., & Ok, Y.S. (2013). Biochar as a sorbent for contaminant management in soil and water: A review. *Chemosphere*, 99, 19-33.
54. Houben, D., Evrard, L., & Sonnet, P. (2013). Mobility, bioavailability and pH-dependent leaching of cadmium, zinc and lead in a contaminated soil amended with biochar. *Chemosphere*, 92, 1450-1457.
55. Foyer, C.H., & Noctor, G. (2009). Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Advances in Radio Science*, 11(4), 861-905.
56. Demidchik, V. (2015). Mechanisms of oxidative stress in plants: from classical chemistry to cell biology. *Environmental and Experimental Botany*, 109, 212-228.
57. Cong, M., Hu, Y., Sun, X., Yan, H., Yu, G., Tang, G., Chen, S., Xu, W., & Jia, H. (2023). Long-term effects of biochar application on the growth and physiological characteristics of maize. *Frontiers in Plant Science,* 14, 1172425.

The effect of biochar on the improvement of some morphophysiological and biochemical characteristics of cowpea (*Vigna unguiculata* L.) grown in chromium-contaminated soil

Abstract

Background and Objectives: Chromium (Cr) at higher concentrations acts as a major pollutant and heavy metal (HM), causing many environmental problems and contaminating the food chain. In plants, the toxic effects of Cr are also evident, exhibiting symptoms such as delayed germination, damaged roots and reduced root growth, decreased biomass, reduced plant height, photosynthesis, reduced grain yield, and ultimately causing plant death. In recent years, organic amendments such as biochar in HM-contaminated soils, which significantly stabilize HMs in soil and water, have been considered. Therefore, the present research investigated different levels of rice straw-derived biochar in mitigating the negative effects of Cr in cowpea (*V. unguiculata* L.).

Materials and Methods: A factorial experiment based on a completely randomized design was used in 2023 at the research greenhouse of Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University. The treatments consisted of biochar (0, 1, 2, and 4 weight percent) and Cr (0, 2.5, 5, 10 and 25 mg kg^{-1}) with three replications. In this experiment, stem diameter (SD), plant height (PH), root and shoot dry weight (RDW and SDW), chlorophyll a, b (Chl a and b) and carotenoids (CAR), electrolyte leakage (EL), hydrogen peroxide (H_2O_2), the activity of catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) were measured.

Results: Based on the findings, the interaction of applying biochar levels in different concentrations of Cr showed a significant difference in all traits except for the SD trait. Increasing Cr concentration negatively affected the traits studied; however, the application of biochar significantly mitigated these adverse effects. The optimal performance across all Cr levels consistently occurred at the 4-weight percent level of biochar. Thus, using four weight percent biochar increased physiological traits, including Chl a and b, CAR, and EL by 92.88, 95.27, 95.36 and 63.94%, respectively. It also reduced the activity of CAT and SOD enzymes and H_2O_2 production by 4.88, 53.68 and 34.25 percent, respectively. In addition, between the activity of the two enzymes of CAT and SOD and the production of H_2O_2 with the SDW, a negative and significant correlation of (-0.89^{**}, -0.85^{**}, and -0.81^{**}) was observed, respectively.

Conclusion: Overall, increasing the concentration of Cr in the soil negatively affected all the studied morpho-physiological and biochemical traits; conversely, using different levels of biochar moderated the negative effects of chromium. The concentration of 25 mg/kg of Cr had the most negative effects, and at all levels of Cr, the level of 4 (weight percent) of biochar always had the best results in terms of evaluated parameters. According to the results of the current research, biochar can significantly improve the growth of the cowpea under Cr stress conditions.

Keywords: Soil amendment, oxidative stress, enzyme activity, heavy metals, stem diameter