نشریه علمی اکوفیزیولوژی گیاهان زراعی، جلد پانزدهم، شماره ۲(۵۸)، تابستان ۱۴۰۰، صفحه ۲۵۰-۲۲۹

مقاله پژوهشی DOI: 10.30495/jcep.2021.683384

تأثیر کاربرد کودهای زیستی و بیوچار بر عملکرد کمّی، کیفی و خصوصیات ریشه در توتون (*Nicotiana tabacum* L.) گرمخانه‌ای تحت شرایط دیم

رامین مصباح[۱]، محمدرضا اردکانی[۲*]، علی مقدم[۳] و فرناز رفیعی[۴]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۷/۸ تاریخ بازنگری: ۱۳۹۹/۸/۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱/۱۴

چکیده

توتون به‌عنوان یک محصول با ارزش زراعی در بیش از صد کشور دنیا و در شرایط آب و هوایی مختلف کشت شده و در اقتصاد برخی از کشورها نقش مهمی ایفا می‌کند. این تحقیق به منظور بررسی اثر کاربرد میکوریزا و ازتوباکتر به همراه بیوچار بر عملکرد برگ، خصوصیات ریشه و ترکیبات فیتوشیمیایی توتون تحت شرایط دیم طی دو سال زراعی ۱۳۹۶-۱۳۹۵ و ۱۳۹۷-۱۳۹۶ در مزرعه مرکز تحقیقات و آموزش توتون تیرتاش واقع در استان مازندران انجام گردید. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب بلوک‌های کامل تصادفی با سه فاکتور در چهار تکرار شامل بیوچار در سه سطح (صفر، ۴ و ۸ تن در هکتار)، میکوریزا و ازتوباکتر هر کدام در دو سطح (با کاربرد و بدون کاربرد) اجرا شد. بر اساس نتایج، کاربرد ۴ تن بیوچار در هکتار موجب افزایش عملکرد تر و خشک به میزان ۲۶٪، وزن خشک ریشه ۴۴٪، وزن تر ریشه ۳۷٪، طول ریشه ۴۱٪، نیکوتین ۳٪، قند احیا ۲۴٪ و نسبت قند احیا به نیکوتین ۲۱٪ در مقایسه با سطح صفر آن شد. اثر میکویزا و ازتوباکتر بر عملکرد برگ افزایشی اما غیرمعنی‌دار بود. بیشترین تاثیر ازتوباکتر با ۱۷٪ افزایش بر محتوای نیکوتین برگ بود. با توجه به عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین سطوح کاربرد ۴ و ۸ تن بیوچار در هکتار در اغلب صفات مورد ارزیابی با لحاظ جنبه‌های اقتصادی، کاربرد ۴ تن بیوچار در هکتار به همراه میکوریزا و ازتوباکتر با هدف کاهش اثرات منفی ناشی از کمبود آب در مناطق کشت دیم توتون و بهبود رشد آن توصیه می‌گردد. همچنین کاربرد ازتوباکتر نیز می‌تواند به‌عنوان راهکاری مطلوب در جهت افزایش محتوای نیکوتین برگ تلقی گردد.

واژگان کلیدی: ازتوباکتر، بیوچار، میکوریزا، توتون، عملکرد، دیم.

۱- دانشجوی دکتری، گروه زراعت، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲- استاد گروه زراعت، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران. (نگارنده‌ی مسئول) mreza.ardakani@gmail.com

۳- استادیار موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

۴- استادیار گروه زراعت، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

مقدمه

توتون به عنوان یک محصول با ارزش زراعی در بیش از صد کشور دنیا و در شرایط آب و هوایی مختلف کشت شده و در اقتصاد برخی از کشورها نقش مهمی ایفا می‌کند (Tso, 2005). این گیاه علاوه بر صنعت سیگارت‌سازی کاربردهای دیگری از جمله استخراج نیکوتین جهت مصارف دارویی داشته و به عنوان گیاه مدل در زمینه بیوتکنولوژی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Chawla, 2003). با توجه به اینکه مصرف افراطی کودهای شیمیایی ضمن افزایش هزینه‌های تولید تخریب منابع خاکی، آبی و بیولوژیکی را به همراه داشته این امر موجب علاقمندی متخصصین به نظام‌های زراعی سالم و بادوام از نظر اکولوژیکی و توسعه سیستم‌های پایدار کشاورزی گردید. به منظور حفظ حاصلخیزی خاک، بهبود ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی و ایجاد توازن در عوامل زیست محیطی مصرف کودهای زیستی (Wu *et al.*, 2005) و ترکیباتی تحت عنوان اصلاح‌گرهای خاک از جمله بیوچار همراستا با اهداف کشاورزی پایدار در سالیان اخیر مورد توجه قرار گرفته است.

بیوچار کربن غنی شده با قابلیت جذب مواد مغذی و ماندگاری بالا در خاک است که موجب حفظ رطوبت در طول دوره کم‌بارش و فصل گرما می‌شود (Yaghoby *et al.*, 2014). این ماده همچنین موجب تغییر شرایط فیزیکی و فرایندهای شیمیایی در خاک، افزایش فعالیت میکروبی آن، حفاظت میکروب‌ها در مقابل شکارگرها، تأمین نیاز کربنی، انرژی و عناصر معدنی برای ریزجانداران می‌گردد (Warnock *et al.*, 2007). در تحقیقی اثر مصرف مقادیر مختلف بیوچار بر خصوصیات کیفی خاک و توتون در طی چهار سال در دو منطقه مختلف بررسی شد (Jiangzhou *et al.*, 2016). نتایج نشان داد مصرف این ماده به طور معنی‌داری موجب افزایش مقدار کربن آلی خاک در سطح خاک و بهبود وضعیت تغذیه‌ای گیاه می‌شود. بعد از چهار سال مصرف متوالی بیوچار نیز ویژگی‌های کیفی مرتبط با برگ توتون با مصرف ۱۵ تن در هکتار افزایش یافت که دلیل این امر فراهمی بیشتر عناصر غذایی و نفوذپذیری بیشتر آب عنوان گردید. در مطالعه دیگری مقادیر مختلف بیوچار تولید شده از کاه بر خصوصیات رشدی و توسعه‌ای ریشه توتون در چهار مرحله رشدی بر بیوماس اندام هوایی، ریشه و خصوصیات تغذیه‌ای خاک بررسی و عنوان شد بیوچار با بهبود رشد اندامهای زیرزمینی باعث افزایش سرعت رشد بیوماس ریشه در مقایسه با اندام هوایی گردید (Gao *et al.*, 2017). همچنین با افزایش مقدار بیوچار میزان فراهمی عناصر ازت، فسفر و پتاسیم، کربن آلی و pH افزایش یافت. (Lin *et al.*, 2017). در آزمایشی دیگر در انستیتو تحقیقات توتون کشور چین کاربرد بیوچار حاصل از ساقه برنج در زراعت توتون موجب افزایش عملکرد و محتوای نیتروژن کل، پتاسیم کل و فسفر گیاه گردید (Zhang *et al.*, 2016). کاربرد بیوچار به شکل نواری در مزرعه دیم، کلونیزاسیون ریشه گیاه توسط میکوریزا را در سال بعد از اعمال، ترغیب و اثرات آن تا ۲ سال بعد نیز ادامه داشت (Solaiman *et al.*, 2010). در مطالعات دیگری نیز اثر بیوچار بر فراوانی قارچ میکوریزا آرباسکولار و اثرات مثبت این دو در افزایش عملکرد گزارش شده است (Warnock *et al.*, 2007). استفاده از میکروارگانیسم‌هایی نظیر قارچ میکوریزا می‌تواند یک راه حل مناسب برای بهبود وضعیت تغذیه‌ای گیاه از طریق جذب عناصر غذایی، کاهش اثرات منفی ناشی از عوامل زنده و

غیر زنده از جمله کم‌آبی (Ruiz-Lozano *et al*., 2012)، جذب بیشتر آب (Mickan *et al*., 2016)، تجزیه مواد آلی خاک و بهبود رشد و نمو گیاهان میزبان تلقی شود. هیف‌های قارچ میکوریزا قادرند با ورود به منافذ بسیار ریزی که حتی تارهای کشنده ریشه قادر به نفوذ در آن نیستند موجب تعدیل اثرات نامطلوب تنش خشکی در گیاه میزبان شوند (Auge, 2001). همزیستی قارچ میکوریزا با اغلب گیاهان تحت شرایط تنش خشکی باعث بهبود تولید در گیاهان از طریق جذب بیشتر عناصر غذایی غیرمتحرک مانند فسفر، روی و مس و همچنین افزایش طول و عمق ریشه (Vamerali *et al*., 2003)، کاهش مقاومت روزنه‌ای به وسیله تغییر در تعادل هورمون‌های گیاهی و بهبود تغذیه فسفر گیاهان میکوریزی تحت تنش خشکی می‌شود (Elwan, 2001). عنوان شده که هدایت هیدرولیکی سیستم ریشه‌های گیاه میکوریز به مراتب بیشتر از گیاه غیرمیکوریزی است که این موضوع به دلیل اثر افزایش سطح ریشه و یا طول ریشه‌های میکوریزایی و افزایش ۲ تا ۳ برابری هدایت آبی در واحد طول ریشه می‌باشد (Zahra and Loynachan, 2003). بهبود شرایط ریزوسفر خاک در شرایط تنش، توسعه سیستم ریشه‌ای و بهبود جذب آب و عناصر غذایی توسط گیاه، افزایش سیستم دفاعی و کاهش خطرات اکسیداسیون ناشی از تنش خشکی را می‌توان با اثرات میکوریزا مرتبط دانست (Song, 2005). اثرات مثبت غیرمستقیم مصرف بیوچار ممکن است به صورت افزایش کلونیزاسیون ریشه‌ها با قارچ‌های میکوریزایی مشاهده شود (Taffouo *et al*., 2013).

از دیگر جانداران مفید خاکزی ازتوباکتر می‌باشد. این باکتری ریزوسفری محرک رشد، از طریق تثبیت بیولوژیک نیتروژن و تولید هورمون‌های گیاهی مانند اکسین، جیبرلین، سیتوکینین (Yousef *et al*., 2004) موجب دسترسی مواد غذایی و افزایش میزان جذب عناصر غذایی می‌گردد (Ladha and Reddy, 2003). استفاده از این باکتری در مزارع دیم توتون به دلیل دارا بودن توان حل‌کنندگی فسفات‌ها، افزایش مقاومت به تنش‌ها و تولید ویتامین‌ها (Kennedy *et al*., 2004) می‌تواند موجب بهبود رشد گیاه و توسعه آن گردد. با توجه به اینکه عملکرد در گیاه توتون بر اساس رشد سبزینه‌ای و به طور مشخص برگ می‌باشد در این تحقیق تاثیر استفاده از بیوچار به همراه دو نوع کود زیستی بر عملکرد کمی، ویژگی‌های شیمیایی موثر در کیفیت و خصوصیات ریشه‌ای توتون به مدت دو سال در شرایط دیم مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

زمان، موقعیت و قالب اجرای طرح

این تحقیق مزرعه‌ای در شرایط دیم با استفاده از توتون گرمخانه‌ای رقم کا ۳۲۶ در استان مازندران طی دو سال زراعی ۱۳۹۶-۱۳۹۵ و ۱۳۹۷-۱۳۹۶ در مزرعه تحقیقاتی مرکز تحقیقات و آموزش توتون تیرتاش به طول جغرافیایی ۵۳ درجه و ۴۴ دقیقه شرقی و عرض جغرافیایی آن ۳۶ درجه و ۴۲ دقیقه شمالی اجرا شد. بر اساس آمار ۳۰ ساله هواشناسی متوسط بارندگی سالانه این منطقه ۶۲۲ میلی‌متر است که عمدتا در نیمه دوم سال اتفاق می‌افتد. میانگین حداکثر و حداقل درجه حرارت سالانه به‌ترتیب در تیرماه۳۰ درجه سلسیوس و در دی‌ماه ۵ درجه

سلسیوس و متوسط درجه حرارت در یک دوره ۳۰ ساله ۱۹ درجه سلسیوس است. منحنی آمبروترمیک و مشخصات فیزیکی و شیمیایی خاک در شکل ۱ و جدول ۱ آورده شده است.

این آزمایش به صورت فاکتوریل ۲×۲×۳ در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تکرار اجرا شد. فاکتور اول بیوچار در سه سطح صفر، ۴ و ۸ تن در هکتار، فاکتور دوم و سوم به ترتیب میکوریزا و ازتوباکتر هر یک در دو سطح بدون مصرف و با مصرف در نظر گرفته شد. هر واحد آزمایشی شامل ۵ ردیف ۱۱ بوته‌ای توتون با فاصله کشت ۵۰ × ۱۰۰ سانتیمتر بود.

مشخصات بیوچار، ازتوباکتر و میکوریزا

بیوچار مورد استفاده در مرکز پژوهش متالورژی رازی توسط میکروسکوپ الکترونی مدل VEGA\\TESCAM مورد عکس‌برداری قرار گرفت (شکل۲). بر این اساس سطح فعال آن مورد استفاده ۴۰۰ مترمربع در گرم بود. مایه تلقیح میکوریزا با جمعیت کل ۷۰ اندام فعال در هر گرم از کود بیولوژیک و مایه تلقیح ازتوباکتر با تراکم حداقل CFU/g ^{۷}۱۰× ۱ از موسسه تحقیقات خاک و آب کشور تهیه گردید.

عملیات آماده‌سازی خزانه و مزرعه

در هر دو سال، عملیات خزانه‌گیری در اواخر اسفندماه به روش شناور در آب (Float System) و نشاکاری در نیمه دوم اردیبهشت ماه انجام شد. ریشه نشاهای تیمارهای حاوی ازتوباکتر ده روز قبل از انتقال به مزرعه با مایع تلقیح به مدت ۴۵ دقیقه آغشته شد. همچنین مایه تلقیح میکوریزا نیز به نسبت ۱ به ۱۰ با خاک بستر خزانه قبل از بذرگذاری مخلوط گردید. بیوچار نیز به صورت دستی و به طور یکنواخت در سطح کرت‌ها پاشیده و توسط دیسک با خاک مزرعه مخلوط شد.

پس از رسیدگی صنعتی، عملیات برداشت توتون در چهار چین انجام شد و در هر مرحله از برداشت، وزن تر هر کرت آزمایشی یادداشت برداری شده و در پایان برداشت، مجموع وزن چهار چین هر کرت آزمایشی به عنوان وزن تر و پس از عمل‌آوری به عنوان وزن خشک کل کرت محاسبه شد. در هر کرت آزمایشی نمونه‌برداری ریشه توسط اوگری با قطر ۱۰ و ارتفاع ۳۰ سانتیمتر (حجم ۲۳۵۵ سانتیمتر مکعب) انجام شد. نمونه خاک هر کرت به مدت ۲۴ ساعت در تشت‌های پلاستیکی خیسانده شدند تا در هنگام شستشو، ریشه‌ها با سهولت بیشتری از خاک جدا شوند (Antony *et al* 2004). مرحله شستشوی ریشه‌ها با کمک فشار آب به وسیله صافی پلاستیکی ۵۰ مشی (تعداد منافذ در هر اینچ مربع) انجام و وزن تر آنها بر حسب گرم و طول ریشه‌های دارای قطر بالای یک میلی‌متر بر حسب سانتی‌متر اندازه‌گیری شد. وزن خشک ریشه‌ها هم پس از قراردادن در آون به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۷۰ درجه سلسیوس (Alizadeh, 2004) با ترازوی حساس توزین شد. در محاسبات واحد وزن تر و خشک به صورت گرم و طول ریشه به صورت سانتی‌متر در حجم استوانه نمونه‌برداری (۲۳۵۵ سانتی‌متر مکعب) در نظر گرفته شد. جهت محاسبه درصد همزیستی ریشه با میکوریزا از روش فیلیپ و هایمن (Phillips and Hayman, 1970) استفاده شد. برای این منظور نمونه ریشه‌های هر کرت به‌طور جداگانه شسته و با محلول KOH رنگ‌بری و با محلول تریپان‌بلو رنگ‌آمیزی شدند. درصد کلونیزاسیون ریشه‌ها، درصدی از طول ریشه است که کلنی‌دار شده

است. در نهایت از روش تقاطع شبکه بر پایه تعداد برخورد ریشه‌ها با خطوط مشبک درصد کلونیزاسیون محاسبه شد. برای اندازه‌گیری درصد نیکوتین و قند احیا از استاندارد شماره ۳۵ و ۳۸ سازمان جهانی کرستا (CORESTA) استفاده شد (Anonymous, 1994 a,b). برای اندازه‌گیری نیکوتین، یک گرم پودر توتون را در بالن تقطیر ریخته و به ترتیب آب مقطر، سدیم کلراید و محلول سدیم هیدروکسید اضافه شد. محلول حاصل از تقطیر را در بالن حجمی حاوی اسید سولفوریک غلیظ ریخته و با آب مقطر به حجم رسانده و در انتها به روش اسپکتروفتومتری میزان نیکوتین تعیین شد. برای تعیین درصد قند نیز از برگ توتون عصاره تهیه شد. در ادامه به آن استات سرب، اسید کلریدریک و آب مقطر افزوده شد. ارلن حاوی محلول در حمام بخار قرار داده و بعد از عبور از صافی با محلول پرمنگنات پتاسیم تیتر و بر اساس رابطه کرستا درصد قند محاسبه شد.

برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از نرم‌افزارهای MINI Tab (Ver. 17) و SPSS (Ver. 12)، رسم اشکال از نرم افزار Excel و مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد استفاده شد. پیش از انجام تجزیه واریانس مرکب، تست یکنواختی واریانس‌ها با استفاده از آزمون بارتلت انجام و با توجه به نبود تفاوت معنی‌دار بین واریانس سال‌ها تجزیه مرکب انجام شد. تجزیه واریانس صفات عملکردی و صفات مرتبط با ریشه با چهار تکرار و خصوصیات فیتوشیمیایی در سه تکرار انجام شد.

نتایج و بحث

عملکرد برگ تر و خشک

بر اساس نتایج مندرج در جدول ۲ اثر اصلی سال بر عملکرد برگ خشک در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بود. به‌طوری‌که در سال دوم میزان عملکرد برگ خشک ۱۵٪ در مقایسه با سال اول بالاتر بود (جدول ۳). هر چند عملکرد برگ تر نیز در سال دوم بالاتر بود اما به لحاظ آماری اثر سال بر این صفت معنی‌دار نشد. اثر سطوح بیوچار نیز بر عملکرد برگ تر و خشک به‌ترتیب در سطح احتمال ۵ و ۱٪ معنی‌دار شد. با وجود اثر مثبت کاربرد بیوچار در افزایش عملکرد توتون تفاوت معنی‌داری بین سطوح ۴ و ۸ تن در هکتار دیده نشد. با این وجود کاربرد ۴ و ۸ تن در هکتار در هکتار در قیاس با عدم کاربرد آن عملکرد برگ خشک را به ترتیب ۲۶ و ۳۴٪ و عملکرد برگ تر را به ترتیب ۲۶ و ۳۱٪ افزایش داد (جدول ۳). این امر می‌تواند به‌دلیل بارش ۴۰ میلی‌متری باران در اواسط دوره رشد و همچنین افزایش ۵۰ درصدی بارش خارج فصل قبل از آغاز فصل زراعی در سال دوم اجرای طرح باشد.

هر چند کاربرد میکوریزا نیز بهبود عملکرد ۱۹ و ۲۲ درصد برگ تر و خشک را در قیاس با عدم کاربرد آن نشان داد با این حال تیمارهای آزمایشی از نظر کاربرد یا عدم کاربرد میکوریزا با یکدیگر تفاوت معنی‌دار نشان ندادند. همین روند در خصوص کاربرد ازتوباکتر نیز مشاهده شد به‌طوری‌که، با وجود عدم معنی‌دار شدن سطوح ازتوباکتر، کاربرد آن باعث افزایش ۱۴۲۱ کیلوگرمی عملکرد تر و ۲۳۰ کیلوگرمی عملکرد خشک در هکتار در تیمارها شد (جدول ۳). در تحقیقی اثرات مصرف بیوچار بر رشد و وضعیت تغذیه‌ای گندم بررسی و مشخص گردید استفاده از بیوچار عملکرد گندم را در خاک‌های شنی در طول دوره رشد در شرایط تنش خشکی افزایش می‌دهد. نتایج تحقیق بسیاری از محققین نیز نشان داده است که بیوچار رشد، بیوماس و میزان

جذب عناصر غذایی را در گیاه در شرایط کمبود رطوبت خاک افزایش می‌دهد (Kim *et al.*, 2019). هر چند شرایط دیم بر عملکرد توتون تاثیر منفی دارد اما نتایج این تحقیق نشان داد استفاده از بیوچار از اثرات منفی آن می‌کاهد. بیوچار با سطح ویژه بالا و ساختمان متخلخل در افزایش ظرفیت نگهداری آب خاک مؤثر است (Suliman *et al.*, 2017; Agegnehu *et al.*, 2017). این ماده می‌تواند حتی در شرایط پایین بودن رطوبت خاک موجب افزایش جذب نیتروژن، فسفر و پتاسیم گردد که بخشی از این امر می‌تواند ناشی از وجود این عناصر در ساختمان بیوچار باشد که به تدریج در خاک آزاد می‌گردد (Xu *et al.*, 2015).

بین اثرات متقابل عامل‌های آزمایشی تنها اثر متقابل بیوچار و ازتوباکتر بر عملکرد برگ تر در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار شد (جدول ۲). کمترین مقدار عملکرد برگ تر در تیمار فاقد بیوچار و ازتوباکتر به‌دست آمد. با افزایش سطوح مصرف این دو عامل، عملکرد تر برگ نیز افزایش یافت. به‌طوری‌که، بالاترین عملکرد برگ تر با ۱۹۵۱۰ کیلوگرم در هکتار در سطح ۸ تن بیوچار در هکتار و کاربرد ازتوباکتر به‌دست آمد. همچنین، در سطح صفر بیوچار، کاربرد ازتوباکتر تاثیر بسیار جزیی بر عملکرد داشت. اما این تاثیر در سطوح بالاتر بیوچار بیشتر بود (شکل ۳).

تاثیر مثبت کاربرد همزمان بیوچار و ازتوباکتر بر عملکرد تر برگ را می‌توان به نقش بیوچار در خاک و تاثیر مثبت آن در افزایش جمعیت میکروبی آن از جمله ازتوباکتر نسبت داد که موجب بهبود فعالیت آنزیمی و چرخه عناصر غذایی توسط ازتوباکتر می‌شود. به نظر می‌رسد ایجاد شرایط مناسب محیطی ناشی از کاربرد بیوچار از یک سو و نقش ازتوباکتر در افزایش سرعت سنتز هورمون‌های گیاهی بهبود عملکرد را در توتون موجب گردیده است.

نتایج چندین مطالعه همراستا با نتایج این تحقیق نشان می‌دهد ریزجاندارانی نظیر باکتری‌های بهبود دهنده رشد می‌توانند اثرات منفی تنش‌های آبی را در تعداد زیادی از گیاهان کاهش دهند (Behrooz and Vahdati, 2019). این تاثیر مثبت در بهبود عملکرد را می‌توان به نقش این باکتری در تولید برخی هورمون‌های محرک رشد، توانایی تثبیت نیتروژن اتمسفری و سنتز آنزیم‌های حاوی اتیلن در گیاهان نسبت داد (Stajkovic *et al.*, 2011).

همزیستی میکوریزایی

بر اساس نتایج تجزیه واریانس صرفاً اثر میکوریزا بر همزیستی میکوریزایی در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار شد (جدول ۲). کمترین میزان همزیستی میکوریزایی در تیمارهای آزمایشی ۵ درصد و بیشترین آن حدود ۳۲ درصد بود (جدول ۳). در این مطالعه هرچند میزان ناچیزی از همزیستی میکوریزایی به‌طور طبیعی و بدون استفاده از مایه تلقیح در تیمارها دیده شد اما به‌طور مشخص استفاده از مایه تلقیح مقدار این همزیستی را تا بیش از ۵ برابر افزایش داد. قارچ میکوریزا با ریشه بسیاری از گیاهان رابطه برقرار کرده و ایجاد یک شبکه میکوریزایی متراکم را می‌نماید که اثرات مثبت و قابل توجهی در سیستم‌های زراعی و طبیعی دارد (Pringle *et al.*, 2009). همزیستی ریشه گیاهان با قارچ‌های میکوریزا آرباسکولار یکی از قدیمی‌ترین و رایج‌ترین راهکارهای افزایش جذب عناصر غذایی برای سازگاری با تنش‌های محیطی است. ریشه‌های گسترش یافته این قارچ‌ها در خاک، سطح وسیعی را فراهم می‌کند که از آن طریق

عناصر غذایی همچون فسفر، روی و مس جذب و به گیاه میزبان منتقل شوند. مشخص شده است که گیاهان همزیست چه در شرایط تنش، چه در شرایط بدون تنش فسفر بیشتری جذب می‌کنند و در نتیجه این گیاهان رشد بهتر و محصول بیشتری خواهند داشت (Ortiz *et al.*, 2015). از طرف دیگر همزیستی میکوریزا امکان جذب اشکال غیر قابل دسترس نیتروژن را برای گیاه فراهم می‌کند که منجر به رشد و تغذیه بهتر در شرایط خشکی می‌شود. همچنین، این قارچ‌ها از طریق افزایش نسبی جذب آب که باعث رقیق شدن اثرات یون‌های سمی می‌شود، افزایش غلظت قندهای محلول در ریشه که منجر به کاهش پتانسیل اسمزی ریشه می‌شود و ایجاد تعادل عناصر غذایی گیاه، موجب افزایش مقاومت گیاهان در برابر تنش‌های محیطی می‌گردند (Asgharipoor and Rafiei, 2010). کلونیزه شدن گیاهان به‌وسیله قارچ سبب تنظیم اسمزی بهتر و بهبود رابطه آبی می‌شود. قارچ باعث افزایش میزان جذب آب در گیاه نسبت به تیمارهای بدون قارچ می‌شود و افزایش جذب آب سبب تورژسانس در سلول‌ها می‌گردد که خود یک عامل محرک طویل شدن سلول‌ها است. قارچ سبب گسترش سیستم هیف در اطراف ریشه و افزایش تماس ریشه با خاک می‌شود و در نتیجه توانایی جذب آب در آنها بیشتر می‌گردد. علاوه بر این، قارچ موجب افزایش جذب عناصر غذایی از خاک و افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی می‌گردد که عامل افزایش رشد ریشه و اندام هوایی و عملکرد ماده خشک می‌باشد (Wu and Xia, 2006). هر چند در این تحقیق کاربرد بیوچار و ازتوباکتر تاثیر معنی‌داری روی درصد همزیستی نداشت. با این حال افزایش جزئی در درصد همزیستی با افزایش سطح بیوچار مشاهده شد (جدول ۳). نشان داده شد کاربرد بیوچار در زراعت گندم تحت دوره متناوب تنش-آبیاری و کودهای معدنی، میزان کلونیزاسیون ریشه یا میکوریزا را افزایش داده است (Soleiman *et al.*, 2010). از طرفی بیوچار می‌تواند به‌عنوان یک پناهگاه برای میکوریزا تلقی گردد (Hammer *et al.*, 2014). اما برخی مطالعات نیز اثر منفی کاربرد بیوچار را در این زمینه اعلام داشتند (Warnock *et al.*, 2007).

وزن تر، وزن خشک و طول ریشه

نتایج تجزیه واریانس مرکب داده‌ها نشان داد که اثر سال بر طول ریشه غیرمعنی‌دار ولی بر وزن تر و خشک ریشه در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بود (جدول ۲). بر این اساس در سال اول وزن خشک ریشه در سال دوم بالاتر بود (جدول ۳). اثر کاربرد بیوچار نیز بر وزن تر ریشه و خشک ریشه به ترتیب در سطح احتمال ۵ و ۱٪ معنی‌دار بود (جدول ۲). با افزایش سطوح مصرف بیوچار، وزن تر و خشک ریشه نیز افزایش یافت به‌طوری‌که تیمارهای حاوی سطوح ۴ و ۸ تن درهکتار در یگ گروه آماری و مستقل از سطح صفر قرار گرفتند. مقدار افزایش وزن تر ریشه در سطوح ۸ و ۴ تن بیوچار در هکتار در مقایسه با سطح صفر آن به ترتیب حدود ۵۲ و ۳۶ درصد و این میزان افزایش در خصوص وزن خشک ریشه در وزن خشک ۵۵ و ۳۹ درصد بود (جدول ۳).

به نظر می‌رسد پایین بودن جرم مخصوص بیوچار نسبت به خاک موجب کاهش جرم مخصوص و افزایش میزان تخلخل و پوکی آن شده که در بهبود ظرفیت نگهداری آب و توسعه ریشه تاثیرگذار است. با وجود عدم معنی‌دار بودن کاربرد میکوریزا بر این دو صفت، متوسط وزن خشک

ریشه در تیمارهای حاوی میکوریزا ۶/۵ و در تیمارهای فاقد آن ۵/۰ گرم در حجم استوانه بود. استفاده از میکوریزا نیز باعث تفاوت بیش از ۷ گرمی وزن تر ریشه گردید (جدول ۳). نتایج حاصل از تجزیه واریانس مرکب داده‌ها نشان داد که اثر اصلی سال و ازتوباکتر در سطح احتمال ۱٪ و اثر اصلی بیوچار و میکوریزا در سطح احتمال ۵٪ بر طول ریشه معنی‌دار بود (جدول ۲). به‌طوری‌که میانگین طول ریشه در سال اول کمتر از سال دوم بود (جدول ۳). با افزایش میزان مصرف بیوچار طول ریشه نیز افزایش یافت به‌طوری‌که هر یک از سطوح بیوچار در گروه آماری مستقل قرار گرفتند (جدول ۳). در همین رابطه نشان داده شد مصرف بیوچار باعث افزایش طول ریشه در گیاهان یک‌ساله می‌گردد اما افزایش طول ریشه به زمان استفاده از بیوچار و فرم زندگی گیاه بستگی دارد. اسیدیته خاک هم در تاثیر بیوچار بر صفات مرتبط با ریشه موثر است (Xiang *et al*., 2017). مصرف میکویزا نیز سبب افزایش ۳۰ درصدی طول ریشه در قیاس با عدم مصرف آن گردید (جدول ۳). مطالعات در این زمینه نشان داد استفاده از میکوریزا، اثر منفی تنش خشکی بر طول را ریشه با افزایش کارایی مصرف آب کاهش می‌دهد (Boyer *et al*., 2015).

در این مطالعه مصرف ازتوباکتر نیز موجب افزایش ۱۳ درصدی طول ریشه در مقایسه با عدم مصرف آن شد (جدول ۳). در همین رابطه (Hashem *et al*., 2019) در بررسی اثر بیوچار و میکوریزا در ایجاد تحمل به تنش خشکی در نخود عنوان گردید تنش خشکی به‌طور معنی‌داری طول ریشه را کاهش داده ولی استفاده از بیوچار و میکوریزا باعث بهبود طول و عمق ریشه و در نتیجه جذب عناصر ماکرو و میکرو شد. در ضمن استفاده از بیوچار و میکوریزا علاوه بر بهبود پارامترهای رشدی گیاه، به‌طور معنی‌داری از آثار سو و بازدارنده تنش خشکی بر طول اندام هوایی و ریشه کاست. لذا، کاربرد کودهای زیستی و اصلاح-گرهای خاک از جمله بیوچار می‌تواند به‌عنوان یک جایگزین مناسب برای افزایش رشد و بهره‌وری گیاهان تحت شرایط تنش خشکی قلمداد شود (Hashem *et al*., 2019). سایر مطالعات نیز حاکی از تاثیر مثبت استفاده از قارچ میکوریزا در افزایش جذب عناصر غذایی از خاک و افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی دارد که عامل افزایش پارامترهای رشدی از جمله طول ریشه می‌باشد (Wu and Xia, 2006). همچنین، اعلام شده در گیاهان تلقیح شده با قارچ میکوریزا افزایش تولید هورمون‌ها و افزایش فعالیت آنزیم‌ها می‌تواند رشد طولی ریشه را تحریک نماید.

به‌نظر می‌رسد کاهش وزن ریشه‌ها در هنگام بروز خشکی به‌دلیل تاثیر تنش در کاهش سطح برگ، بسته شدن روزنه‌ها، کاهش جذب آب و عناصر غذایی و به دنبال آن کاهش رطوبت در منطقه ریشه می‌باشد. افزایش جذب آب سبب توروژسانس در سلول‌ها می‌گردد که خود عامل محرک طویل شدن سلول‌ها است (Asgharipoor and Rafiei, 2010). کمبود آب در هر مرحله از رشد گیاه، جذب و انتقال عناصر غذایی را کاهش می‌دهد. میکوریزا با افزایش جذب عناصر غذایی و به دنبال آن فتوسنتز بیشتر برگ، با اختصاص کربن بیشتر به ریشه در افزایش طول ریشه موثر است (Azimi *et al*., 2013). در این تحقیق، افزایش طول ریشه در نتیجه کاربرد میکوریزا با نتایج تحقیقات (Rapparini and Penuelas, 2014) در گیاه درمنه و (Sensoy *et al*., 2007) در گیاه فلفل مطابقت داشت. استفاده از میکوریزا

تحمل گیاهان به خشکی را از طریق بهبود جذب آب و حفظ پتانسیل آماس برگ، کنترل منافذ روزنه‌ای و تعرق، افزایش طول و عمق توسعه ریشه و شبکه میسیلیومی افزایش می‌دهد (Vamerali *et al.*, 2003). همچنین تحقیق روی گیاهان میکوریزایی و غیرمیکوریزایی در شرایط تنش رطوبتی نشان داده است که هدایت هیدرولیکی سیستم ریشه‌ای گیاهان میکوریزایی بیشتر است که این موضوع در اثر افزایش طول ریشه‌های میکوریزایی می‌باشد. در این حالت هدایت آبی نیز ۲ تا ۳ برابر افزایش نشان می‌دهد (Zahra and Loynachan, 2003). سونگ (Song, 2005) گزارش نمود که بهبود شرایط ریزوسفر خاک در وضعیت تنش، توسعه سیستم ریشه‌ای، افزایش ویژگی‌های رشدی ریشه و بهبود جذب آب و عناصر غذایی توسط گیاه، بهبود سیستم دفاعی گیاه میزبان و کاهش خطرات اکسیداسیون ناشی از تنش خشکی را می‌توان با اثرات کاربرد میکوریزا مرتبط دانست.

خصوصیات فیتوشیمیایی برگ توتون

در این تحقیق اثر سال بر محتوای نیکوتین در سطح احتمال ۵٪ و نسبت قند احیا به نیکوتین در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بود (جدول ۲). میانگین درصد نیکوتین در سال نخست ۱/۸ و در سال دوم با حدود ۱۰٪ افزایش به ۲/۰٪ رسید. درحالی‌که نسبت قند احیا به نیکوتین در سال اول بالاتر از سال دوم اجرای طرح بود (جدول ۳). کاربرد بیوچار نیز اثر معنی‌دار در ۵٪ بر درصد قند احیا و ۱٪ بر نسبت قند احیا به نیکوتین داشت (جدول ۲). نبود اختلاف معنی‌دار بین سطوح ۴ و ۸ تن در هکتار حاکی از عدم اثر افزایشی مثبت در مقادیر صفات یاد شده در سطوح بالاتر بیوچار دارد. با این حال بالاترین مقدار نسبت قند احیا به نیکوتین مربوط به سطح ۸ تن بیوچار در هکتار بود که در مقایسه با سطح صفر آن حدود ۲۴ ٪ افزایش نشان داد. این میزان افزایش در خصوص درصد قند احیا ۳۰ درصد بود (جدول ۳). در کل، در مقایسه سطوح بیوچار در تیمارهای آزمایشی دامنه تغییرات قند احیا بین ۱۱/۹ تا ۱۵/۵و نسبت قند احیا به نیکوتین بین ۶/۳ تا ۷/۸ بود (جدول ۳). در این مطالعه میکوریزا بر خصوصیات شیمیایی برگ توتون تاثیر معنی‌دار نداشت با این حال تاثیر ازتوباکتر بر درصد نیکوتین در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار بود (جدول ۲) به‌طوری‌که کاربرد ازتوباکتر حدود ۱۷ درصد محتوای نیکوتین برگ را افزایش داد (جدول ۳). باکتری ازتوباکتر مقادیر قابل توجهی از نیتروژن اتمسفری را در خاک تثبیت می‌نماید. این عنصر جزو اصلی ساختمان نیکوتین بوده و رابطه مستقیمی بین محتوای نیتروژن خاک و نیکوتین برگ توتون وجود دارد (Sabeti *et al.*, 2012). اثر متقابل بیوچار در میکوریزا بر درصد نیکوتین و قند احیا در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بود (جدول ۲). بر اساس شکل ۴، در هر سطح بیوچار کاربرد میکوریزا سبب افزایش درصد نیکوتین و قند احیا شد. بیشترین مقدار درصد نیکوتین در سطح ۸ تن بیوچار در هکتار و کاربرد میکویزا با ۲/۰۱ درصد بود. همین روند نیز در خصوص قند احیا مشاهده شد. همچنین اثر متقابل بیوچار در ازتوباکتر نیز در سطح احتمال ۵٪ بر درصد نیکوتین معنی‌دار بود (جدول ۲).

در هر سطح از بیوچار کاربرد ازتوباکتر موجب افزایش محتوای نیکوتین برگ شد. بیشترین و کمترین مقدار آن با ۲/۱۵ درصد در سطح ۸ تن بیوچار در هکتار و کاربرد ازتوباکتر و کمترین مقدار آن با ۱/۷۲ درصد در سطوح صفر

بیوچار و ازتوباکترحاصل شد (شکل ۵). هر چند شرایط رطوبتی مطلوب برای فعالیت ازتوباکتر در خاک ظرفیت حد مزرعه‌ای است اما حتی در شرایط انجام این آزمایش، این فعالیت به‌طور مؤثری انجام شده است. با توجه به تاثیر مثبت و معنی‌دار کاربرد توام بیوچار و ازتوباکتر بر درصد نیکوتین برگ، به نظر می‌رسد بیوچار به‌واسطه نقشی که در افزایش ظرفیت نگهداری آب داشته به‌طور غیرمستقیم در افزایش محتوای نیکوتین برگ با بهینه ساختن شرایط رطوبتی خاک دخیل بوده است. کاربرد توام میکوریزا و ازتوباکتر نیز موجب افزایش درصد نیکوتین برگ در سطح احتمال پنج درصد شد (جدول ۲). با توجه به شکل ۶ در هر سطح از میکوریزا، کاربرد ازتوباکتر موجب افزایش درصد نیکوتین شد که این درصد افزایش در زمان کاربرد توام این دو در قیاس با سطح صفر آنها حدود ۲۳ بود. اثر متقابل سه‌گانه فاکتورهای آزمایشی بر درصد نیکوتین در سطح احتمال ۱٪ و بر درصد قند احیا و نسبت قند احیا به نیکوتین در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار بود (جدول ۲). با روندی مشابه در تیمارهای یکسان از لحاظ سطح مصرف بیوچار و میکوریزا، کاربرد ازتوباکتر باعث افزایش درصد نیکوتین و کاهش نسبت قند احیا به نیکوتین گردید (شکل ۷).

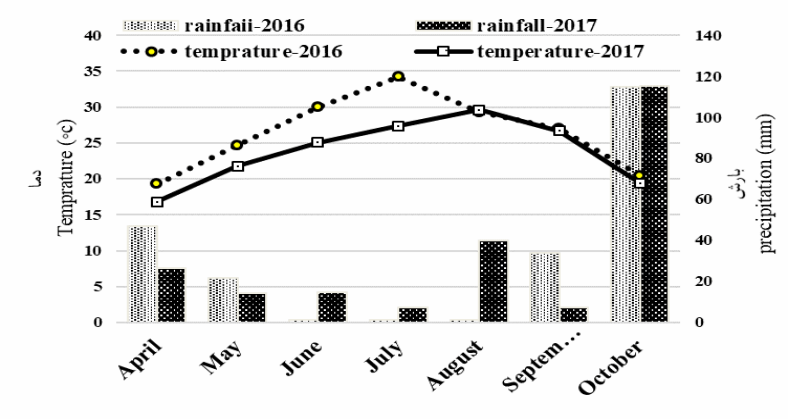
درصد قند احیا با بالا رفتن سطح مصرف هر یک از فاکتورهای آزمایشی افزایش یافت. حداکثر مقدار درصد قند احیا با ۱۶ درصد در تیمارهای حاوی ۸ تن بیوچار در هکتار همراه با کاربرد میکوریزا و ازتوباکتر و کمترین مقدار آن در تیمار شاهد با ۱۱/۶ درصد حاصل شد (شکل ۸). بالا بودن درصد قند به واسطه تاثیر مستقیم در نسبت قند احیا به نیکوتین یک مزیت محسوب می‌گردد.

اندازه‌گیری این صفات از این جهت اهمیت دارد که کیفیت برگ توتون به‌طور مستقیم با ترکیبات فیتوشیمیایی آن در ارتباط است. در این میان درصد نیکوتین یکی از مهم‌ترین فاکتورهای ارزیابی کیفی توتون است (Shang *et al*., 2017). نیکوتین در ریشه سنتز شده و از طریق آوندها به اندام هوایی و به‌طور مشخص به برگ منتقل می‌گردد. مقدار نیکوتین برگ توتون به وضعیت رشدی گیاه و ویژگی‌های خاک وابسته است. به نظر می‌رسد مقدار نیکوتین موجود در برگ توتون بیشتر از اینکه تحت تاثیر سنتز و انتقال آن باشد به محتوای نیتروژن خاک حاصل از فعالیت میکروارگانیسم‌ها وابسته است. لذا کاربرد میکروارگانیسم‌ها در اکوسیستم‌های زراعی تنها به عنوان کودهای بیولوژیک مطرح نیستند. زیرا ازتوباکتر یک عامل تاثیرگذار بر درصد نیکوتین می‌باشد (Sabeti *et al*., 2012) که در این تحقیق نیز تاثیر آن مشاهده شد. این باکتری با تثبیت نیتروژن که یکی از ترکیبات اصلی در ساختمان نیکوتین می‌باشد باعث افزایش دسترسی گیاه به این عنصر می‌گردد (Fritz *et al*., 2006). دامنه نسبت قند احیا به نیکوتین بین ۶ تا ۱۰ بوده که هر چه این نسبت به ۱۰ نزدیک‌تر باشد مطلوب‌تر است (Maw *et al*., 2009). البته هر چه مقدار این نسبت از ۱۰ بیشتر گردد نشان‌دهنده تاثیر منفی بر کیفیت دود بوده و در مقادیر زیر عدد شش نیز دود حالت اسیدی و تند خواهد داشت. در این طرح مقادیر این صفت در دامنه استاندارد تعریف شده قرار داشت. هرچند در این تحقیق استفاده از بیوچار باعث بهبود صفات کیفی شیمیایی مورد ارزیابی شد اما اطلاعات علمی در خصوص مکانیسم تاثیر بیوچار بر این صفات در دسترس نیست. با این وجود نتایج به‌دست آمده حاکی از

تاثیر مثبت بیوچار در افزایش درصد نیکوتین برگ بود. این تاثیر مثبت و معنی‌دار از این جهت با اهمیت می‌باشد که پایین بودن درصد نیکوتین برگ در توتون‌های تولید شده در کشور به‌عنوان یک فاکتور منفی در صنعت سیگارت‌سازی مطرح می‌باشد. همچنین استفاده از بیوچار موجب شد نسبت قند احیا به نیکوتین به مقادیر مطلوب نزدیکتر شود.

نتیجه‌گیری کلی

در حال حاضر یکی از راه حل‌های شناخته شده برای به حداقل رساندن مصرف کودهای شیمیایی استفاده از منابع ایمن مانند کودهای زیستی و ترکیبات اصلاحگر خاک از جمله بیوچار است. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که کاربرد بیوچار باعث بهبود عملکرد برگ، توسعه بیشتر ریشه در توتون و کیفیت شیمیایی برگ آن می‌گردد. بر اساس نتایج، به دلیل عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین سطح ۴ و ۸ تن بیوچار در هکتار بر روی صفات ارزیابی شده با لحاظ جنبه‌های اقتصادی، کاربرد ۴ تن بیوچار در هکتار برای زراعت توتون در شرایط دیم توصیه می‌گردد. همچنین طول ریشه با کاربرد کودهای زیستی افزایش یافت. همچنین ازتوباکتر نیز به طور مشخص باعث افزایش درصد نیکوتین برگ شد. نظر به اینکه محتوای نیکوتین توتون‌های تولید شده در ایران عمدتا پایین بوده کاربرد توام بیوچار و این دو نوع کود زیستی می‌تواند به عنوان یک راهکار عملی مدنظر قرار گیرد. در کل کاربرد بیوچار به‌دلیل تاثیر مستقیم بر عملکرد و کودهای زیستی به واسطه نقشی که در افزایش درصد نیکوتین و افزایش طول ریشه داشتند جهت استفاده در زراعت دیم توتون توصیه می‌گردند.



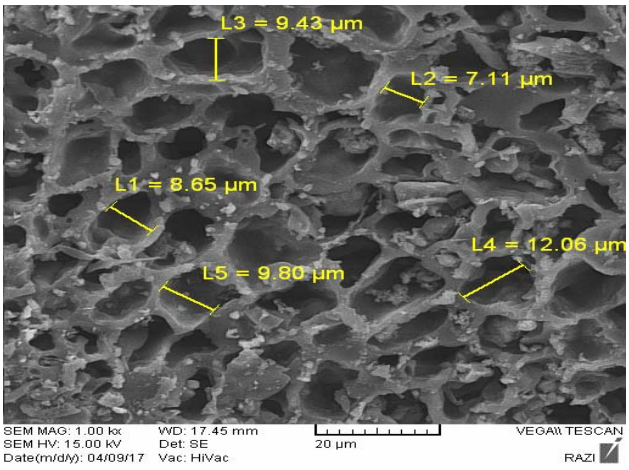
شکل ۱- تغییرات دما و پراکنش بارندگی (۱۳۹۷-۱۳۹۶)

Figure 1- Temperature and precipitation distribution (2016-2017)

جدول ۱- خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک

Table 1- Soil physical and chemical properties

Soil characteristics **خصوصیات خاک**		Year **سال**	
		2016	2017
بافت خاک	Soil texture	Sandy loam	Sandy loam
درصد رس	Clay (%)	14	16
درصد سیلت	Silt (%)	19	18
درصد شن	Sand (%)	67	66
مواد خنثی شونده	Neutralizing matter) %)	18	21
نیتروژن کل	Total nitrogen (%)	0.089	0.093
فسفر	Phosphorus (ppm)	6.9	10.1
پتاسیم قابل جذب	Absorbable potassium (ppm)	220	238
کلر	Chloride (ds/m)	0.97	0.65
هدایت الکتریکی	Electerical conductivity	0.37	0.49
کربن آلی	Organic carbone (%)	1.03	0.95
اسیدیته	pH	7.6	7.2



شکل ۲- تصویر میکروسکوپ الکترونی از بیوچار

Figure 2- Electeronic picture of biochar

جدول۲- تجزیه واریانس مرکب صفات مورد مطالعه

Table 2 -F statistics of combined ANOVA on the traits

منابع تغییرات S.O.V.	درجه آزادی df	عملکرد تر Fresh yield	عملکرد خشک Cured yield	همزیستی میکوریزایی Mycorrhizal Colonization	وزن تر ریشه Root fresh weight	وزن خشک ریشه Root dry weight
سال Year	1	204312526**	3371251**	70.6 ns	1030.25**	34.80**
تکرار (سال) r (year)	6	1919424	48729	28.7	6.58	0.3373
بیوچار B:Biochar	2	188510572*	4903875**	72.8 ns	1362.42*	52.8027**
B×Y	2	6806420 ns	38244 ns	9.8 ns	71.23**	0.4968 ns
میکوریزا M:Mycorrhiza	1	234118820 ns	6189473 ns	17888.1*	1265.78 ns	52.9551 ns
M×Y	1	9515523 ns	86881 ns	46.5 ns	158.49 ns	3.3900**
ازتوباکتر A:Azotobacter	1	14946817 ns	303750 ns	13.8 ns	2.00 ns	0.0007 ns
A×Y	1	5332665 ns	59203 ns	11.8 ns	30.63 ns	3.5651**
B×M	2	11757176 ns	279621 ns	78.2 ns	29.23 ns	6.2913 ns
B×M×Y	2	10326068 ns	230508 ns	10.5 ns	5.26 ns	2.6265**
B×A	2	3180506*	29260 ns	1.8 ns	0.90 ns	1.0409 ns
B×A×Y	2	131370 ns	13742 ns	20.7 ns	9.15 ns	1.3441**
M×A	1	6821334 ns	9401 ns	9.7 ns	145.85 ns	11.3438 ns
M×A×Y	1	10168620 ns	222915 ns	19.2 ns	131.34**	6.0501**
B×M×A	2	4194819 ns	52152 ns	19.9 ns	32.21 ns	2.2375 ns
B×M×A×Y	2	2648692 ns	62279 ns	16.3 ns	19.59**	1.3530**
خطا Error	66	3441394	76744	11.6	3.54	0.2480
ضریب تغییرات C.V.(%)		10.6	10.48	18.18	6.07	8.30

ns، * و ** به‌ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد.

Significant at the 0.05 and 0.01 probability levels, respectively and ns: Non- significant.

ادامه جدول۲-

Table 2-Continued

منابع تغییرات S.O.V.	درجه آزادی df	طول ریشه Root lenght	درصد نیکوتین Nicotine percent	درصد قند احیا Reduced sugar percent	نسبت قند احیا به نیکوتین Reduced sugar to nicotine ratio
سال Year	1	526.9 ns	0.56122**	12.334 *	1.2535**
تکرار (سال) r (year)	6	318.3	0.00625	1.074	0.0132
بیوچار B:Biochar	2	25838.5*	0.05070 ns	87.950*	15.8304**
B×Y	2	456.0 *	0.00854 ns	1.168 ns	0.1460 ns
میکوریزا M:Mycorrhiza	1	18349.1*	0.02809 ns	0.201 ns	0.4201 ns
M×Y	1	73.1 ns	0.00046 ns	.0376 ns	0.0168 ns
ازتوباکتر A:Azotobacter	1	3966.0**	2.14102*	6.009 ns	15.9613 ns
A×Y	1	0.1 ns	0.00597 ns	0.161 ns	0.1901 ns
B×M	2	1411.3 ns	0.01992**	4.441*	2.5426 ns
B×M×Y	2	271.4 ns	0.00005 ns	0.068 ns	0.1643 ns
B×A	2	538.4 ns	0.01414*	4.414 ns	1.1429 ns
B×A×Y	2	1422.3 **	0.00052 ns	0.414 ns	0.0668 ns
M×A	1	5.9 ns	0.03067*	2.205 ns	0.0113 ns
M×A×Y	1	257.9 ns	0.00002 ns	0.056 ns	0.0501 ns
B×M×A	2	145.4 ns	0.02618**	3.289*	1.8779*
B×M×A×Y	2	279.8 ns	0.00007 ns	0.043 ns	0.0235 ns
خطا Error	66	141.2	0.00709	1.471	0.4862
ضریب تغییرات C.V.(%)		11.31	4.32	8.69	9.66

ns، * و ** به‌ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد.

Significant at the 0.05 and 0.01 probability levels, respectively and ns: Non- significant.

جدول ۳- اثر اصلی سال، بیوچار، میکوریزا و ازتوباکتر بر صفات مورد ارزیابی

Table 3 –Main effect of year, biochar, mycorrhiza and azotobacter on the traits

		عملکرد تر Fresh yield ($kg.ha^{-1}$)	عملکرد خشک Cured yield ($kg.ha^{-1}$)	همزیستی میکوریزایی Mycorrhizal Colonization (%)	وزن تر ریشه Root fresh weight ($g.2355\ cm^{-3}$)	وزن خشک ریشه Root dry weight ($g.2355\ cm^{-3}$)
سال Year	2017	16001 b	2455 b	17.8 a	27.7 b	5.2 b
	2018	18919 a	2830 a	19.5 a	34.2 a	6.4 a
بیوچار Biochar	B0	14693 b	2200 b	16.9 a	23.9 b	4.3 b
	B4	18549 a	2782 a	19.8 a	32.7 a	6.2 a
	B8	19228 a	2944 a	19.3 a	36.5 a	6.8 a
میکوریزا Micorrhiza	M0	15899 a	2388 a	5.0 b	27.4 a	5.0 a
	M1	19021 a	2896 a	32.3 a	34.7 a	6.5 a
ازتوباکتر Azotobacter	A0	16433 a	2468 a	18.3 a	31.0 a	5.8 a
	A1	17854 a	2698 a	19.0 a	31.2 a	5.8 a

در هر ستون، میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک تفاوت آماری معنی‌داری باهم ندارند (براساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪).

* Means with same letter in each column (between each horizontal line) are not significantly different according Duncan's Multiple Range Test (0.05).

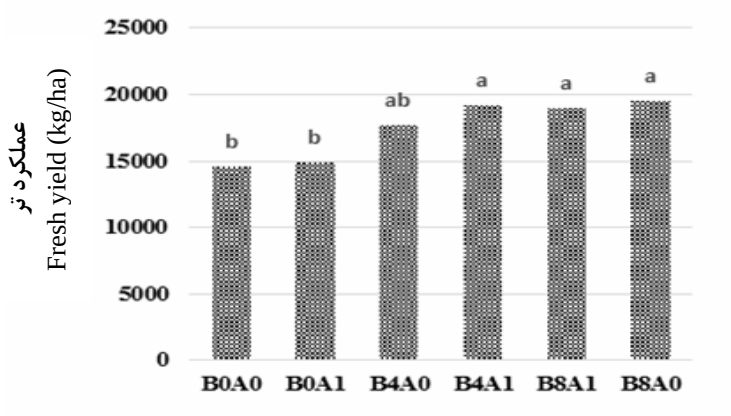
ادامه جدول ۳-

Table 3 – Continued

		طول ریشه Root length ($g.2355\ cm^{-3}$)	درصد نیکوتین Nicotine percent	درصد قند احیا Reduced sugar percent	نسبت قند احیا به نیکوتین Reduced sugar to nicotine ratio
سال Year	2017	102.7 a	1.8 b	13.6 b	7.4 a
	2018	107.4 a	2.0 a	14.5 a	7.1 b
بیوچار Biochar	B0	75.8 c	1.9 a	11.9 b	6.3 b
	B4	106.9 b	1.9 a	14.8 a	7.6 a
	B8	132.5 a	2.0 a	15.5 a	7.8 a
میکوریزا Micorrhiza	M0	91.2 b	1.9 a	14.0 a	7.3 a
	M1	118.9 a	1.9 a	14.1 a	7.2 a
ازتوباکتر Azotobacter	A0	98.6 b	1.8 b	13.6 a	7.7 a
	A1	111.5 a	2.1 a	14.3 a	6.8 a

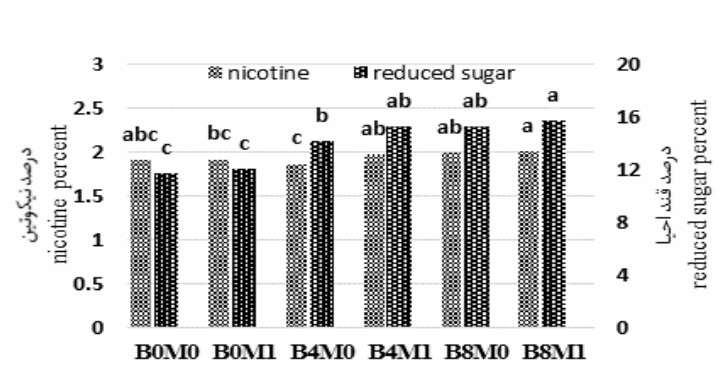
در هر ستون، میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک تفاوت آماری معنی‌داری باهم ندارند (براساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪).

* Means with same letter in each column (between each horizontal line) are not significantly different according Duncan's Multiple Range Test (0.05).



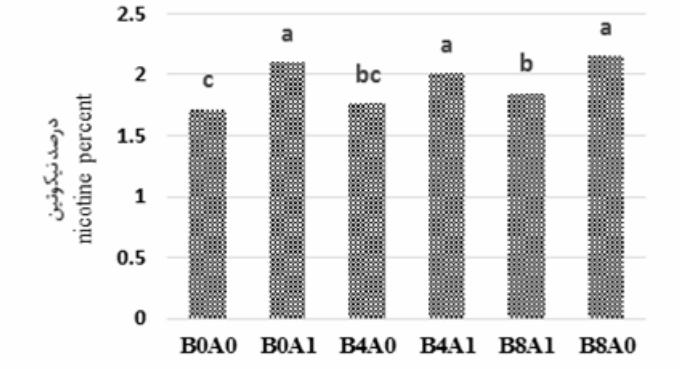
شکل ۳- اثر متقابل بیوچار و ازتوباکتر بر عملکرد تر

Figure 3- Effect of biochar and azotobacter interaction on fresh yield



شکل ۴- اثر متقابل بیوچار و میکوریزا بر درصد نیکوتین و قند احیا

Figure 4- Effect of biochar and micorrhiza interaction on nicotine and reduced sugar percent

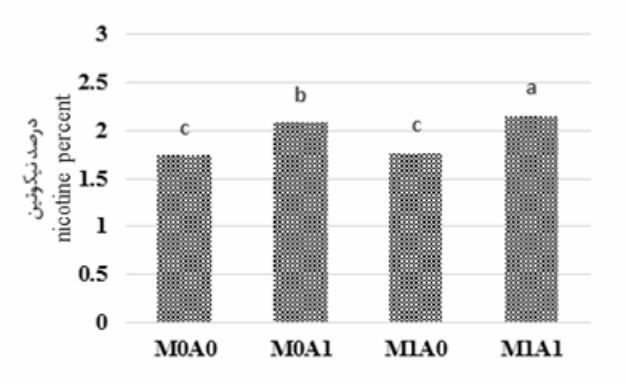


شکل ۵- اثر متقابل بیوچار و ازتوباکتر بر درصد نیکوتین

Figure 5- Effect of biochar and azotobacter interaction on nicotine percent

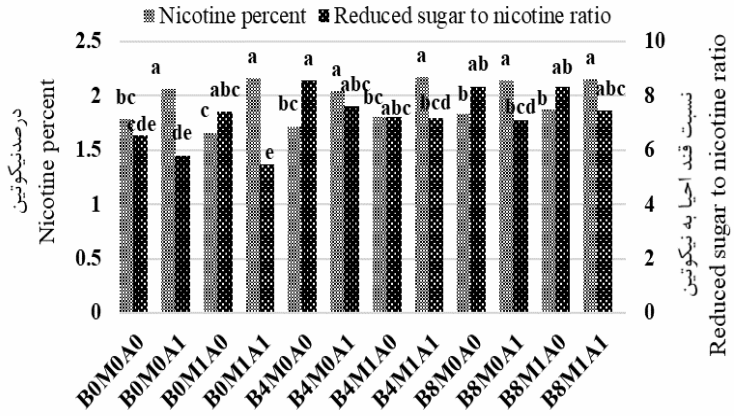
B0: عدم مصرف بیوچار، B4: مصرف ۴ تن بیوچار در هکتار ، B8: مصرف ۸ تن بیوچار در هکتار ، M0: عدم کاربرد میکوریزا و M1: کاربرد میکوریزا، A0: عدم کاربرد ازتوباکتر و A1: کاربرد ازتوباکتر

B0: no biochar application, B4; application 4 ton/haof biochar, B8: application 8 ton/ha of biochar, M0: no mycorrhiza application, M1: mycorrhiza application, A0: no azotobacter application and A1: azotobacter application



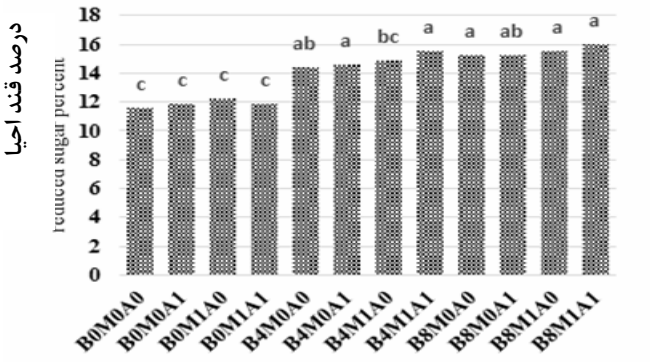
شکل ۶- اثر متقابل میکوریزا و ازتوباکتر بر درصد نیکوتین

Figure 6- Effect mycorrhiza and azotobacter interaction on leaf nicotine content



شکل ۷- اثر متقابل بیوچار، میکوریزا و ازتوباکتر بر درصد نیکوتین و نسبت قند احیا به نیکوتین

Figure 7- Effect of biochar, mycorrhiza and azotobacter interaction on nicotine percent and reduced sugar to nicotine ratio



شکل ۸- اثر متقابل بیوچار، میکوریزا و ازتوباکتر بر درصد قند احیا

Figure 8- Effect of biochar, mycorrhiza and azotobacter interaction on reduced sugar percent

B0: عدم مصرف بیوچار، B4: مصرف ۴ تن بیوچار در هکتار ، B8: مصرف ۸ تن بیوچار در هکتار ، M0: عدم کاربرد میکوریزا و M1: کاربرد میکوریزا، A0: عدم کاربرد ازتوباکتر و A1: کاربرد ازتوباکتر

B0: no biochar application, B4; application 4 ton/haof biochar, B8: application 8 ton/ha of biochar, M0: no mycorrhiza application, M1: mycorrhiza application, A0: no azotobacter application and A1: azotobacter application

References منابع مورد استفاده

- Agegnehu, G., A. Srivastava, and M.I. Bird. 2017. The role of biochar and biochar-compost in improving soil quality and crop performance: a review. *Applied Soil Ecology*. 119: 156–170.
- Alizadeh, A. 2004. Relations between soil, root and plant. Astan Ghods Press. 46 pp. (In Persian).
- Anonymous. 1994a. CORESTA recommended method No 35. Determination of total alkaloids (as nicotine) in tobacco by continuous flow analysis. Available from: https://www.coresta.org/sites/default/files/technical_documents/main/CRM_35-update (Aug10).pdf
- Anonymous. 1994b. CORESTA recommended method No 38. Determination of reducing carbohydrates in tobacco by continuous flow analysis. Available from: https://www.coresta.org/sites/default/files/technical_documents/main/CRM_38-update (Aug10).pdf
- Antony, A., and R.B. Singadhupe. 2004. Impact of drip and surface irrigation on growth, yield and WUE of Capsicum (*Capsicum anum* L.). *Agricultural Water Management*. 65: 121-132.
- Asgharipoor, M.R., and M. Rafiei. 2010. Effect of drought stress on different morphological characteristics of root and root: shoot ratio on mungbean genotypes. Pp: 2814. In: Proceedings of the 11th Iranian Crop Sciences Congress, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran. (In Persian).
- Auge, R.M. 2001. Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza*. 11: 3-42.
- Azimi, R., M. Ghang Gho, and H.R. Asgari. 2013. The effect of mycorrhiza inoculation on the initial establishment and morphological of the *Thymus vulgaris* L. under natural conditions. *Iranian Journal of Crop Science*. 4: 666-676. (In Persian).
- Behrooz, A., and K. Vahdati. 2019. Arbuscular mycorrhiza and plant growth-promoting bacteria alleviate drought stress in Walnut. *American Society for Horticultural Science*. 54: 1087-1092.
- Boyer, L.R., P. Brain, X.M. Xu, and P. Jeffries. 2015. Inoculation of drought-stressed strawberry with a mixed inoculum of two arbuscular mycorrhizal fungi: effects on population dynamics of fungal species in roots and consequential plant tolerance to water deficiency. *Mycorrhiza.* 25(3): 215–227.
- Chawla, H.S. 2003. Plant biotechnology a practical approach. Science Publishers Inc. USA.
- Elwan, L.M. 2001. Effect of soil water regimes and inoculation with mycorrhizae on growth and nutrients content of maize plants. *Zagazig Journal of Agriculture Research*. 28: 162-172.
- Fritz, C., N. Palacios-Rojas, R. Feil, and M. Still. 2006. Regulation of secondary metabolism by the Carbon-nitrogen status in tobacco: nitrate inhibits large sectors of phenylpropanoid metabolism. *The Plant Journal*. 46: 533-548.

- Gao, L., R. Wang, G. Shen, J. Zhang, G. Meng, and J. Zhang. 2017. Effects of biochar on nutrients and the microbial community structure of tobacco-planting soils. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. 17(40): 884-896.
- Hammer, E.C., Z. Balogh-Brunstad, I. Jakobsen, P.A. Olsson, S.L.S. Stipp, and M.C. Rilling. 2014. A mycorrhizal fungus grows on biochar and captures phosphorus from its surfaces. *Soil Biology and Biochemistry*. 77: 252-260.
- Hashem, A., A. Kumar, A.M. Al-Dbass, A.A. Alqarawi, A.B.F. Al-Arjani, G. Singh, M. Farooq, M. Elsayed, and E. Fathi Abd_Allah. 2019. Arbuscular mycorrhizal fungi and biochar improves drought tolerance in chickpea. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 26: 614-624.
- Jiangzhou, L., J. Sigui, Z. Limeng, and Z. Qingzhong. 2016. Effects of biochar on soil quality and tobacco growthduring four years of consecutive application. Institute of Enviromental and Sustainable Development in Agriculture. Chinese Agricultural Science. APPOST 16.
- Kennedy, I.R., A.T.M.A. Choudhury, and M.L. Kecskes. 2004. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? *Soil Biology and Biochemistry*. 36: 1229–1244.
- Kim, Y., J.I. Oh, M. Vithanage, Y.K. Park, J. Lee, and E.E. Kwon. 2019. Modification of biochar properties using CO_2. *Chemical Engineering Journal*. 372: 383-389.
- Ladha, J.K., and P.M. Reddy. 2003. Nitrogen fixation in rice systems state of knowledge and future prospects. *Plant and Soil*. 252: 151-167.
- Lin, G., W. Rui, S. Guoming, Z. Jixu, M. Guixing, and Z. Jiguang. 2017. Effects of biochar on nutrients and the microbial community structure of tobacco-planting soils. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. 17(4): 884-896.
- Maw, B.W., J.R. Stansell, and B.G. Stansell. 2009. Soil-plant-water relationships for flue-cured tobacco. The University of Georgia, Cooperative Extension. *Research Bulletin*. 427: 1–36.
- Mickan, B.S.; L.K. Abbott, K. Stefanova, and Z.M. Solaiman. 2016. Interactions between biochar and mycorrhizal fungi in a water-stressed agricultural soil. *Mycorrhiza*. 26: 565-574.
- Ortiz, N., E. Armada, E. Duque, A. Roldan, and R. Azcon. 2015. Contribution of arbuscular mycorrhizal fungi and/or bacteria to enhancing plant drought tolerance under natural soil conditions: effectiveness of autochthonous or allochthonous strains. *Journal of Plant Physiology*. 174: 87-96.
- Phillips, J.M., and D.S. Hayman. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*. 55: 158-161.
- Pringle, A., J.D. Bever, M. Gardes, J.L. Parrent, M.C. Rillig, and J.N. Klironomos. 2009. Mycorrhizal symbioses and plant invasions. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 40: 699–715.

- Rapparini, F., and J. Penuelas. 2014. Mycorrhizal fungi to alleviate drought stress on plant growth, p. 21–42. In: M. Miransari (ed.). Use of microbes for the alleviation of soil stresses. Vol. 1. Springer, New York, NY.
- Ruiz-Lozano, J.M., R. Porcel, G. Bárzana, R. Azcón, and R. Aroca. 2012. Contribution of arbuscular mycorrhizal symbiosis to plant drought Mycorrhiza (2016) 26:565–574 tolerance: state of the art. In: Aroca, R (ed.), Plant Responses to Drought Stress. Springer, Berlin 335–362.
- Sabeti, M.M., A. Fallah, M. Norouzi, and S. Harutyunyan. 2012. Response of coker flue-cured tobacco to inoculation with *Azotobacter chroococum* at various levels on nitrogen fertilization. *Australian Journal of Crop Science*. 6(5): 861-868.
- Sensoy, S., S. Demir, O. Turkmen, C. Erdinc, and O. Savur. 2007. Responses of some different pepper (*Capsicum annum* L.) genotypes to inoculation with two different arbuscular mycorrhizal fungi. *Scientia Horticulturae*. 113(1): 92-95.
- Shang, X., Y. Shang, J. Fu, and T. Zhan. 2017. Nicotine significantly improves chronic stress-induced impairments of cognition and synaptic plasticity in mice. *Mol neurobiol*. 54: 4644-4658.
- Solaiman, Z.M., P. Blackwell, L.K. Abbott, and P. Storer. 2010. Direct and residual effect of biochar application on mycorrhizal root colonization, growth and nutrition of wheat. *Australian Journal of Soil Research*. 48(7): 546-554.
- Song, H. 2005. Effects of VAM on host plant in condition of drought stress and its mechanisms. *Electronic Journal of Biology.* 1(3) 44-48.
- Stajkovic, O., D. Delic, D. Josic, N. Kuzmanovic, N. Rasulic, and J. Knezevic-Vukcevic. 2011. Improvement of common bean growth by co-inoculation with rhizobium and plant growth-promoting bacteria. *Romanian Biotechnological Letters*. 16: 5919-5926.
- Suliman, W., J.B. Harsh, N.I. Abu-Lail, A.M. Fortun, I. Dallmeyer, and M. GarciaPérez. 2017. The role of biochar porosity and surface functionality in augmenting hydrologic properties of a sandy soil. *Science of Thethe Total Environment*. 574: 139–147.
- Taffouo, V.D., B. Ngwene, A. Akoa, and P. Franken. 2013. Influence of phosphorus application and arbuscular mycorrhizal inoculation on growth, foliar nitrogen mobilization, and phosphorus partitioning in cowpea plants. *Mycorrhiza*. 24: 361–368.
- Tso, T.C. 2005. Production, physiology and biochemistry of tobacco plant. Institute of international development and education in agricultural and life sciences, New York, USA
- Vamerali, T., M. Saccomani, S. Bona, G. Mosca, M. Guarise, and A. Ganis. 2003. A comparison of root characteristics in relation to nutrient and water stress in two maize hybrids. *Plant and Soil*. 255: 157–167.
- Warnock, D.D., J. Lehmann, T.W. Kuyper, and M.C. Rillig. 2007. Mycorrhizal responses to biochar in soil–concepts and mechanisms. *Plant and Soil*. 300: 9-20.

- Wu, Q.S., and R.X. Xia. 2006. Arbuscular mycorrhizal fungi influence growth, osmotic adjustment and photosynthesis of citrus under well-watered and water stress conditions. *Journal of Plant Physiology.* 163: 417-425.
- Wu, S.C., Z.H. Cao, Z.G. Li, K.C. Cheung, and M.H. Wong. 2005. Effects of biofertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: a greenhouse trial. *Geoderma*. 125(1-2): 155-166.
- Xiang, Y., Q. Deng, H. Duan, and Y. Guo. 2017. Effects of biochar application on root traits. *GCB Bioenergy*. 9: 1563-1572.
- Xu, C.Y., S. Hosseini-Bai, Y. Hao, R.C.N. Rachaputi, H. Wang, Z. Xu, and H. Wallace. 2015. Effect of biochar amendment on yield and photosynthesis of peanut on two types of soils. *Environmental Science and Pollution Research International*. 22: 6112–6125.
- Yaghoby, M., M. Amerian, and H. Asghar. 2014. Comparison of the effect of biological and biofertilized fertilizers on some physiological traits in bean growing. The 2nd National Conference of the Desert with the Approach of the Management of Arid and Desert Areas. Semnan University. (In Persian).
- Yousef, A.A., A.E. Edris, and A.M. Gomaa. 2004. A comparative study between some plant growth regulators and certain growth hormones producing microorganisms on growth and essential oil composition of *Saliva officinalis* L. *Plant Annals of Agricultural Science*. 49: 299-311.
- Zahra, I. T., and T.E. Loynachan. 2003. Endomycorrhizal fungi survival in continuous corn, soybean and fallow. *Agronomy Journal*. 95(1): 224-230.
- Zhang, J., Z.F. Zhang, G.M. Shen, R. Wang, L. Gao, Y.C. Dai, T. Zha, and J.G. Zhang. 2016. Tobacco growth responses and soil properties to rice-straw biochar applied on yellow-brown soil in central China. International Conference on Energy Development and Environmental Protection (EDEP 2016) ISBN: 978-1-60595-360-1.

Research Article DOI: 10.30495/jcep.2021.683384

Effect of Biofertilizer and Biochar Applications on Quantitative, Qualitative Yields and Root Characteristics of Flue-Cured Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) Under Dryland Farming Conditions

Ramin Mesbah[1], Mohammad Reza Ardakani[2*], Ali Moghaddam[3] and Farnaz Rafiei[4]

Received: September 2020 , Revised: 10 October 2020, Accepted: 2 April 2021

Abstract

Tobacco is cultivated as a valuable crop in more than one hundred countries in different climatic conditions and plays an important role in the economies of some countries.This study was performed to evaluate the effect of mycorrhiza and azotobacter with application of biocahr on tobacco leaf yield, root characteristics and phytochemical components under rainfed conditions for two growing seasons at 2016 and 2017 at the Research Farm of Tirtash Tobacco Research and Education Center of Mazandaran province, Iran. A factorial experiment based on randomized complete block design with four replications and three treatments was performed. Treatments consisted of biochar (B) at three levels (0, 4 and 8 ton/ha), mycorrhiza (M), and azotobacter (A) both at two levels (without and with application). Application of 4 ton/ha biocahr increased fresh yield by 26%, cured yield 26%, root dry weight 44%, root fresh weigth 37%, root length 41%, nicotine 3%, while reduced sugar content 24% and sugar to nicotine ratio by 21% as compared to zero level of biochar application. The effect of mycorrhiza and azotobacter application on tobacco leaf yield but it was not significant, however, azotobacter had the most significant effect on nicotine content (17%). There was a positive and significant correlation between root characteristics and tobacco leaf yield. Due to the lack of significant differences between levels of 4 and 8 tons per hectare of biochar in most of the evaluated traits in terms of economic approach, the use of 4 tons per hectare of biochar along with mycorrhiza and Azotobacter to reduce the adverse of low water effects in rainfed farms and ameliorate the tobacco growth is recommended. Also azotobacter application is considered as desirable factor to increase of nicotine in tobacco.

Key words: Azotobacter, Biochar, Mycorrhiza, Tobacco, Rainfed, Yield.

1- Ph.D. Student, Agronomy Department, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran.
2- Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran.
3- Assistant Professor, Seed and Plant Improvement Institute, Tehran, Iran.
4- Assistant Professor, Agronomy Department, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
**Corresponding Author: mreza.ardakani@gmail.com*