Journal of Agroecology
Homepage: https://agry.um.ac.ir/

Research Article
Vol. 14, No. 2, Summer 2022, p. 345-361

Effect of Biochar, *Azotobacter*, and Mycorrhizal Symbiosis on Yield, Nutrient Content, and Phytochemical Properties of Flue-Cured Tobacco (*Nicotiana Tabacum* L.)

R. Mesbah[1], M.R. Ardakani[2*], A. Moghaddam[3], and F. Rafiei[4]

Received: 22-01-2021
Revised: 13-04-2021
Accepted: 26-04-2021
Available Online: 14-09-2022

How to cite this article:
Mesbah, R., Ardakani, M.R., Moghaddam, A., and Rafie, F., 2022. Effect of biochar, *Azotobacter*, and mycorrhizal symbiosis on yield, nutrient content, and phytochemical properties of flue-cured tobacco (*Nicotiana Tabacum* L.). Journal of Agroecology 14(2):345-361.
DOI: 10.22067/agry.2021.68371.1013

Introduction

In tobacco, chemical fertilizers are used to achieve the desired yield like other crops. In recent years, with the aim of maintaining soil fertility, improving physical and chemical properties, and creating a balance in environmental factors, the use of biofertilizers and compounds such as biochar has been considered in line with the goals of sustainable agriculture. Biochar improves soil's physical and chemical properties, increases microbial activity, and provides microorganisms with carbon, energy, and mineral elements. The positive effects of using biochar with some beneficial microorganisms can be intensified. In some studies, the effect of biochar on the abundance of arbuscular mycorrhizal fungi and the positive effects of these in increasing yield have been reported. Mycorrhizal fungi can be considered a suitable solution to improve the plant's nutritional status by absorbing nutrients and more water, decomposing soil organic matter and improving the growth and development of host plants. Mycorrhizal fungi can increase water uptake by entering very small pores that even the plant roots cannot penetrate. Applying other useful soil organisms such as Azotobacter in tobacco fields due to its ability to dissolve phosphates and produce vitamins can improve plant growth and development. Considering that no research has been done in Iran on tobacco production without chemical fertilizers, in this study, the possibility of economic production of tobacco using biofertilizers and modifying compounds such as biochar is evaluated.

Materials and Methods

This experiment was carried out as a factorial based 3×2×2 on randomized complete block design including biochar (B) at three levels (0, 4, and 8 ton/ha), mycorrhiza (M), and Azotobacter (A) at two levels (without and with application) with four replications. The seedling roots of Azotobacter-containing treatments were inoculated ten days before transplanting. Also, mycorrhiza inoculum was mixed with the soil bed in a ratio of 1 to 10. The biochar was also distributed manually on the surface of the plots and mixed with field soil by a disc. The total weight of four picks of each experimental plot was calculated as fresh yield and after curing as dry plot yield. The leaf nitrogen content was measured by the Kjeldahl method, phosphorus was measured by spectrophotometer, and the amount of absorbable potassium was measured by reading potassium ions by flame photometer. Phillips and Hayman's (1970) method was used to calculate the mycorrhizal symbiosis of the root. The nicotine and sugar

1- Ph.D. Student, Department of Agronomy, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2- Professor, Department of Agronomy, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran.
3- Assistant Professor, Seed and Plant Improvement Institute (SPII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
4- Assistant Professor, Department of Agronomy, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
(*- Corresponding Author: mreza.ardakani@gmail.com)

content was determined using the standard method Nos. 35 and 38 of the world organization of Corseta.

Results and Discussion

Application of 4 ton/ha biochar increased fresh yield by 11%, cured yield by 12%, the leaf nitrogen, phosphorus, and potassium content by 13, 20, and 15%, respectively, and leaf nicotine and sugar content by 18 and 24% compared to zero level. The leaf nitrogen enhanced by increasing biochar consumption level. The highest amount of leaf nitrogen was obtained at the B8. The same trend was observed in leaf phosphorus content. But in terms of potassium content, the lowest amount was obtained at B0 with 2.6% and the highest at B4 with 3%. Application of mycorrhiza inoculum increased the fresh and dry yield by 6%. The positive results of this study in the simultaneous use of biochar and mycorrhiza and Azotobacter on the mycorrhizal symbiosis can be due to the positive effect of biochar in increasing the activity of other microorganisms such as mycorrhiza or reducing the negative effects of harmful chemical compounds in soil. In this study, although using Azotobacter increased the leaf yield, this increase was not significant. Also, the Azotobacter application had a positive and significant effect on nicotine content and increased it by 32%. The application of Azotobacter can be a desirable solution to increase tobacco nicotine content.

Conclusion

Due to the lack of significant differences between 4 and 8 tons per hectare of biochar on the evaluated traits in terms of economic aspects, the use of 4 tons per hectare of biochar along with the use of mycorrhiza and Azotobacter to achieve acceptable yield while maintaining chemical quality in tobacco farms is recommended.

Keywords: Biofertilizer, Soil modifier, Yield, Nicotine

نشریه بوم شناسی کشاورزی
Homepage: https://agry.um.ac.ir/

مقاله پژوهشی

تأثیر بیوچار، *ازتوباکتر* و هم‌زیستی میکوریزایی بر عملکرد، محتوای عناصر غذایی و خصوصیات فیتوشیمیایی توتون (*Nicotiana tabacum* L.) گرمخانه‌ای

رامین مصباح[1]، محمدرضا اردکانی[2*]، علی مقدم[3] و فرناز رفیعی[4]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۱/۰۳
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۰۱/۲۴
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۲/۰۶

مصباح، ر.، اردکانی، م.ر.، مقدم، ع.، و رفیعی، ف.، ۱۴۰۱. تأثیر بیوچار، *ازتوباکتر* و هم‌زیستی میکوریزایی بر عملکرد، محتوای عناصر غذایی و خصوصیات فیتوشیمیایی توتون (*Nicotiana tabacum* L.) گرمخانه‌ای. بوم‌شناسی کشاورزی ۱۴(۲): ۳۶۱-۳۴۵.

چکیده

این تحقیق به منظور بررسی اثر دو نوع کود زیستی به همراه بیوچار بر عملکرد، محتوای عناصر غذایی و ترکیبات شیمیایی برگ توتون (*Nicotiana Tabacum* L.) طی دو سال زراعی ۱۳۹۶ و ۱۳۹۷ در مزرعه تحقیقاتی مرکز تحقیقات و آموزش تیرتاش به اجرا درآمد. آزمایش به‌صورت فاکتوریل ۲×۲×۳ در قالب بلوک‌های کامل تصادفی با سه فاکتور بیوچار در سه سطح (صفر، چهار و هشت تن در هکتار)، میکوریزا و *ازتوباکتر* هر یک در دو سطح (با کاربرد و بدون کاربرد) در چهار تکرار اجرا شد. با توجه به نتایج، تفاوت آماری معنی‌دار بین کاربرد مقادیر چهار و هشت تن بیوچار در هکتار در اکثر صفات مورد مطالعه دیده نشد. بر این اساس کاربرد چهار تن بیوچار در هکتار موجب افزایش عملکرد برگ تر به‌میزان ۱۱ درصد، عملکرد برگ خشک ۱۲ درصد، محتوای نیتروژن، فسفر و پتاسیم برگ به‌ترتیب ۱۳، ۲۰ و ۱۵ درصد و محتوای نیکوتین و قند برگ به‌ترتیب ۱۸ و ۲۴ درصد گردید. کاربرد میکوریزا نیز اثر مثبت و معنی‌دار بر روی صفات ارزیابی شده داشت. به‌طوری‌که عملکرد تر و خشک، محتوای نیتروژن، فسفر و پتاسیم برگ با کاربرد میکوریزا به‌ترتیب ۶، ۲۴، ۳۹ و ۱۵ درصد افزایش یافت. تأثیر کاربرد *ازتوباکتر* بر بسیاری از صفات به لحاظ آماری معنی‌دار نبود و تنها بر محتوای نیکوتین برگ تأثیر مثبت و معنی‌دار داشت و موجب افزایش ۳۲ درصدی آن گردید. نظر به عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین سطوح چهار و هشت تن بیوچار در هکتار در اغلب صفات مورد ارزیابی و با لحاظ جنبه‌های اقتصادی، کاربرد چهار تن بیوچار در هکتار به همراه میکوریزا با هدف افزایش عملکرد کمّی و کیفی توتون بدون استفاده از کودهای شیمیایی و نیز *ازتوباکتر* به‌عنوان راهکاری مطلوب در جهت افزایش محتوای نیکوتین و رفع مشکل پایین بودن آن در توتون تولید داخل در مناطق کشت توصیه می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: اصلاحگر خاک، کود زیستی، نیکوتین

۱- دانشجوی دکترای زراعت، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۲- استاد، گروه زراعت، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران.
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.
(*- نویسنده مسئول: (Email: mreza.ardakani@gmail.com

DOI: 10.22067/agry.2021.68371.1013

مقدمه

برای دستیابی به سیستم‌های زراعی پایدار، حفظ سلامت خاک از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در سیستم‌های زراعی عملکرد گیاهان وابسته به مصرف کودهای شیمیایی است. در حال حاضر، کشاورزی مدرن از طریق برداشت‌های مکرر محصول موجب تخریب ساختمان خاک و کاهش مواد آلی آن شده است. با صنعتی شدن کشاورزی همراستا با افزایش مصرف کودهای شیمیایی میزان عملکرد گیاهان زراعی نیز افزایش یافت، امّا تأثیرات مخرب حاصل از فشار بیش از حد به منابع خاکی موجب شد، پس از چند سال برای حصول همان مقدار عملکرد به‌تدریج مصرف کودهای شیمیایی در طی زمان افزایش یابد (Widowati et al., 2012).

توتون با نام علمی (*Nicotiana tobaccum* L.) یکی از گیاهان زراعی صنعتی است که در علوم زیستی، شیمی و بیوتکنولوژی به‌عنوان گیاه مدل کاربرد داشته و مبدا اولیه آن مناطق جنوبی و مرکزی قاره آمریکا ست. محصول قابل برداشت آن برگ بوده، امّا در یک تک بوته ویژگی‌های کیفی شیمیایی و ذائقه‌ای آن بر اساس موقعیت برگ بر روی ساقه کاملاً متفاوت است. به‌عنوان مثال، مقدار نیکوتین برگ با افزایش ارتفاع بوته افزایش می‌یابد، درحالی‌که در صد قند در برگ های میانی بوته در حداکثر مقدار است. با توجه به حساسیت بالای این گیاه به تأمین نیاز غذایی از این گیاه به‌طور گسترده در تحقیقات کودی استفاده می‌شود، زیرا هر گونه کمبود ناشی از تأمین ناکافی عناصر غذایی در ویژگی‌های ظاهری و شیمیایی آن نمود پیدا می‌کند (Tso, 2005). در زراعت توتون برای دستیابی به عملکرد مطلوب نظیر سایر گیاهان زراعی از کودهای شیمیایی استفاده می‌گردد. یک ایده جدید برای افزایش مواد آلی خاک و کاهش مصرف نهاده‌های شیمیایی استفاده از بیوچار است که یک ماده زیستی گرماکافت شده حاصل از سوختن مواد آلی در شرایط عدم حضور اکسیژن می‌باشد. این ماده غنی از کربن بوده و در برابر تجزیه بسیار مقاوم است (Azeem et al., 2016; Mukherajee et al., 2014). توانایی بیوچار در جذب و نگه‌داری عناصر خاک و جلوگیری از شستشوی آن‌ها، کاهش آزادسازی گازهای گلخانه‌ای موجب افزایش حاصلخیزی خاک می‌گردد (Berek et al., 2011). بیوچار به‌دلیل ساختار متخلخل و سطح ویژه بالا ضمن این که زیستگاه مناسبی برای ریزجانداران خاکزی به جهت حفاظت از خشکی و شکار شدن توسط موجودات بزرگ‌تر تلقی می‌گردد، منبع سرشاری از مواد معدنی و کربنی را هم فراهم می‌نماید. با توجه به اثرات مطلوب ریزجانداران بر ساختار بیولوژیکی خاک، چرخه عناصر غذایی و بهبود دانه‌بندی خاک بر رشد گیاهان تأثیر مثبت دارند (Aslam et al., 2016). با توجه به نقش بیوچار در پایداری اکوسیستم‌های زراعی، تحقیقاتی در ارتباط با تأثیر آن در بهبود رشد و عملکرد گیاهان انجام شده، امّا تاکنون در کشور ما در رابطه با تأثیر کاربرد بیوچار بر عملکرد کمّی و کیفی توتون مطالعه‌ای صورت نگرفته است.

نتایج مطالعه‌ای چهارساله روی اثر کاربرد مقادیر مختلف بیوچار بر خصوصیات کیفی خاک و توتون نشان داد، کاربرد آن موجب افزایش معنی‌دار محتوای کربن آلی سطح خاک و بهبود وضعیت تغذیه‌ای گیاه گردید. ویژگی‌های کیفی مرتبط با برگ توتون نیز با مصرف ۱۵ تن در هکتار افزایش یافت که دلیل این امر فراهمی بیشتر عناصر غذایی و افزایش ظرفیت نگه‌داری آب در خاک عنوان گردید. البته تأثیر بیوچار در بهبود ویژگی‌های خاک و رشد گیاه در شرایط پایین بودن سطح عناصر غذایی خاک بیشتر است (Jiangzhou et al., 2016). نتایج مطالعه‌ای نشان داد که کاربرد مقادیر مختلف بیوچار تولید شده از کاه در زراعت توتون موجب افزایش میزان محتوای عناصر غذایی شامل نیتروژن، فسفر و پتاسیم برگ شد (Lin et al., 2017).

نتایج تحقیقی در انستیتو تحقیقات توتون چین نشان داد که کاربرد بیوچار حاصل از ساقه برنج در زراعت توتون موجب بهبود عملکرد و محتوای نیتروژن کل، پتاسیم کل و فسفر برگ گردید (Zhang et al., 2016). اثرات مثبت استفاده از بیوچار به همراه برخی میکروارگانیسم‌های مفید می‌تواند تشدید گردد. در برخی مطالعات، اثر بیوچار بر فراوانی قارچ میکوریزا آرباسکولار و اثرات مثبت این دو در افزایش عملکرد گزارش شده است، به‌طوری‌که همراهی بیوچار و میکوریزا موجب بهبود خواص فیزیکی و شیمیایی خاک از جمله بهبود دسترسی به مواد مغذی شد (Warnock et al., 2007). هم‌زیستی با قارچ میکوریزا نیز به بهبود وضعیت تغذیه‌ای گیاه از طریق جذب عناصر غذایی (Ruiz-Lozano et al., 2012)، جذب بیشتر آب (Mickan et al., 2016)، تجزیه مواد آلی خاک و افزایش رشد و نمو گیاهان میزبان کمک می‌نماید. هیف های قارچ میکوریزا قادرند به منافذی از خاک نفوذ نمایند که در حالت عادی ریشه گیاهان بدان دسترسی ندارند (Tisdall, 1991). افزایش کلونیزاسیون ریشه‌ها با

میکوریزا یکی از اثرات غیرم ستقیم م صرف بیوچار می‌تواند مح سوب گردد (Taffouo et al., 2013). از سایر ریزوباکتری‌های محرک رشد *ازتوباکتر* می باشـــد که علاوه‌بر تثبیت نیتروژن مولکولی موجود در اتمســـفر، از طریق افزایش تحرک و قابلیت جذب عناصـــر غذایی و به‌ویژه تولید فیتوهورمون‌های ر شد گیاهی موجب بهبود شرایط تغذیه و رشـــد گیاه می‌شـــود. علاوه‌براین، *ازتوباکتر* از طریق کنترل عوامل بیماریزا، به‌طور غیرم ستقیم نیز به حفظ سلامت گیاه کمک نموده که تأثیر نهایی آن افزایش عملکرد گیاهان زراعی می‌باشد (Mrkovacki & Milic, 2001). پتانسیل تولید سیدروفورها و افزایش جذب عناصر کم‌مصـــرف نظیر آهن، مس و روی، توانایی آن در افزایش حلالیت فسفر از ترکیبات نامحلول معدنی نیز به اثبات رسیده است که از جمله روش‌های افزایش دسترسی و جذب عناصر غذایی می‌باشد (Narula et al., 2000). با عنایت به این که تاکنون در کشور هیچ‌گونه تحقیقی در خ صوص تولید توتون بدون ا ستفاده از کودهای شیمیایی صورت نپذیرفته ا ست، در این تحقیق امکان تولید اقتصادی توتون با ا ستفاده از کودهای زیستی و ترکیبات اصلاحگر چون بیوچار مورد ارزیابی قرار می‌گیرد.

مواد و روش‌ها

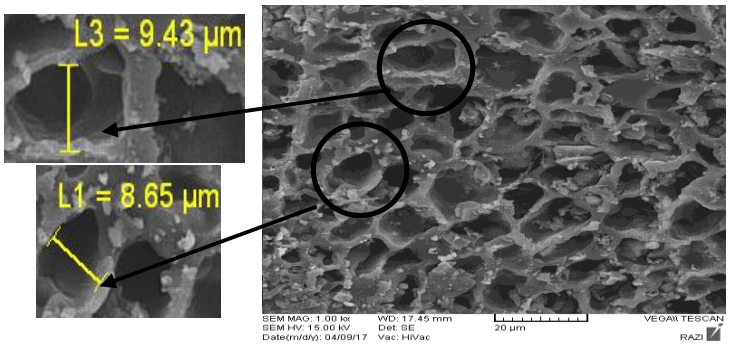
این تحقیق در قالب آزمایش مزرعه‌ای بر روی توتون گرم‌خانه‌ای رقم کا ۳۲۶ طی دو سال زراعی ۱۳۹۶ و ۱۳۹۷ در دو قطعه جداگانه از مزر عه تحقیقاتی مرکز تحقیقات و آموزش توتون تیر تاش واقع در اســـتان مازندران به طول جغرافیایی ۵۳ درجه و ۴۴ دقیقه شـــرقی و عرض جغرافیایی ۳۶ درجه و ۴۲ دقیقه شـــمالی اجرا شـــد. رقم مورد اســـتفاده کا ۳۲۶ بود که این رقم نرعقیم بوده و به‌طور متوســـط ۲۲ تا ۲۶ برگ قابل برداشت دارد. جزو ارقام متوسط رس بوده با عملکرد بالا می باشد، مشخصات فیزیکی و شیمیایی خاک مزرعه به شرح جدول ۱ می‌باشد.

جدول ۱- خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک
Table 1- Soil physical and chemical characteristics

خصوصیات Characteristics	سال Year	
	2017	2018
بافت Texture	شنی لومی Sandy-Loam	شنی لومی Sandy-Loam
نیتروژن کل Total N (%)	0.089	0.093
فسفر قابل جذب Absorbable P (ppm)	9.6	10.1
پتاسیم قابل جذب Absorbable K (ppm	220	238
کلر Cl ($me.l^{-1}$)	0.97	0.65
هدایت الکتریکی EC ($dS.m^{-1}$)	0.37	0.49
کربن آلی Organic C (%)	1.03	0.95
اسیدیته pH	7.6	7.2

- مشخصات بیوچار، *ازتوباکتر* و میکوریزا

جهت تعیین خصوصیات میکروسکوپی بیوچار مورد استفاده، نسبت به آنالیز شـــیمیایی به‌منظور تعیین عناصـــر آن (جدول ۲) و همچنین تهیه عکس الکترونی با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی مدل VEGA\TESCAM و تعیین قطر حفره‌های آن اقدام شد (شکل ۱). بر ا ساس برر سی صورت گرفته سطح فعال آن نیز ۴۰۰ مترمربع در گرم اعلام گردید. مایه تلقیح میکوریزا (ترکیب سه گونه قارچ میکوریزا شامل *Glomus mosseae*، *Glomus intraradices* و *Glomus etunicatum*) با جمع یت کل ۷۰ ا ندام ف عال در هر گرم از کود بیولوژیک و مایه تلقیح *ازتوباکتر* (*Azotobacter chroococcum*) با تراکم حداقل $CFU.g^{-1}$ ۱×۱۰۷ تهیه گردید.



شکل ۱- تصویر میکروسکوپ الکترونی از بیوچار

Fig. 1- Electronic picture of biochar

جدول ۲- آنالیز شیمیایی بیوچار*

Table 2- Chemical analysis of biochar

درصد وزنی عناصر Elements weight percentage									
سیلیکون Silicon	آلومینیوم Al	نیتروژن N	آهن Fe	کلسیم Ca	پتاسیم K	فسفر P	منیزیم Mg	اکسیژن O	کربن C
1.43	0.19	0.31	0.43	4.27	0.38	0.18	0	43.71	48.83

* ماخذ: آزمایشگاه مرکز پژوهش متالورژی رازی

* Source: Razi Metallurgical Research Center

- عملیات آماده سازی خزانه و مزرعه

طی دو سال انجام آزمایش، تهیه نشاء توتون به دو روش شناور در آب[1] (Float System) و سنتی (تحت عنوان خزانه پشتیبان) صورت پذیرفت. عملیات آغشته‌سازی ریشه با مایه تلقیح *ازتوباکتر* ۱۰ روز قبل از انتقال به مزرعه انجام شد. بدین صورت که مایه تلقیح *ازتوباکتر* را در درون تشتکی ریخته و با آب، پنج برابر رقیق‌تر و هر سینی حاوی نشا به‌مدت ۴۵ دقیقه در داخل تشتک قرار داده شد. پس از این مدت، سینی‌ها در داخل حوضچه محل خزانه تا زمان نشاکاری شناور شدند. همچنین مایه تلقیح میکوریزا نیز به‌نسبت ۱ به ۱۰ با خاک بستر خزانه قبل از بذرگذاری مخلوط گردید. در خزانه سنتی نیز ۱۰ روز قبل از تاریخ نشاکاری، مایه تلقیح *ازتوباکتر* همراه با آب آبیاری به خزانه داده شد. مایه تلقیح میکوریزا نیز قبل از بذرپاشی با خاک سطحی خزانه مخلوط شد. در مزرعه نیز قبل از نشاکاری و به‌منظور تأمین بخشی از نیاز غذایی گیاه، مقدار ۱۰ تن در هکتار کود حیوانی پوسیده به مزرعه داده شد؛ و همچنین تیمارهای مختلف بیوچار به صورت دستی و به‌طور یکنواخت در سطح کرت‌ها مصرف و توسط دیسک با خاک مزرعه مخلوط شد. نشاکاری نیز با استفاده از نشاهای حاصل از خزانه شناور، به‌دلیل کیفیت مطلوب آن، در نیمه دوم اردیبهشت ماه انجام شد. عملیات آبیاری به‌روش قطره‌ای از ۳۰ روز پس از نشاکاری تا قبل از برداشت چین آخر هر ۱۴ روز یک بار انجام شد. سایر عملیات داشت و برداشت بر اساس عرف مرکز تحقیقات و آموزش توتون تیرتاش و زیر نظر کارشناسان انجام گرفت.

اندازه‌گیری صفات

عملکرد برگ تر (سبز) و خشک

پس از ۷۵ روز از تاریخ نشاکاری، برداشت توتون از اواخر تیرماه آغاز و در چهار چین به فاصله تقریبی ۲۰ روز (در سال اول: ۲۸ تیرماه، ۱۸ مردادماه، ۱۰ شهریورماه و ۲ مهرماه و در سال دوم: ۲۳

۱- در روش خزانه شناور از سینی‌های یونولیتی ۲۲۰ سلولی استفاده می‌گردد که هر سلول آن با حدود ۲۰ سانتی‌متر معکب گنجایش با خاک بستر پر می‌شود. سپس در هر سلول یک عدد بذر پو شش دار توتون قرار داده شده و در نهایت، سینی پس از بذرگذاری در داخل حوضچه آب حاوی عناصر غذایی شناور می‌گردد. آب به واسطه سوراخ بودن ته هر سلول، آب جذب خاک موجود در هر سلول شده و در نهایت، جوانه‌زنی بذر انجام شد.

تیرماه، ۱۴ مردادماه،۳ شهریور ماه و ۲۵ شهریور ماه) انجام شد. در هر مرحله از برداشت با توجه به رسیدگی صنعتی، تعداد پنج تا شش برگ از پایین بوته برداشت و بلافاصله وزن تر برگ هر کرت آزمایشی ثبت گردید. در ادامه توتون‌های هر کرت در داخل گرم‌خانه و با رژیم دمایی و رطوبتی مشخص عمل‌آوری گردید. وزن توتون عمل‌آوری شده از هر چین به‌عنوان عملکرد خشک همان چین محاسبه شد. در انتهای فصل، مجموع وزن تر چهار چین هر کرت آزمایشی به‌عنوان عملکرد تر و پس از عمل‌آوری به‌عنوان عملکرد خشک همان کرت در نظر گرفته شد.

محتوای عناصر غذایی برگ

در انتهای فصل، از برگ عمل‌آوری شده چین سوم به‌عنوان کمربرگ برای اندازه‌گیری محتوای نیتروژن، فسفر و پتاسیم برگ نمونه‌گیری شد. نیتروژن به‌روش هضم تر با استفاده از دستگاه کجلدال (مدل Hanon 58220)، فسفر با استفاده از اسپکتروفتومتر مدل Perkin elmer ez201 و میزان پتاسیم قابل جذب نیز از طریق قرائت یون‌های پتاسیم با دستگاه فلیم فتومتر مدل Jenway pfp7 اندازه‌گیری شد.

درصد همزیستی میکوریزایی

از ریشه‌های محدوده ۱۰ سانتی‌متری از ساقه توتون در پایان فصل زراعی نمونه تهیه شد. پس از انتقال به آزمایشگاه و شستشو نسبت به محاسبه درصد همزیستی ریشه با میکوریزا اقدام گردید (Phillips & Hayman, 1970). در نهایت، درصد کلونیزاسیون ریشه با قارچ به‌روش تلاقی خطوط مشبک تعیین گردید. بدین صورت که تعداد ۱۰۰ قطعه یک سانتی‌متری از ریشه‌های هر کرت آزمایشی به‌طور جداگانه و به‌صورت تصادفی در داخل پتری‌دیش مشبک پخش شدند. سپس زیر لوپ آزمایشگاهی تعداد نقاطی از ریشه که با خطوط عمودی و افقی برخورد کرده، شمرده و سپس نقاطی که به رنگ آبی بودند، شمارش گردید. در نهایت، از تقسیم این عدد بر کل برخوردها، درصد همزیستی محاسبه شد.

محتوای نیکوتین و قند برگ

در پایان فصل، در هر تیمار از برگ عمل‌آوری شده چین سوم (کمربرگ) در سه تکرار نمونه تصادفی تهیه و محتوای نیکوتین و قند برگ با استفاده از روش استاندارد شماره ۳۵ (1994a) و ۳۸ (1994b) سازمان جهانی کرستا (CORESTA) تعیین شد.

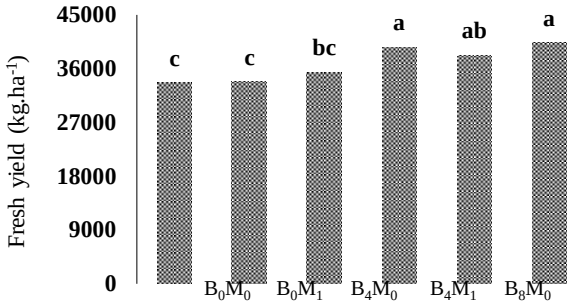
برای تجزیه و تحلیل آماری داده ها از نرم‌افزار های Minitab (Ver. 17) و SPSS (Ver. 24)، رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel و مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح پنج در صد استفاده شد. پیش از انجام تجزیه واریانس مرکب، تست یکنواختی واریانس ها از طریق آزمون بارتلت انجام و با توجه به نبود تفاوت معنی‌دار بین واریانس سال‌ها، تجزیه مرکب انجام شد. تجزیه واریانس صفات عملکردی و صفات مرتبط با ریشه با چهار تکرار و خصوصیات شیمیایی در سه تکرار انجام شد.

نتایج و بحث

عملکرد برگ تر و خشک

نتایج تجزیه واریانس مرکب داده‌ها نشان داد که اثر اصلی سال، بیوچار و میکوریزا در سطح یک درصد بر عملکرد برگ تر و خشک و اثر متقابل بیوچار در میکوریزا بر عملکرد تر در سطح پنج درصد معنی‌دار بود (جدول ۳). میانگین عملکرد برگ تر و خشک در سال اول به‌ترتیب ۳۸۷۱۵ و ۵۶۲۱ و در سال دوم، ۳۴۹۴۹ و ۵۱۹۳ کیلوگرم در هکتار بود (جدول ۴). با افزایش سطوح مصرف بیوچار میزان عملکرد برگ تر در تیمارهای آزمایشی افزایش یافت، به‌طوری‌که هر یک از سطوح بیوچار در گروه آماری متفاوتی قرار گرفتند (جدول ۴). مقدار عملکرد برگ تر در تیمار هشت تن بیوچار در هکتار با ۳۹۲۷۴ در گروه a و در تیمار صفر بیوچار با ۳۳۷۲۴ کیلوگرم در هکتار در گروه c قرار گرفت. درحالی‌که بین سطوح چهار و هشت تن بیوچار در هکتار اختلاف معنی‌دار به لحاظ عملکرد برگ خشک وجود نداشت. در کل مصرف بیوچار به‌میزان هشت تن در هکتار باعث افزایش ۱۴ درصدی عملکرد برگ تر و خشک در هکتار در مقایسه با عدم مصرف آن شد (جدول ۴). اثر مثبت بیوچار در افزایش عملکرد به نقش نگه‌دارندگی رطوبت خاک توسط بیوچار نسبت داده شده است (Tayyab et al., 2018). همچنین به ویژگی‌هایی چون تخلخل و سطح ویژه بالای آن و در نتیجه، قدرت نگهداری رطوبت بیشتر خاک نسبت می‌دهند (Suliman et al., 2014). کاربرد بیوچار با بهبود خواص فیزیکوشیمیایی خاک نظیر ظرفیت تبادل کاتیونی، ساختمان خاک و ظرفیت نگهداری آب موجب افزایش عملکرد گیاه می‌گردد

(Kim et al., 2019). در خاک های غرقاب تحت کشت برنج (*Oryza sativa* L.) در چین، کاربرد بیوچار عملکرد را از طریق بهبود رشد گیاه و ریشه، افزایش مواد مغذی گیاه، افزایش ظرفیت نگهداری آب و نفوذپذیری خاک و تعدیل pH تا ۱۴ در صد بهبود داد (Zhang et al., 2010). در تحقیقی نشان داده شد که مصرف بیوچار در خاک‌های مناطق معتدل و با حاصلخیزی بالاتر سبب بهبود نسبی عملکرد در محدوده ۴ تا ۲۰ درصد شد (Lairde et al., 2010). در مزرعه استفاده از بیوچار عملکرد بسیاری از گیاهان را افزایش می‌دهد، به‌خصوص در زمانی که همراه با کود معدنی یا آلی نظیر کود دامی استفاده شود (Blackwell et al., 2009). گزارش شده است که افزودن ۲۳ تن بیوچار در هکتار به خاک موجب افزایش میزان زیست‌توده ذرت (*Zea mays* L.) به بیش از ۱۸۹ درصد گردید (Major et al., 2010). در این تحقیق، استفاده از میکوریزا در مقایسه با عدم استفاده از آن موجب افزایش معنی‌دار عملکرد تر و خشک گردید (جدول ۳). به‌طوری‌که مصرف میکوریزا باعث افزایش حدود ۶ درصدی عملکرد برگ تر و خشک شد (جدول ۴). این میزان افزایش در عملکرد را می‌توان به نقش مثبت میکوریزا در فراهمی آب و عناصر غذایی برای گیاه نسبت داد. در حقیقت این قارچ یکی از انواع کودهای زیستی است که دارای رابطه همزیستی با ریشه اغلب گیاهان زراعی بوده و از طریق افزایش جذب عناصر غذایی (مانند فسفر، نیتروژن و برخی عناصر ریز مغذی)، افزایش جذب آب، افزایش مقاومت در برابر تنش‌های زنده و غیرزنده سبب بهبود رشد، نمو و عملکرد گیاهان میزبان در سیستم‌های کشاورزی پایدار می‌شود. بیشترین تأثیر در عملکرد گیاهان کلونیزه شدن با میکوریزا، زمانی که میزان حاصلخیزی خاک پائین است، حاصل می شود (Lakziyan et al., 2004). اثر متقابل دو ساله بیوچار در میکوریزا هم در سطح پنج درصد بر عملکرد برگ تر معنی‌دار بود (جدول ۳). به‌طوری‌که بیشترین مقدار عملکرد برگ تر با ۴۰۳۱۸ مربوط به تیمار هشت تن بیوچار در هکتار با مصرف میکوریزا و کمترین آن با ۳۳۶۵۳ کیلوگرم در هکتار مربوط به تیمار عدم مصرف بیوچار و میکوریزا بود (شکل ۱). در این تحقیق، هر چند کاربرد *ازتوباکتر* موجب افزایش عملکرد برگ تر و خشک گردید، امّا این افزایش به لحاظ آماری معنی‌دار نبود (جدول۲).



شکل ۱- اثر متقابل بیوچار و میکوریزا بر عملکرد تر توتون

Fig. 1- Effect of biochar and mycorrhiza on fresh yield of tobacco

B_0: عدم مصرف بیوچار، B_4: مصرف ۴ تن در هکتار بیوچار، B_8: مصرف ۸ تن در هکتار بیوچار، M_0: عدم کاربرد میکوریزا و M_1: کاربرد میکوریزا

B_0: no biochar application, B_4: application 4 ton/ha of biochar, B_8: application 8 ton.ha^{-1} of biochar, M_0: no mycorrhiza application and M_1: mycorrhiza application.

محتوای عناصر غذایی برگ

بر اساس نتایج جدول تجزیه واریانس مرکب داده‌ها بین دو سال به لحاظ آماری تفاوت معنی‌دار در سطح یک درصد در خصوص میزان نیتروژن، فسفر و پتاسیم برگ وجود داشت (جدول ۳) به‌طوری که در سال ۹۶ میانگین نیتروژن، فسفر و پتاسیم برگ به‌ترتیب ۱۳، ۱۹ و ۲۵ درصد بالاتر از سال ۹۷ بود (جدول ۴). همچنین تفاوت معنی‌دار در سطح یک درصد بین سطوح بیوچار و نیز میکوریزا بر میزان پتاسیم، فسفر و نیتروژن برگ و در سطح پنج درصد بین سطوح *ازتوباکتر* بر میزان نیتروژن برگ وجود داشت (جدول ۳). بر اساس جدول ۴ با افزایش سطح مصرف بیوچار میانگین نیتروژن برگ افزایش یافت. بیشترین مقدار نیتروژن برگ در سطح هشت تن بیوچار در هکتار حاصل شد که با سطح چهار تن در هکتار در یک گروه آماری و متفاوت از سطح صفر قرار گرفت. در خصوص محتوای فسفر برگ نیز همین روند دیده شد. امّا به لحاظ درصد پتاسیم کمترین مقدار در سطح صفر بیوچار

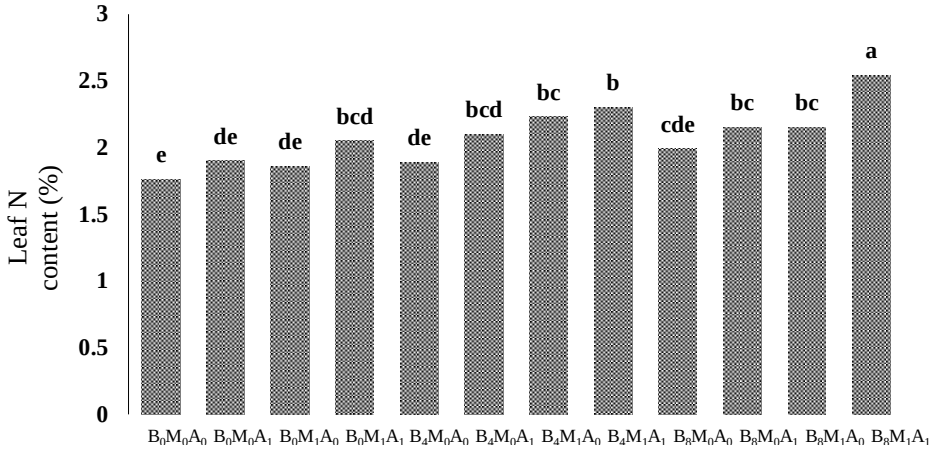
با ۲/۶ درصد و بیشترین آن در سطح چهار تن در هکتار با سه درصد به‌دست آمد. به‌طوری‌که هر یک از سطوح بیوچار در گروه‌های آماری متفاوت قرار گرفتند (جدول ۴). در برخی از تحقیقات عنوان شده است، افزایش محتوای نیتروژن، فسفر و پتاسیم برگ در اثر کاربرد بیوچار می‌تواند ناشی از وجود این عناصر در ساختمان بیوچار باشد (جدول ۲) که به‌تدریج در خاک آزاد می‌گردد (Xu et al., 2015). کاربرد بیوچار از طریق بهبود وضعیت آب گیاه، افزایش راندمان استفاده از مواد غذایی، حفظ مواد غذایی و افزایش فراهمی عناصر برای گیاه (McCormack et al., 2013)، در خاک اثرات مثبتی بر بهبود وضعیت حاصلخیزی خاک (Gaskin et al., 2010) دارد. افزایش غلظت عناصر غذایی در برخی سبزیجات مانند اسفناج و کلم بروکلی تحت تأثیر کاربرد بیوچار (Gartler et al., 2013)، افزایش فراهمی فسفر خاک در اثر کاربرد ۱۰ تا ۱۰۰ تن بیوچار در هکتار تهیه شده از بقایای (Zhao et al., 2014)، افزایش غلظت فسفر، پتاسیم و نیتروژن اندام هوایی ذرت در اثر کاربرد ۱۰۰ تن در هکتار بیوچار تهیه شده از منابع مختلف (Liu et al., 2014) گزارش شده است. گروهی از محققین گزارش کردند که کاربرد بیوچار باعث افزایش رشد گیاه، زیست‌توده و جذب بیشتر عناصر غذایی می‌شود (Kim et al., 2019). در این تحقیق، مصرف میکوریزا در مقایسه با عدم استفاده از آن باعث افزایش معنی‌دار میزان عناصر نیتروژن، فسفر و پتاسیم شد (جدول ۳). این میزان افزایش در خصوص نیتروژن ۱۱، فسفر ۴۰ و پتاسیم ۱۵ درصد بود (جدول ۴). شواهد علمی حاکی از آن است که ریزجانداران حل‌کننده فسفات از جمله میکوریزا از طریق فرایندهای ویژه‌ای می‌توانند حلالیت ترکیبات فسفر رسوب کرده در خاک را افزایش داده و بخشی از فسفر مورد نیاز گیاه را تأمین نمایند. در اکثر اوقات گیاهان میکوریزایی با جذب راحت‌تر فسفر باعث بهبود عملکرد می‌گردند. در همین رابطه، اعلام شده که افزایش سطح جذب، کاهش pH در سطح ریشه و فعالیت زیاد آنزیم فسفاتاز در سطح میسلیوم‌های قارچ باعث می‌شود قارچ از منابع غیرقابل استفاده فسفر گیاه مثل فسفات آلی و فسفات کلسیم استفاده نماید (Feng et al., 2002). افزایش میزان نیتروژن برگ در زمان استفاده از میکوریزا در مقایسه با عدم استفاده از آن می‌تواند ناشی از دلایل زیر باشد یا این که میکوریزا از طریق میسلیوم خود به‌طور مستقیم سبب افزایش جذب نیتروژن شود و یا میکوریزا با جذب آب و مواد غذایی، شرایط گیاه را از نظر فیزیولوژیکی جهت تثبیت، بهینه سازد. در رابطه با افزایش غلظت فسفر در تیمارهای باکتریایی و قارچی، دلایل مختلفی از جمله تولید اسیدهای معدنی (اسید کربنیک و اسید سولفوریک)، اسیدهای آلی (اگزالیک، سیتریک و لاکتیک) و تولید آنزیم‌های فسفاتاز و در نتیجه، انحلال فسفات‌های آلی و معدنی را می‌توان ذکر کرد (Tilak et al., 2005).

در تحقیق حاضر، تأثیر کاربرد *ازتوباکتر* در مقایسه با عدم کاربرد آن بر مقدار نیتروژن برگ در سطح یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۳). به نظر می‌رسد این افزایش مربوط به توانایی این باکتری در تثبیت بیولوژیکی نیتروژن باشد. مشخص شده است اگر نیتروژن قابل دسترس در محیط وجود داشته باشد، *ازتوباکتر* از آن استفاده کرده و دیگر تثبیت نیتروژن انجام نمی‌دهد.

نتایج اثر متقابل بیوچار در میکوریزا در *ازتوباکتر* بر محتوای نیتروژن برگ نشان داد که بالاترین میزان آن در سطوح هشت و چهار تن بیوچار در هکتار به همراه میکوریزا و *ازتوباکتر* به‌ترتیب با ۲/۵۴ و ۲/۳ درصد بود. کمترین مقدار آن نیز مربوط به تیمار شاهد با ۱/۷۶ درصد بود. افزایش بیش از ۴۰ درصدی میزان نیتروژن برگ در مقایسه با شاهد را می‌توان به برهم‌کنش مثبت بیوچار، *ازتوباکتر* و میکوریزا در افزایش دسترسی و جذب نیتروژن توسط گیاه نسبت داد (شکل ۲).

با توجه به شکل ۳، بالاترین مقدار فسفر برگ با میانگین ۰/۱۰۲ درصد مربوط به مصرف میکوریزا و *ازتوباکتر* بود که در مقایسه با عدم مصرف این دو حدود ۳۰ درصد بیشتر بود.

اثر متقابل بیوچار در میکوریزا بر میزان پتاسیم برگ نیز در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۳). به‌طوری‌که بالاترین مقدار پتاسیم برگ در سطح چهار تن در هکتار بیوچار و مصرف میکوریزا با ۳/۳ درصد حاصل شد و به‌تنهایی در گروه آماری a قرار گرفت. در مقابل، در سطح صفر بیوچار و عدم استفاده از میکوریزا مقدار پتاسیم برگ ۲/۳ درصد و در گروه آماری c جای گرفت (شکل ۴).

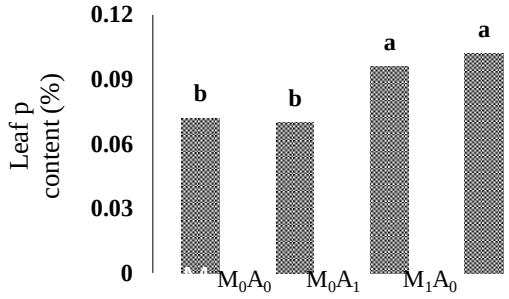


شکل ۲- اثر متقابل بیوچار، میکوریزا و *ازتوباکتر* بر محتوای نیتروژن برگ توتون

Figure 2- Effect of biochar, mycorrhiza and *Azotobacter* interaction on leaf nitrogen content of tobacco

B_0: عدم مصرف بیوچار، B_4: مصرف ۴ تن در هکتار بیوچار، B_8: مصرف ۸ تن در هکتار بیوچار، M_0: عدم کاربرد میکوریزا و M_1: کاربرد میکوریزا، A_0: عدم کاربرد *ازتوباکتر* و A_1: کاربرد *ازتوباکتر*.

B0: no biochar application, B4; application 4 ton/haof biochar, B8: application 8 ton.ha^{-1} of biochar, M0: no mycorrhiza application, M1: mycorrhiza application, A0: no *Azotobacter* application and A1: *Azotobacter* application

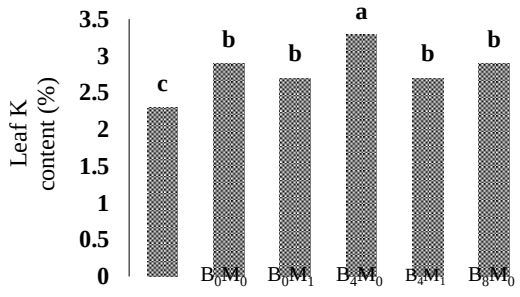


شکل ۳- اثر متقابل میکوریزا و *ازتوباکتر* بر محتوای فسفر برگ توتون

Figure 3- Effect mycorrhiza and *Azotobacter* interaction on leaf phosphorous content of tobacco

M_0: عدم کاربرد میکوریزا و M_1: کاربرد میکوریزا، A_0: عدم کاربرد *ازتوباکتر* و A_1: کاربرد *ازتوباکتر*.

M_0: no mycorrhiza application, M_1: mycorrhiza application, A_0: no *Azotobacter* application and A_1: *Azotobacter* application.



شکل ٤- اثر متقابل بیوچار و میکوریزا بر محتوای پتاسیم برگ توتون

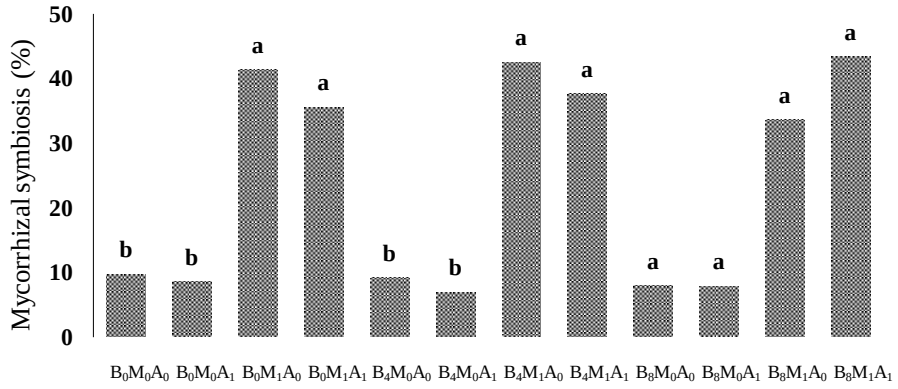
Figure 4- Effect of biochar and mycorrhiza on leaf potassium content of tobacco

B_0: عدم مصرف بیوچار، B_4: مصرف ۴ تن در هکتار بیوچار، B_8: مصرف ۸ تن در هکتار بیوچار، M_0: عدم کاربرد میکوریزا و M_1: کاربرد میکوریزا.

B_0: no biochar application, B_4: application 4 ton/ha of biochar, B_8: application 8 ton.ha^{-1} of biochar, M_0: no mycorrhiza application and M_1: mycorrhiza application.

همزیستی میکوریزایی

نتایج تجزیه واریانس مرکب نشان داد که اثر اصلی میکوریزا بر درصد همزیستی ریشه در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۳). استفاده از میکوریزا باعث افزایش کلونیزاسیون ریشه شد، به‌طوری‌که در تیمارهای فاقد میکوریزا درصد همزیستی ۸/۳۸ و در تیمارهای حاوی میکوریزا ۳۹/۰۵ درصد بود (جدول ۴). همچنین اثر متقابل بیوچار در میکوریزا در *ازتوباکتر* هم بر درصد همزیستی ریشه در سطح پنج درصد معنی‌دار بود (جدول ۳). بر این اساس، کلیه تیمارهای حاوی میکوریزا در یک گروه آماری و سایر تیمارها که فاقد میکوریزا بودند، در گروه آماری دیگر قرار گرفتند. با این حال، بالاترین مقدار عددی درصد همزیستی میکوریزا با ریشه در تیمار هشت تن در هکتار بیوچار و میکوریزا و *ازتوباکتر* با ۴۳/۳۹ در صد حاصل شد (شکل ۵). در این مطالعه، هر چند میزان ناچیزی از همزیستی میکوریزایی به‌طور طبیعی و بدون استفاده از مایه تلقیح در تیمارها دیده شد، امّا به‌طور مشخص استفاده از مایه تلقیح مقدار این همزیستی را تا بیش از پنج برابر افزایش داد. گزارش شده که قارچ میکوریزا با ریشه بسیاری از گیاهان رابطه برقرار کرده و ایجاد یک شبکه میکوریزایی متراکم را می‌نماید که اثرات مثبت و قابل‌توجهی در سیستم‌های زراعی و طبیعی دارد (Pringle et al., 2019). نتایج مثبت حاصل از این تحقیق در مصرف همزمان بیوچار و میکوریزا و *ازتوباکتر* بر میزان همزیستی میکوریزایی می‌تواند به‌دلیل تأثیر مثبت بیوچار در افزایش فعالیت سایر ریزجانداران از جمله میکوریزا و یا کاهش اثرات منفی ناشی از ترکیبات شیمیایی مضر موجود در خاک و در نتیجه، فراوانی جمعیت میکوریزا قلمداد گردد (Warnock et al., 2007). در همین رابطه نشان داده شد، میزان کلونیزاسیون ریشه با میکوریزا با کاربرد بیوچار در زراعت گندم (*Triticum aestivum* L.) نیز افزایش یافته است (Solaiman et al., 2010). با توجه به ویژگی ساختاری بیوچار وجود این ماده در خاک در نقش پناهگاه عمل نموده و موجب حفاظت میکوریزا در برابر شرایط نامساعد محیطی می‌گردد (Hammer et al., 2014). به نظر می‌رسد جهت کسب اطلاعات بیشتر تحقیقات تکمیلی شامل تأثیر اندازه ذرات بیوچار و واکنش آن در قبال گونه های میکوریزا در خاک‌های مختلف مورد نیاز باشد.



شکل ۵- اثر متقابل بیوچار، میکوریزا و *ازتوباکتر* بر درصد همزیستی میکوریزایی

Fig. 5- Effect of biochar, mycorrhiza and *Azotobacter* interaction on mycorrhizal symbiosis percent

B_0: عدم مصرف بیوچار، B_4: مصرف ۴ تن در هکتار بیوچار، B_8: مصرف ۸ تن در هکتار بیوچار، M_0: عدم کاربرد میکوریزا و M_1: کاربرد میکوریزا، A_0: عدم کاربرد *ازتوباکتر* و A_1: کاربرد *ازتوباکتر*.

B_0: no biochar application, B_4; application 4 ton/haof biochar, B_8: application 8 ton.ha^{-1} of biochar, M_0: no mycorrhiza application, M_1: mycorrhiza application, A_0: no *Azotobacter* application and A_1: *Azotobacter* application.

جدول۳- تجزیه واریانس مرکب صفات مورد مطالعه توتون تحت تأثیر همزیستی با میکوریزا و *ازتوباکتر*

Table 3 –F statistics of combined ANOVA on the traits of tobacco affected as mycorhiza symbiosis and *Azotobacter*

S.O.V.		d.f	عملکرد تر Fresh yield	عملکرد خشک Dry yield	محتوای نیتروژن N content	محتوای فسفر P content	محتوای پتاسیم K content	هم‌زیستی میکوریزایی Mycorrhizal colonization	d.f	درصد نیکوتین Nicotine percent	درصد قند Sugar percent	نسبت قند به نیکوتین Sugar to nicotine ratio
سال	Year	1	340397464**	4427366**	145.636**	0.005270**	11.6403**	19.6 ns	1	1.56911**	9.3833**	2.4872 ns
خطای نوع اول	a	6	70946428	1733848	8.472	0.000292	0.0001	10.4	4	0.01007	0.0368	0.1441
ب: بیوچار	B: Biochar	2	257106048**	5252733**	66.683**	0.002034**	0.8732**	24.4 ns	2	1.53712**	71.1491**	0.7720 ns
ب × سال	B×Y	2	10947484 ns	545303 ns	0.558 ns	0.000034 ns	0.2136**	13.7 ns	2	0.07153 ns	6.6603**	2.7929*
م: میکوریزا	M: Mycorrhiza	1	109910684**	2768634**	89.067**	0.013668**	3.1042**	22570.3**	1	0.92696**	0.1448 ns	9.6185**
م×سال	M×Y	1	29979ns	97267 ns	27.528**	0.000128 ns	0.7919**	1.3 ns	1	1.00400 ns	0.4836 ns	0.0003 ns
ا: *ازتوباکتر*	A: *Azotobacter*	1	6512735ns	37332 ns	66.432**	0.000053 ns	0.1935 ns	44.4 ns	1	5.12327**	3.1828*	39.3286**
ا×سال	A×Y	1	10154228 ns	24437 ns	7.373*	0.000007 ns	0.0100 ns	14.1 ns	1	0.09517 ns	0.6468 ns	0.8334 ns
ب× م	B×M	2	32848029*	320795 ns	4.153 ns	0.000024 ns	0.3427**	12.9 ns	2	0.09272 ns	0.2639 ns	1.5605 ns
ب×م×سال	B×M×Y	2	12171497 ns	294677 ns	0.804 ns	0.000614**	0.1177 ns	8.3 ns	2	0.00069 ns	0.0091 ns	0.0337 ns
ب×ا	B×A	2	11696141 ns	351605 ns	3.234 ns	0.000033 ns	0.0389 ns	165.8 ns	2	0.01473 ns	0.7063 ns	0.0973 ns
ب×ا×سال	B×A×Y	2	8745779 ns	224494 ns	7.581*	0.000594**	0.2552*	58.2 ns	2	0.00988 ns	2.0781*	0.3236 ns
م×ا	M×A	1	6872434 ns	242675 ns	1.238 ns	0.000365*	0.2167 ns	1.3 ns	1	0.03067 ns	0.8388 ns	1.9042 ns
م×ا×سال	M×A×Y	1	25295662 ns	319340 ns	0.077 ns	0.000020 ns	0.0042 ns	12.3 ns	1	0.00696 ns	0.9414 ns	0.4914 ns
ب×م×ا	B×M×A	2	7766169 ns	222402 ns	5.330*	0.000123 ns	0.0282 ns	109.9*	2	0.26734**	0.3237 ns	2.2959*
ب×م×ا×سال	B×M×A×Y	2	5031867 ns	168062 ns	8.995**	0.000425**	0.0557 ns	63.4 ns	2	0.10006 ns	0.4975 ns	0.9122 ns
خطای نوع دوم	b	66	7833348	243115	1.545	0.000079	0.0542	33.0	44	0.04760	0.6089	0.6520
	C.V. (%)		7.60	9.12	5.98	10.46	4.35	24.60		11.02	6.51	12.91

ns، * و **: به‌ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح پنج و یک درصد.

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

جدول ٤- مقایسه میانگین اثر اصلی سال، بیوچار، میکوریزا و *ازتوباکتر* بر صفات مورد ارزیابی توتون

Table 4- Mean comparisons for the mail effect of year, biochar, mycorrhiza and *Azotobacter* on the traits of tobacco

		عملکرد تر Fresh yield (kg.ha^{-1})	عملکرد خشک Dry yield (kg.ha^{-1})	محتوای نیتروژن برگ N content (%)	محتوای فسفر برگ P content (%)	محتوای پتاسیم برگ K content (%)	همزیستی میکوریزایی Mycorrhizal colonization (%)	درصد نیکوتین Nicotine percent	درصد قند Sugar percent	نسبت قند به نیکوتین Sugar to nicotine ratio
سال Year	2017	38715 a*	5621 a	2.22 a	0.094 a	3.2 a	24.17 a	2.11 a	12.84 a	6.09 a
	2018	34949 b	5193 b	1.93 b	0.076 b	2.4 b	23.27 a	1.85 b	11.85 b	6.41 a
بیوچار Biochar	B_0	33724 c	4953 b	1.89 b	0.074 b	2.6 c	24.34 a	1.73 b	10.59 b	6.13 a
	B_4	37497 b	5538 a	2.13 a	0.089 a	3.0 a	24.09 a	2.05 a	13.18 a	6.43 a
	B_8	39274 a	5731 a	2.41 a	0.091 a	2.8 b	22.72 a	2.16 a	13.42 a	6.21 a
میکوریزا Mycorrhiza	M_0	35762 b	5238 b	1.59 a	0.071 b	2.6 b	8.38 b	1.88 b	12.34 a	6.57 a
	M_1	37902 a	5577 a	1.97 a	0.099 a	3.0 a	39.05 a	2.08 a	12.38 a	5.94 b
ازتوباکتر *Azotobacter*	A_0	36571 a	5388 a	1.98 b	0.084 a	2.7 a	24.41 a	1.75 b	12.03 b	6.89 a
	A_1	37092 a	5427 a	2.17 a	0.086 a	2.8 a	23.02 a	2.31 a	12.39 a	5.61 b

*حروف مشترک در هر ستون و برای هر جزء به‌معنای عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد می‌باشد.

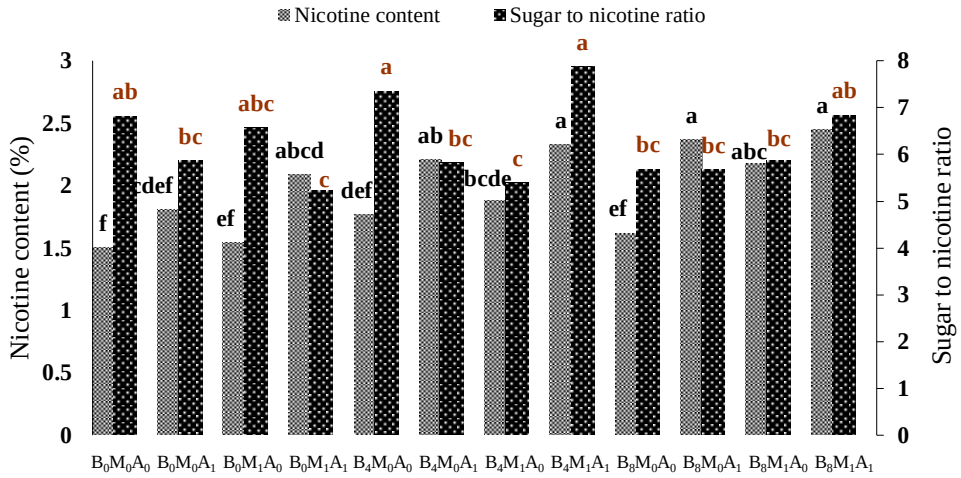
* Means with common letter in the same column and for each component do not differ significantly at $P \leq 0.05$.

B_0: عدم مصرف بیوچار، B_4: مصرف ۴ تن در هکتار بیوچار، B_8: مصرف ۸ تن در هکتار بیوچار، M_0: عدم کاربرد میکوریزا و M_1: کاربرد میکوریزا، A_0: عدم کاربرد *ازتوباکتر* و A_1: کاربرد *ازتوباکتر*

B_0: no biochar application, B4; application 4 ton/haof biochar, B_8: application 8 ton.ha^{-1} of biochar, M_0: no mycorrhiza application, M_1: mycorrhiza application, A_0: no *Azotobacter* application and A_1: *Azotobacter* application.

محتوای نیکوتین و قند برگ

نتایج تجزیه واریانس مرکب نشـــان داد که اثر ســـاده ســـال بر محتوای نیکوتین و قند برگ در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۳). به‌طوری‌که میانگین درصـد نیکوتین و قند در ســال اول به‌ترتیب حدود ۱۴ و ۵ درصد بیشتر از سال دوم اجرای آزمایش بود (جداول ۳). هر چند مصـرف بیوچار نیز تأثیر معنی‌دار بر درصـد نیکوتین و قند در سطح یک درصد داشت (جدول ۳) امّا بین سطوح چهار و هشت تن در هکتار بیوچار از نظر این دو صفت اختلاف معنی‌دار وجود نداشت، این بدین معناست که در مقادیر بالای بیوچار در شرایط آبیاری تأثیر مثبت و معنی‌دار از کاربرد بیوچار مشـاهده نگردید. تأثیر کاربرد *ازتوباکتر* نیز بر روی درصد نیکوتین و نسبت قند به نیکوتین در سطح یک و قند در ســطح پنج درصـــد معنی‌دار بود (جدول ۳). کاربرد *ازتوباکتر* موجب کاهش معنی‌دار نسبت قند به نیکوتین و افزایش ۲۶ در صدی در صد نیکوتین گردید (جدول ۴). اثر متقابل بیوچار در میکوریزا در *ازتوباکتر* نیز بر درصد نیکوتین و نسبت قند به نیکوتین به‌ترتیب در سطح یک و پنج درصد معنی‌دار بود (شکل ۶).



شکل ٦- اثر متقابل بیوچار، میکوریزا و *ازتوباکتر* بر درصد نیکوتین و نسبت قند به نیکوتین توتون

Figure 6- Effect of biochar, mycorrhiza and *Azotobacter* interaction on nicotine content and sugar to nicotine ratio of tobacco

B_0: عدم مصرف بیوچار، B_4: مصرف ۴ تن در هکتار بیوچار، B_8: مصرف ۸ تن در هکتار بیوچار، M_0: عدم کاربرد میکوریزا و M_1: کاربرد میکوریزا، A_0: عدم کاربرد *ازتوباکتر* و A_1: کاربرد *ازتوباکتر*

B_0: no biochar application, B_4: application 4 ton/haof biochar, B_8: application 8 ton.ha^{-1} of biochar, M_0: no mycorrhiza application, M_1: mycorrhiza application, A_0: no *Azotobacter* application and A_1: *Azotobacter* application.

ترکیبات شـــیمیایی برگ توتون، کیفیت آن را تعیین می‌کند که مهم‌ترین معیار ارزیابی در این خصـوص درصـد نیکوتین برگ اسـت (Shang et al., 2017). در گیاه توتون، نیکوتین در ریشـه تولید و از طریق سـیسـتم آوندی به برگ‌ها منتقل می‌شـود (Shang et al., 2017). محتوای نیکوتین برگ به‌شـدت به وضـعیت عناصـر غذایی خاک به‌ویژه نیتروژن بستگی دارد. در مطالعه حاضر نشان داده شد، *ازتوباکتر* نقش تعیین‌کننده‌ای در محتوای نیکوتین برگ دارد که این افزایش را می‌توان به نقش *ازتوباکتر* در تثبیت نیتروژن اتمسـفری که در ساختار مولکولی نیکوتین نقش دارد، مرتبط دانست (Fritz et al., 2006). علاوه‌بر درصد نیکوتین فاکتورهای دیگری نظیر درصد قند و نسبت قند به نیکوتین نیز در کیفیت شیمیایی توتون تأثیرگذار هستند (Weybrew et al., 1983). در برخی منابع محدوده مطلوب برای نسبت قند به نیکوتین بین شش تا نه (Weybrew et al., 1983) و در دیگر منابع بین شش تا ۱۰ (Maw et al., 2009) قید شده است. امّا این اتفاق نظر وجود دارد که هر چه این نسـبت به حداکثر نزدیکتر باشـد، مطلوب‌تراسـت (Maw et al., 2017). بر اسـاس یافته‌ها در

صورت بهنه بودن در صد نیکوتین و قند در برگ توتون، میزان سایر ترکیبات موجود در برگ نیز در حد مناسب قرار خواهند داشت (Weybrew et al., 1983). در صورتی‌که نسبت قند به نیکوتین در محدوده مناسب و نزدیک به حداکثر باشد، سبب می‌گردد دود ناشی از سوختن ملایم گردد، امّا پایین بودن نسبت یاد شده باعث ایجاد بوی بد در دهان می‌شود (Kristina & Miroslav., 2019). در این مطالعه، هر چند مقدار نسبت قند به نیکوتین در کلیه تیمارها در محدوده استاندارد قرار داشت، با این وجود بالاترین نسبت قند به نیکوتین در تیمار چهار تن بیوچار در هکتار و کاربرد میکوریزا و *ازتوباکتر* به‌دست آمد.

نتیجه‌گیری

در این تحقیق امکان سنجی تولید توتون به این روش برای اولین بار در کشور مورد بررسی قرار گرفت. کاربرد بیوچار تأثیر مثبت و معنی‌دار بر صفات عملکردی کمّی و کیفی داشت. نقش میکوریزا نیز در بهبود شاخص‌های کمّی و کیفی توتون معنی‌دار بود. *ازتوباکتر* نیز به‌طور مشخص باعث افزایش درصد نیکوتین برگ شد. نظر به این که محتوای نیکوتین توتون‌های تولید شده در ایران عمدتاً پایین بوده، کاربرد این کود زیستی می‌تواند به‌عنوان یک راهکار عملی برای افزایش محتوای نیکوتین برگ در توتون‌های تولید داخل مدنظر قرار گیرد. در کل، به‌دلیل عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین سطح چهار و هشت تن در هکتار بیوچار بر روی صفات ارزیابی شده با لحاظ جنبه‌های اقتصادی، کاربرد چهار تن در هکتار بیوچار به همراه کاربرد میکوریزا و *ازتوباکتر* به‌منظور دستیابی به عملکرد قابل قبول با حفظ کیفیت شیمیایی در زراعت توتون در مناطق شمالی کشور قابل توصیه می‌باشد. لذا، بر اساس نتایج این تحقیق تولید توتون بدون استفاده از کودهای شیمیایی به‌واسطه قیمت جهانی بالاتر آن می‌تواند در مناطق توتون‌کاری ترویج گردد.

References

Aslam, Z., Khalid, M., and Aon, M., 2014. Impact of biochar on soil physical properties. Scholarly Journal of Agricultural Science 4(5): 280-284.

Azeem, M., Hayat, R., Hussain, Q., Ahmed, M., Imran, M., and Crowley, D., 2016. Effect of biochar amendment on soil microbial biomass, abundance, and enzyme activity in the mash bean field. Journal of Biodiversity and Environmental Sciences 8: 1-13.

Berek, A.K., Hue, N., and Ahmad, A., 2011. Beneficial use of biochar to correct soil acidity. The Food Provider. Available at Website http:// www.ctahr.hawaii.edu/huen/nvh/biochar.

Blackwell, P., Krull, E., Butler, G., Herbert, A., and Solaiman, Z., 2010. Effect of banded biochar on dryland wheat production and fertiliser use in south-western Australia: an agronomic and economic perspective. Australian Journal of Soil Research 48: 531-545.

CORESTA, 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

CORESTA., 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

Feng, G., Zang, F., Lix, S., Tian, C.Y., and Tang, C., 2002. Rengelz Improved tolerance of maize plants to salt stress by arbuscular mycorrhiza is related to higher accumulation of soluble sugars in roots. Mycorrhiza 12: 90-185.

Fritz, C., Palacios-Rojas, N., Feil, R., and Still, M., 2006. Regulation of secondary metabolism buy the Carbon-nitrogen status in tobacco: nitrate inhibits large sectors of phenylpropanoid metabolism. 2006. The Plant Journal 46: 533-548.

Gartler, J., Robinson, B., Burton, K., and Clucas, L., 2013. Carbonaceous soil amendments to biofortify crop plants with zinc. Science of the Total Environment 465: 308–313.

Gaskin, J.W., Speir, R.A., Harris, K., Das, K.C., Lee, R.D., Morris, L.A. and Fisher, D.S., 2010. Effect of peanut hull and pine chip biochar on soil nutrients, corn nutrient status, and yield. Agronomy Journal 102: 623-633.

Hammer, E.C., Balogh-Brunstad, Z., Jakobsen, I., Olsson, P.A., Stipp, S.L.S. and Rilling, M.C., 2014. A mycorrhizal fungus grows on biochar and captures phosphorus from its surfaces. Soil Biology and Biochemistry 77: 252-260.

Jiangzhou, L., Sigui, J., Limeng, Z., and Qingzhong, Z., 2016. Effects of biochar on soil quality and tobacco growth during four years of consecutive application. Institute of Environmental and Sustainable Development in Agriculture. Chinese Agricultural Science APPOST 16.

Kim, Y., Oh, J., Vithanage, M., Park, Y.K., Lee, J., and Kwon, E.E., 2019. Modification of biochar properties using CO_2. Chemical Engineering Journal 372: 383-389.

Kristina, G., and Miroslav, Č., 2019. Effect of topping height and ripeness on quality of flue-cured tobacco varieties. Journal of Central European Agriculture 20(3): 841-851.

Laird, D., Fleming, P., Wang, B.Q., Horton, R., and Karlen, D., 2010. Biochar impact on nutrient leaching from a Midwestern agricultural soil. Geoderma 158: 436-442.

Lakziyan, A., Sheibani, S., Bahadoriyan, M., and Shaddel, L., 2004. The Soil Microbiology. Sokhan gostar publishers, Mashhad, Iran. p. 555. (In Persian)

Lin, G., Rui, W., Guoming, S., Jixu, Z., Guixing, M., and Jiguang, Z., 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.

Liu, T., Liu, B., and Zhang, W., 2014. Nutrients and heavy metals in biochar produced by sewage sludge pyrolysis: its application in soil amendment. Polish Journal of Environmental Studies 23(1): 271-275.

Maw, B.W., Stansell, J.R., and Stansell, B.G., 2009. Soil-plant-water relationships for flue-cured tobacco. The University of Georgia, Cooperative Extension. Research Bulletin 427: 1-36.

McCormack, S.A., Ostle, N., Bardgett, R.D., Hopkins, D.W., and Vanbergen, A.J., 2013. Biochar in bioenergy cropping systems: Impacts on soil faunal communities and linked ecosystem processes. GCB Bioenergy 5: 81–95.

Mickan, B.S., Abbott, L.K., Stefanova, K., and Solaiman, Z.M., 2016. Interactions between biochar and mycorrhizal fungi in a water-stressed agricultural soil. Mycorrhiza 26: 565-574.

Mrkovacki, N., and Milic, V., 2001. Use of *Azotobacter chroococcum* as potential useful in agricultural application. Ann. Microbiol 51: 145-158.

Mukherjee, A., Lal, R., and Zimmerman, A.R., 2014. Effects of biochar and other amendments on the physical properties and greenhouse gas emissions of an artificially degraded soil. Science of the Total Environment 487: 26-36.

Narula, N., Kumar, V., Behl, R.K., Deubel, A., Gransee, A., and Merbach, W., 2000. Effect of P-solubilizing *Azotobacter chroococcum* on N, P and K uptake in P-responsive wheat genotypes grown under greenhouse conditions. Journal of Plant Nutrition 163: 393-398.

Phillips, J.M., and Hayman, D.S., 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., Bever, J.D., Gardes, M., Parrent, J.L., Rilling, M.C., and Klironomos, J.N., 2009. Mycorrhizal symbioses and plant invasions. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics 40: 699–715.

Ruiz-Lozano, J.M., Porcel, R., Bárzana, G., Azcón, R., and Aroca, R., 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.

Shang, X., Shang, Y., Fu, J., and Zhang, T., 2017. Nicotine significantly improves chronic stress-induced impairments of cognition and synaptic plasticity in mice. Mol Neurobiol 54: 4644-4658.

Solaiman, Z.M., Blackwell, P., Abbott, L.K., and Storer, P. 2010. Direct and residual effect of biochar application on mycorrhizal root colonization, growth and nutrition of wheat. Australian Journal of Soil Research 48: 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.

Suliman, W., Harsh, J.B., Abu-Lail, N.I., Fortun, A.M., Dallmeyer, I., and GarciaPérez, 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.

Taffouo, V.D., Ngwene, B., Akoa, A., and Franken, P., 2013. Influence of phosphorus application and arbuscular mycorrhizal inoculation on growth, foliar nitrogen mobilization, and phosphorus partitioning in cowpea plants. Mycorrhiza 24: 361–368.

Tayyab, M., Islam, W.F., Khalil, P., Ziqin, Z., Caifang, Y., Arafat, L., Hui, M., Rizwan, K., Ahmad, H., and Waheed, S., 2018. Biochar: An efficient way to manage low water availability in plants. Applied Ecology and Environmental Research 16(3): 2565–2583.

Tilak, K.V.B.R., Ranganayaki, N., Pal, K.K., De, R., Saxena, A.K., Shekhar Nautiyal, C., Mittal, S., Tripathi, A.K., and Johri, B.N., 2005. Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. Current Science 89: 136-150.

Tisdall, J.M., 1991. Fungal hyphae and structural stability of soil. Australian Journal of Soil Research 29(6): 729-743.

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. 393 p.

Warnock, D.D., Lehmann, J., Kuyper, T.W., and Rilling, M.C., 2007. Mycorrhizal responses to biochar in soil–concepts and mechanisms. Plant and Soil 300: 9-20.

Warnock, D.D., Mummeya, D.L., McBride, B., Major, J., Lehmann, J., and Rilling, M.C., 2010. Influences of nonherbaceous biochar on arbuscular mycorrhizal fungal abundances in roots and soils: results from growth chamber and field experiments. Applied Soil Ecology 46: 450–456.

Weybrew, J.A., Wan Ismail, W.A., and Long, R.C., 1983. The cultural management of flue-cured tobacco quality. Tobacco Science 27: 56–61.

Widowati, W.H., 2012. The effect of biochar on the growth and N fertilizer requirement of Maize (*Zea mays*) in green house experiment. Journal of Agricultural Science 4(5): 256-262.

Xu, C-Y., Hosseini-Bai, S., Hao, Y., Rachaputi, R.C.N., Wang, H., Xu, Z., and Wallace, H., 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., Amerian, M., and Asghar, H., 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, Iran. (In Persian)

Zhang, A., Cui, L., Pan, G., Li, L., Hussain, Q., Zhang, X., Zheng, J., and Crowley, D., 2010. Effect of biochar amendment on yield and methane and nitrous oxide emissions from a rice paddy from Tai Lake plain, China. Agriculture, Ecosystems and Environment 139: 469-475.

Zhang, J., Zhang, Z.F., Shen, G.M., Wang, Gao, R.L., Dai, Y.C., Zha, T., and Zhang, J.G., 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. 439 North Duke Street, Lancaster, Pennsylvania 17602 USA.

Zhao, X.R., Li, D., Kong, J., and Lin, Q.M., 2014. Does biochar addition influence the change points of soil phosphorus leaching? Journal of Integrative Agriculture 13: 499–506.