مقاله پژوهشی

تأثیر قارچ‌های همزیست بر بیوماس، فلورسانس کلروفیل و تجمع نیترات در گیاه کاهو (*Lactuca sativa*) تحت تنش بازدارنده نیتریفیکاسیون دی‌سیان دی‌آمید

رسول آذرمی*[۱]، اکبر پاداش[۱]، علی اشرف سلطانی طولارود[۲] و بهروز اسماعیل‌پور[۱]

[۱] گروه علوم باغبانی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

[۲] گروه علوم خاکشناسی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

(تاریخ دریافت:۱۴۰۰/۱۲/۰۲، تاریخ پذیرش نهایی:۱۴۰۱/۰۵/۰۴)

چکیده

کاربرد بازدارنده‌های نیتریفیکاسیون دی‌سیان دی‌آمید (DCD) در خاک طی سالیان متوالی باعث آلودگی‌خاک می‌شود و به‌دلیل اثرات سمی احتمالی آنها بر گیاه در دهه‌های اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته است، اما هیچ اقدامی برای کنترل و رفع آلودگی بازدارنده‌های نیتریفیکاسیون انجام نشده است. در این تحقیق، بازدارنده نیتریفیکاسیون DCD در چهار غلظت (صفر، ۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) در یک آزمایش گلدانی با چهار تکرار به خاک اضافه شد. آزمایش گلخانه‌ای با استفاده از فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی برای آزمایش اثر قارچ‌های همزیست (گیاهان تلقیح‌شده با *P. indica*، *G. etunicatum* و *G. mosseae*) بر روی سمیت گیاهی DCD انجام شد. گیاه کاهو (*Lactuca sativa*) رقم سیاهو به‌دلیل ارزش اقتصادی در سراسر جهان برای این آزمایش انتخاب شد. سپس برخی از خصوصیات فلورسانس کلروفیل مانند فلورسانس حداقل (F_0)، فلورسانس حداکثر (Fm) و حداکثر کارایی کوانتومی فتوسیستم II (Fv/Fm) اندازه‌گیری شد. نتایج HPLC غلظت بازدارنده نیتریفیکاسیون DCD در برگ کاهو بسیار مهم بود. مشخص شد که گیاهان تلقیح‌شده با قارچ‌های همزیست در مقایسه با گیاهان غیرهمزیست سطوح DCD کمتری داشتند. گیاهان تیمارشده با *P. indica* دارای ۷۰ و ۸۰ درصد DCD کمتر (به‌ترتیب ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) در مقایسه با گیاهان غیره همزیست بودند.

کلمات کلیدی: بازدارنده نیتریفیکاسیون دی‌سیان دی‌آمید (DCD)، قارچ‌های همزیست، گیاه کاهو، کلروفیل فلورسانس

مقدمه

امروزه برای کنترل تلفات نیتروژن خاک‌های کشاورزی از بازدارنده‌های نیتریفیکاسیون استفاده می‌شود. تلفات نیتروژن از خاک عمدتاً به‌صورت شستشو، تبخیر آمونیاک و انتشار اکسیدهای نیتروژن از دسترس گیاه خارج می‌شود که این تلفات موجب آلودگی محیط زیست می‌شود (Hatzenpichler, 2012). نیتریفیکاسیون فرآیند مهمی در خاک است که توسط باکترهای نیتریفیکاتور، موجب کنترل نیترات در خاک می‌گردد. باکتری‌های اکسیدکننده آمونیوم طی فرایند نیتریفیکاسیون آمونیوم را به نیتریت، سپس نیتریت توسط باکتری‌های نیتریت کننده به فرم نیترات تبدیل می‌شود (Bock and Wagner, 2006; Rodrigues *et al.*, 2018). نیترات حاصل از فرایند نیتریفیکاسیون بسیار سریع شسته شده و از دسترس گیاه خارج می‌گردد. بنابراین برای جلوگیری از هدررفت نیتروژن،

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: r_azarmi@uma.ac.ir

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-04-03]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.53.2.0]

بازدارنده‌های نیتریفیکاسیون به کودهای نیتروزنه اضافه می‌شود که فرایند میکروبی نیتریفیکاسیون را مختل می‌کنند. این مواد شامل مهارکننده‌های اوره‌از بوده که از هیدرولیز اوره و از اکسیداسیون NH_4^+ به NO_2^- به تأخیر می‌اندازند (Ruser and Schulz, 2015). بازدارندهای نیتریفیکاسیون مورد استفاده شامل: (2-chloro-6-(trichloromethyl)-pyridin)، dicyandiamide (DCD) و 3,4-Dimethylpyrazole phosphate (DMPP) است. بازدارنده‌های نیتریفیکاسیون علاوه بر مزایا، دارای معایبی نیز هستند. به‌عنوان مثال Yang و همکاران (۲۰۱۶) گزارش نمودند که بازدارنده‌های نیتریفیکاسیون می‌توانند بر فعالیت سایر موجودات زنده نیز اثرات منفی داشته باشند. سمیت بازدارنده‌های نیتریفیکاسیون از قبیل سمیت DMPP در گیاه شبدر (Rodrigues *et al*., 2018) و DCD در گیاه کاهو انجام شده است (Zerulla *et al*., 2001). Zerulla و همکاران (۲۰۰۱) مشاهده کردند کاربرد ۱/۵ کیلوگرم در هکتار DCD در گیاه کاهو موجب سوختگی شدید حاشیه برگ‌ها می‌شود. همچنین کاربرد ترکیبات تری‌آزولی مانند 1,2,4-Triazole (TZ) که در مقادیر بین ۰/۲ تا ۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک موجب اختلال در عمل نیتریفیکاسیون می‌گردد، می‌تواند بر سایر باکتری‌ها نیز اثر منفی داشته باشد (باکتری‌های هتروتوفیک هوازی و اکسیدکننده متان) (Li *et al*., 2020). بنابراین تعدیل اثرات سمی بازدارنده-های نیترات‌سازی در خاک یک امر بسیار ضروری در کشاورزی پایدار می‌باشد ولی تاکنون مطالعه‌ای در این زمینه صورت نگرفته است.

مطالعات زیادی در زمینه نقش قارچ‌های اندوفیت در گیاهان و نقش آن‌ها در مقاومت برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی از طریق تولید متابولیت‌های مختلف انجام شده است. از نقش‌های مهم قارچ‌های آندوفیت در گیاهان می‌توان به بهبود وضعیت تغذیه‌ای محصولات کشاورزی اشاره کرد (Wani *et al*., 2015). قارچ پیریفورموسپورا ایندیکا از جمله قارچ‌های همزیست با ریشه گیاهان بوده که در رشد گیاهان در شرایط عادی و تنش نقش بسزایی دارد (Varma *et al*., 1998). این قارچ سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی گیاهان را تقویت می‌کند که در تحمل تنش بسیار مهم است. همچنین با افزایش سطح آنتی‌اکسیدان‌ها برای مقابله با استرس اکسیداتیو، مقاومت به بیماری را در گیاهان القا می‌کند (Vadassery *et al*., 2009). حضور قارچ‌های مایکوریز در اطراف ریشه باعث تخریب شدید آلاینده‌ها شده است. بنابراین مایه‌زنی قارچ ریشه یک روش امیدوارکننده برای حذف آلودگی‌ها از جمله آلودگی نفتی است، برای مثال مایه‌زنی قارچ ریشه گلوموس به همراه گیاه چچم باعث کاهش آلودگی هیدروکربن‌های نفتی به‌ویژه پیرین می‌شود (Yu *et al*., 2011) و تلقیح قارچ ریشه گلوموس موسه و گلوموس اتونیکاتیوم با گیاه یونجه باعث حذف بیش از ۹۸ درصد فنانترن و ۸۸ درصد پیرین شد (Gao *et al*., 2011).

از آنجایی که کاهو بیشترین میزان مصرف در بین سبزیجات برگی را دارد، بنابراین ارگانیک بودن آن امری مهم در کشاورزی است. هدف از این پژوهش کاهش سمیت بازدارنده نیتریفیکاسیون DCD با استفاده از قارچ‌های همزیست و بررسی تأثیر دو جانبه آنها بر صفات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی در گیاه کاهو است.

مواد و روش‌ها

طرح آزمایشی: این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه محقق اردبیلی در سال ۱۳۹۹ اجرا گردید. تیمارها شامل چهار سطح قارچ همزیست (*P. indica, G. etunicatum, G. mosseae* و عدم تلقیح با قارچ) و چهار سطح DCD (صفر، ۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک) بودند (Maftoun and Sheibany, 1979; Padash *et al*., 2016).

آماده‌سازی خاک و تلفیق تیمارهای آزمایشی: خاک لومی شنی (از لایه صفر تا ۲۵ سانتی‌متر) از افق سطحی مزرعه دانشگاه محقق اردبیلی جمع‌آوری شد و برخی از خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آن شامل: ۶۸ درصد ماسه، ۲۰ درصد سیلت، ۱۲ درصد رس، ۱/۲ درصد ماده آلی، ۰/۰۵ درصد

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-04-03]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.53.2.0]

نیتروژن کل، ۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم فسفر، ۳۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم پتاسیم، ۷/۳pH و ۱/۳ EC dS/m مشخص شد. سپس پودر DCD (سیگما آلدریچ) به یک کیلوگرم نمونه خاک خشک‌شده در هوا اضافه شد تا غلظت‌های زیر را به دست آورد: ۰/۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک خشک (Maftoun and Sheibany, 1979) به‌صورت همگن با خاک مخلوط شد.

بذر کاهو (*Lactuca sativa* cv. Siyahoo) از مؤسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج، ایران (SPII) تهیه و در سینی‌های حاوی پیت‌ماس کاشته شد. هنگامی که دانهال‌ها به مرحله چهار برگی رسیدند، با قارچ‌های همزیست تلقیح شدند.

تهیه قارچ‌های همزیست و نحوه تلقیح: قارچ *P. indica* در ظروف پتری در محیط Hill & Käfer کشت شد (Hill and Kafer, 2001). پلیت‌ها به‌مدت دو هفته در محفظه رشد با دمای ۱±۲۹ درجه سانتی‌گراد در تاریکی قرار گرفتند. یک تکه از قارچ به قطر ۱۰ میلی‌متر در عمق یک سانتی‌متری زیر ریشه نشاهای ۱۰ روزه کاهو قرار داده شد. قارچ‌های میکوریزا (*G. mosseae* و *G. etunicatum*) از گروه خاک‌شناسی دانشگاه تبریز تهیه شد و به خاک اضافه شدند (Hajiboland *et al.*, 2010).

در پایان آزمایش (۴۵ روز پس از کشت و مرحله بسته شدن هد) گیاهان به‌همراه ریشه‌ها از بستر خاک خارج شدند. با استفاده از آب و توری تمام ریشه‌های ریز جمع شدند و ساقه‌ها و ریشه‌ها با آب‌مقطر شسته شدند، با دستمال کاغذی آب آنها گرفته شد و وزن آنها ثبت گردید. برخی از بخش‌های ریشه جدا شدند، دوباره وزن‌بندی شدند و برای تعیین کلونیزاسیون ریشه در اتانول ۵۰ درصد قرار گرفتند.

برای رنگ‌آمیزی و بررسی کلونیزاسیون ریشه از روش Hayman و Phillips (۱۹۷۰) استفاده شد. چندین قطعه نازک از ریشه اصلی گیاه انتخاب و با آب شسته شد و نمونه‌های ریشه را به‌مدت پنج دقیقه در محلول هیدروکسید پتاسیم ۱۰ درصد از قبل گرم شده قرار داده و در ادامه داخل محلول اسیدی رقیق ۱ درصد اسید کلریدریک قرار داده شدند؛ در نهایت از رنگ تریپان بلو ۲۰ درصد از قبل گرم شده به‌مدت پنج دقیقه استفاده شد، و درصد کلونیزاسیون ریشه با استفاده از خطوط متقاطع و رابطه زیر اندازه‌گیری شد.

$$\text{درصد کلنیزاسیون} = \frac{\text{تعداد نقاط دارای همزیستی قارچی}}{\text{تعداد کل نقاط}} \times ۱۰۰$$

اندام هوایی و ریشه گیاه بعد از وزن شدن در دمای ۸۰ درجه خشک شدند و دوباره وزن گردیدند. قسمت‌های جوان برگ (برگ‌های توسعه‌یافته جوان) برای تصویربرداری با میکروسکوپ SEM انتخاب شدند. و سپس برای اندازه‌گیری غلظت نیترات در گیاه کاهو، ۰/۱ گرم نمونه گیاهی به‌مدت یک ساعت در ۱۰ میلی‌لیتر آب با دمای ۴۵ درجه سلسیوس خوابانیده شدند. سپس نمونه‌ها سانتریفیوژ شده و با استفاده از کاغذ صافی فیلتر شدند. غلظت نیترات به روش سولفوسالسیلیک اسید و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول‌موج ۴۱۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Cataldo *et al.*, 1975).

غلظت DCD با استفاده از روش Kim و همکاران (۲۰۱۲) در برگ گیاه کاهو اندازه‌گیری شد. برای انجام این کار، از جوان‌ترین برگ حدود ۱ گرم استفاده شد که با استفاده از شیکر به‌مدت ۲۰ دقیقه در ۴۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه شده وزن و همگن شدند. سپس از طریق کاغذ واتمن شماره ۴۲ فیلتر شد. ۵ میلی‌لیتر از فیلتر به‌دست‌آمده با ۰/۲ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک ۰/۶۶ مولار اسیدی شد و به‌مدت ۳۰ دقیقه قبل از سانتریفیوژ کردن (۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۵ دقیقه معادل ۱۱، ۱۸۰ گرم از پیش رسوب شده) اجازه داده شد تا خارج شود. مواد و pH را در شرایط HPLC بهینه گردید. غلظت DCD در مایع رویی اسیدی شده روی دستگاه HPLC Waters 2695 (AGILENT America) با استفاده از ستون محافظ کاتیون-H با فاز متحرک ۰/۰۲۵ مولار H_2SO_4 با سرعت جریان ۰/۶ میلی‌لیتر در دقیقه و یک آشکارساز اسپکتروفتومتری فرابنفش ۲۱۰ نانومتری (UV) تعیین شد.

به‌منظور اندازه‌گیری کلروفیل فلورسانس از هر تکرار چهار گیاه و از هر گیاه یک برگ کاملاً توسعه‌یافته در مرحله‌ای رشد فعال انتخاب و فلورسانس آن ثبت گردید. از دستگاه کلروفیل

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-04-03]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.53.2.0]

فلورومتر مدل Os-30p ساخت کشور آمریکا برای خواندن میزان فلورسانس کلروفیل استفاده شد.

آنالیز واریانس دو طرفه بر روی تمامی داده‌های تجربی با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۳ (شیکاگو، ایالات متحده آمریکا) انجام شد. واریانس مربوط به عوامل اصلی (قارچ‌های همزیست و DCD) و برهمکنش بین آنها بود. تفاوت بین میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن در سطح احتمال یک و پنج درصد تعیین شد.

بحث و نتایج

۳-۱- درصد همزیستی، وزن خشک اندام هوایی و ریشه، غلظت DCD در برگ: تجزیه واریانس تأثیر بازدانده نیتریفیکاسیون DCD و قارچ‌های همزیست بر درصد همزیستی، غلظت DCD در برگ و مقدار وزن خشک اندام هوایی و ریشه در گیاه کاهو (جدول ۱) نشان داد که اثر متقابل بازدارنده نیتریفیکاسیون DCD و قارچ‌های همزیست بر شاخص‌های درصد همزیستی، غلظت DCD برگ در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بوند و بر مقدار وزن خشک اندام هوایی و نسبت وزن خشک اندام هوایی به ریشه در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بوند. اثرات اصلی قارچ‌های همزیست و DCD بر شاخص وزن خشک ریشه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بودند (جدول ۱).

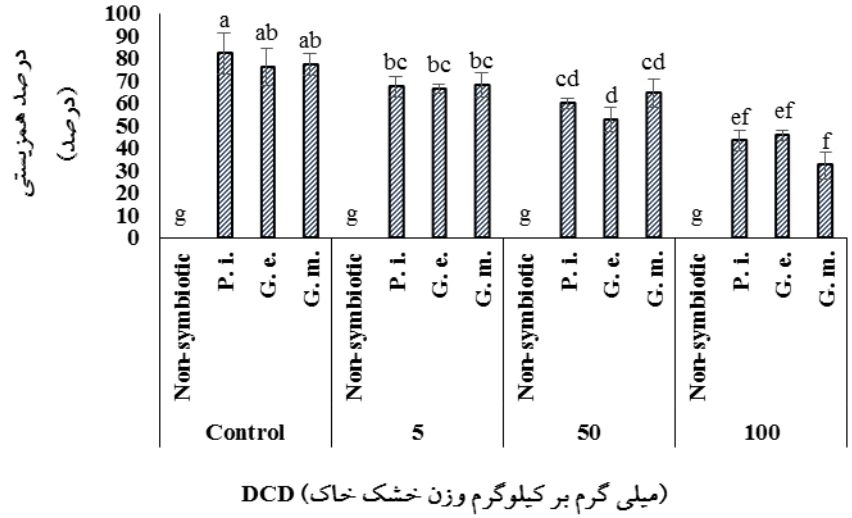
درصد همزیستی: نتایج مقایسه میانگین تأثیر بازدارنده نیتریفیکاسیون DCD بر درصد کلونیزاسیون ریشه گیاه کاهو تحت تیمار قارچ‌های همزیست (شکل ۱) نشان داد که شاخص درصد همزیستی قارچ *P. indica, G. etonicatom* و *G. mousa* تحت تیمار غلظت‌های بازدارنده نیتریفیکاسیون DCD معنی‌دار بود ($P < 0.01$). نتایج حاصل از تأثیر بازدارنده نیترفیکاسیون DCD در گیاه کاهو نشان داد که بیشترین درصد همزیستی مربوط به قارچ *P. indica* تحت غلظت صفر DCD بود. هر چند از لحاظ آماری درصد همزیستی قارچ *P. indica* با قارچ‌های *G. etunicatum* و *G. mosseae* اختلاف معنی‌داری نداشت ولی درصد همزیستی همه قارچ‌ها با افزایش غلظت بازدارنده نیتریفیکاسیون DCD کاهش یافت، بطوری‌که کمترین درصد همزیستی در ریشه گیاه کاهو مربوط به تیمار قارچ *G. etunicatum* تحت غلظت ۱۰۰میلی‌گرم در کیلوگرم خاک، بازدارنده نیتریفیکاسیون DCD بود. در ریشه گیاهان تحت تیمار با قارچ *P. indica* در غلظت‌های ۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم DCD، درصد همزیستی به‌ترتیب ۲۲، ۳۷ و ۹۷ درصد کمتر از ریشه گیاهان عدم استفاده از بازدارنده نیتریفیکاسیون DCD بود. همچنین درصد همزیستی ریشه گیاهان تلقیح‌شده با قارچ *G. etunicatum* در غلظت‌های ۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم DCD به‌ترتیب ۱۵، ۴۴ و ۶۶ درصد کمتر از گیاهان بدون بازدارنده نیتریفیکاسیون DCD بود. درصد ریشه‌های کلونیزه شده با قارچ *G. mosseae* تحت غلظت‌های ۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم DCD به‌ترتیب ۱۳، ۲۰ و ۱۳۹درصد کمتر از گیاهان بدون تیمار بازدارنده بودند. قارچ‌های خاک معمولاً در معرض مخلوط‌های شیمیایی قرار می‌گیرند و تأثیرات بالقوه‌ای بر روی فراوانی و جوامع آنها دارند (Coppola *et al*., 2011; Maienza *et al*., 2014). بر این اساس، برخی مطالعات برای روشن‌کردن تأثیرات مواد شیمیایی بر قارچ‌های خاک انجام شده است (Sigler and Turco, 2002; Coppola *et al*., 2011). 3, 4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP) به‌عنوان یک بازدارنده نیترات‌سازی مورد استفاده قرار می‌گیرد و مشاهده شده است که می‌تواند به‌طور خاص میکروارگانیسم‌های نیتروژن‌ساز خاک را سرکوب کرده و میزان نیترات خاک را کاهش دهد (Florio *et al*., 2016). درنتیجه استفاده از بازدارنده‌های نیتریفیکاسیون در خاک‌های کشاورزی اثرات نامشخصی بر جمعیت قارچ‌های خاک دارند. البته نتایج حاضر با برخی نتایج Yu و همکاران (۲۰۱۵) متفاوت بود. زیرا آنها به این نتیجه رسیدند که بازدارنده‌های نیتریفیکاسیون زیاد بر جمعیت قارچ‌ها تأثیر نمی‌گذارند چون بازدارنده‌های نیتریفیکاسیون با از بین بردن باکتری‌های نیترات‌سازی موجب تحریک و افزایش قارچ‌های خاک می‌گردند. همچنین برخی بازدارنده‌های نیتریفیکاسیون دارای کربن و نیتروژن هستند که موجب افزایش جمعیت قارچ‌های خاک می‌گردد (Yu *et al*.,

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-04-03]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.53.2.0]

جدول ۱- تجزیه واریانس تأثیر بازدارنده نیتریفیکاسیون DCD و قارچ‌های همزیست بر شاخص‌های درصد همزیستی، غلظت DCD در برگ، غلظت نیترات برگ و مقدار فلورسانس کلروفیل در گیاه کاهو

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات				
		درصد همزیستی	وزن خشک اندام هوایی	وزن خشک ریشه	وزن خشک اندام هوایی به ریشه	غلظت DCD در برگ
DCD	۳	۱۶۷۰/۸ **	۱۲۴/۰۷۷**	۰/۳۵۰**	۱۲/۵۵۷**	۲/۳**
قارچ همزیست	۳	۱۱۹۱۱/۶ **	۱۱۴/۴۷۸**	۱/۰۲۵**	۷/۱۱۱**	۰/۴۰*
DCD × قارچ	۹	۲۹۹/۷ **	۶/۶۳۳*	۰/۰۱۳ns	۲/۵۴۷*	۰/۲**
خطا	۳۲	۳۲/۸	۲/۷۳۲	۰/۰۱۳	۱/۶۲۵	۰/۱
ضریب تغییرات		۸/۲	۱۱/۰۴	۸	۸/۷	۴



شکل ۱- تأثیر غلظت‌های مختلف DCD بر شاخص درصد همزیستی در گیاه کاهو تحت تیمارقارچ‌های همزیست *Piriformospora indica* (*P. i*)، *G. etunicatum* (*G. e*) و *G. mosseae* (*G. m*)

2015). البته در تحقیقی دیگر که توسط Maienza و همکاران (۲۰۱۴) انجام شد، به این نتیجه رسیدند که بازدارنده‌های نیتریفیکاسیون می‌توانند اثرات نامطلوبی بر قارچ‌های مفید و غیرمفید خاک داشته باشند. آنها بیان نمودند که کاربرد بازدارنده نیتریفیکاسیون DMPP همرا با کود گاوی موجب می‌شود که جمعیت میکروبی خاک زیاد تحت تأثیر بازدارنده نیتریفیکاسیون قرار نگیرد و جمعیت قارچ تحت تیمار بازدارنده DMPP کاهش شدیدی داشت. دلیل اینکه بازدارنده-های نیتریفیکاسیون چگونه درصد همزیستی ریشه را کاهش می‌دهند معلوم نیست ولی در تحقیقی که توسط Marschner (۲۰۱۱) انجام گرفت مشاهده گردید که افزایش NH_4^+ در خاک موجب تورم میتوکندری و ترک خوردگی سلول‌های ریشه گیاه می‌گردد که به‌دنبال آن همزیست شدن قارچ‌های میکوریز با ریشه گیاه کاهش می‌یابد. حتی در مواقعی گزارش شده است که افزایش NH_4^+ باعث ایجاد سمیت در قارچ‌های میکوریز شده و مانع از جوانه‌زنی اسپور می‌شود (Garcia and Mendoza, 2008). از طرفی هم گزارش شده است که بازدارنده‌های نیتریفیکاسیون DCD از اکسیداسیون NH_4^+ به NO_2^- جلوگیری می‌کند و درنتیجه موجب افزایش NH_4^+ در خاک می‌شود (Ruser and Schulz, 2015). پس با توجه به

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-04-03]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.53.2.0]

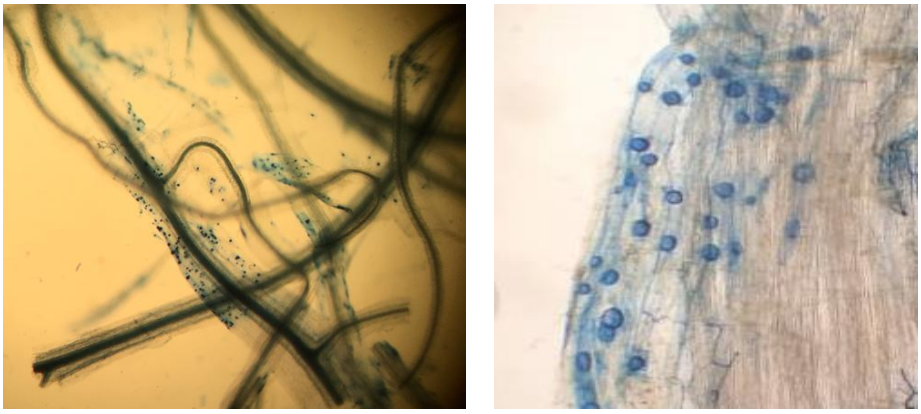
نتایج آزمایش‌های گذشته و آزمایش حاضر، احتمالاً دلیل یکی از دلایل کاهش درصد همزیستی سمیت ناشی از NH_4^+ و آسیب به ریشه بوده است. البته لازم به ذکر است که صدمه به گیاه موجب کاهش تولید کربوهیدرات می‌شود و گیاه قادر به تأمین کربوهیدرات کافی برای قارچ‌های همزیست نیست (Pal *et al.*, 2016). احتمال می‌رود یکی از دلایل کاهش درصد کلونیزاسیون، صدمه گیاه ناشی از غلظت زیاد NH_4^+ در خاک باشد که نتیجه آن می‌تواند منجر به کاهش کربوهیدرات در گیاه و کاهش درصد همزیستی باشد. تصاویر مربوط به کلونیزاسیون ریشه (شکل ۲) نشان‌دهنده همزیستی قارچ‌ها با ریشه گیاه است.

وزن خشک اندام هوایی: قارچ‌های *P. indica*، *G. etunicatum* و *G. mosseae* و بازدارنده نیتریفیکاسیون DCD در گیاه کاهو بر شاخص وزن خشک اندام هوایی نشان داد که اثر متقابل قارچ و بازدارنده بر وزن خشک اندام هوایی معنی‌دار بود ($P < 0.05$). مقایسه میانگین اثر متقابل قارچ‌های همزیست و DCD بر وزن خشک اندام هوایی (شکل ۳) نشان داد که استفاده از قارچ *P. indica* در مقایسه با گیاه شاهد موجب افزایش وزن خشک اندام هوایی به میزان ۵۴/۶ درصد تحت تیمار بازدارنده نیتریفیکاسیون DCD ۵ میلی‌گرم در کیلوگرم گردید. کمترین وزن خشک اندام هوایی گیاه کاهو تحت تیمار DCD ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم مشاهده گردید. قارچ‌های همزیست با برقراری شبکه گسترده میسلیومی در اطراف ریشه موجب جذب بیشتر عناصری مانند فسفر که در رشد گیاه بسیار پراهمیت است می‌شوند (Varma *et al.*, 2012). اهمیت قارچ *P. indica* در جذب عناصر ریزمغذی مانند روی توسط Padash و همکاران (۲۰۱۶) در گیاه کاهو نیز گزارش شده است. آنها گزارش نمودند قارچ *P. indica* با جذب بیشتر عناصر مفید موجب افزایش در میزان عملکرد، وزن خشک و تر، کلروفیل کل و ارتفاع گیاه کاهو می‌گردد. پس احتمالاً دلیل اصلی افزایش وزن خشک گیاه کاهو تحت قارچ همزیست، کمک به ریشه گیاه در جذب بیشتر عناصر مفید خاکزی باشد. کاربرد DCD در غلظت‌های پایین موجب تغییر نیترات به آمونیوم می‌شود که برای جذب نیتروژن و رشد گیاهان مفید است که موجب بالارفتن نیتروژن در گیاه می‌شود. با بالارفتن میزان نیتروژن در گیاه کلروفیل و فتوسنتز در گیاه نیز بالا می‌رود و این امر موجب تقسیم سلولی و افزایش اندازه سلول می‌شود. و درنتیجه وزن خشک گیاه نیز افزایش می‌یابد. همچنین در آزمایش حاضر غلظت بالای DCD موجب کاهش وزن خشک (شکل ۳) شده که با نتایج Zerulla و همکاران (۲۰۰۱) مطابقت داشت. ایشان برای اولین بار سمیت بازدارنده نیتریفیکاسیون DCD را در گیاه کاهو بررسی کردند. آنها گزارش نمودند غلظت بالای DCD موجب ایجاد اثرات سمی در گیاه کاهو مانند کلروز برگی و سوختگی حاشیه برگ‌ها می‌شود و به شدت بیوماس گیاه را تحت تأثیر قرار گذاشت و کاهش داد.

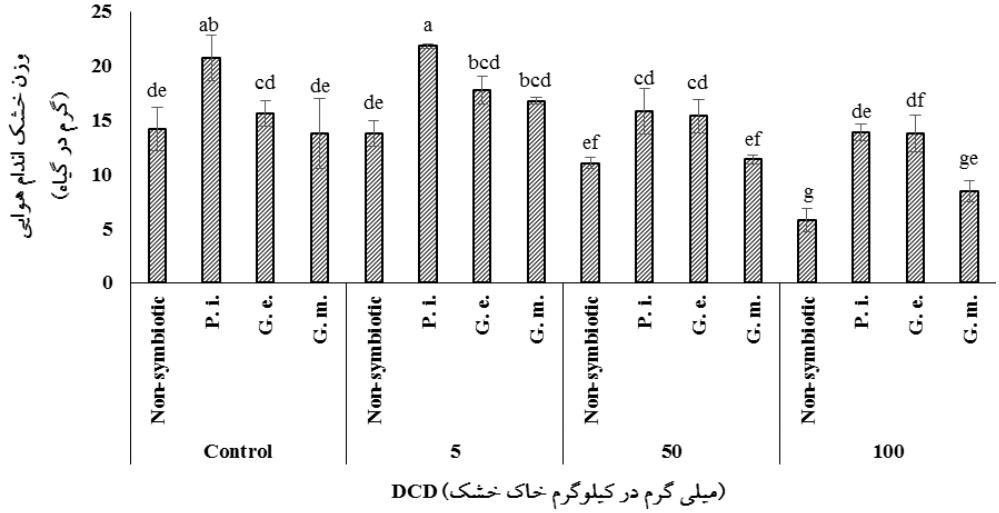
وزن خشک ریشه: نتایج حاصل از تأثیر قارچ‌های همزیست (شکل a ۴) و بازدارنده نیتریفیکاسیون DCD (شکل b ۴) در گیاه کاهو، نشان داد که بیشترین وزن خشک ریشه مربوط به قارچ *P. indica* (شکل a ۴) و غلظت ۵ میلی‌گرم DCD بود (شکل b ۴). در حالت کلی گیاهانی که با قارچ‌های همزیست تیمار شده بودند نسبت به گیاهان غیرهمزیست، کارایی ریشه بهتری داشتند. جذب بازدارنده نیتریفکاسیون DCD توسط ریشه گیاهان در بسیار از پژوهش‌ها مورد بررسی گرفته است (Marsden *et al.*, 2015; Pal *et al.*, 2016). طبق تحقیقات Pal و همکاران (۲۰۱۶) بازدارنده نیتریفیکاسیون DCD پویایی بسیار بالایی در جذب به‌وسیله ریشه دارد و گیاه قادر به متابولیزه کردن آن نیست. DCD جذب شده به‌وسیله ریشه، به اندام‌های بالایی گیاه رفته و بقیه آن در ریشه گیاه تجمع پیدا می‌کند (Marsden *et al.*, 2015). پس به احتمال زیاد دلیل کاهش رشد ریشه گیاه تحت غلظت بالای DCD تجمع مقدار زیاد بازدارنده نیتریفیکاسیون در ریشه است که درنهایت وزن تر و خشک و طول ریشه را کاهش می‌دهد. البته قابل به ذکر است که طول و وزن خشک ریشه در گیاهان دارای همزیستی میکوریزایی تحت بازدارنده نیتریفیکاسیون DCD بسیار بیشتر از گیاهان غیرهمزیست بود.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-04-03]

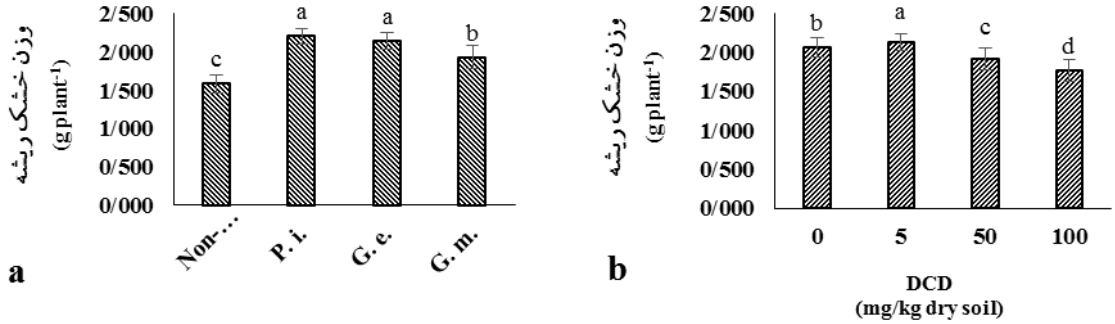
[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.53.2.0]



شکل ۲- همزیستی قارچ پریفورموسپورا ایندیکا باریشه کاهو



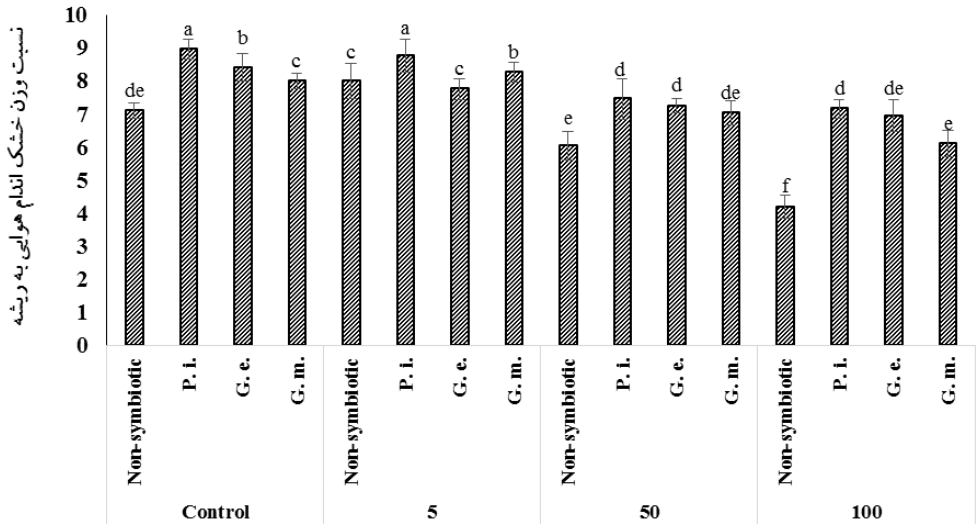
شکل ۳. تاثیر غلظت‌های مختلف DCD بر شاخص وزن خشکاندام هوایی گیاه کاهو تحت تیمارقارچ‌های *Piriformospora indica* (*P. i*)، *G. etunicatum* (*G. e*) و *G. mosseae* (*G. m*)



شکل ۴- اثرات اصلی قارچ همزیست تیمار قارچ‌های *Piriformospora indica* (*P. i*)، *G. etunicatum* (*G. e*) و *G. mosseae* (*G. m*) (a) و DCD (b) بر شاخص وزن خشک ریشه گیاه کاهو

موجودات ذره‌بینی از جمله قارچ‌های میکوریز برای رشد ریشه گیاهان بسیار مفید هستند (Evelin and Kapoor, 2014; Sharma *et al*., 2017). Arora و همکاران (۲۰۲۰) گزارش نمودند همزیستی میکوریزایی موجب جذب فسفر و نیتروژن توسط ریشه گیاه می‌شود که نتیجه آن افزایش رشد ریشه است. در قسمت پایین تصاویر مربوط به ریشه تحت تیمار قارچ

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-04-03]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.53.2.0]



شکل ۵- تأثیر غلظت‌های مختلف DCD بر شاخص نسبت وزن خشک اندام هوایی به ریشه در گیاه کاهو تحت تیمارقارچ‌های همزیست *Piriformospora indica* (*P. i***)، *G. etunicatum* (***G. e***) و *G. mosseae* (***G. m***)**

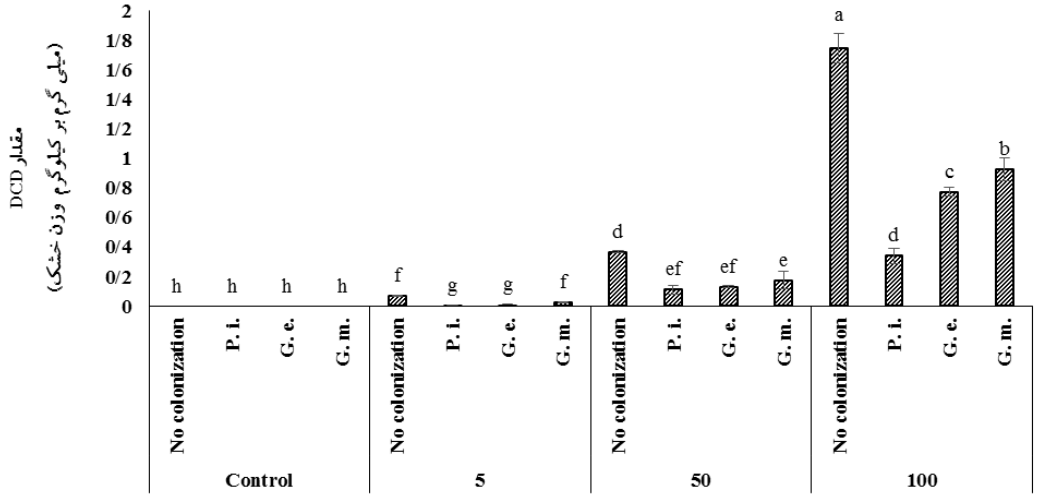
همزیست و بازدارنده نیتریفیکاسیون DCD آورده شده است.

نسبت وزن خشک اندام هوایی به ریشه: مقایسه میانگین تأثیر متقابل DCD و قارچ‌های همزیت بر شاخص نسبت وزن خشک برگ بر ریشه (شکل ۵) نشان داد که با افزایش غلظت DCD (۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم) در بستر کشت گیاه کاهو، نسبت وزن خشک اندام هوایی به ریشه کاهش یافته است. و از طرف دیگر بیشترین مقدار این شاخص مربوط به گیاهان تحت تیمار با قارچ‌های همزیست (بدون تیمار با DCD) بودند. قارچ *P. indica* نسبت وزن خشک اندام هوایی بر ریشه را نسبت به سایر تیمارها به خوبی افزایش داد که با نتایج Padash و همکاران (۲۰۱۹) مطابقت داشت.

غلظت DCD در برگ: نتایج حاصل از اندازه گیری DCD در برگ گیاه کاهو (شکل ۶) نشان داد که بیشترین مقدار DCD موجود در برگ گیاه کاهو مربوط به غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم در گیاهان بدون تلقیح با قارچ همزیست بود. با توجه نمودار مقایسه میانگین تأثیر قارچ‌های *P. indica*، *G. etunicatum* و *G. mosseae* و غلظت بازدارنده نیتریفیکاسیون DCD در گیاه کاهو (شکل ۶) کاملاً مشخص شد که غلظت DCD موجود در برگ گیاهان تحت تیمار با قارچ *P. indica* در غلظت‌های ۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم DCD، به‌ترتیب ۹۴، ۷۰ و ۸۱ درصد کمتر از گیاهان غیرهمزیست بود. همچنین غلظت DCD در برگ گیاهان تلقیح شده با قارچ *G. etunicatum* تحت غلظت‌های ۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم DCD، به‌ترتیب ۸۲، ۵۴ و ۶۲ درصد کمتر از گیاهان بدون همزیستی بود. مقدار بازدارنده نیتریفیکاسیون DCD در برگ گیاهان همزیست‌شده با قارچ *G. mosseae* تحت غلظت‌های ۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم DCD، به‌ترتیب ۶۴، ۵۲ و ۴۷ درصد کمتر از گیاهان غیرهمزیست بودند. تاکنون هیچ مطالعه‌ای در در دنیا در زمینه استفاده از قارچ‌های همزیست بر کاهش سمیت بازدارنده‌های نیتریفیکاسیون انجام نشده است. استقرار و رشد گیاه در خاک آلوده به مواد شیمیایی بسیار دشوار است و استفاده از قارچ‌های میکوریز بسیار مفید است (Lenoir *et al*., 2016). قارچ‌های مایکوریز با تجزیه و تثبیت آلاینده‌ها در خاک باعث رشد و استقرار بهتر گیاهان در خاک‌های آلوده می‌شوند (Sainz *et al*., 2006; Li *et al*., 2011). طبق نتایج آزمایش حاضر، مقدار

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-04-03]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.53.2.0]



شکل ۶. تاثیر غلظت‌های مختلف DCD بر مقدار بازدارنده نیتریفیکاسیون DCD در گیاه کاهو تحت تیمارقارچ‌های همزیست *Piriformospora indica* (*P. i*)، *G. etunicatum* (*G. e*) و *G. mosseae* (*G. m*).

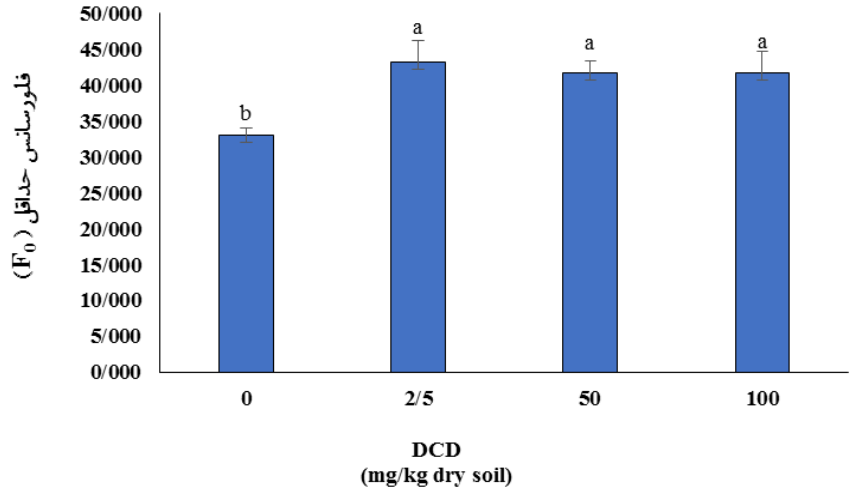
2019 جذب DCD بین قارچ‌های همزیست در این پژوهش متفاوت بود. نحوه جذب یا تخریب آلاینده‌های شیمیایی در بین گونه‌های قارچ‌های میکوریز متفاوت است (Liu and Dalpe,). البته نوع گیاه و غلظت آلاینده نیز مهم است (Yu *et al.*, 2011). همان‌طور که قبلاً هم به آن اشاره کردیم، هیچ مطالعه‌ای در زمینه کاهش سمیت بازدارنده‌های نیتریفیکاسیون توسط قارچ‌های همزیست انجام نشده است ولی تحقیقاتی در زمینه کاهش سمیت سایر آلاینده‌ها و مواد شیمیایی مضر انجام شده است. به‌عنوان مثال، Binet و همکاران (۲۰۰۱) در آزمایشی بر روی چمن تحت سمیت anthracene (anthraquinone) به این نتیجه رسیدند که استفاده از قارچ میکوریز مقدار anthracene را به‌طور قابل‌توجهی در گیاهان تحت همزیستی کاهش داد و غلظت anthracene در گیاهان دارای همزیستی ۰/۹ $gk.g^{-1}$ و در گیاهان غیرهمزیست ۱/۲ $gk.g^{-1}$ بود. همچنین Aranda و همکاران (۲۰۱۹) گزارش نمودند که استفاده از قارچ مایکوریز *Rhizoglomus custos* در گیاه هویج (*Daucus carota*) تحت غلظت‌های مختلف آلاینده Anthracene، موجب کاهش جذب آلاینده به میزان ۲۰ تا ۴۰ درصد نسبت به شاهد گردید. یا تحقیق دیگری که در کاهش سمیت آلاینده polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) در گیاه *Medicago sativa* با استفاده از قارچ‌های میکوریز انجام گرفت، نشان داد که گیاهان دارای همزیستی میکوریزایی دارای مقدار کمتری PAH نسبت به گیاهان غیرهمزیست بودند (Zhou *et al.*, 2013). قارچ‌های میکوریزا با برقراری شبکه بزرگ مسیلیومی آلاینده‌ها را جذب و تثبیت کرده و مانع از انتقال بیشتر آلاینده‌ها به اندام هوایی گیاه می‌شوند (Lenoir *et al.*, 2016). با توجه به نتایج شکل ۴ مشخص شد که گیاهانی که با قارچ‌های همزیست تیمار شده بودند، مقدار DCD کمتری نسبت به گیاهان عدم تلقیح با قارچ‌های همزیست داشتند. از بین قارچ‌های استفاده شده در این آزمایش قارچ *P. indica* دارای عملکرد بهتری در کاهش جذب DCD در گیاه کاهو داشت.

فلورسانس کلروفیل و غلظت نیترات برگ: نتایج تجزیه واریانس تأثیر بازدارنده نیتریفیکاسیون DCD و قارچ‌های همزیست بر مقدار فلورسانس کلروفیل و غلظت نیترات (جدول ۲) نشان داد که اثرات متقابل تیمارها (DCD × قارچ) بر فلورسانس حداقل (F_0)، فلورسانس حداکثر (Fm) و حداکثر کارایی کوانتومی فتوسیستم II (Fv/Fm) در سطح احتمال یک درصد و بر غلظت نیترات برگ در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود (جدول ۲).

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-04-03]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.53.2.0]

جدول ۲- تجزیه واریانس تأثیر بازدارنده نیتریفیکاسیون DCD و قارچ‌های همزیست بر مقدار فلورسانس کلروفیل و غلظت نیترات در گیاه کاهو

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		F0	Fm	Fv/Fm	نیترات
DCD	۳	۲۴۵ **	۳۶۵۸۰**	۰/۰۴**	۳۹**
قارچ همزیست	۳	۴۷/۸**	۱۹۴۶۷/۶ **	۰/۰۲**	۱۶/۷**
DCD × قارچ	۹	۸۱/۶**	۴۷۴۲/۱**	۰/۰۰۵**	۰/۹۴*
خطا	۳۲	۵۴/۸	۱۶۷۲/۵	۰/۰۰۱	۰/۴۲
ضریب تغییرات		۷/۸	۹/۲	۰/۶۸	۲/۷



شکل ۷- تأثیر غلظت‌های مختلف DCD برشاخص فلورسانس حداقل

فلورسانس حداقل (F_0): مقایسه میانگین اثر اصلی بازدارنده نیتیرفیکاسیون DCD بر مقدار F_0 (شکل ۷) نشان داد که گیاهان شاهد دارای کمترین مقدار F_0 نسبت به غلظت‌های بالاتر DCD بودند. هر چند بین غلظت‌های ۵، ۵۰ و ۱۰۰ بازدارنده نیتریفیکاسیون DCD اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ولی هر سه غلظت موجب افزایش F_0 به میزان ۲۰ درصد نسبت به گیاه شاهد شدند. افزایش در مقدار F_0 نشان از آسیب به زنجیره انتقال الکترون فتوسیستم II در اثر کاهش ظرفیت کوئینونآ (QA) و عدم اکسیداسیون کامل آن به‌دلیل جریان کند الکترون در طول مسیر فتوسیستم II و در مجموع غیرفعال شدن فتوسیستم II را دارد (Zlatev and Yordanov, 2004). تنش‌های موجود در طول رشد گیاه موجب افزایش مقدار F_0 می‌شود، مانند تنش خشکی در گیاه ذرت (Darvish *et al.*, 2010) و تنش سرمایی در کاهو (Roosta and Sajjadinia, 2010). تاکنون مطالعه‌ای در خصوص تأثیر بازدارنده‌های نیتریفیکاسیون بر فلورسانس کلروفیل صورت نگرفته است ولی با استناد بر اینکه تنش موجب افزایش F_0 در گیاه می‌گردد می‌توان چنین برداشت کرد افزایش F_0 در غلظت‌های بالای DCD، این است که DCD ممکن است به دلیل تنش ایجاد شده در گیاه کاهو و تولید بیشتر پراکسید هیدروزن باشد.

فلورسانس حداکثر (Fm): اثر متقابل غلظت‌های مختلف DCD و قارچ‌های همزیست بر شاخص Fm (جدول ۳) نشان داد که بیشترین مقدار Fm مربوط به گیاهان تیمارشده با

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-04-03]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.53.2.0]

جدول ۳- تأثیر غلظت‌های مختلف DCD بر شاخص‌های فلورسانس حداکثر (Fm) و حداکثر کارایی کوانتومی فتوسیستم II (Fv/Fm) در گیاه کاهو تحت تیمارقارچ‌های همزیست *Piriformospora indica* (*P. i*)، *G. etunicatum* (*G. e*) و *G. mosseae* (*G. m*)

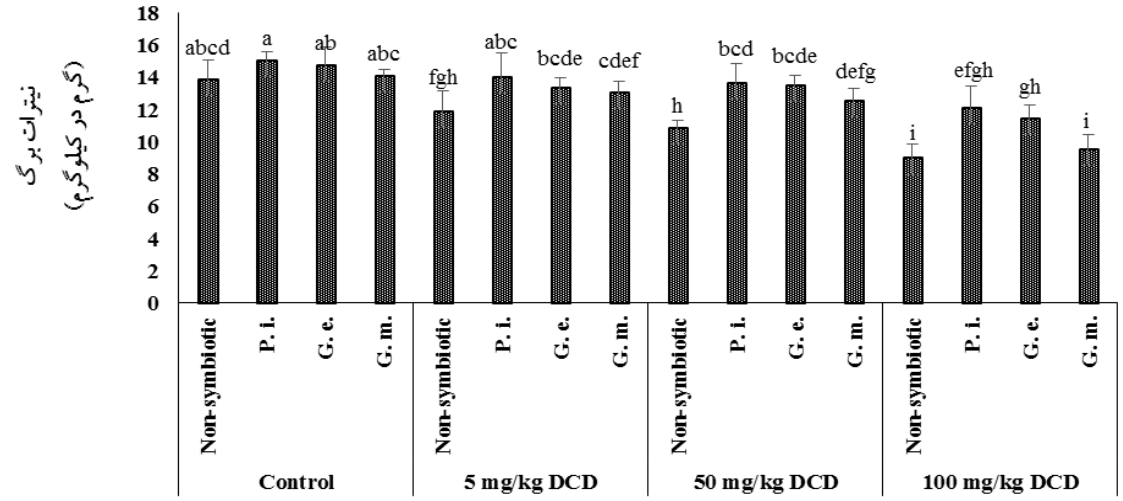
تیمار		پارامتر	
DCD (میلی‌گرم در کیلوگرم خاک)	قارچ همزیست	Fm	Fv/Fm
شاهد		۲۲۸/۳ cde	۰/۸۰۱ cde
	+ *P.i*	۳۴۳/۲ a	۰/۹۲۷ a
	+ *G.e*	۳۲۶/۲ a	۰/۹۱۰ ab
	+ *G. m*	۱۸۶/۳ cdef	۰/۷۷۸ cdefg
۵		۲۵۲/۸ bc	۰/۸۱۵ cde
	+ *P.i*	۳۰۵/۶ ab	۰/۸۵۵ bc
	+ *G.e*	۲۴۲/۵ bcd	۰/۸۰۶ cdef
	+ *G. m*	۱۷۰/۵ def	۰/۷۳۸ fg
۵۰		۱۶۱/۹ ef	۰/۷۴۸ efg
	+ *P.i*	۲۴۷/۷ bc	۰/۸۲۷ cd
	+ *G.e*	۱۷۷/۲ cdef	۰/۷۶۲ defg
	+ *G. m*	۱۶۱/۳ ef	۰/۷۳۱ efg
۱۰۰		۱۱۳/۲ f	۰/۶۵۴ h
	+ *P.i*	۱۵۷/۵ ef	۰/۷۳۲ efg
	+ *G.e*	۱۶۰/۸ef	۰/۷۴۶ fg
	+ *G. m*	۱۶۶/۲ def	۰/۷۳۹ g

در هر ستون میانگین‌ها با حروف مشترک در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

قارچ‌های همزیست *P. indica* و *G. etunicatum* بدون حضور DCD و کمترین مقدار آن مربوط به تیمارهای ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم DCD بدون تلقیح با قارچ‌های همزیست بود (جدول ۳). کاهش Fm در شرایط تنش ممکن است با کاهش فعالیت کمپلکس آنزیم تجزیه‌کننده آب و چرخه انتقال الکترون در درون یا اطراف فتوسیستم II باشد (Zlatev, 2009). پس احتمالاً دلیل اصلی کاهش Fm در غلظت‌های بالای DCD، تنش ایجاد شده به‌وسیله DCD باشد. همان‌طور که در شکل ۱ نیز مشاهده شد غلظت‌های بالای DCD موجب کاهش شدید درصد کلونیزاسیون در ریشه گیاه کاهو گردید و علایمی مانند سوختگی حاشیه برگ بر جای گذاشت. قارچ‌های همزیست با افزایش کارایی گیاه و افزایش مقاومت گیاهان به انواع تنش‌ها موجب افزایش کارایی فتوسنتزی می‌شوند (Tanha *et al.*, 2014). قارچ *P. indica* ژن‌های کدکننده مربوط به فتوسنتز را مورد هدف قرار نمی‌دهد، بلکه با ایجاد فضایی در داخل سلول از تخریب پلاستیدها جلوگیری می‌کنند (Sun *et al.*, 2010).

حداکثر کارایی کوانتومی فتوسیستم II (Fv/Fm): طبق نتایج بدست آمده از تأثیر غلظت‌های مختلف DCD در گیاه کاهو تحت تیمار قارچ‌های همزیست بر شاخص Fv/Fm (جدول ۳) مشخص گردید که تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر DCD موجب کاهش شدید مقدار Fv/Fm گردیده است. و از طرفی بیشترین مقدار Fv/Fm مربوط به تیمار با قارچ‌های

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-04-03]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.53.2.0]



شکل ۸- غلظت نیترات برگ تحت اثر متقابل DCD و قارچ‌های همزیست *Piriformospora indica* (*P. i*)، *G. etunicatum* (*G. e*) و *G. mosseae* (*G. m*) در گیاه کاهو

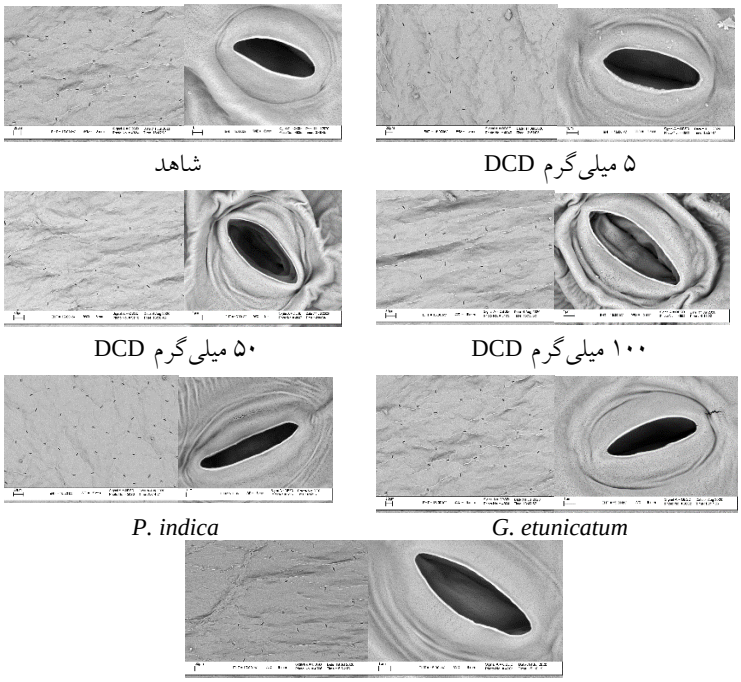
همزیست *P. indica* و *G. etunicatum* در گیاه کاهو بدست آمد. طبق نتایج کاملاً روشن بود که گیاهانی که با قارچ‌های همزیست کلونیزه شده بودند دارای Fv/Fm بیشتری نسبت به گیاهان عدم تیمار با قارچ‌های همزیست تحت غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ بازدارنده نیتریفیکاسیون DCD بودند. Fv/Fm حداکثر کارایی کوانتومی فتوسیستم II است که بطورکلی به‌عنوان شاخصی معتبر برای نشان دادن اختلال ناشی از تنش در مراکز فتوشیمیایی و بازدارندگی نوری استفاده شده است (Li *et al.*, 2008). کاهش Fv/Fm بیانگر کاهش کارایی کوانتومی فتوسیستم II است (Baker and Rosenqvist, 2004). تنش در گیاهان موجب کاهش شدید Fv/Fm در گیاهان می‌گردد (Li *et al.*, 2004). به‌نظر می‌رسد که تنش ناشی از بازدارنده نیتریفیکاسیون استفاده شده در آزمایش موجب کاهش مقدار Fv/Fm شده باشد. و از طرفی قارچ‌های همزیست که به‌عنوان الیسیتور عمل کرده و باعث ایجاد مقاومت در گیاه در برابر تنش ایجاد شده توسط بازدارنده نیتریفیکاسیون شده‌اند.

نیترات برگ: با توجه به نتایج تأثیر DCD و قارچ‌های همزیست بر شاخص نیترات برگ (شکل ۸) بیشترین غلظت نیترات برگ مربوط به گیاهان تحت تیمار با قارچ‌های همزیست بود. همچنین تیمار با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ بدون قارچ‌های همزیست موجب کاهش غلظت نیترات در برگ گیاه گردید (شکل ۸). مطالعات گسترده‌ای در زمینه کاهش جذب نیترات به‌وسیله بازدارنده‌های نیتریفیکاسیون انجام شده است به‌عنوان مثال کاربرد بازدارنده‌های نیتریفیکاسیون موجب کاهش نیترات در گیاه چاودار (Fangueiro *et al.*, 2009)، مرکبات (Martineza *et al.*, 2015) و توت‌فرنگی (Serna *et al.*, 2000) شده است. همچنین گزارش نموده‌اند که گیاه میل زیادی به جذب آمونیوم نسبت به نیترات دارد (Martineza *et al.*, 2015).

قارچ‌های همزیست موجب جذب بیشتر نیتروژن و نیترات توسط ریشه گیاه می‌شود که نتیجه آن افزایش مقدار نیترات در گیاه است (Arora *et al.*, 2020). Tanha و همکاران (۲۰۱۴) گزارش نمودند که قارچ *P. indica* قابلیت بالایی در جذب نیترات از خاک و انتقال آن به ریشه دارد. افزایش جذب نیترات تحت تیمار قارچ *P. indica* در گیاه سویا نیز گزارش شده است (Rathod *et al.*, 2011).

تصاویر مربوط به روزنه: تصاویر SEM تأثیر بازدارنده نیتریفیکاسیون DCD در غلظت‌های مختلف بر تغییرات روزنه برگ گیاه کاهو (شکل ۹) مشخص شد که، با افزایش غلظت بازدارنده DCD اطراف سلول‌های نگهبان روزنه حالت چروکیده پیدا کرده و روزنه بسته شده است. در گیاه شاهد تغییرات روزنه‌ای خاصی مشاهده نشد و غلظت ۵ میلی‌گرم

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-04-03]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.53.2.0]



شکل ۹- تصاویر SEM از روزنه برگ گیاه کاهو تحت تیمار با DCD و قارچ‌های همزیست با بزرگنمایی ۱ و ۲۰ میکرومتر (بزرگنمایی ۱ میکرومتر سمت چپ و بزرگنمایی ۲۰ میکرومتر سمت راست هر شکل)

DCD حالت چروکیدکی اطراف سلول‌های نگهبان روزنه بسیار کمتر از غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم DCD بود. گیاهان تحت تیمار با بازدارنده نیتریفیکاسیون DCD علاوه بر چروک شدن سلول‌های اطراف روزنه، بسته‌شدن روزنه در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ نیز دیده شد که احتمالاً دلیل آن سمیت ناشی از غلظت‌های بالای بازدارنده بوده است. مطالعاتی که دلیل بسته شدن روزنه و چروکیدگی اطراف آن را در غلظت‌های بالای بازدارنده‌های نیتریفیکاسیون اثبات کند انجام نشده است ولی موادی مانند نمک (Fatma *et al*., 2016)، فلزات سنگین (Sehar *et al*., 2019; Per *et al*., 2017) و محیط‌هایی با تغییرات دمایی و خشکسالی بر رفتار روزنه برگ و باز و بسته شدن سلول‌های نگهبان تأثیر می‌گذارند. همچنین از مهم‌ترین عوامل تأثیرگذار در باز و بسته شدن روزنه‌ها فیتوهورمون‌ها هستند (Fatma *et al*., 2013). اکسید نیتریک (NO) یک مولکول مهم در برابر رادیکال های آزاد محسوب می‌شود و در توسعه گیاه، عملکردهای مختلف فیزیولوژیکی و فرآیندهای جذب مواد مغذی نقش دارد و همچنین گزارش شده است که باعث تحمل گیاه به تنش‌های محیطی از جمله تنش نمکی، فلزات سمی، درجه حرارت بالا و پایین با نقش در باز و بسته کردن روزنه گیاه می‌شود (Fatma *et al*., 2016; Asgher *et al*., 2017; Per *et al*., 2017). پس احتمالاً هر عاملی که باعث سرکوب NO در گیاه شود موجب بسته شدن روزنه نیز خواهد شد. از طرفی برای اولین بار Wu و همکاران (۲۰۱۷) گزارش نمودند استفاده از بازدارنده‌های نیتریفیکاسیون با تأثیر بر باکتری‌هایی که عمل نیتریفیکاسیون را انجام می‌دهند، مانع از تولید گازهای گلخانه‌ای N_2O و NO در خاک می‌شوند. پس به احتمال زیاد بازدارنده نیتریفیکاسیون DCD با ممانعت از تولید NO موجب کاهش غلظت NO در گیاه شده و روزنه بسته می‌شود. و با توجه به نتایج پژوهش‌های گذشته و نتایج آزمایش حاضر کاهش NO موجب کاهش رشد در گیاه می‌شود.

نتیجه‌گیری

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-04-03]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.53.2.0]

در این مطالعه کاربرد DCD تأثیر بسیاری بر فلورسانس کلروفیل گذاشت. از طرفی استفاده از قارچ‌های همزیست باعث افزایش میزان این پارامترها شد. اثر متقابل قارچ‌های همزیست و DCD نشان داد که، کاربرد همزمان قارچ‌های همزیست با DCD در مقایسه با عدم کاربرد قارچ‌ها تحت DCD اثرات مثبتی بر کلروفیل فلورسانس داشت. با بررسی غلظت DCD جذب شده در برگ‌های گیاه کاهو کلونیزه شده با قارچ‌های همزیست، مشخص شد که قارچ‌های همزیست به خوبی می‌توانند از جذب بیشتر DCD به اندام هوایی کاهو جلوگیری کنند. همچنین DCD بر درصد کلونیزاسیون نیز تأثیر منفی داشت، اما با همان درصد کم کلونیزاسیون، قارچ‌های همزیست توانستند مقدار DCD را در برگ‌های کاهو تا حدودی کاهش دهند. قارچ‌های همزیست با تأمین مواد مغذی برای گیاه و سایر شرایط مناسب رشد را افزایش می‌دهند و گیاه کربوهیدرات‌های مورد نیاز قارچ‌های همزیست را نیز تأمین می‌کند که به نوبه خود هم ترشحات ریشه را افزایش می‌دهد. در مجموع، نتایج آزمایش حاضر نشان می‌دهد که استفاده از DCD به تنهایی صحیح نیست و اگر قرار است استفاده آن در کشاورزی ادامه یابد، باید از روشی برای کنترل اثرات مضر آن نیز استفاده شود. استفاده از قارچ‌های همزیست می‌تواند اثرات منفی DCD را تا حدودی کنترل کند، اما تحقیقات گسترده‌ای برای درک این نتیجه مورد نیاز است.

منابع

Aranda, E., Jose, M. S., Patricia, G., Rocio, R., Juan A. O., Regina-Michaela, W. and Inmaculada, G. R. (2019) "Role of arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus custos* in the dissipation of PAHs under root-organ culture conditions." Environmental Pollution 181: 182-189.

Arora, M., Saxena, P., Abdin, M. Z. and Varma, A. (2020) Interaction between *Piriformospora indica* and *Azotobacter chroococcum* diminish the effect of salt stress in *Artemisia annua* L. by enhancing enzymatic and non-enzymatic antioxidants. Symbiosis 80: 61-73.

Asgher, M., Per, T. S., Masood, A., Fatma, M., Freschi, L., Corpas, F. J. and Khan, N. A. (2017) Nitric oxide signaling and its crosstalk with other plant growth regulators in plant responses to abiotic stress. Environmental Science and Pollution Research 24: 2273-2285.

Baker, N. R. and Rosenqvist, E. (2004) Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: An examination of future possibilities. Journal of Environmental and Experimental Botany 55: 1607-1621.

Binet, P., Portal, J. M. and Leyval, C. (2001) Application of GC–MS to the study of anthracene disappearance in the rhizosphere of ryegrass." Organic Geochemistry 32: 217-222.

Bock, E. and Wagner, M. (2006) Oxidation of inorganic nitrogen compounds as energy source. Prokaryotes 2: 457-495.

Cataldo, D. A., Haroon, M., Schrader, L. E. and Youngs, V. L. (1975) Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. Communications in Soil Science and Plant Analysis 6: 71-80.

Coppola, L., Comitini, F., Casucci, C., Milanovic, V., Monaci, E., Marinozzi, M., Taccari, M., Ciani, M. and Vischetti, C. (2011) Fungicides degradation in an organic biomixture: Impact on microbial diversity. New Biotechnology 29: 99-106.

Darvish Balouchi, M., Paknejad, F., Kashani, A. and Ardakani, M. R. (2010) Effect of water stress and foliar spraying of trace elements on chlorophyll fluorescence parameters, chlorophyll content, relative water content, membrane stability and yield of corn. Iranian Journal of Field Crop Science 41: 531- 543. Persian.

Evelin, H. and Kapoor, R. (2014) Arbuscular mycorrhizal symbiosis modulates antioxidant response in salt-stressed *Trigonella foenum-graecum* plants. Mycorrhiza 24: 197-208.

Fangueiro, D., Fernandes, A., Coutinho, J., Moreira, N. and Trindade, H. (2009) Influence of two nitrification inhibitors (DCD and DMPP) on annual ryegrass yield and soil mineral N dynamics after incorporation with cattle slurry. Communications in Soil Science and Plant Analysis 40: 3387-3398.

Fatma, M., Khan, M. I. R., Masood, A. and Khan, N. A. (2013) Coordinate changes in assimilatory sulfate reduction are correlated to salt tolerance: involvement of phytohormones. Annual Research and Review in Biology 10: 267-295.

Fatma, M., Masood, A., Per, T. S. and Khan, N. A. (2016) Nitric oxide alleviates salt stress inhibited photosynthetic performance by interacting with sulfur assimilation in mustard. Frontiers in Plant Science 7: 521.

Florio, A., Maienza, A., Dell'Abate, M. T., Stazi, S. R. and Benedetti, A. (2016) Changes in the activity and abundance of the soil microbial community in response to the nitrification inhibitor 3, 4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP). Journal of Soils and Sediments 16: 2687-2697.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-04-03]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.53.2.0]

Gao, Y., Li, Q., Ling, W. and Zhu, X. (2011) Arbuscular mycorrhizal phytoremediation of soils contaminated with phenanthrene and pyrene. Journal of Hazardous Materials 185: 703-709.

Garcia, I. V. and Mendoza, R. E. (2008) Relationships among soil properties, plant nutrition and arbuscular mycorrhizal fungi–plant symbioses in a temperate grassland along hydrologic, saline and sodic gradients. FEMS Microbiology Ecology 63: 359-371.

Hajiboland, R., Aliasgharzadeh, N., Laiegh, S. F. and Poschenrieder, C. (2010) Colonization with arbuscular mycorrhizal fungi improves salinity tolerance of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants. Plant and Soil 331: 313-327.

Hatzenpichler, R. (2012) Diversity, physiology, and niche differentiation of ammonia-oxidizing archaea. Applied and Environmental Microbiology 78: 7501-7510.

Hill, T. W. and Kafer, E. (2001) Improved protocols for Aspergillus minimal medium: Trace element and minimal medium salt stock solutions. Fungal Genetics Newsletter 48: 20-21.

Kim, D. G., Giltrap, D., Saggar, S., Palmada, T., Berben, P. and Drysdale, D. (2012) Fate of the nitrification inhibitor dicyandiamide (DCD) sprayed on a grazed pasture: Effect of rate and time of application. Soil Research 50: 337-347.

Lenoir, I., Lounes-Hadj Sahraoui, A., Laruelle, F., Dalpe, Y. and Fontaine, J. (2016) Arbuscular mycorrhizal wheat inoculation promotes alkane and polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation: microcosm experiment on aged-contaminated soil. Environmental Pollution 213: 549-560.

Li, G. M., Liu, B. B., Wu, Y. and Zou, Z. R. (2008) Interactive effects of drought stresses and elevated CO_2 concentration on photochemistry efficiency of cucumber seedlings. Journal of Integrative Plant Biology 50: 1307-1317.

Li, X. G., Duan, W., Meng, Q. W. and Zou, Q. (2004) The function of chloroplastic NAD (P) H dehydrogenase in tobacco during chilling stress under low irradiance. Plant and Cell Physiology 45: 103-108.

Li, G., James, A., Field, Ch. Z., Camila, L. M., Chi, H. N., Kalyani, V. J., David, S. and Reyes, S. A. (2020) Diazole and triazole inhibition of nitrification process in return activated sludge. Chemosphere 241: 124993.

Li, J. H., Yu, X. Z., Wu, S. C., Wang, X. R., Wang, S. H., Tam, N. F. Y. and Wong, M. H. (2011) Responses of bioaugmented ryegrass to PAH soil contamination. International Journal of Phytoremediation 13: 441-455.

Liu, J., Liu, J., Liu, J., Cui, M., Huang, Y., Tian, Y., Chen, A. and Xu, G. (2019) The potassium transporter SlHAK10 is involved in mycorrhizal potassium uptake. Plant Physiology 180: 465-479.

Maftoun, M. and Sheibany, B. (1979) Comparative phytotoxicity of several nitrification inhibitors to soybean plants. Journal of Agricultural and Food Chemistry 27: 1365-1368.

Maienza, A., Baath, E., Stazi, S. R., Benedetti, A., Grego, S. and Dell'Abate, M. T. (2014) Microbial dynamics after adding bovine manure effluent together with a nitrification inhibitor (3, 4 DMPP) in a microcosm experiment. Biology and Fertility of Soils 50: 869-877.

Marschner, H. (2011) Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press.

Martineza, F., Palencia, P., Weiland, C. M., Alonso, D. and Oliveira, J. A. (2015) Influence of nitrification inhibitor DMPP on yield, fruit quality and SPAD values of strawberry plants. Scientia Horticulturae 185: 233-239.

Marsden, K. A., Scowen, M., Hill, P. W., Jones, D. L. and Chadwick, D. R. (2015) Plant acquisition and metabolism of the synthetic nitrification inhibitor dicyandiamide and naturally-occurring guanidine from agricultural soils. Plant and Soil 395: 201-214.

Padash, A., Shahabivand, S., Behtash, F. and Aghaee, A. (2016) A practicable method for zinc enrichment in lettuce leaves by the endophyte fungus *Piriformospora indica* under increasing zinc supply. Scientia Horticulturae 213: 367-372.

Padash, A., Shahabivand, S., Behtash, F., Aghaee, A. and Aliloo, A. (2019) the changes in antioxidant enzymes activity of lettuce under *Piriformospora indica* and zinc treatments. Journal of Plant Process and Function 7: 75-86.

Pal, P., McMillan, A. M. S. and Saggar, S. (2016) Pathways of dicyandiamide uptake in pasture plants: A laboratory study. Biology and Fertility of Soils 52: 539-546.

Per, T. S., Masood, A. and Khan, N. A. (2017) Nitric oxide improves S-assimilation and GSH production to prevent inhibitory effects of cadmium stress on photosynthesis in mustard (*Brassica juncea* L.). Nitric Oxide 68: 111-124.

Phillips, J. M. and Hayman, D. S. (1970) Improved procedures for clearing roots andstaining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapidassessment of infection. Transactions of the British Mycological Society 55: 158-161.

Rodrigues, J. M., Lasa, B., Aparicio-Tejo, P. M., Gonzalez-Murua, C. and Marino, D. (2018) 3, 4-Dimethylpyrazole phosphate and 2-(N-3, 4-dimethyl-1H-pyrazol-1-yl) succinic acid isomeric mixture nitrification inhibitors: Quantification in plant tissues and toxicity assays. Science of the Total Environment 624: 1180-1186.

Roosta, H. R. and Sajjadinia, A. (2010) Studying the effect of cold stress on green basil, violet basil, tomato and lettuce using chlorophyll fluorescence technique. Environmental Stresses in Crop Sciences 3: 1-8.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-04-03]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.53.2.0]

Ruser, S. (2015) The effect of nitrification inhibitors on the nitrous oxide (N_2O) release from agricultural soils - a review. Journal of Plant Nutrition and Soil Science 178: 171-188.

Rathod, D. P., Brestic, M. and Shao, H. B. (2011) Chlorophyll a fluorescence determines the drought resistance capabilities in two varieties of mycorrhized and non-mycorrhized *Glycine max* Linn. African Journal of Microbiology Research 5: 4197-4206.

Sainz, M. J., Gonzalez, P. B. and Vilarino, A. (2006) Effects of hexachlorocyclohexane on rhizosphere fungal propagules and root colonization by arbuscular mycorrhizal fungi in *Plantago lanceolata*. European Journal of Soil Science 57: 83-90.

Serna, M., Balnus, J. and Quinones, A. (2000) Evaluation of 3,4-dimethylpyrazole phosphate as a nitrification inhibitor in citrus-cultivated soil. Biology and Fertility of Soils 32: 41-46.

Sehar, Z., Masood, A. and Khan, N. A. (2019) Nitric oxide reverses glucose-mediated photosynthetic repression in wheat (*Triticum aestivum* L.) under salt stress. Environmental and Experimental Botany 161: 277-289.

Sharma, P., Kharkwal, A. C., Abdin, M. Z. and Varma, A. (2017) *Piriformospora indica*-mediated salinity tolerance in *Aloe vera* plantlets. Symbiosis 72: 103-115.

Sun, C., Johnson, J. M., Cai, D., Sherameti, I., Oelmuller, R. and Lou, B. (2010) *Piriformospora indica* confers drought tolerance in Chinese cabbage leaves by stimulating antioxidant enzymes, the expression of drought-related genes and the plastid-localized CAS protein. Journal of Plant Physiology 167: 1009-1017.

Sigler, W.V. and Turco, R.F. (2002) The impact of chlorothalonil application on soil bacterial and fungal populations as assessed by denaturing gradient gel electrophoresis. Applied Soil Ecology *21*(2): 107-118.

Tanha, S. R., Ghasemnezhad, A. and Babaeizad, V. (2014) A study on the effect of endophyte fungus, *Piriformospora indica*, on the yield and phytochemical changes of globe artichoke (*Cynara scolymus* L.) leaves under water stress. International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research 2: 1907-1921.

Vadassery, J., Tripathi, S., Prasad, R., Varma, A. and Oelmuller, R. (2009) Monodehydroascorbate reductase 2 and dehydroascorbate reductase 5 are crucial for a mutualistic interaction between *Piriformospora indica* and *Arabidopsis*. Journal of Plant Physiology 166: 1263-1274.

Varma, A., Sativa, S., Sahay, N., Butehorn, B. and Franken, P. (1998) *Piriformospora indica*, a cultivable plant growth-promoting root endophyte. Applied and Environmental Microbiology 65: 2741-2744.

Varma, A., Bakshi, M., Lou, B., Hartmann, A. and Oelmueller, R. (2012) *Piriformospora indica*: A novel plant growth-promoting mycorrhizal fungus. Agricultural Research 1: 117-131.

Wani, P. A. and Omozele, A. B. (2015) Cr (VI) removal by indigenous Klebsiella species PB6 isolated from contaminated soil under the influence of various factors. Current Research in Bacteriology 8: 62.

Wu, D., Cardenas, L. M., Calvet, S., Bruggemann, N., Loick, N., Liu, S. and Bol, R. (2017) The effect of nitrification inhibitor on N_2O, NO and N_2 emissions under different soil moisture levels in a permanent grassland soil. Soil Biology and Biochemistry 113: 153-160.

Yadav, I. C., Devi, N. L., Syed, J. H., Cheng, Z., Li, J., Zhang, G. and Jones, K. C. (2015) Current status of persistent organic pesticides residues in air, water, and soil, and their possible effect on neighboring countries: A comprehensive review of India. Science of the Total Environment 511: 123-137.

Yang, M., Fang, Y., Sun, D. and Shi, Y. (2016) Efficiency of two nitrification inhibitors (dicyandiamide and 3, 4-dimethypyrazole phosphate) on soil nitrogen transformations and plant productivity: A meta-analysis Science 6: 1-10.

Yu, Q., Ma, J., Zou, P., Lin, H., Sun,W., Yin, J. and Fu, J. (2015) Effects of combined application of organic and inorganic fertilizers plus nitrification inhibitor DMPP on nitrogen runoff loss in vegetable soils. Environmental Science and Pollution Research 22: 472-481.

Yu, X. Z., Wu, S. C., Wu, F. Y. and Wong, M. H. (2011) Enhanced dissipation of PAHs from soil using mycorrhizal ryegrass and PAH-degrading bacteria. Journal of Hazardous Materials 186: 1206-1217.

Zerulla, W., Barth, T., Dressel, J., Erhardt, K., Horchler von Locquenghien, K., Pasda, G., Radle, M. and Wissemeier, A. H. (2001) 3, 4-Dimethylpyrazole phosphate (DMPP) – a new nitrification inhibitor for agriculture and horticulture. An introduction. Biology and Fertility of Soils 34: 79-84.

Zhou, X., Zhou, J. and Xiang, X. (2013) Impact of four plant species and arbuscular mycorrhizal (AM) fungi on polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) dissipation in spiked soil. Polish Journal of Environmental Studies 22: 1239-1245.

Zlatev, Z. and Yordanov, T. (2004) Effect of soil drought on photosynthesis and chlorophyll fluorescence in bean plants. Biology and Fertility of Soils 30: 3-18.

Zlatev, Z. (2009) Drought-induced changes in chlorophyll fluorescence of young wheat plants. Biotechnology and Biotechnological Equipment 23: 438-441.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-04-03]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.53.2.0]

Effect of symbiotic fungi on biomass, chlorophyll fluorescence and nitrate accumulation in lettuce (Lactuca sativa) under dicyandiamide stress

Rasoul Azarmi *[1], Akbar Padash [1], Ali Ashraf Soltani toularoud [2], Behrooz Esmailpour [1]

[1] Department of Horticulture, Mohaghegh Ardabili University, Ardabil, Iran
[2] Department of Soil Science, Mohaghegh Ardabili University, Ardabil, Iran
(Received: 21/02/2022, Accepted: 26/07/2022)

Abstract

The application of dicyandiamide (DCD) nitrification inhibitors in soil has caused soil contamination for many years and has received much attention in recent decades due to its potential toxic effects on plants, but no action has been taken to control and eliminate contamination of nitrification inhibitors. In this study, DCD nitrification inhibitor at 4 concentrations (0, 5, 50 and 100 mg / kg) was added to the soil in a pot experiment with four replications. Greenhouse experiment was performed using factorial based on a completely randomized design to test the effect of symbiotic fungi (plants inoculated with *P. indica*, *G. etunicatum* and *G. mosseae*) on DCD plant toxicity. Lettuce (Lactuca sativa) cultivar Black was selected for this experiment because of its worldwide economic value. Then, some properties of chlorophyll fluorescence such as minimum fluorescence (F0), maximum fluorescence (Fm) as well as maximum quantum efficiency of photosystem II (Fv / Fm) were measured. HPLC results showed that the concentration of DCD nitrification inhibitor in lettuce leaves was very important. It was found that plants inoculated with symbiotic fungi had lower DCD levels than non-symbiotic plants. Plants treated with *P. indica* had 70 and 80% less DCD (50 and 100 mg / kg, respectively) compared to the other plants.

Keywords: Dicyanidamide nitrification inhibitor (DCD), Symbiotic fungi, Lettuce, Fluorescence chlorophyll

Corresponding author, Email: r_azarmi@uma.ac.ir

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-04-03]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.53.2.0]