

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

رسول آذر می\*<sup>۱</sup>، اکبر پاداش<sup>۱</sup>، علی اشرف سلطانی طولارود<sup>۲</sup> و بهروز اسماعیل پور<sup>۱</sup>

<sup>۱</sup> گروه علوم باغبانی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

<sup>۲</sup> گروه علوم خاکشناسی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

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

### چکیده

کاربرد بازدارنده‌های نیتروفیکاسیون دی‌سیان دی‌آمید (DCD) در خاک طی سالیان متوالی باعث آلودگی خاک می‌شود و به دلیل اثرات سمی احتمالی آنها بر گیاه در دهه‌های اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته است، اما هیچ اقدامی برای کنترل و رفع آلودگی بازدارنده‌های نیتروفیکاسیون انجام نشده است. در این تحقیق، بازدارنده نیتروفیکاسیون 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 تلقیح شده با *P. indica*، *G. etunicatum* و *G. mosseae*) بر روی سمیت گیاهی DCD انجام شد. گیاه کاهو (*Lactuca sativa*) رقم سیاهو به دلیل ارزش اقتصادی در سراسر جهان برای این آزمایش انتخاب شد. سپس برخی از خصوصیات فلورسانس کلروفیل مانند فلورسانس حداقل ( $F_0$ )، فلورسانس حداکثر ( $F_m$ ) و حداکثر کارایی کوانتومی فتوسیستم II ( $F_v/F_m$ ) اندازه‌گیری شد. نتایج HPLC غلظت بازدارنده نیتروفیکاسیون DCD در برگ کاهو بسیار مهم بود. مشخص شد که گیاهان تلقیح شده با قارچ‌های همزیست در مقایسه با گیاهان غیرهمزیست سطوح DCD کمتری داشتند. گیاهان تیمار شده با *P. indica* دارای ۷۰ و ۸۰ درصد DCD کمتر (به ترتیب ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) در مقایسه با گیاهان غیره همزیست بودند.

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

### مقدمه

باکترهای نیتروفیکاتور، موجب کنترل نیترات در خاک می‌گردد. باکتری‌های اکسیدکننده آمونیوم طی فرایند نیتروفیکاسیون آمونیوم را به نیتريت، سپس نیتريت توسط باکتری‌های نیتريت کننده به فرم نیترات تبدیل می‌شود (Bock and Wagner, 2006; Rodrigues et al., 2018). نیترات حاصل از فرایند نیتروفیکاسیون بسیار سریع شسته شده و از دسترس گیاه خارج می‌گردد. بنابراین برای جلوگیری از هدررفت نیتروژن،

امروزه برای کنترل تلفات نیتروژن خاک‌های کشاورزی از بازدارنده‌های نیتروفیکاسیون استفاده می‌شود. تلفات نیتروژن از خاک عمدتاً به صورت شستشو، تبخیر آمونیاک و انتشار اکسیدهای نیتروژن از دسترس گیاه خارج می‌شود که این تلفات موجب آلودگی محیط زیست می‌شود (Hatzenpichler, 2012). نیتروفیکاسیون فرآیند مهمی در خاک است که توسط

\*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: r\_azarmi@uma.ac.ir

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 فنانترون 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 نیتروفیکاسیون 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

بازدارنده‌های نیتروفیکاسیون به کودهای نیتروژنه اضافه می‌شود که فرآیند میکروبی نیتروفیکاسیون را مختل می‌کنند. این مواد شامل مهارکننده‌های اوره‌از بوده که از هیدرولیز اوره و از اکسیداسیون  $\text{NH}_4^+$  به  $\text{NO}_2^-$  به تأخیر می‌اندازند (Ruser and Schulz, 2015). بازدارنده‌های نیتروفیکاسیون مورد استفاده شامل: (2-chloro-6-(trichloromethyl)-pyridin)، 3,4-Dimethylpyrazole و dicyandiamide (DCD) phosphate (DMPP) است. بازدارنده‌های نیتروفیکاسیون علاوه بر مزایا، دارای معایبی نیز هستند. به‌عنوان مثال Yang و همکاران (۲۰۱۶) گزارش نمودند که بازدارنده‌های نیتروفیکاسیون می‌توانند بر فعالیت سایر موجودات زنده نیز اثرات منفی داشته باشند. سمیت بازدارنده‌های نیتروفیکاسیون از قبیل سمیت DMPP در گیاه شبدر (Rodrigues *et al.*, 2018) و DCD در گیاه کاهو انجام شده است (Zerulla *et al.*, 2001). همکاران 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 نیتروفیکاسیون می‌گردد، می‌تواند بر سایر باکتری‌ها نیز اثر منفی داشته باشد (باکتری‌های هتروتوفیک هوازی و اکسیدکننده متان) (Li *et al.*, 2020). بنابراین تعدیل اثرات سمی بازدارنده‌های نیتروژن‌سازی 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).

نهایت از رنگ تریپان بلو ۲۰ درصد از قبل گرم شده به مدت پنج دقیقه استفاده شد، و درصد کلونیزاسیون ریشه با استفاده از خطوط متقاطع و رابطه زیر اندازه‌گیری شد.

$$\times 100 = \frac{\text{تعداد نقاط دارای همزیستی قارچی}}{\text{تعداد کل نقاط}} = \text{درصد کلونیزاسیون}$$

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 به مدت 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 طول موج 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 به مدت 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 به دست آمده با ۰/۲ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک ۰/۶۶ مولار اسیدی شد و به مدت ۳۰ دقیقه قبل از سانتریفیوژ کردن (۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت 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 ۰/۲۵ مولار H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> با سرعت جریان ۰/۶ میلی‌لیتر در دقیقه و یک آشکارساز اسپکتروفتومتری فرابنفش ۲۱۰ نانومتری (UV) تعیین شد.

به منظور 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

نیتروژن کل، ۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم فسفر، ۳۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم پتاسیم، ۷/۳ pH و ۱/۳ EC dS/m مشخص شد. سپس پودر DCD (سیگما آلدریج) 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) به صورت همگن با خاک مخلوط شد.

بذر کاهو (*Lactuca sativa* cv. Siyadoo) از مؤسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج، ایران (SPII) تهیه و در سینی‌های حاوی پیت‌ماس کاشته شد. هنگامی که دانه‌ها 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 Käfer, 2001). پلیت‌ها به مدت 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. etunicatum* و *G. mosseae*) 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 به همراه ریشه‌ها از بستر خاک خارج شدند. با استفاده از آب و توری تمام ریشه‌های ریز جمع شدند و ساقه‌ها و ریشه‌ها با آب مقطر 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 به مدت 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

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

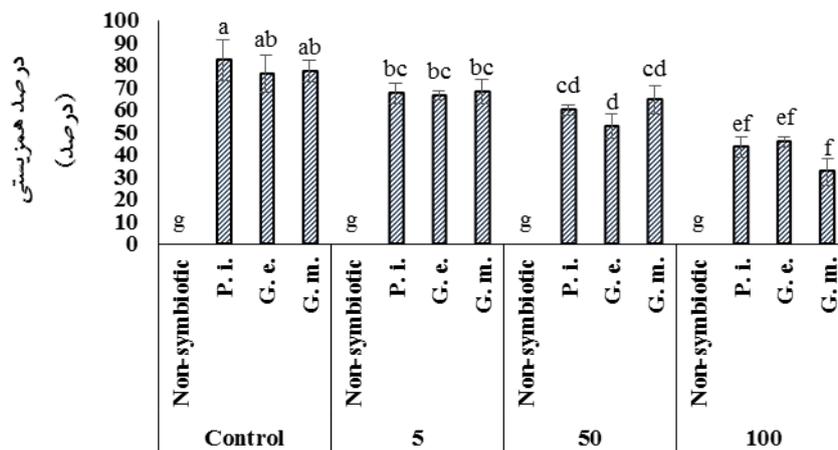
۳-۱- درصد همزیستی، وزن خشک اندام هوایی و ریشه، غلظت DCD در برگ: تجزیه واریانس تأثیر بازدارنده نیتروفیکاسیون DCD و قارچ‌های همزیست بر درصد همزیستی، غلظت DCD در برگ و مقدار وزن خشک اندام هوایی و ریشه در گیاه کاهو (جدول ۱) نشان داد که اثر متقابل بازدارنده نیتروفیکاسیون DCD و قارچ‌های همزیست بر شاخص‌های درصد همزیستی، غلظت DCD برگ در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بودند و بر مقدار وزن خشک اندام هوایی و نسبت وزن خشک اندام هوایی به ریشه در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بودند. 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 نیتروفیکاسیون DCD بر درصد کلونیزاسیون ریشه گیاه کاهو تحت تیمار قارچ‌های همزیست (شکل ۱) نشان داد که شاخص درصد همزیستی قارچ *G. etunicatum*، *P. indica* و *G. mousa* تحت تیمار غلظت‌های بازدارنده نیتروفیکاسیون DCD معنی‌دار بود ( $P < 0.01$ ). نتایج حاصل از تأثیر بازدارنده نیتروفیکاسیون 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 نیتروفیکاسیون DCD کاهش یافت، بطوری‌که کمترین درصد همزیستی در ریشه گیاه کاهو مربوط به تیمار قارچ *G. etunicatum* تحت غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک، بازدارنده نیتروفیکاسیون DCD بود. در ریشه گیاهان تحت تیمار با قارچ *P. indica* در غلظت‌های ۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم DCD، درصد همزیستی به ترتیب ۲۲، ۳۷ و ۹۷ درصد کمتر از ریشه گیاهان عدم استفاده از بازدارنده نیتروفیکاسیون DCD بود. همچنین درصد همزیستی ریشه گیاهان تلقیح‌شده با قارچ *G. etunicatum* در غلظت‌های ۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم DCD به ترتیب ۱۵، ۴۴ و ۶۶ درصد کمتر از گیاهان بدون بازدارنده نیتروفیکاسیون DCD بود. درصد ریشه‌های کلونیزه شده با قارچ *G. mosseae* تحت غلظت‌های ۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم DCD به ترتیب ۱۳، ۲۰ و ۱۳۹ درصد 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 روشن کردن 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 میکروارگانیزم‌های نیتروژن‌ساز خاک را سرکوب کرده و میزان نیترات خاک را کاهش دهد (Florio et al., 2016). در نتیجه استفاده از بازدارنده‌های نیتروفیکاسیون 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 نیتروفیکاسیون زیاد بر جمعیت قارچ‌ها تأثیر نمی‌گذارند چون بازدارنده‌های نیتروفیکاسیون با از بین بردن باکتری‌های نیترات‌سازی موجب تحریک و افزایش قارچ‌های خاک می‌گردند. همچنین برخی بازدارنده‌های نیتروفیکاسیون دارای کربن و نیتروژن هستند که موجب افزایش جمعیت قارچ‌های خاک می‌گردد (Yu et al.,

جدول ۱- تجزیه واریانس تأثیر بازدارنده نیتریفیکاسیون DCD و قارچ‌های همزیست بر شاخص‌های درصد همزیستی، غلظت DCD در برگ، غلظت نترات 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
DCD	۳	۱۶۷۰/۸**	۱۲۴/۰۷۷**	۰/۳۵۰**	۱۲/۵۵۷**
قارچ همزیست	۳	۱۱۹۱۱/۶**	۱۱۴/۴۷۸**	۱/۰۲۵**	۷/۱۱۱**
DCD × قارچ	۹	۲۹۹/۷**	۶/۶۳۳*	۰/۰۱۳ <sup>ns</sup>	۲/۵۴۷*
خطا	۳۲	۳۲/۸	۲/۷۳۲	۰/۰۱۳	۱/۶۲۵
ضریب تغییرات		۸/۲	۱۱/۰۴	۸	۸/۷



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

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

(۲۰۱۱) انجام گرفت مشاهده گردید که افزایش  $NH_4^+$  در خاک موجب تورم میتوکندری و ترک خوردگی سلول‌های ریشه گیاه می‌گردد که به دنبال 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 در نتیجه موجب افزایش  $NH_4^+$  در خاک می‌شود (Ruser and Schulz, 2015). پس با توجه به

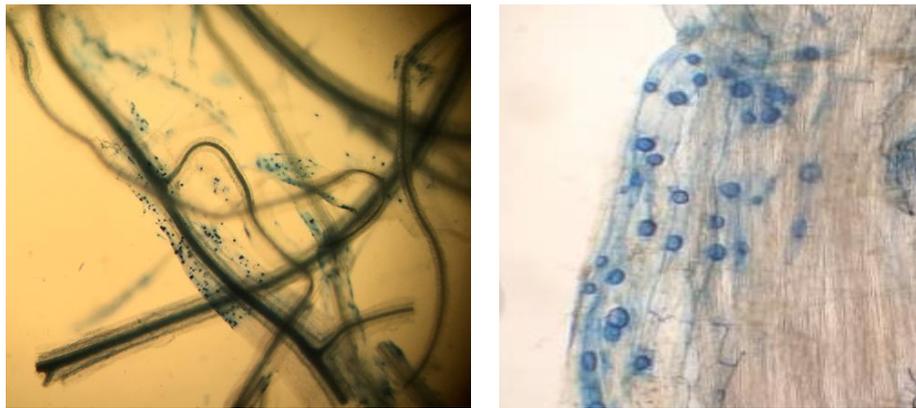
(2015). البته در تحقیقی دیگر که توسط Maienza و همکاران (۲۰۱۴) انجام شد، به این نتیجه رسیدند که بازدارنده‌های نیتریفیکاسیون می‌توانند اثرات نامطلوبی بر قارچ‌های مفید و غیرمفید خاک داشته باشند. آنها بیان نمودند که کاربرد بازدارنده نیتریفیکاسیون DMPP همراه با کود گاوی موجب می‌شود که جمعیت میکروبی خاک زیاد تحت تأثیر بازدارنده نیتریفیکاسیون قرار نگیرد و جمعیت قارچ تحت تیمار بازدارنده DMPP کاهش شدیدی داشت. دلیل اینکه بازدارنده‌های نیتریفیکاسیون چگونه درصد همزیستی ریشه را کاهش می‌دهند معلوم نیست ولی در تحقیقی که توسط Marschner

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 در نتیجه 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 برگگی و سوختگی حاشیه برگ‌ها می‌شود و به شدت بیوماس گیاه را تحت تأثیر قرار گذاشت و کاهش داد.

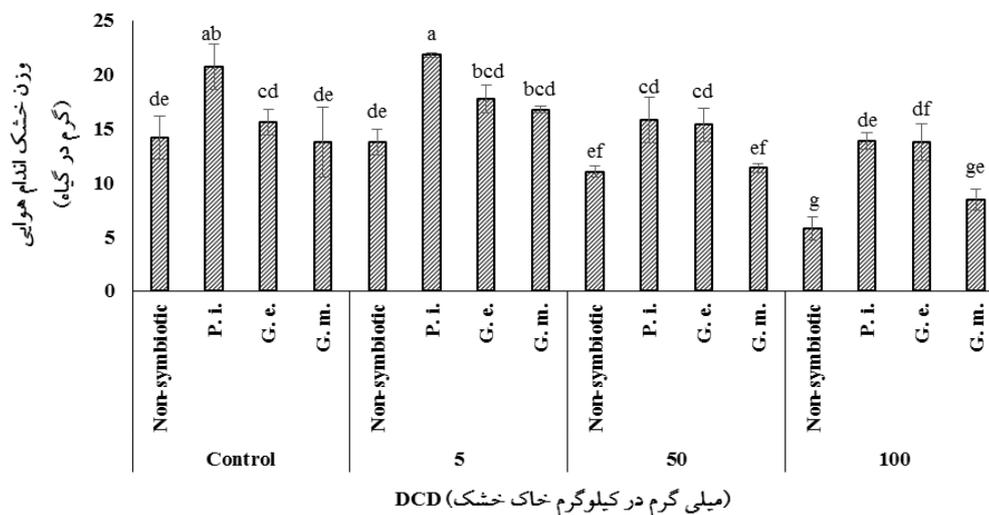
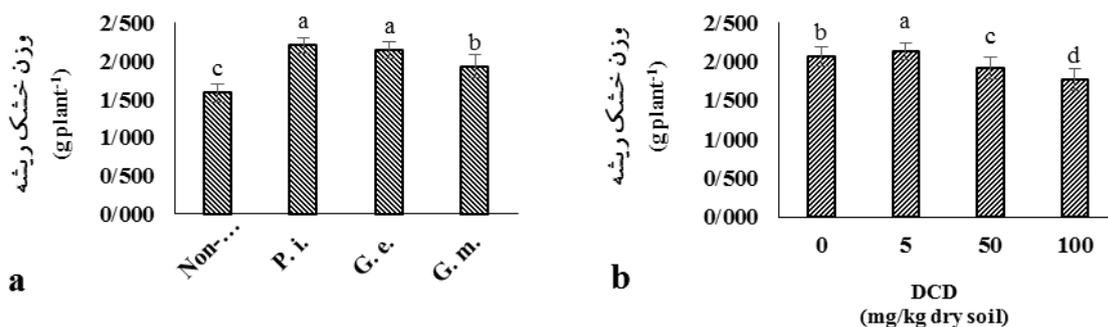
**وزن خشک ریشه:** نتایج حاصل از تأثیر قارچ‌های همزیست (شکل a ۴) و بازدارنده نیتریفیکاسیون DCD (شکل b ۴) در گیاه کاهو، نشان داد که بیشترین وزن خشک ریشه مربوط به قارچ *P. indica* (شکل a ۴) و غلظت ۵ میلی‌گرم DCD بود (شکل b ۴). در حالت کلی گیاهانی که با قارچ‌های همزیست تیمار شده بودند نسبت به گیاهان غیرهمزیست، کارایی ریشه بهتری داشتند. جذب بازدارنده نیتریفیکاسیون 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 در نهایت 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 میکوریزیایی تحت بازدارنده نیتریفیکاسیون DCD بسیار بیشتر از گیاهان غیرهمزیست بود.

نتایج آزمایش‌های گذشته و آزمایش حاضر، احتمالاً دلیل یکی از دلایل کاهش درصد همزیستی سمیت ناشی از  $\text{NH}_4^+$  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  $\text{NH}_4^+$  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 میسلومی 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

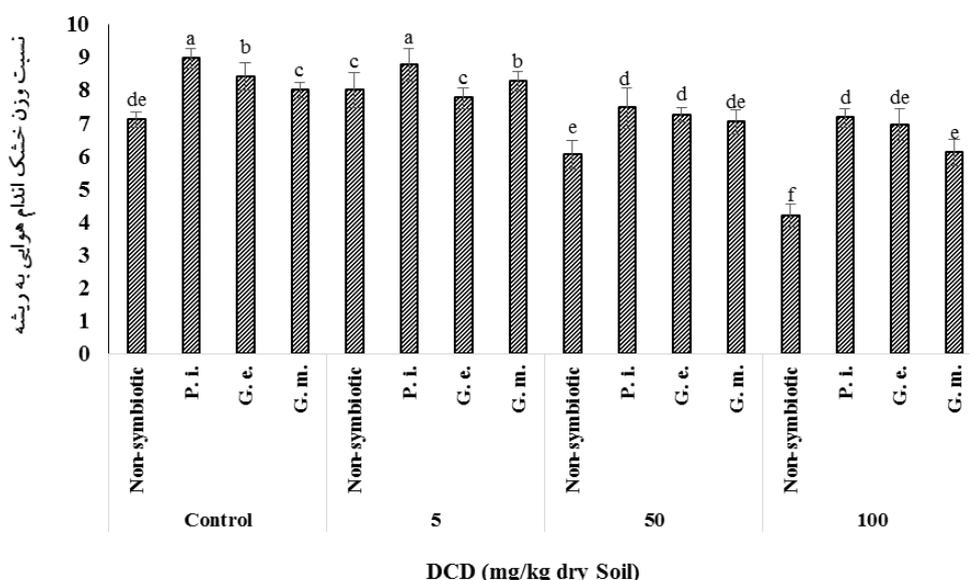


شکل ۲- همزیستی قارچ پیریفورموسپورا ایندیکا باریشه کاهو

شکل ۳. تأثیر غلظت‌های مختلف DCD بر شاخص وزن خشکاندام هوایی گیاه کاهو تحت تیمار قارچ‌های *Piriformospora indica* (P. i) و *G. mosseae* (G. m) و *G. etunicatum* (G. e)شکل ۴- اثرات اصلی قارچ همزیست تیمار قارچ‌های *Piriformospora indica* (P. i) و *G. mosseae* (G. m) و *G. etunicatum* (G. e) (a) و DCD (b) بر شاخص وزن خشک ریشه گیاه کاهو

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

موجودات ذره‌بینی از جمله قارچ‌های میکوریز برای رشد ریشه گیاهان بسیار مفید هستند (Evelin and Kapoor, 2014; Arora and Sharma et al., 2017). همکاران (۲۰۲۰) گزارش



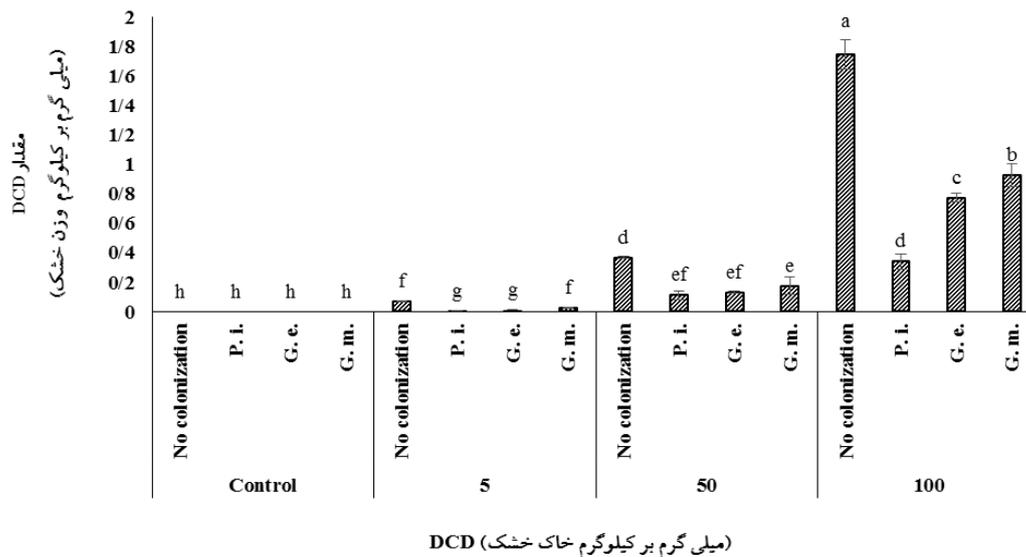
شکل ۵- تأثیر غلظت‌های مختلف DCD بر شاخص نسبت وزن خشک اندام هوایی به ریشه در گیاه کاهو تحت تیمار قارچ‌های همزیست *G. mosseae* (*G. m.*) و *G. etunicatum* (*G. e.*)، *Piriformospora indica* (*P. i.*)

شد که غلظت DCD موجود در برگ گیاهان تحت تیمار با قارچ *P. indica* در غلظت‌های ۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم DCD، به ترتیب 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، به ترتیب ۸۲، ۵۴ و ۶۲ درصد کمتر از گیاهان بدون همزیستی بود. مقدار بازدارنده نیتروفیکاسیون DCD در برگ گیاهان همزیست‌شده با قارچ *G. mosseae* تحت غلظت‌های ۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم DCD، به ترتیب 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 نیتروفیکاسیون 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

همزیست و بازدارنده نیتروفیکاسیون DCD آورده شده است.

نسبت وزن خشک اندام هوایی به ریشه: مقایسه میانگین تأثیر متقابل DCD و قارچ‌های همزیست 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 اندازه‌گیری 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 نیتروفیکاسیون DCD در گیاه کاهو (شکل ۶) کاملاً مشخص



DCD (میلی گرم بر کیلوگرم خاک خشک)

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

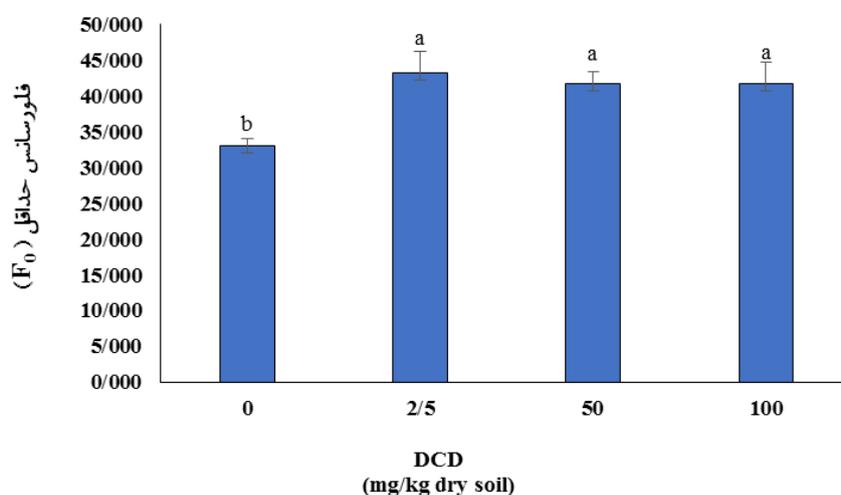
گیاه *Medicago sativa* با استفاده از قارچ‌های میکوریز انجام گرفت، نشان داد که گیاهان دارای همزیستی میکوریزی دارای مقدار کمتری PAH نسبت به گیاهان غیرهمزیست بودند (Zhou *et al.*, 2013). قارچ‌های میکوریز با برقراری شبکه بزرگ مسیلیومی آلاینده‌ها را جذب و تثبیت کرده و مانع از انتقال بیشتر آلاینده‌ها به اندام 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 نترات برگ:** نتایج تجزیه واریانس تأثیر بازدارنده نیتروفیکاسیون DCD و قارچ‌های همزیست بر مقدار فلورسانس کلروفیل و غلظت نترات (جدول ۲) نشان داد که اثرات متقابل تیمارها (DCD × قارچ) بر فلورسانس حداقل (F<sub>0</sub>)، فلورسانس حداکثر (F<sub>m</sub>) و حداکثر کارایی کوانتومی فتوسیستم II (F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>) در سطح احتمال یک درصد و بر غلظت نترات برگ در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود (جدول ۲).

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, 2011). 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 نیتروفیکاسیون 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  $0.9 \text{ g.kg}^{-1}$  و در گیاهان غیرهمزیست  $1.2 \text{ g.kg}^{-1}$  بود. همچنین Aranda و همکاران (۲۰۱۹) گزارش نمودند که استفاده از قارچ میکوریز *Rhizoglossum 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)

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

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		Fv/Fm	Fm	F <sub>0</sub>
DCD	۳	۰/۰۴**	۳۶۵۸۰**	۲۴۵**
قارچ همزیست	۳	۰/۰۲**	۱۹۴۶۷/۶**	۴۷/۸**
DCD × قارچ	۹	۰/۰۰۵**	۴۷۴۲/۱**	۸۱/۶**
خطا	۳۲	۰/۰۰۱	۱۶۷۲/۵	۵۴/۸
ضریب تغییرات		۰/۶۸	۹/۲	۷/۸



شکل ۷- تأثیر غلظت‌های مختلف DCD بر شاخص فلورسانس حداقل (F<sub>0</sub>)

مقدار F<sub>0</sub> می‌شود، مانند تنش خشکی در گیاه ذرت (Darvish et al., 2010) و تنش سرمایی در کاهو (Roosta and Sajjadinia, 2010). تاکنون مطالعاتی در خصوص تأثیر بازدارنده‌های نیتروفیکاسیون بر فلورسانس کلروفیل صورت نگرفته است ولی با استناد بر اینکه تنش موجب افزایش F<sub>0</sub> در گیاه می‌گردد می‌توان چنین برداشت کرد افزایش F<sub>0</sub> در غلظت‌های بالای DCD، این است که DCD ممکن است به دلیل تنش ایجاد شده در گیاه کاهو و تولید بیشتر پراکسید هیدروژن باشد.

**فلورسانس حداکثر (F<sub>m</sub>):** اثر متقابل غلظت‌های مختلف DCD و قارچ‌های همزیست بر شاخص F<sub>m</sub> (جدول ۳) نشان داد که بیشترین مقدار F<sub>m</sub> مربوط به گیاهان تیمار شده با

**فلورسانس حداقل (F<sub>0</sub>):** مقایسه میانگین اثر اصلی بازدارنده نیتروفیکاسیون DCD بر مقدار F<sub>0</sub> (شکل ۷) نشان داد که گیاهان شاهد دارای کمترین مقدار F<sub>0</sub> نسبت به غلظت‌های بالاتر DCD بودند. هر چند بین غلظت‌های ۵، ۵۰ و ۱۰۰ بازدارنده نیتروفیکاسیون DCD اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ولی هر سه غلظت موجب افزایش F<sub>0</sub> به میزان ۲۰ درصد نسبت به گیاه شاهد شدند. افزایش در مقدار F<sub>0</sub> نشان از آسیب به زنجیره انتقال الکترون فتوسیستم II در اثر کاهش ظرفیت کوئینون آ (QA) و عدم اکسیداسیون کامل آن به دلیل 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

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

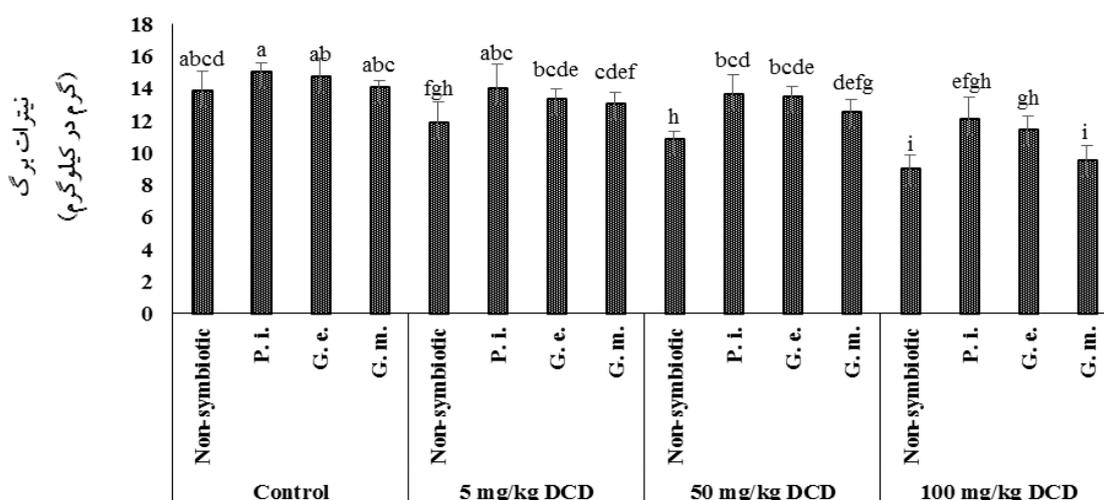
پارامتر		تیمار	DCD
Fv/Fm	Fm	قارچ همزیست	(میلی‌گرم در کیلوگرم خاک)
۰/۸۰۱ <sup>cde</sup>	۲۲۸/۳ <sup>cde</sup>		شاهد
۰/۹۲۷ <sup>a</sup>	۳۴۳/۲ <sup>a</sup>	+ P.i	
۰/۹۱۰ <sup>ab</sup>	۳۲۶/۲ <sup>a</sup>	+ G.e	
۰/۷۷۸ <sup>cdefg</sup>	۱۸۶/۳ <sup>cdef</sup>	+ G.m	
۰/۸۱۵ <sup>cde</sup>	۲۵۲/۸ <sup>bc</sup>		۵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

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

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 می‌کند (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

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 به وسیله 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



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

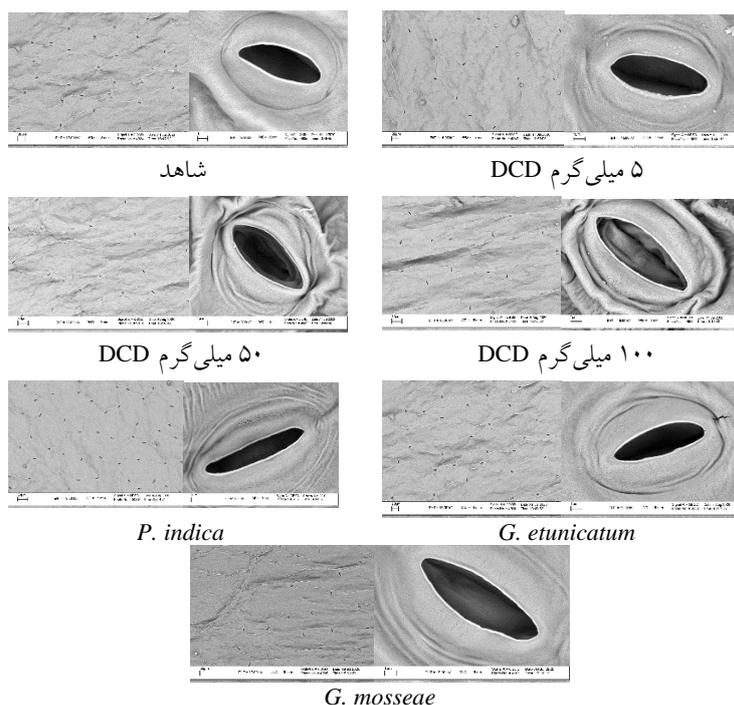
گردید (شکل ۸). مطالعات گسترده‌ای در زمینه کاهش جذب نیترات به وسیله بازدارنده‌های نیتروفیکاسیون انجام شده است به‌عنوان مثال کاربرد بازدارنده‌های نیتروفیکاسیون موجب کاهش نیترات در گیاه چاودار (Fangueiro *et al.*, 2009)، مرکبات (Martinez *et al.*, 2015) و توت‌فرنگی (Serna *et al.*, 2000) شده است. همچنین گزارش نموده‌اند که گیاه میل زیادی به جذب آمونیوم نسبت به نیترات دارد (Martinez *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 نیتروفیکاسیون 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

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 نیتروفیکاسیون DCD بودند. Fv/Fm حداکثر کارایی کوانتومی فتوسیستم II است که بطور کلی 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). به نظر می‌رسد که تنش ناشی از بازدارنده نیتروفیکاسیون استفاده شده در آزمایش موجب کاهش مقدار Fv/Fm شده باشد. و از طرفی قارچ‌های همزیست که به‌عنوان الیستور عمل کرده و باعث ایجاد مقاومت در گیاه در برابر تنش ایجاد شده توسط بازدارنده نیتروفیکاسیون 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



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)

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  $\text{N}_2\text{O}$  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

DCD حالت چروکیدگی 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، بسته شدن 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 رادیکال‌های آزاد محسوب می‌شود و در توسعه گیاه، عملکردهای مختلف فیزیولوژیکی و فرآیندهای جذب مواد مغذی نقش دارد و همچنین گزارش شده است که

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.

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 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

#### 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., Abidin, 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.

- 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., Saggarr, 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<sub>2</sub> 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 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 SIHAK10 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.
- Martinez, 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 Saggarr, 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 and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment 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.

- Ruser, S. (2015) The effect of nitrification inhibitors on the nitrous oxide (N<sub>2</sub>O) 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 Oelmuller, 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<sub>2</sub>O, NO and N<sub>2</sub> 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-dimethylpyrazole 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.

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

Rasoul Azarmi \*<sup>1</sup>, Akbar Padash <sup>1</sup>, Ali Ashraf Soltani toularoud <sup>2</sup>, Behrooz Esmailpour <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Horticulture, Mohaghegh Ardabili University, Ardabil, Iran

<sup>2</sup> 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 (F<sub>0</sub>), maximum fluorescence (F<sub>m</sub>) as well as maximum quantum efficiency of photosystem II (F<sub>v</sub> / F<sub>m</sub>) 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