بررسی میزان تجمع نیترات در کاهو (*Lactuca sativa*) تحت تیمار قارچ تریکودرما

حسین آروئی[۱*]، مهدی بابایی[۲]، لادن آژدانیان[۲]، شهاب آهوئی[۳]، حسین نعمتی[٤]

[۱] دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران

[۲] دانشجو دکتری علوم باغبانی، اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهان باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران

[۳] دانشجو دکتری علوم باغبانی، فیزیولوژی سبزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران

[۴] استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران

[*]نویسنده مسئول: *aroiee@um.ac.ir*

چکیده

در بین میکروارگانیزم‌های شناخته‌شده که معمولاً به‌منظور حفظ سلامت عمومی گیاه بکار می‌روند، گونه‌های قارچ تریکودرما[۱] از اهمیت زیادی برخوردارند. بدین منظور برای بررسی اثر این میکروارگانیسم بر میزان تجمع نیترات در سبزی کاهو و میزان تغییرات در محتوی کلروفیل این گیاه، آزمایشی در قالب طرح کامل تصادفی با آرایش فاکتوریل (۲×۴) در ۶ تکرار انجام شد پایه‌ریزی شد. از دو رقم سیاهو و گرید لیک استفاده شد که با چهار غلظت صفر، ۵، ۱۰ و۱۵ درصد عصاره تریکودرما تیمار شدند. نتایج آزمون نشان داد که سطوح مختلف عصاره این قارچ اثـرات متفـاوتی بر پارامترهای ذکرشده بر روی گیـاه کاهو داشته است. در بین سطوح مختلف مورداستفاده، سطح غلظت ۵ درصد بیشترین میزان تجمع نیترات را شامل شد و اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد با سایر سطوح داشت، همچنین این سطح میزان کلروفیل بالاتری نسبت به سایر سطوح داشت اما تفاوت معنی‌دار نبود. رقم سیاهو نسبت به گریدلیک هم تجمع نیترات بیشتری نشان داد و هم میزان کلروفیل b,a بیشتری و این اختلاف در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار شد. نتایج پژوهش نشان می‌دهد که نوع گیاه و نوع و مقدار متابولیت‌های ثانوی ترشح‌شده توسـط جدایه‌ها و گونه‌های مختلف تریکودرمـا می‌تواند در میـزان اثـرات رشـدی آن‌هـا در تعامـل گیـاه–تریکودرما تأثیرگذار باشد.

واژه‌های کلیدی: تجمع نیترات، سیاهو، کلروفیل، متابولیت ثانویه

مقدمه

مقدار نیترات یکی از فاکتورهای مهم در تعیین کیفیت سبزی‌ها است. تجمع نیترات که بیشتر در آوندها، دمبرگ‌ها و برگ‌ها صورت می‌گیرد می‌تواند تأثیر نامطلوبی در سلامتی انسان داشته باشد. در مدیریت سیستم‌های هیدروپونیک لازم است از یک‌سو تغذیه نیتروژنی مناسب گیاه انجام شود تا دستیابی به عملکردهای بالا امکان‌پذیر باشد و از سوی دیگر می‌باید تلاش شود تا از تلفات این عنصر که سبب آلودگی محیط‌زیست و از دست رفتن سرمایه می‌گردد، جلوگیری شود. استفاده از ترکیباتی که بتوانند عناصر غذایی را به‌صورت مخزنی نگه‌داشته و به‌تدریج در اختیار گیاه قرار دهند یکی از مهم‌ترین کارهایی است که می‌توان برای گیاهانی مانند کاهو که تجمع نیترات در آن بسیار بالا است، مفید باشد (Kristkova *et al*.,2008). امروزه به دلیل استفاده بیش‌ازحد کودهای شیمیایی حاوی ازت برای تسریع رشد رویشی، بسیاری از سبزی‌ها مخصوصاً سبزی‌های برگی دارای درصد بالایی نیترات هستند که در بسیاری از موارد از استانداردهای تعیین‌شده بیشتر است. البته نیترات (NO_3) خودش یک ماده سمی برای انسان محسوب نمی‌شود ولی نیتریت (NO_2) حاصل از احیاء آن می‌تواند با آمین‌ها ترکیب‌شده و تشکیل نیتروزآمین را بدهد که یک ماده سرطان‌زا برای بدن محسوب می‌شود. برخی اوقات هنگام نگهداری سبزی‌ها در انبار و یا انجام عملیات بر روی آنها نیترات تبدیل به نیتریت شده و در افرادی که با غذاهای حاوی نیتریت تغذیه می‌شوند خطر ابتلا به مت هموگلوبینا وجود دارد (Bai *et al*.,2020) همچنین در سبزی‌های کنسرو شده مقدار زیاد نیترات در چند ماه در انبار باعث آزاد شدن قلع از آنها می‌شود (Tei *et al*.,2020). کاهو یکی از سبزی‌ها برگی است که تولید و مصرف نسبتاً بالایی در ایران دارد و بیشتر به‌صورت تازه خوری مصرف می‌شود به همین دلیل میزان تجمع نیترات در این محصول از اهمیت زیادی برخوردار است. بنابراین در این تحقیق سعی شد تا اثر یک میکروارگانیسم مهم مانند تریکودرما را در دو رقم کاهو موردبررسی قرار دهیم.

[1]- Trichoderma

مواد و روش‌ها

جدایه موردنظر از گروه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی که شامل TBi بود تهیه گردید؛ و درون محیط کشت سیب‌زمینی دکستروآگار[1] و در پتری دیش‌هایی به قطر ۱۰ سانتی‌متر در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در آون به مدت ۵ روز نگهداری شد. به‌منظور تهیه عصاره قارچ‌ها از محیط کشت انتخابی داوه (Windham *et a*l.,1986) استفاده شد. بذر دو رقم کاهو به نام‌های گرید لیک (Gredleke) و سیاهو (Siahoo) در سینی‌های نشاء کاشته شد و نشاءها پس از ۴۰ روز آماده انتقال به بستر اصلی شدند. گلدان‌های دهنه ۳۰ سانت به‌وسیله ۲۰ درصد کوکوپیت و ۸۰ درصد پرلایت پر شد که ریشه‌ها در این بستر به‌راحتی قابل جداسازی باشد. گلدان‌ها در زیرسیستم چیده شدند و انتقال نشاء صورت گرفت. ۵ منبع مورداستفاده قرار گرفت به منبع A، هیچ عصاره‌ای اضافه نشد و به‌عنوان شاهد بود، به منبع B، پنج درصد حجم منبع به منبع C، ۱۰ درصد حجم منبع به منبع D، ۱۵ درصد حجم منبع عصاره اضافه شد. مابقی حجم منبع‌ها به‌وسیله محلول غذایی هوگلند پر شد. همچنین منبع E، از آهن و کلسیم پر شد و در زمان جداگانه وارد سیستم شد. در روزهای اولیه به مدت ۱۰ روز تنها آب خالص به بوته‌ها داده شد پس از اطمینان از استقرار کامل بوته‌ها در روزهای ابتدایی به ازای هر بوته ۸۰ میلی‌لیتر و در روزهای بعدی با توجه به دما و نور نیاز آبی و غذایی بوته تأمین گردید. واکنش محلول۲، توسط سود۳ و اسیدکلریدریک۴ حدود ۶/۵ تنظیم گردید. شرایط به‌گونه‌ای کنترل شد تا همانند کشت‌های تجاری تغذیه صورت گیرد. تجمع نیترات به روش دی آزو اندازه‌گیری شد بدین ترتیب که پس از خشک شدن نمونه‌ها و پودر کردن آنها (۲۰۰ مش) از هر نمونه ۰/۲ گرم توزین و ۲۰ سی‌سی اسید استیک ۲ درصد به آنها اضافه شد بعد از تهیه محلول، نمونه‌ها را به مدت ۲۰ دقیقه تکان داده تا محلول یکنواخت و عصاره نیترات به دست آید. برای اندازه‌گیری مقدار نیترات توسط دستگاه اسپکتروفتومتر، دستگاه بر روی طول‌موج ۵۴۰ نانومتر تنظیم‌شده و نمونه‌ها یک‌بار بدون معرف نیترات و بار دوم پس از اضافه نمودن معرف نیترات اندازه‌گیری شدند سپس اختلاف این دو عدد را به دست آورده و آن را در معادله‌ای که از منحنی استاندارد عبور نور از محلول نیترات سدیم در غلظت‌های مختلف (۱۲۰،۱۰۰،۸۰،۶۰،۴۰،۲۰ پی پی ام) به‌دست‌آمده بود، قرار داده و به‌این‌ترتیب میزان نیترات هر یک از سبزی‌ها تعیین گردید. کلروفیل a و b به روش لیشتن تالر و ول بورن با استفاده از متانول از بافت برگ استخراج شد. سپس با استفاده از دستگاه طیف‌سنج (اسپکتروفتومتر) در طول‌موج‌های ۶۶۶ و ۶۵۳ نانومتر، قرائت شد و میزان کلروفیل a وb با استفاده از فرمول مربوطه اندازه‌گیری شد. تجزیه‌وتحلیل داده‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار JMP8 صورت گرفت و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال ۱ و ۵٪ انجام شد.

نتایج و بحث

تجزیه‌وتحلیل داده‌های به‌دست‌آمده از این آزمون نشان داد که قارچ تریکودرما اثرات رشدی متفاوتی را بر روی میزان کلروفیل و میزان تجمع نیترات گیاه کاهو می‌گذارد. بر اساس نتایج تجزیه واریانس جدول (۱) اثر متقابل غلظت × رقم بر میزان تجمع نیترات در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود. اثر رقم بر میزان کلروفیل b,a در سطح احتمال ۵ درصد بود. اثر غلظت و اثر متقابل غلظت × رقم بر میزان کلروفیل معنی‌دار نبود.

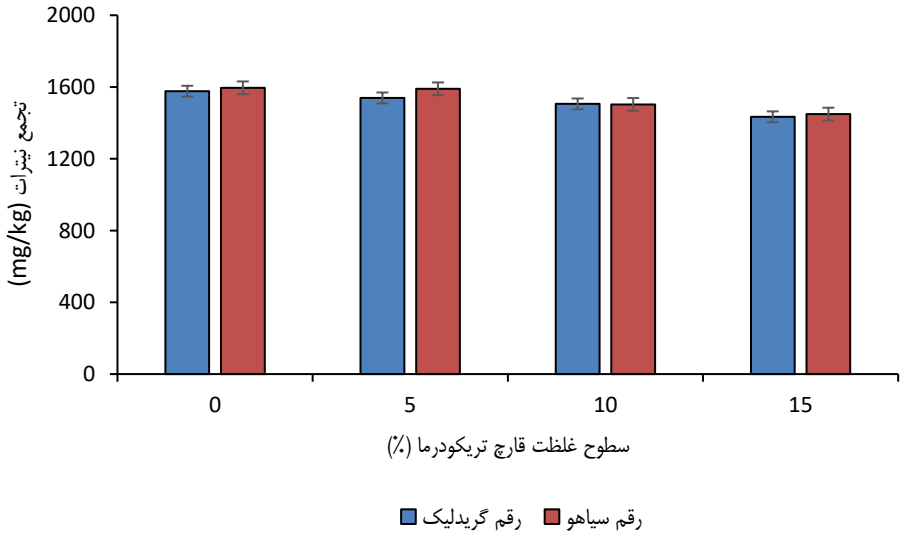
[1]- PDA
[2]- PH
[3]- KOH
[4]- HCL

جدول ۱- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) اثر قارچ تریکودرما در سطوح صفر، ۵،۱۰ و ۱۵ درصد بر کلروفیل و تجمع نیترات رقم‌های گریدلیک و سیاهو کاهو

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		کلروفیل a	کلروفیل b	تجمع نیترات (NO_3)
غلظت	۳	۰/۱۵۱^{ns}	۰/۵۱۷۶^{ns}	۱۵۳۷۷**
رقم	۱	۴/۳۲۰*	۰/۳۷۸۱*	۳۷۰۶۵۷**
غلظت * رقم	۳	۲/۳۵۱^{ns}	۲/۱۲۶۶^{ns}	۳۸۹۶**
خطای آزمایش	۳۵	۱/۷۳۲	۰/۵۲۲۲	۳۱۰

^{ns} عدم وجود اختلاف معنی‌دار،*معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد،** معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که غلظت ۱۵ درصد جدایه TBi کمترین میزان تجمع نیترات نسبت به شاهد و سایر تیمارها در رقم گریدلیک را داشت که برخلاف آن در رقم سیاهو در تیمار شاهد، بیشترین میزان تجمع نیترات را داشتیم که نسبت به سایر تیمارها حدود ۸۰ درصد افزایش را شاهد بودیم (شکل ۱).



شکل۱- اثر متقابل غلظت‌های متفاوت قارچ تریکودرما و دو نوع رقم بر میزان تجمع نیترات

جدول ۲- مقایسه میانگین تأثیر سطوح مختلف از جدایه Bi قارچ *Trichoderma harzianom* بر کلروفیل و نیترات دو رقم کاهو

صفات اندازه‌گیری شده	سطوح غلظت (٪)			
	۰	۵	۱۰	۱۵
کلروفیل a $(\mu g/mg)$	۵/۰۸b	۵/۵۹a	۵/۴۸a	۵/۴۱a
کلروفیل b $(\mu g/mg)$	۲/۱۲b	۲/۵۷a	۲/۴۹a	۲/۳۷a

اعداد دارای حروف غیرمشابه در هر ردیف دارای اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد با آزمون چند دامنه‌ای دانکن هستند.

بر اساس نتایج جدول ۳ رقم سیاهو هم در تجمع نیترات و هم در میزان کلروفیل b,a نسبت به رقم گرید لیک افزایش نشان داد و در سطح احتمال ۵ در صد معنی‌دار بود.

جدول ۳- مقایسه میانگین اثرات نوع رقم بر میزان کلروفیل و نیترات دو رقم کاهو

صفات اندازه‌گیری شده	رقم	
	گریدلیک	سیاهو
کلروفیل a ($\mu g/mg$)	۵/۱۵[b]	۵/۸۴[a]
کلروفیل b ($\mu g/mg$)	۲/۰۴[b]	۲/۶۷[a]

*اعداد دارای حروف غیرمشابه در هر ردیف دارای اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد با آزمون چند دامنه‌ای دانکن هستند.

به‌طورکلی نتایج این آزمون نشان داد که جدایه TBi تریکودرما هارزیانوم تغییراتی در میزان تجمع نیترات بر روی کاهو به وجود می آورد دارد (شکل ۱). دلایل مستقیم و غیرمستقیم می‌توان برای این تغییرات غلظت نیترات بیان کرد، نور کم، دمای بالا و تنش‌های رطوبتی منجر به کاهش فعالیت آنزیم احیاء کننده نیترات و تجمع بیشتر نیترات می‌شود تراکم کاشت نیز در تجمع نیترات تأثیر بسزایی دارد به‌طور مثال هر چه تراکم کاشت بالا در نظر گرفته شود به دلیل شدت نور کمتر، نیترات بیشتری در اندام‌ها تجمع می‌یابد (Zhang *et al*.,2020). بر همین اساس در این آزمایش تیمار ۵ درصد عصاره که در میزان تجمع نیترات و کلروفیل نسبت به سایر تیمارها افزایش نشان داده با توجه به اهمیت تراکم کاشت و شدت نور دریافتی توسط برگ‌های کاهو برای عدم تجمع نیترات می‌شود می‌توان این‌گونه متصور شد که عصاره قارچ با افزایش حجم کاهو در این غلظت سبب کاهش نور دریافتی توسط برگ‌های کاهو شده است درنتیجه اثری غیرمستقیم بر تجمع نیترات گذاشته است. نتایج پژوهش‌ها نشان می‌دهد که نوع گیاه و نوع و مقدار متابولیت‌های ثانوی ترشح‌شده توسط‌جدایه‌ها و گونه‌های مختلف تریکودرما می‌تواند در میزان اثرات رشدی آن‌ها در تعامل گیاه–تریکودرما تأثیرگذار باشد (۱۸). از سوی دیگر در تفسیر مکانیسم عمل عوامل تحریک‌کننده رشد گیاهی بسیاری از محققان بر این باورند که به‌طور عمده جدایه‌های مختلف قارچ Trichoderma spp.با تولید مواد بیوشیمیایی باعث تحریک رشد گیاهان می‌شوند و یا باعث کاهش اثرات ممانعت از رشد برخی ترکیبات، توکسین‌های زیستی و شیمیایی موجود در خاک و حتی تغییر در میزان عناصر محلول در خاک می‌شوند (Vinale *et al*.,2004; Vinale *et al*.,2008). ترشح اسیدهای آلی هم‌چون گلوکونیک اسید، اسید سیتریک و فوماریک اسید توسط گونه‌های تریکودرما باعث کاهش pHخاک و درنهایت افزایش حلالیت و جذب ریزمغذی‌های مهم موردنیاز برای رشد گیاه هم‌چون آهن، منگنز، منیزیم، کاتیون‌های معدنی و فسفات‌ها می‌شود (Barton *et al*.,2006). با توجه به این موارد اثر مستقیم عصاره می‌تواند به علت وجود موادی در عصاره باشد که سبب جذب بهتر و بیشتر نیترات می‌گردد. ثابت‌شده از مهم‌ترین متابولیت‌های تولیدشده توسط ۶-pentyl-α-pyrone .T. hrzianum است که به‌عنوان محرک رشد گیاهی در غلظت‌های پایین شناخته‌شده است. باعث ممانعت در. در این‌جا دو فرضیه مطرح شد که این ترکیب به‌عنوان یک ترکیب شبه‌اکسین عمل می‌کند یا در تولید این شبه اکسین ها نقش دارد (Cutler *et al*.,1986). می‌تواند عدم تجمع نیترات و کاهش کلروفیل در تیمارهای سطوح غلظت ۱۰ و ۱۵ درصد را وجود همین ترکیبات شبه اکسینی دانست که از رشد گیاه جلوگیری کرده است زیرا اکسین در غلظت‌های پایین‌تر باعث رشد و در غلظت‌های بیش‌تر باعث ممانعت رشد در اندام‌های مختلف گیاه می‌شود.

منابع

Bai, X., et al. 2020. Strategies to mitigate nitrate leaching in vegetable production in China: a meta-analysis. Environmental Science and Pollution Research: 1-10.

Barton, L., & Colmer, T. D. 2006. Irrigation and fertiliser strategies for minimising nitrogen leaching from turfgrass. *Agricultural Water Management*, *80*(1-3), 160-175.

Cutler, H. G., Cox, R. H., Crumley, F. G., & Cole, P. D. (1986). 6-Pentyl-α-pyrone from Trichoderma harzianum: its plant growth inhibitory and antimicrobial properties. *Agricultural and Biological Chemistry*, *50*(11), 2943-2945.

Kristkova, E., Dolezalova, I., Lebeda, A., Vinter, V., & Novotná, A. 2008. Description of morphological characters of lettuce (*Lactuca sativa* L.) genetic resources. *Hortic Sci*, *35*(3), 113-129.

Tei, F., et al. 2020. Nitrogen management of vegetable crops. Agricultural Water Management 240: 106316.

Vinale, F., Ambrosio, G. D., Abadi, K., Scala, F., Marra, R., Turrà, D., Lorito, M. 2004. Application of Trichoderma harzianum (T22) and Trichoderma atroviride (P1) as plant growth promoters, and their compatibility with copper oxychloride... Zhejiang Univ., *30*(4), 425-425.

Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L., & Lorito, M. (2008). Trichoderma–plant–pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry*, *40*(1), 1-10.

Windham, M. T., Elad, Y. and Baker, R. 1986. A mechanism for increased plant growth induced by Trichoderma spp. Phytopathology, 76: 518-552.

Zhang, W., et al. 2020. Enrichment of hydrogen-oxidizing bacteria with nitrate recovery as biofertilizers in the mixed culture. Bioresource Technology 313: 123645.

Evaluation of nitrate accumulation in *Lactuca sativa* treated with Trichoderma

H. Aroiee[1 *], M. Babaei[2],L. Ajdanian[2], Sh.Ahooi[3], H. Nemati[4]

1. Associate Professor, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad;Iran,
2. PhD student in Horticulture, Breeding and biotechnology of horticultural plants, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran
3. PhD Student in Horticulture, Vegetable Physiology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran
4. Assistant Professor, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran

[*]Corresponding Author: aroiee@um.ac.ir

Abstract

Among the known microorganisms that are commonly used to maintain the general health of the plant, Trichoderma species are of great importance. For this purpose, to investigate the effect of this microorganism on the amount of nitrate accumulation in lettuce and the amount of changes in the chlorophyll content of this plant, an experiment was conducted in a completely randomized design with the factorial arrangement (2×4) in 6 replications. Two cultivars, Siahoo and Gredleke, were used and treated with four concentrations of 0, 5, 10 and 15 valleys of Trichoderma extract. The results showed that different levels of the extract of this fungus were based on the parameters mentioned on lettuce. At different levels used, the concentration level of 5% had the highest nitrate accumulation and had a significant difference in the probability level of 5% with other levels. Also, this level had a higher chlorophyll content than other levels, but the difference was not significant. Siahoo cultivar showed more nitrate accumulation and higher chlorophyll b, a, and chloride content than Gredleke, and this difference was significant at 1% probability level. The results show that the type of plant and the type and amount of secondary metabolites secreted by different isolates and species of Trichoderma can affect their growth effects in the interaction of Trichoderma.

***Keywords*:** Accumulation of nitrate, Chlorophyll, Secondary metabolites, Siahoo