مقاله پژوهشی

نشریه علمی تحقیقات جنگل و صنوبر ایران
جلد ۳۰ شماره ۳، صفحه ۲۲۳-۲۱۱، (۱۴۰۱)

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijfpr.2022.360008.2068
شناسه دیجیتال (DOR): 20.1001.1.17350883.1401.30.3.1.9

جداسازی و شناسایی قارچ *Paxillus involutus* (Boletales: Paxillaceae) به‌عنوان همزیست اکتومیکوریزایی صنوبر و تأثیر آن بر تنش خشکی در کبوده (*Populus alba* L.)

نرگس سپاسی [۱]، عبدالحسین طاهری [۲*]، سیده‌معصومه زمانی [۳]، مهدی جهانی [۴] و محمدابراهیم فراشیانی [۳]

۱- دانشجوی دکتری بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

۲*- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه بیماری‌شناسی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

پست الکترونیک: a.taheri@gau.ac.ir

۳- استادیار، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

۴- دانشیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۶/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۱۶

چکیده

کم‌آبی و روند افزایش گرما در سال‌های اخیر، محدودیت‌هایی را برای کشت و پرورش صنوبر ایجاد کرده‌اند. قارچ‌های اکتومیکوریز، نقش مؤثری در افزایش تحمل گیاهان در مواجهه با تنش‌های آبی، شوری و دفاع در برابر آفات و بیماری‌ها دارند. در پژوهش پیش‌رو، جداسازی و شناسایی ریخت‌شناختی و مولکولی قارچ‌های اکتومیکوریز از رویشگاه‌های صنوبر استان گیلان (شفارود، گیسوم و صفرابسته) انجام گرفت. براساس این اطلاعات، قارچ اکتومیکوریز *Paxillus involutus* به‌عنوان همزیست صنوبر شناسایی و معرفی شد. از میسلیوم این قارچ برای تلقیح به گیاهچه‌های کبوده (*Populus alba* L.) در شرایط گلخانه و بررسی تأثیر آن بر پارامترهای رشدی گیاه در شرایط تنش خشکی و آبیاری استفاده شد. نتایج نشان داد که برقراری ارتباط همزیستی بین گیاهچه‌های کبوده و *P. involutus* موفقیت‌آمیز است. به‌طوری‌که صفات رشدی شامل وزن تر و خشک ریشه، وزن تر و خشک ساقه، وزن تر برگ، سطح برگ و ارتفاع ساقه در گیاهچه‌های تلقیح‌شده با این قارچ همزیست نسبت به گیاهچه‌های تیمار شاهد به‌طور معنی‌داری بیشتر بودند ($P<۰/۰۱$). همچنین، *P. involutus* با کاهش اثرات منفی تنش خشکی بر کبوده سبب افزایش توان تحمل گیاهچه‌های میکوریزی شد. براساس این یافته‌ها، وجود سیستم هماهنگ قارچ- گیاه می‌تواند نقش مؤثری در بهبود عملکرد درختان کبوده در شرایط تنش خشکی ایفا کند.

واژه‌های کلیدی: تلقیح، صنوبر، گیاهچه، همزیستی اکتومیکوریزایی.

مقدمه

همزیستی اکتومیکوریزایی، ارتباط سازمان‌یافته‌ای بین ریشه برخی گیاهان آوندی با قارچ‌های اختصاصی خاک است. قارچ‌های اکتومیکوریز (ECM) همزیست‌های اجباری درختان آوندی مانند صنوبر هستند (Smith & Read, 2008). اگرچه تعداد کمی از گونه‌های گیاهی قادر به برقراری همزیستی اکتومیکوریزایی هستند (حدود ۲۰۰۰ گونه)، اما غالبیت آن‌ها در بوم‌سازگان‌های جنگلی و نیز ارزش اقتصادی قابل‌توجه آن‌ها، این همزیستی را در مرکز توجه و اهمیت قرار داده است. برآوردها نشان می‌دهند که

حدود ۲۰۰۰ تا ۲۵۰۰ گونه ECM در طبیعت وجود دارند و گیاهان میزبان به‌وسیله گونه‌های مختلفی از این قارچ‌ها کلونیزه می‌شوند (Smith & Read, 2008). از دیرباز، اهمیت ECM در افزایش تولید گیاهان زراعی و حفظ بوم‌سازگان‌های جنگلی شناخته شده است. در جنگل‌های معتدله، اغلب درختان، همزیستی اکتومیکوریزایی تشکیل می‌دهند. ECMها با افزایش جذب عناصر غذایی و رشد گیاه در تکمیل چرخه غذایی کارآمد نقش دارند، ساختار خاک را با شبکه‌های میسلیومی تثبیت می‌کنند و تحمل گیاه را در برابر تنش خشکی و آلودگی خاک افزایش می‌دهند (Schützendübel & Polle, 2002). به‌طوری‌که توانایی جذب آب در ریشه‌ها و مقدار آب در شاخ‌وبرگ نهال‌های صنوبر تلقیح‌شده با ECM بیشتر از گیاهان فاقد همزیستی است (Landhäusser *et al*., 2002).

صنوبر (*Populus*) به‌عنوان یک جنس درختی تندرشد، به‌طور گسترده‌ای برای تولید چوب، خمیر کاغذ و مصارف صنعتی دیگر کاربرد دارد. این جنس با تعداد گونه‌های بسیار متنوع در شرایط متفاوت بوم‌شناختی خشک تا مرطوب رویش دارد (Yousefi & Modir Rahmati, 2018). در شرایط طبیعی، درختان صنوبر با طیف وسیعی از قارچ‌ها، ارتباط همزیستی اکتومیکوریزایی (غالب) و میکوریزای آربوسکولار برقرار می‌کنند. بااین‌وجود، گزارش‌های اندکی از برقراری همزیستی اکتومیکوریزایی صنوبر در شرایط آزمایشگاهی وجود دارد (Loewe *et al*., 2000). قارچ‌های جنس *Paxillus* (Basidiomycota: Boletales: Paxillaceae) از گروه قارچ‌های غیرخوراکی سمی هستند. تاکنون، ۳۸ گونه در جنس *Paxillus* شناسایی شده‌اند (Kirk, 2019). در بین این گونه‌ها، کامل‌ترین پژوهش‌ها ازنظر مولکولی، ریخت‌شناختی و بوم‌شناختی درمورد *P. involutus* انجام شده‌اند. گزارش‌های زیادی مبنی‌بر اینکه *P. involutus* یک کمپلکس قارچی متشکل از چهار گونه قارچی است، منتشر شده‌اند. این گونه‌ها شامل *P. ammoniavirescens*، *P. obscurisporus*، *P. involutus* و گونه چهارمی که تاکنون شناسایی نشده است، هستند (Vellinga *et al*., 2012; Jargeat *et al*., 2014). *P. involutus* به‌دلیل مواد غذایی غیراختصاصی مورد نیازش برای رشد، قادر به برقراری ارتباط همزیستی با بسیاری از گونه‌های درختی بازدانگان و نهان‌دانگان مانند کاج، صنوبر و بید است (Taylor *et al*., 2000). دامنه میزبانی گسترده و سهولت نسبی کشت این قارچ سبب استفاده فراوان از این گونه در پژوهش‌های همزیستی اکتومیکوریزایی شده است. همچنین، این قارچ به‌دلیل رشد مناسب در محیط کشت اختصاصی، پتانسیل استفاده تجاری را نیز دارد (Cripps & Miller, 1995).

نظر به محدودیت سطح جنگل‌های طبیعی ایران، توان تولیدی کم در رویشگاه‌های جنگلی و نیاز روزافزون به ماده اولیه چوب، کشت و توسعه درختان تندرشد می‌تواند بخش قابل‌ملاحظه‌ای از نیازهای صنایع چوب کشور را تأمین کند (Zamani *et al*., 2020). در سال‌های اخیر باتوجه‌به روند افزایش گرما و خشکی در کشور، کشت و پرورش نهال‌های صنوبر که بیشتر در زمین‌های مرطوب رشد می‌کنند، با مشکلاتی مواجه شده است. نقش مؤثر ECM بر افزایش تحمل نهال‌های صنوبر تلقیح‌شده با این قارچ‌ها در مواجهه با تنش خشکی در پژوهش‌های زیادی تأیید شده است (Landhäusser *et al*., 2002; Wu *et al*., 2007). اهداف پژوهش پیش‌رو شامل شناسایی و معرفی قارچ *P. involutus* به‌عنوان همزیست اکتومیکوریز درختان سپیدار یا کبوده (*Populus alba* L.)، توسعه تجربی ابزارهایی برای آنالیزهای فیزیولوژیکی و مولکولی قارچ مذکور و استفاده کارآمد از آن برای برقراری همزیستی با گیاهان جنگلی هستند.

مواد و روش‌ها

منطقه مورد مطالعه

سه رویشگاه‌های مورد مطالعه در پژوهش پیش‌رو شامل جنگل‌های صنوبر صفرابسته، شفارود و گیسوم در استان گیلان بودند. ایستگاه تحقیقات صفرابسته در پنج کیلومتری شهرستان آستانه اشرفیه در مختصات ۴۹۵۵ طول شرقی و

۳۷۱۷ عرض شمالی و در ارتفاع ۱۰- متر از سطح دریاهای آزاد قرار دارد. جنگل گیسوم با وسعت ۱۷۱ هکتار واقع در ۱۴ کیلومتری شهرستان رضوانشهر و در مختصات بین ۴۹۰۰ تا ۴۹۱۰ طول شرقی و ۳۷۳۷ تا ۳۷۴۰ عرض شمالی قرار گرفته است. میانگین سالانه دما و بارندگی در این منطقه حدود ۱۳/۷ درجه سانتی‌گراد و ۱۳۶۵/۸ میلی‌متر هستند. ارتفاع از سطح دریا در مناطق بازبینی‌شده در جنگل گیسوم بین ۶- تا ۱۴ متر از سطح دریا متغیر بود. صنوبرکاری‌های شرکت جنگل شفارود واقع در غرب گیلان در حوضه جنگل‌داری رضوان‌شهر در ارتفاع بین ۴۰ تا ۷۰ متر از سطح دریا قرار دارد. این منطقه که تقریباً مسطح است در مختصات ″۵۰ ′۴ °۴۹ تا ″۴۹ ′۲۵ °۵۰ طول شرقی و ″۳۰ ′۳۴ °۳۷ تا ″۵۰ ′۵۴ °۳۷ عرض شمالی قرار دارد. میانگین سالانه درجه‌حرارت و بارندگی در این منطقه به‌ترتیب حدود ۱۶ درجه سانتی‌گراد و ۱۰۳۴ میلی‌متر هستند.

روش پژوهش

نمونه‌برداری و آماده‌سازی

در اطراف جنگل‌های صنوبر در سه رویشگاه مورد مطالعه طی فصل‌های بهار و پاییز سال ۱۴۰۰ از اندام‌های باردهی قارچ‌های رویش‌یافته در کنار درختان صنوبر (*P. deltoides* و *P. euroamericana*) نمونه‌برداری شد. همچنین، نمونه‌برداری از خاک همراه با ریشه درختان مذکور به‌منظور بررسی حضور قارچ‌های اکتومیکوریز میکروسکوپی روی ریشه صورت گرفت. از هرکدام از سه رویشگاه مورد مطالعه، حداقل ۱۵ نمونه خاک همراه با ریشه از درختان سالم صنوبر با حفظ فاصله ۵۰ متری از یکدیگر و از عمق ۳۰ سانتی‌متری منطقه ریشه‌گاه (Rhizosphere) پایه‌ها جمع‌آوری شدند و در شرایط خنک به آزمایشگاه منتقل شدند. در آزمایشگاه پس از شستشوی ریشه‌ها، ده قطعه ده سانتی‌متری ریشه از هر نمونه به‌منظور بررسی‌های میکروسکوپی انتخاب شدند. در هر نمونه ریشه براساس مشاهده‌های میکروسکوپی، نوک ریشه‌های اکتومیکوریزایی که ویژگی‌های ریخت‌شناختی مشابه مانند رنگ مانتل، خصوصیات سطح مانتل و نحوه انشعاب داشتند، به مورفوتایپ‌های مشخص تقسیم شدند. سپس، نوک ریشه‌هایی که براساس منابع ذکرشده با قارچ *P. involutus* مشابهت داشتند، جدا شدند و درون میکروتیوب‌های استریل و در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

شناسایی ریخت‌شناسی قارچ

مشخصات ماکروسکوپی قارچ براساس مشخصات بازیدیوم تازه در عرصه طبیعی بررسی شد. بافت‌های بازیدیوم این نمونه‌ها پس از قرارگیری در محلول KOH 5% حل شدند. سپس، مشخصات میکروسکوپی آن‌ها مانند اندازه (طول و عرض) و رنگ اسپور، عناصر هیمنیال و ساختار بازیدیوم در محلول KOH و Congo red مقایسه و بررسی شدند (Gelardi *et al.*, 2011). علی‌رغم شناسایی ریخت‌شناختی اسپوروکارپ قارچ، به‌منظور بررسی مولکولی و استفاده قارچ در مراحل بعدی، کشت قارچ در محیط آزمایشگاهی انجام گرفت. بدین‌منظور از قسمت درونی بافت Gill (زیرپوسته) قطعه‌های کوچکی انتخاب شدند. این قطعه‌ها، درون محیط MNM (Melin Norkans Medium) در تاریکی و در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد به‌مدت سه هفته قرار گرفتند.

استخراج DNA و انجام واکنش PCR

استخراج DNA از میسلیوم قارچی رویش‌یافته در محیط MNM و توسط پروتکل بهینه‌سازی‌شده CTAB انجام گرفت (Gardes & Bruns, 1993). به‌منظور انجام واکنش زنجیره پلیمراز و تکثیر ناحیه ITS1-5.8S-ITS2 از DNA ریبوزومی قارچ‌های اکتومیکوریز، آغازگرهای ITS1F و ITS4B (Gardes & Bruns, 1993) که توسط شرکت تکاپوزیست سنتز شدند، به‌کار گرفته شد. مواد مورد استفاده و حجم‌های به‌کاررفته از این مواد در واکنش زنجیره پلیمراز براساس روش Gardes و Bruns (۱۹۹۳) تنظیم شد. محصولات نهایی PCR به‌منظور تعیین توالی

نوکلئوتیدی به شرکت پیشگام ارسال شدند.

توالی‌یابی و آنالیز فیلوژنتیکی

توالی‌یابی محصول PCR با روش SAanger توسط شرکت پیشگام انجام شد. توالی باند خالص به‌دست‌آمده توسط الگوریتم بلاست (BLAST) با توالی‌های نوکلئوتیدی پایگاه داده GenBank مقایسه شد. سپس، مقادیر e-Value و Sequence similarity برای نتیجه‌گیری در مورد بهترین تطابق بررسی شد. چینش و مرتب‌سازی مجموعه داده‌های ITS با استفاده از نرم‌افزار MAFFT v6.8 14b با برنامه پیش‌فرض حذف گپ‌ها انجام شد و سپس در نرم‌افزار MEGA7 ویرایش شد. تجزیه‌وتحلیل فیلوژنتیکی از طریق بیشینه احتمال (Maximum likelihood) تحت بوت استرپ کامل با ۲۵ اجرا و ۱۰۰۰ تکرار انجام شد (Tamura *et al*., 2011).

تکثیر گیاه‌چه‌های کبوده و تلقیح قارچ همزیست به آن

به‌منظور بررسی اثرات همزیستی قارچ *P. involutus* بر گیاه‌چه‌های کبوده از روش Otgonsuren و همکاران (۲۰۱۶) استفاده شد. پس از تهیه قلمه‌های ۲۰ سانتی‌متری از کبوده، آن‌ها در گلدان‌های حاوی خاک استریل کشت داده شدند. بستر کشت شامل یک قسمت پرلیت، شش قسمت خاک نرم، دو قسمت پیت و یک قسمت ماسه بود که پس از طی مراحل سترون‌سازی به گلدان‌های یک کیلویی منتقل شدند. دو ماه پس از کاشت قلمه‌ها، قارچ‌های تکثیریافته در محیط MNM با آن‌ها تلقیح داده شدند. به‌این‌صورت که پس از کنار زدن خاک اطراف ریشه‌های فرعی گیاه‌چه، پنج پلاگ قارچی حاوی میسلیوم در اطراف ریشه قرار داده شد. سپس، دوباره روی آن‌ها خاک ریخته شد. گیاه‌چه‌های شاهد، بدون تلقیح در نظر گرفته شد. یک ماه پس از مرحله اول تلقیح و اطمینان از استقرار قارچ روی ریشه گیاه‌چه‌های کبوده، سه گلدان از بین گلدان‌های تلقیح‌شده به‌منظور بررسی وجود همزیستی به آزمایشگاه منتقل شدند.

اعمال تنش خشکی و بررسی خصوصیات رشدی

به‌منظور بررسی نقش همزیستی اکتومیکوریزایی در مقاومت به تنش خشکی، نیمی از گیاهان تلقیح‌شده و نیمی از گیاهان تلقیح‌نشده (از هر تیمار ۱۰ گلدان) تحت تنش خشکی قرار گرفتند. دو هفته پس از اعمال تنش خشکی، خصوصیات رشدی گیاهان هر دو تیمار شامل وزن تر و خشک برگ، سطح برگ، وزن تر و خشک ساقه، قطر و ارتفاع ساقه اصلی و وزن تر و خشک ریشه اندازه‌گیری شدند. متغیرهای رشد مانند ارتفاع و قطر ساقه به‌وسیله خط‌کش با دقت میلی‌متر ارزیابی شدند. به‌منظور اندازه‌گیری وزن‌های خشک برگ، ساقه و ریشه، بافت‌های گیاه به‌مدت ۴۸ ساعت در آون و در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. برای اندازه‌گیری وزن آن‌ها از ترازو با دقت ۰/۰۰۱ گرم استفاده شد. سطح برگ‌ها توسط دستگاه Win Area و برنامه Win Dias 2.0 محاسبه شد.

نتایج

مشخصات ریخت‌شناختی

بررسی ریخت‌شناختی قارچ در محلول KOH 5% نشان داد که اسپورهای شفاف با متوسط اندازه ۷/۵ تا نه میکرومتر از نمای جانبی به‌شکل بیضی و از نمای صورت به‌شکل تخم‌مرغی و صاف با دیواره به‌نسبت ضخیم به رنگ زرد روشن، اغلب دارای یک قطره روغن مرکزی و به‌ندرت در زمان بلوغ، دارای دو یا سه قطره روغن هستند. رنگ کلنی در محیط کشت اختصاصی MNM، سبز مایل به قهوه‌ای با سرعت رشد محدود بود. به‌طوری‌که پس از گذشت دو هفته، قطر آن به ۵/۵ سانتی‌متر رسید. رنگ پشت کلنی، قهوه‌ای تیره بود که علت آن به ترشح رنگ‌دانه‌های موجود در قارچ برمی‌گردد. یکی از شاخصه‌های قارچ *P. involutus* نسبت به گونه‌های نزدیک به آن، تولید رنگ‌دانه‌های قهوه‌ای در محیط غنی از کربن و گلوکز، رشد محدودتر و

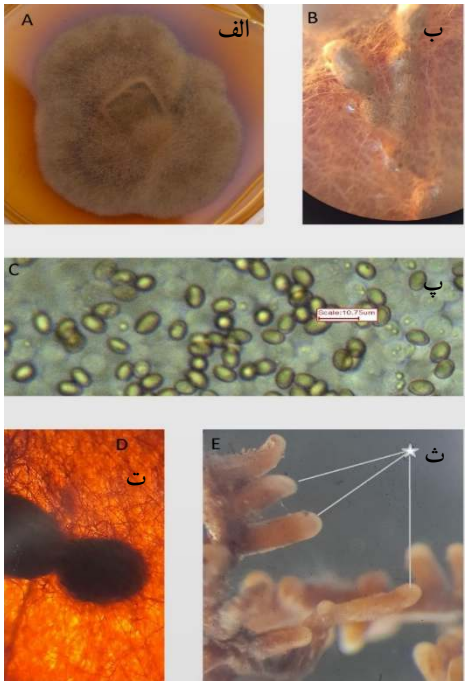
عدم تشکیل قطره‌های روغنی قهوه‌ای در کشت قدیمی است (Jargeat *et al*., 2014). کلامیدوسپور پس از دو ماه در سطح محیط کشت جامد MNM اصلاح‌شده مشاهده شد. تعداد و اندازه اسکلروت تشکیل‌شده، ارتباط مستقیم با دمای نگهداری دارد. به‌طوری‌که اگر میسلیوم‌های قارچ به‌مدت طولانی در دمای شش تا هشت درجه سانتی‌گراد قرار گیرند، تعداد زیادی اسکلروت با قطر کمتر از یک میلی‌متر تولید می‌کنند. درصورتی‌که با قرارگیری میسلیوم‌ها در دمای ۱۰ تا ۱۴ درجه سانتی‌گراد، تعداد اسکلروت‌های کمتر با قطر بیشتر از یک میلی‌متر در سطح محیط کشت تشکیل می‌شود (Moore & Peterson, 1992). گفتنی است که در محیط مایع MNM در دمای ۱۰ الی ۲۵ درجه سانتی‌گراد، اسکلروت تشکیل نشد (شکل ۱).

بازیدیوم به‌رنگ قهوه‌ای روشن، گوشتی و فسادپذیر، دارای قوس اتصال با فراوانی متوسط در منطقه صفرابسته استان گیلان وجود داشت. هیمنوفور به‌صورت ورقه‌ای با تیغه‌هایی کمانی‌شکل که به‌راحتی از بافت پیلئوس جدا می‌شدند، متراکم و تاحدودی پهن، دارای لبه یکنواخت تا موج‌دار و به‌رنگ بژ کم‌رنگ تا قهوه‌ای مشاهده شد. عرض پیلئوس بین هشت تا ۱۲ سانتی‌متر و به‌شکل محدب بودند که در نمونه‌های بالغ‌تر و مسن‌تر به‌فرم دیسکی تبدیل می‌شدند. حاشیه پیلئوس تاحدی تاخورده و سطح آن مات و خشک بود، اما در هوای مرطوب حالت چسبنده تا لزج داشت. کوتیکول به‌طورکامل قابل‌تفکیک و به‌رنگ سفید عاجی تا بژ روشن بود. در نمونه‌هایی که مربوط به مکان‌های خشک است، رنگ آن تا قهوه‌ای تغییر می‌کند. لایه زیر کوتیکولی کرم‌رنگ، بلافاصله پس از برخورد دست یا زخمی شدن، به‌رنگ قهوه‌ای تغییر رنگ می‌داد. ساقه به‌شکل شمع باریک، سفت و خشک، بدون ریشه، مرکزی تا کمی خارج از مرکز و استوانه‌ای بود یا به‌تدریج از رأس به‌سمت قاعده باریک می‌شد. سطح آن نیز صاف و به‌رنگ کرم تا بژ بود که در اثر فشار یا ضربه به رنگ قهوه‌ای درمی‌آید (Jargeat *et al*., 2014). بیشترین تعداد اندام باردهی قارچ در اوایل تابستان تا اوایل پاییز در رویشگاه‌های جنگلی با خاک‌های اسیدی مشاهده می‌شود (Walting & Hills, 2005).

توصیف نوک ریشه‌های میکوریزایی همزیست‌شده توسط قارچ *P. involutus* باتوجه‌به مشخصات ظاهری براساس بررسی مقاله‌های معتبر منتشرشده و مقایسه در وبگاه DEEMY (www.deemy.de) انجام شد: شکل نوک ریشه اغلب مستقیم و کوتاه و گاهی به‌صورت خمیده، استوانه‌ای و فاقد تورم است. گاهی قسمت انتهایی نوک ریشه به‌رنگ سفید و قسمت‌های قدیمی‌تر ساختار همزیستی، قهوه‌ای و قهوه‌ای مایل به زرد هستند. غلاف مانتل قابل‌رؤیت، غیرشفاف و متمایل به نقره‌ای است. هیف‌های خارج سلولی منشعب و قطر رایزومورف بین ۰/۱ تا ۰/۳ میلی‌متر با رنگ متمایل به قهوه‌ای نیز مشاهده می‌شوند (شکل ۱).

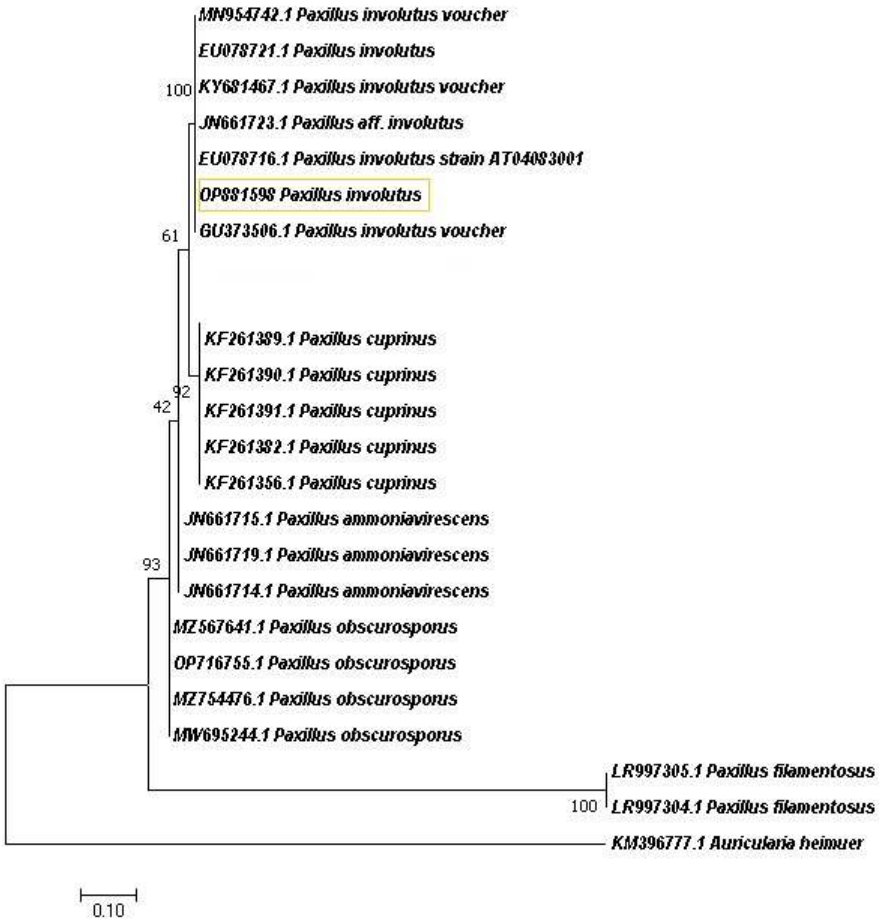
آنالیز مولکولی

بیشینه احتمال در ۲۴ نمونه که ۲۳ نمونه از داده‌های NCBI و مقاله‌های معتبر استخراج شده بود، انجام شد (Jargeat *et al*., 2014, Du *et al*., 2020). گونه OP881598 با جدایه‌های *P. involutus* مستخرج‌شده از منابع در یک کلاد قرار گرفتند (شکل ۲).



شکل ۱- الف) کلنی قارچ ***P. involutus*** روی محیط کشت **MNM** پس از گذشت سه هفته، ب) اسکلروت قارچ، پ) اسپورهای قارچ در بزرگ‌نمایی **40X**، ت) تصویر میکروسکوپی از اسکلروت قارچ و ث) نوک ریشه‌های همزیست‌شده با قارچ در درختان صنوبر در طبیعت

Figure 1. A) Colony of *P. involutus* on MNM medium after 3 weeks, B) Sclrotia, C) Spores at 40X magnification, D) Microscopic picture of Sclrotia, and E) Ectomycorrhizal root tip of poplar trees in nature.



شکل ۲- درخت فیلوژنی ترسیم‌شده توسط نرم‌افزار **MEGA7**: ارتباط و نزدیکی بین توالی قارچ جداسازی‌شده (**OP881598**) با گونه‌های دیگر استخراج‌شده از **NCBI**

Auricularia heimuer به‌عنوان برون‌گروه استفاده شد (**Du *et al.*, 2020**).

Figure 2. Phylogenetic tree by MEGA7: Relationship between the sequence of isolated fungi (OP881598) with other species extracted from NCBI
***Auricularia heimuer* was used as outgroup (Du *et al.*, 2020).**

تلقیح قارچ و برقراری همزیستی

پس از ۱۴ هفته نگهداری گلدان‌های تلقیح‌شده صنوبر با قارچ *P.involotus*، همزیستی اکتومیکوریزایی در بررسی سیستم ریشه‌ای این گیاه‌چه‌ها مشاهده شد (شکل ۳-الف). در بررسی‌های استریومیکروسکوپی، ساختاری شاخص همزیستی مانند میسلیوم خارج سلولی و غلاف هیفی (Hyphal mantle) در ریشه گیاهان تلقیح‌شده دیده شد، درحالی‌که در گیاهان تیمار شاهد، هیچ‌کدام از ساختارهای همزیستی وجود نداشت. براساس این یافته‌ها، استفاده از میسلیوم قارچی به‌خوبی توان برقراری رابطه همزیستی میان قارچ مذکور و کبوده را دارد.

شکل ۳- الف) ریشه‌های کبوده همزیست‌شده با قارچ *P. involutus* در شرایط گلخانه و ب) مقایسه گیاهچه همزیست‌شده (چپ) و گیاهچه فاقد همزیستی (راست)

Figure 3. A) Mycorrhizal poplar root with *P. involutus* in the greenhouse condition, and B) Comparison of mycorrhizal (left) and non-mycorrhizal seedlings (right)

جدول ۱- تأثیر قارچ اکتومیکوریز *P.involutus* بر خصوصیات رشدی گیاهچه‌های کبوده ۱۴ هفته پس از تلقیح

Table 1. Effect of ectomycorrhizal fungus *P. involutus* on growth characteristics of *P. alba* seedlings, 14 weeks after inoculation

متغیر Variable	واحد اندازه‌گیری Unit	گیاهچه میکوریزایی Mycorrhizal seedling	گیاهچه غیرمیکوریزایی Non-mycorrhizal seedling	t value
ارتفاع ساقه Stem height		135.3±5.25[a]	98.2±6.477[b]	14.071
سطح برگ Leaf area		26.17±3.595[a]	14.289±2.152[b]	8.966
وزن خشک برگ Leaf dry weight		1.341±0.271[a]	0.988±0.833[b]	3.924
وزن تر برگ Leaf fresh weight		3.659±0.294[a]	2.584±0.348[b]	6.832
وزن خشک ساقه Stem dry weight		32.171±3.913[a]	13.871±1.167[b]	14.171
وزن تر ساقه Stem fresh weight		42.831±4.29[a]	23.379±1.836[b]	13.179
وزن خشک ریشه Root dry weight		3.501±0.511[a]	1.975±0.39[b]	7.938
وزن تر ریشه Root fresh weight		10.744±0.685[a]	7.281±1.203[b]	7.909
قطر ساقه Stem diameter		7.09±0.858[a]	5.7±1.056[b]	3.23

براساس آزمون t، حرف‌های متفاوت لاتین در هر سطر نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۹ درصد هستند.

Different letters in each row indicate a significant difference based on the t test (P<0.01).

مقایسه خصوصیات رشدی گیاهان تلقیح‌شده و تلقیح‌نشده در شرایط تنش خشکی نشان داد که کلونیزه شدن گیاه توسط قارچ اکتومیکوریز باعث افزایش میانگین صفات رشدی در تیمارهای تلقیح‌شده تحت تنش نسبت به گیاهان شاهد شد (شکل ۳-ب). گیاه‌چه‌های همزیست‌شده با قارچ در شرایط تنش و غیرتنش، تفاوت معنی‌داری در سطح اطمینان ۹۹ درصد با گیاه‌چه‌های شاهد ازنظر متغیرهای رشد شامل وزن تر و خشک ریشه، وزن تر و خشک ساقه، وزن تر برگ، سطح برگ و ارتفاع ساقه داشتند (جدول ۱).

بحث

در گذشته، قارچ‌های اکتومیکوریز فقط براساس داده‌های ریخت‌شناسی شناسایی می‌شدند، اما این روش به‌طور دقیق ساختار، فراوانی و تنوع قارچ‌های اکتومیکوریز زیرزمینی را منعکس نمی‌کرد (Zhou *et al*., 2001). عوامل مختلفی در نوع و ساختار قارچ‌های اکتومیکوریز اثرگذار هستند. ازجمله این عوامل می‌توان به گونه میزبان (Tedersoo *et al*., 2008)، غلظت عناصر غذایی خاک و آب‌وهوا (Tedersoo *et al*., 2012) اشاره کرد. وابستگی قارچ‌های اکتومیکوریز به شرایط محیطی (مانند دما و رطوبت) برای تشکیل اندام باردهی سبب عدم تشکیل اندام باردهی (یا اندام باردهی بسیار کوچک که قابل‌چشم‌پوشی است) در بسیاری از گونه‌های زیرزمینی شده است. به این دلیل، تکنیک‌های مبتنی بر PCR در کنار روش سنتی به‌منظور بررسی قارچ‌های اکتومیکوریز به کار گرفته شدند (Sakakibara *et al*., 2002).

توالی نوکلئوتیدی جدایه قارچی مورد مطالعه با کد دسترسی OP881598 در بانک ژن NCBI ثبت شده است. نتایج آنالیز فیلوژنتیکی نشان داد که *P. involutus* توالی‌یابی‌شده در پژوهش پیش‌رو، کلاد ۱۰۰ را با گونه‌های دیگر *P. involutus* ایجاد کرده است. این خوشه‌بندی فیلوژنتیکی، اصالت گونه‌ای آن را تأیید می‌کند (درصد تکرار کلادها در ۱۰۰۰ بار نمونه‌گیری کاذب در محل ریشه کلادها درج شده است). مقدار Bootstrapping زیاد در محل انشعاب شاخه‌های درخت نشان می‌دهد که درخت فیلوژنی نوکلئوتیدهای مورد نظر، درجه اعتماد زیادی دارند. ویژگی‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی گونه مورد مطالعه نیز به‌اندازه کافی شباهت لازم برای قرار گرفتن در کنار *P. involutus* را دارند (Hahn, 2000, Henrici, 2004, Walting & Hills, 2005). براساس نتایج دیگر پژوهش پیش‌رو، استفاده از میسلیوم نیز قادر به ارائه منبع مناسبی از DNA به‌منظور بررسی‌های مولکولی است.

بیشتر گونه‌های صنوبر، درختانی تندرشد با نیاز آبی زیاد هستند که بهره‌وری آن‌ها، ارتباط نزدیکی با مقدار آب در دسترس دارد. دوره‌های خشک‌سالی طولانی‌مدت حاصل از گرمایش جهانی می‌تواند به‌شدت به صنوبرهایی که در دوره‌های چرخشی کوتاه‌مدت برای تولید زیست‌توده کاشته می‌شوند، آسیب وارد کنند (Fischer & Polle, 2010). بسیاری از گونه‌های صنوبر به کمبود آب، بسیار حساس هستند. به‌طوری‌که کاهش زودهنگام فتوسنتز، تغییر بیان ژن و فعالیت‌های آنزیمی و درنهایت، سرکوب رشد را به‌دنبال دارد (Hamanishi *et al*., 2012). بااین‌حال، صنوبرها به‌طور معمول در زیستگاه‌های طبیعی خود توسط قارچ‌های اکتومیکوریز کلونیزه می‌شوند که تعامل با این قارچ‌های همزیست می‌تواند پاسخ‌های گیاه به نشانه‌های محیطی را به‌مقدار قابل‌توجهی تعدیل کند (Stefani *et al*., 2009). کلونیزه شدن گیاهان توسط قارچ‌های همزیست خارجی موجب تنظیم اسمزی بهتر و بهبود وضعیت آبی گیاهان می‌شود. قارچ‌های همزیست با گسترش سیستم هیفی در اطراف ریشه میزبان سبب افزایش تماس ریشه با خاک می‌شوند. درنهایت، مقدار جذب آب در گیاه میزبان در مقایسه با تیمارهای غیرمیکوریزایی افزایش می‌یابد (Wu *et al*., 2007). سلول‌ها نیز در اثر تورژسانس، طویل‌تر می‌شوند. علاوه‌براین، قارچ‌های همزیست موجب افزایش در جذب عناصر غذایی از خاک و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی در گیاه میزبان می‌شوند که این عوامل بر

افزایش رشد اندام‌های هوایی و عملکرد ماده خشک آن‌ها تأثیر می‌گذراند (Wu & Zou, 2009). بهبود معنی‌دار صفات رشدی (ارتفاع ساقه، قطر ساقه، وزن تر و خشک برگ، وزن تر و خشک ساقه و وزن تر و خشک ریشه) در گیاه‌چه‌های میکوریزی در مقایسه با گیاه‌چه‌های شاهد در پژوهش پیش‌رو با نتایج گزارش‌شده توسط Danielsen و Polle (۲۰۱۴) و Luo و همکاران (۲۰۰۹) مطابقت دارد. هورمون‌ها و آنزیم‌های گیاهی، نقش مهمی در تنظیم وضعیت آب در گیاهان تحت تنش ایفا می‌کنند. ترشح برخی هورمون‌های گیاهی مانند آبسیزیک‌اسید (ABA)، سالیسیلیک‌اسید (SA) و جاسمونیک‌اسید (JA) در پاسخ به شرایط تنش خشکی القا می‌شوند، درحالی‌که ترشح برخی هورمون‌ها مانند سیتوکینین (CK) کاهش می‌یابند (Cortleven *et al*., 2019). بیشترین پژوهش‌ها درمورد هورمون‌های گیاهی در شرایط تنش آبی مربوط به آبسیزیک اسید است که در طی تنش خشکی در ریشه ساخته می‌شود. تجمع این هورمون در گیاه تحت تنش باعث بسته‌تر شدن روزنه‌ها و درنتیجه، کاهش محتوای آب نسبی گیاه می‌شود (Wilkinson & Davies, 2010). همچنین، این هورمون بر هدایت هیدرولیکی (Lpr) (هم از طریق افزایش و هم مهار آن) و پیری برگ اثرگذار است (Beaudette *et al*., 2007).

قارچ‌های اکتومیکوریز، نقش مهمی در سلامت و بقای بوم‌سازگان جنگل ایفا می‌کنند. باتوجه‌به نقش پررنگ این ریزاندامگان در گذار درختان از شرایط نامساعد محیطی، بررسی رابطه همزیستی آن‌ها با جنس اقتصادی صنوبر بسیار حائز اهمیت است. باتوجه‌به نیاز آبی زیاد گونه‌های صنوبر، عواملی مانند تنش‌های کم‌آبی، خشک‌سالی‌های پی‌درپی، شور شدن خاک، هجوم آفات و بیماری‌ها در کنار قطع بی‌رویه این درختان طی سال‌های اخیر در بسیاری از مناطق کشور، جمعیت صنوبر را کاهش داده‌اند (Yousefi & Modir Rahmati, 2018). پیش‌بینی‌ها نشان می‌دهند که این تنش‌های محیطی در آینده باتوجه‌به تغییرات آب‌وهوایی، شدیدتر خواهند شد. حتی مناطقی که پیش‌ازاین درگیر شرایط تنش نبوده‌اند را نیز در بر خواهند گرفت. راهکارهایی که باعث افزایش کیفی و کمی تولید چوب صنوبر می‌شوند، مانند استفاده از قارچ‌های همزیست خارجی، نه‌تنها ازنظر اقتصادی به افزایش اشتغال و درآمد می‌انجامد، بلکه با گسترش کاشت و پرورش گونه‌های این جنس در مناطق مختلف، مزایای محیط‌زیستی را به‌همراه دارد (Assadi *et al*., 2004). اگرچه سازوکارهای مربوط به فعالیت‌های آنزیمی و هورمونی قارچ‌های اکتومیکوریز طی تنش خشکی هنوز به‌وضوح مشخص نیست، اما به‌طورکلی می‌توان نتیجه گرفت که گیاه‌چه‌های اکتومیکوریزایی، سیستم کاراتر و فعال‌تری در مواجهه با تنش خشکی دارند. نتایج پژوهش پیش‌رو نشان داد که از طریق برقراری همزیستی اکتومیکوریزایی می‌توان گونه‌های مقاوم‌تر صنوبر نسبت به تنش‌های خشکی را ایجاد کرد و برای کاشت در فضای سبز شهری و جنگل‌کاری در مناطق دارای بحران‌های آبی مانند مناطق خشک و نیمه‌خشک به‌کار گرفت.

منابع مورد استفاده

- Assadi, F., Mirzai - Nodushan, H., Modirrahmati, E. and Naderi - Shahab, M.A., 2004. Identification of poplar clones, using morphological markers. Iranian Journal of Forest and Poplar Research, 12(2): 267-300 (In Persian with English summary).
- Beaudette, P.C., Chlup, M., Yee, J. and Emery, R.J.N., 2007. Relationships of root conductivity and aquaporin gene expression in *Pisum sativum*: diurnal patterns and the response to $HgCl_2$ and ABA. Journal of Experimental Botany, 58(6): 1291-1300.
- Cortleven, A., Leuendorf, J.E., Frank, M., Pezzetta, D., Bolt, S. and Schmulling, T., 2019. Cytokinin action in response to abiotic and biotic stresses in plants. Plant, Cell and Environment, 42(3): 998-1018.
- Danielsen, L. and Polle, A., 2014. Poplar nutrition under drought as affected by ectomycorrhizal colonization. Environmental and Experimental Botany, 108: 89-98.
- Du, P., Tu, H., Jiang, J., Cui, B. and Dai, Y., 2020. Molecular identification and biological characteristics of wild *Paxillus ammoniavirescens* strain. Forest Research, 33(3): 146-155 (In Chinese with English summary).
- Fischer, U. and Polle, A., 2010. *Populus* responses to abiotic stress: 225-246. In: Jansson, S., Bhalerao, R. and Groover, A. (Eds.). Genetics and Genomics of

- Otgonsuren, B., Rewald, B., Godbold, D.L. and Göransson, H., 2016. Ectomycorrhizal inoculation of *Populus nigra* modifies the response of absorptive root respiration and root surface enzyme activity to salinity stress. Flora, 224: 123-129.
- Sakakibara, S.M., Jones, M.D., Gillespie, M., Hagerman, S.M., Forrest, M.E., Simard, S.W. and Durall, D.M., 2002. A comparison of ectomycorrhiza identification based on morphotyping and PCR-RFLP analysis. Mycological Research, 106(8): 868-878.
- Schützendübel, A. and Polle, A., 2002. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. Journal of Experimental Botany, 53(372): 1351-1365
- Smith, S.E. and Read, D.J., 2008. Mycorrhizal Symbiosis, Third Edition. Academic Press, New York, 800p.
- Stefani, F.O.P., Moncalvo, J.M., Séguin, A., Bérubé, J.A. and Hamelin, R.C., 2009. Impact of an 8-year-old transgenic poplar plantation on the ectomycorrhizal fungal community. Applied and Environmental Microbiology, 75(23): 7527-7536.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S., 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony Methods. Molecular Biology and Evolution, 28(10): 2731-2739.
- Taylor, A.F.S., Martin, F. and Read, D.J., 2000. Fungal diversity in ectomycorrhizal communities of Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.] and beech (*Fagus sylvatica* L.) along north-south transects in Europe: 343-365. In: Schulze, E.D. (Ed.). Carbon and Nitrogen Cycling in European Forest Ecosystems. Ecological Studies, Vol. 142, Springer, Berlin, Heidelberg, 506p.
- Tedersoo, L., Bahram, M., Toots, M., Diédhiou, A.G., Henkel, T.W., Kjøller, S., ... and Kõljalg, U., 2012. Towards global patterns in the diversity and community structure of ectomycorrhizal fungi. Molecular Ecology, 21: 4160-4170.
- Tedersoo, L., Jairus, T., Horton, B.M., Abarenkov, K., Suvi, T., Saar, I. and Kõljalg, U., 2008. Strong host preference of ectomycorrhizal fungi in a Tasmanian wet sclerophyll forest as revealed by DNA barcoding and taxon-specific primers. New Phytologist, 180(2): 479-490.
- Vellinga, E.C., Blanchard, E.P., Kelly, S. and Contu, M., 2012. *Paxillus albidulus*, *P. ammoniavirescens*, and *P. validus* revisited. Mycotaxon, 119: 351-359.
- Walting, R. and Hills, A.E., 2005. British Fungus Flora: Agarics and Boleti 1: Boletes and their Allies: Boletaceae: Strobilomycetaceae: Gyroporaceae: *Populus*. Springer, New York, 384p.
- Gardes, M. and Bruns, T.D., 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. Molecular Ecology, 2(2): 113-118.
- Gelardi, M., Segneri, G., Ercole, E. and Vizzini, A., 2011. *Paxillus involutus* f. *eburneu*s f. nov. (Agaricomycetes, Boletales), a molecularly confirmed infraspecific taxon in the *P. involutus* complex from Italy. Mycosphere, 2(5): 547-554.
- Hahn, C., 2000. Is it possible to separate *Paxillus involutus* and *P. rubicundulus* by spore measurement only? Zeitschrift für Mykologie, 66(2): 161-171 (In German with English summary).
- Hamanishi, E.T., Thomas, B.R. and Campbell, M.M., 2012. Drought induces alterations in the stomatal development program in *Populus*. Journal of Experimental Botany, 63(13): 4959-4971.
- Henrici, A., 2004. A key to *Paxillus* s.1. in Europe. Field Mycology, 5(3): 87-88
- Jargeat, P., Chaumeton, J.P., Navaud, O., Vizzini, A. and Gryta, H., 2014. The *Paxillus involutus* (Boletales, Paxillaceae) complex in Europe: Genetic diversity and morphological description of the new species *Paxillus cuprinus*, typification of *P. involutus* s.s., and synthesis of species boundaries. Fungal Biology, 118(1): 12-31.
- Kirk, P.M., 2019. Microsporidia: Unicellular spore-forming protozoan parasites (version Nov 2015). In: Roskov, Y., Ower, G., Orrell, T., Nicolson, D., Bailly, N., Kirk, P.M., … and Penev, L. (Eds.). Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 2019 Annual Checklist. Naturalis, Leiden, the Netherlands. Digital resource available at: www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2019
- Landhäusser, S.M., Mushin, T.M. and Zwiazek, J.J., 2002. The effect of ectomycorrhizae on water relations in aspen (*Populus tremuloides*) and white spruce (*Picea glauca*) at low soil temperatures. Canadian Journal of Botany, 80(6): 684-689.
- Loewe, A., Einig, W., Shi, L., Dizengremel, P. and Hampp, R., 2000. Mycorrhiza formation and elevated CO_2 both increase the capacity for sucrose synthesis in source leaves of spruce and aspen. The New Phytologist, 145(3): 565-574
- Luo, Z.B., Li, K., Jiang, X. and Polle, A. 2009. Ectomycorrhizal fungus (*Paxillus involutus*) and hydrogels affect performance of *Populus euphratica* exposed to drought stress. Annals of Forest Science, 66: 106.
- Moore, A.E.P. and Peterson, R.L., 1992. Effect of temperature on sclerotium induction in *Paxillus involutus*. Canadian Journal of Microbiology, 38(11): 1197-1201.

- Yousefi, B. and Modir Rahmati, A.R., 2018. Evaluation of growth and yield of black poplar *(Populus nigra* L.) clones under drought stress period in comparative populetum of Sanandaj. Iranian Journal of Forest and Poplar Research, 26(2): 276-290 (In Persian with English summary).
- Zamani, S.M., Farashiani, M.E., Kazerani, F., 2020. The effect of ectomycorrhizal symbiosis on drought tolerance in *Populus caspica*. Biocontrol in Plant Protection, 8(1): 11-27 (In Persian with English summary).
- Zhou, Z., Miwa, M., Matsuda, Y. and Hogetsu, T., 2001. Spatial distribution of the subterranean mycelia and ectomycorrhizae of *Suillus grevillei* genets. Journal of Plant Research, 114: 179-185.

Paxillaceae: Coniophoraceae: Gomphidiaceae. Published by Royal Botanic Garden Edinburgh, Edinburgh, 200p.
- Wilkinson, S. and Davies W.J., 2010. Drought, ozone, ABA and ethylene: new insights from cell to plant to community. Plant, Cell and Environment, 33(4): 510-525.
- Wu, Q.S., Xia, R.X., Zou, Y.N. and Wangi, G.Y., 2007. Osmotic solute responses of mycorrhizal citrus (*Poncirus trifoliata*) seedlings to drought stress. Acta Physiologiae Plantarum, 29: 543-549.
- Wu, Q.S. and Zou, Y.N., 2009. Mycorrhiza has a direct effect on reactive oxygen metabolism of drought-stressed citrus. Plant, Soil and Environment, 55(10): 436-442.

Isolation and characterization of *Paxillus involutus* (Boletales: Paxillaceae) as an ectomycorrhizae of poplar and its effect on drought stress in White poplar (*Populus alba* L.)

N. Sepasi [1], A. Taheri [2*], S.M. Zamani [3], M. Jahani [4], M.E. Farashiani [3]

1- Ph.D. Student of Plant Pathology, Department of Plant Pathology, Gorgan University of Agricultural Science and Natural Resources, Gorgan, Iran
2*- Corresponding Author, Associate Prof., Department of Plant Pathology, Gorgan University of Agricultural Science and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: a.taheri@gau.ac.ir
3- Assistant Prof., Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran
4- Associate Prof., Department of Plant Protection, College of Agriculture, University of Birjand, Birjand, Iran

Received: 13.09.2022 Accepted: 07.12.2022

Abstract

In recent years, increasing temperature and water deficiency have caused restrictions on poplar cultivation. Ectomycorrhizal fungi (ECM) play an effective role in increasing plant tolerance against water stress, salinity, and the defense of plants against pests and diseases. In this study, isolation, morphological and molecular identification of ectomycorrhizal fungi of three poplar habitats in Guilan province (Shafaroud, Gisoom and Safra-basteh sites) in Iran was carried out. Based on morphological and molecular data, the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* was identified as poplar ectomycorrhizae. Fungal mycelium was used to inoculate seedlings of *Populus alba* L. in the greenhouse condition, and the effect of the ectomycorrhizal fungus on the plant growth parameters was measured in water stress and irrigation. The results showed that establishing a symbiotic relationship between poplar seedlings and ectomycorrhizal fungus *P. involutus* was successful. Moreover, inoculation of the symbiotic fungus positively affected improving the growth characteristics of the inoculated plants. Thus, symbiotic seedlings with ectomycorrhizal fungus were significantly different from the non-mycorrhizal seedlings in plant growth variables including root fresh and dry weight, leaf fresh weight, stem fresh and dry weight, leaf area, and stem height ($p<0.01$). Also, the use of symbiotic fungus reduced the negative effects of water deficit stress on poplar seedlings and increased the tolerance in the mycorrhizal plants. Based on these findings, a coordinated plant-fungal system plays an effective role in improving the performance of poplar plants under water-stress conditions.

Key words: Ectomycorrhizal symbiosis, inoculation, *Populus*, seedling.