Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Journal of Plant Production Research

Print ISSN: 2322-2050
Online ISSN: 2322-2778

Effect of ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* on some physiological and morphological characteristics of *Populus alba* under drought stress and Cytospora canker conditions

Narges Sepasi[1], Abdolhossein Taheri[*2], Seyed Masoume Zamani[3], Mehdi Jahani[4], Mohammad Ebrahim Farashiani[5]

1. Ph.D. Student of Plant Pathology, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. Email: sepasi.n68@gmail.com
2. Corresponding Author, Associate Prof., Dept. of Plant Pathology, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences 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. Email: zamani832003@yahoo.com
4. Associate Prof., Dept. of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Birjand, Birjand, Iran. Email: mjahani@birjand.ac.ir
5. Assistant Prof., Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran. Email: farashiani@gmail.com

Article Info

Article type:
Full Length Research Paper

Article history:
Received: 05.02.2023
Revised: 07.21.2023
Accepted: 08.28.2023

Keywords:
Cytospora chrysosperma, Ectomycorrhizae, *Laccaria bicolor*

ABSTRACT

Background and Objectives: Increasing need for wood and the other hand declining wood resources have caused desire for afforestation with fast growing species such as poplars, but water deficit and cytosporal cankers on poplar species have become to important limiting factors of poplar cultivation in some parts of Iran. Ectomycorrhizal fungi have significant effect in improving the water status of plants, increasing the survival and growth of plants under stress. The purpose of this research is investigation the effect of *Laccaria bicolor* on some morphological and physiological characteristics of poplar seedlings under drought stress and cytosporal canker.

Materials and Methods: This research done in factorial form in a completely randomized design with 5 replications. The test factors included the biological factor in two levels (without mycorrhiza and with mycorrhiza) and the stress factor in three levels (no stress, drought stress and *Cytospora* stress). Inoculation of ectomycorrhizal fungus to poplar seedlings was done 14 weeks after the cuttings were cultivated in the pot and height of the seedlings reached to 50 cm. Isolation and identification of the fungus causing cytosporal canker was done morphologically and molecularly and it was inoculated into poplar seedlings (after ectomycorrhizal establishment). Drought stress was done by reducing irrigation water based on the agricultural capacity of plants. Measurement of growth characteristics, physiological and enzymatic reactions of plants under stress and non-stress conditions were evaluated in different treatments.

Results: The level of catalase, superoxide dismutase and peroxidase significantly increased in mycorrhizae- drought and mycorrhizae - *Cytospora* seedlings and had a significant difference of 1% with control seedlings under stress. The level of malondialdehyde (MDA) in the mycorrhizal seedlings under stress increased less than the control seedlings under stress and they have a significant difference with each other at the 1% level. Using of ectomycorrhizal fungus L. bicolor improves the growth

characteristics of poplar seedlings, the amount of leaf area, leaf fresh and dry weight, root fresh and dry weight, stem fresh and dry weight and stem height have significant differences with seedlings without symbiosis. The stem diameter in symbiosis seedlings with and the control treatment had no significant difference. Ectomycorrhizal symbiosis has led to an increase in photosynthesis, stomata conductance, intercellular carbon dioxide and transpiration in the symbiotic seedlings compared to the control treatment. In the drought and *cytospora* stress, plants without symbiosis had a lower performance in photosynthesis, transpiration, and stomatal conductance, which led to a decrease in growth in these treatments.

Conclusion: In this study, *Cytospora chrysosperma* was identified as the causative agent of cytosporal canker. Findings of this research showed that the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* was able to create symbiosis with *P. alba* in greenhouse conditions. This symbiosis has increased growth, improved plant physiology, and increased plant resistance in plants with symbiosis compared to seedlings without symbiosis under drought and cytospora canker. Therefore, considering the improvement of the water condition, increase growth and biomass, and modification of the physiological characteristics of the inoculated plants with ectomycorrhizal fungi compared to the control, Establishing this ectomycorrhizal interaction can be introduced as a new strategy to increase success of seedlings in poplar plantations for wood cultivation.

Cite this article: Sepasi, Narges, Taheri, Abdolhossein, Zamani, Seyed Masoume, Jahani, Mehdi, Farashiani, Mohammad Ebrahim. 2024. Effect of ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* on some physiological and morphological characteristics of *Populus alba* under drought stress and Cytospora canker conditions. *Journal of Plant Production Research*, 31 (1), 47-68.

© The Author(s).
DOI: 10.22069/JOPP.2023.21018.3008
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی

شاپا چاپی: ۲۰۵۰-۲۳۲۲
شاپا آنلاین: ۲۷۷۸-۲۳۲۲

تأثیر قارچ اکتومیکوریز *Laccaria bicolor* بر برخی خصوصیات فیزیولوژیکی و ریخت‌شناسی گیاهچه‌های سپیدار (*Populus alba*) در شرایط تنش خشکی و آلودگی به شانکر سیتوسپورایی

نرگس سپاسی[۱]، عبدالحسین طاهری*[۲]، سیده معصومه زمانی[۳]، مهدی جهانی[٤]، محمد ابراهیم فراشیانی[٥]

۱. دانشجوی دکتری بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
رایانامه: sepasi.n68@gmail.com

۲. نویسنده مسئول، دانشیار گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
رایانامه: a.taheri@gau.ac.ir

۳. استادیار مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.
رایانامه: zamani832003@yahoo.com

٤. دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران. رایانامه: mjahani@birjand.ac.ir

۵. استادیار مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.
رایانامه: farashiani@gmail.com

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی- پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱٤۰۲/۰۲/۱۲
تاریخ ویرایش: ۱٤۰۲/۰٤/۳۰
تاریخ پذیرش: ۱٤۰۲/۰٦/۰٦

واژه‌های کلیدی:
اکتومیکوریز،
سپیدار،
Cytospora chrysosperma،
Laccaria bicolor

چکیده

سابقه و هدف: کاهش منابع چوبی و نیاز فزاینده به چوب، تمایل به جنگل‌کاری با گونه‌های سریع‌الرشد مانند صنوبر را افزایش داده است اما بحران آب و بیماری شانکر صنوبر به دو عامل مهم محدودکننده کشت صنوبر در برخی نقاط ایران تبدیل شده‌است. قارچ‌های اکتومیکوریز در بهبود وضعیت آبی گیاهان، افزایش زنده‌مانی و رشد گیاهان تحت تنش، اثرات قابل توجهی دارند. هدف از این پژوهش بررسی تأثیر قارچ اکتومیکوریز *Laccaria bicolor* بر برخی خصوصیات ریخت‌شناسی و فیزیولوژیکی گیاهچه‌های سپیدار در شرایط تنش خشکی و شانکر سیتوسپورایی است.

مواد و روش‌ها: این پژوهش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۵ تکرار انجام شد. فاکتورهای آزمایش شامل عامل بیولوژیک در دو سطح (بدون مایکوریز و دارای مایکوریز) و عامل تنش در سه سطح (بدون تنش، تنش خشکی و تنش قارچ بیمارگر سیتوسپورا) بود. تلقیح قارچ اکتومیکوریز به گیاهچه‌های سپیدار ۱٤ هفته پس از کشت قلمه در گلدان و زمانی که ارتفاع گیاه به ۵۰ سانتی‌متر رسید، انجام شد. جداسازی و شناسایی قارچ عامل شانکر سیتوسپورایی به صورت ریخت‌شناسی و مولکولی انجام شد و به گیاهچه‌های سپیدار (پس از

استقرار قارچ مایکوریز) تلقیح شد. تنش خشکی با کاهش آب آبیاری بر اساس ظرفیت زراعی گیاهان انجام شد. اندازه‌گیری خصوصیات رشدی، واکنش فیزیولوژیکی و آنزیمی گیاهان در شرایط تنش و غیرتنش، در تیمارهای مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: سطح آنزیم کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز در شرایط تنش خشکی و سیتوسپورایی در گیاهچه‌های میکوریزایی افزایش چشم‌گیری داشته و دارای اختلاف معنی‌داری در سطح ۱ درصد با گیاهچه‌های شاهد تحت تنش، هستند. آنزیم مالون دی‌آلدئید در گیاهچه‌های تلقیح شده با مایکوریزا و تحت تنش نسبت به گیاهچه‌های بدون مایکوریز تحت تنش افزایش کم‌تری داشته و در سطح ۱ درصد دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر هستند. استفاده از قارچ اکتومیکوریز *L. bicolor* باعث بهبود خصوصیات رشدی گیاهچه‌های سپیدار شده، سطح برگ، وزن تر و خشک برگ، وزن تر و خشک ریشه، وزن تر و خشک ساقه و ارتفاع ساقه دارای اختلاف معنی‌داری با گیاهچه‌های فاقد همزیستی است؛ قطر ساقه در گیاهچه‌های دارای همزیستی و تیمار شاهد، فاقد اختلاف معنی‌داری با یکدیگر است. همزیستی اکتومیکوریزایی منجر به افزایش فتوسنتز، هدایت روزنه‌ای، کربن دی اکسید بین سلولی و تعرق در گیاهچه‌های همزیست نسبت به تیمار شاهد شده‌است. در شرایط تنش خشکی و تنش سیتوسپورایی، گیاهان فاقد همزیستی عملکرد پایین‌تری در میزان فتوسنتز، تعرق و هدایت روزنه‌ای داشته‌است که منجر به کاهش رشد در این تیمارها شد.

نتیجه‌گیری: در این پژوهش گونه *Cytospora chrysosperma* به عنوان عامل ایجاد شانکر درختان صنوبر از استان گیلان شناسایی و معرفی شد. هم‌چنین یافته‌های این پژوهش نشان داد که قارچ اکتومیکوریز *Laccaria bicolor* قادر به ایجاد همزیستی با گیاهچه‌های سپیدار بوده است. این همزیستی باعث افزایش رشد، بهبود فیزیولوژی گیاه، و افزایش مقاومت گیاه در شرایط تنش خشکی و تنش سیتوسپورایی در گیاهان دارای همزیستی نسبت به گیاهچه‌های فاقد همزیستی، شده است. بنابراین با توجه به بهبود وضعیت آبی، افزایش رشد و بیومس و اصلاح خصوصیات فیزیولوژیکی گیاه تلقیح شده با قارچ میکوریز در مقایسه با شاهد، می‌توان برقراری این تعامل اکتومیکوریزایی را راهکاری نوین برای افزایش موفقیت نهال‌کاری در صنوبرکاری‌ها جهت زراعت چوب معرفی نمود.

استناد: سپاسی، نرگس، طاهری، عبدالحسین، زمانی، سیده معصومه، جهانی، مهدی، فراشیانی، محمد ابراهیم (۱۴۰۳). تأثیر قارچ اکتومیکوریز *Laccaria bicolor* بر برخی خصوصیات فیزیولوژیکی و ریخت‌شناسی گیاهچه‌های سپیدار (*Populus alba*) در شرایط تنش خشکی و آلودگی به شانکر سیتوسپورایی. *نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی*، ۳۱ (۱)، ۶۸-۴۷.
DOI: 10.22069/JOPP.2023.21018.3008

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
© نویسندگان.

مقدمه

قارچ‌های میکوریز میکروارگانیسم‌های رشته‌ای هستند که با ریشه‌های حدود ۹۰ درصد گیاهان زمینی، ارتباط همزیستی برقرار می‌کنند (۱). در بین روابط میکوریزی مختلف، همزیستی اندومیکوریزی (آربوسکولار) یا قارچ‌های AM بیش‌ترین شیوع را در قلمروهای گیاهی دارند و ۷۲ درصد از گونه‌های گیاهی که بیش‌تر متعلق به گیاهان زراعی هستند را کلونیزه می‌کنند؛ در حالی‌که قارچ‌های اکتومیکوریز (ECM) تنها حدود ۲ درصد از گونه‌های گیاهی که بیش‌تر به گونه‌های درختی و چوبی جنگل‌های معتدل اختصاص دارند، ساختار همزیستی تشکیل می‌دهند (۲). در هر دو مدل همزیستی آربوسکولار و اکتومیکوریزی، قارچ‌های میکوریز نه تنها مواد معدنی مغذی میزبان خود را از خاک تامین می‌کنند، باعث حفاظت از میزبان در برابر طیف گسترده‌ای از تنش‌های زیستی و غیر زیستی می‌شوند (۳، ٤).

درختان صنوبر از نظر تجاری گونه‌های مهمی هستند که علاوه بر تولیدکننده اصلی چوب، به عنوان تولیدکننده خمیر کاغذ، تولید تخته ۳ لایه، الوار، کاغذ و منبع تجدیدپذیر برای تولید بیواتانول (انرژی زیستی) استفاده می‌شوند (۵). از آنجایی‌که بهره‌وری آن‌ها ارتباط نزدیکی با میزان در دسترس بودن آب دارد، صنوبرهایی که در دوره‌های چرخشی کوتاه‌مدت برای تولید بیومس استفاده می‌شوند، با فرایند گرم شدن جهانی که به سمت دوره‌های طولانی‌مدت خشکسالی سوق پیدا خواهد کرد، به شدت آسیب می‌بینند (٦). گونه‌های صنوبر اغلب در زمین‌های مرطوب رشد می‌کنند و اغلب ژنوتیپ‌های آن نسبت به خشکی حساس هستند (۷). در پژوهش‌های مختلف ثابت شده‌است که در تعداد زیادی از گونه‌های صنوبر که به کمبود آب حساس هستند، در نتیجه کم‌آبی کاهش فتوسنتز، تغییر بیان ژن‌ها و فعالیت‌های آنزیمی و توقف رشد مشاهده شده‌است (۸).

تأثیر تنش خشکی بر توسعه و عملکرد گیاهان به خوبی شناخته شده‌است و انتظار می‌رود طی سال‌های آینده با توجه به تغییرات اقلیمی پیش رو، یکی از مسائل تاثیرگذار در کشاورزی و جنگل‌داری باشد (۹). مطالعات زیادی در زمینه اثرات تنش آب بر رشد، فیزیولوژی و بیوشیمی گیاه مستند شده است و در مطالعات متعدد نقش شاخص‌های فیزیولوژیکی گیاه در رابطه با تحمل آن‌ها به تنش آبی بررسی شده‌است (۱۰، ۱۱). اگرچه پاسخ دقیق گیاهان به تنش کم‌آبی بسته به گونه گیاهی متفاوت است اما معمولاً در اثر اعمال تنش خشکی به گیاه، بسته شدن روزنه‌ها برای کاهش تعرق و تنظیم جذب آب ریشه برای جلوگیری از خشک شدن گیاه، رخ می‌دهد (۱۲). در گیاهان محدودیت آب سبب تولید بیش از حد گونه‌های اکسیژن فعال (ROS)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و رادیکال‌های آنیون سوپراکسید (O_2) شده و در نتیجه اثر بازدارندگی بر روی رشد گیاه (۱۳)، کاهش فتوسنتز، پراکسیداسیون لیپید (١٤) و در شدت‌های بالاتر باعث مرگ برنامه‌ریزی شده سلول می‌شود (۱۵). نتایج پژوهش‌های اسکرزوسکا نشان داده‌است که تنش خشکی و شوری به طور معنی‌داری باعث کاهش تعداد برگ، وزن تر و خشک برگ، وزن تر و خشک ساقه در گیاهچه‌های *Populus nigra* شده‌است (١٦).

علائم شانکر سیتوسپورایی شامل نواحی کشیده، کمی فرورفته و تغییر رنگ یافته برروی پوست درخت که اغلب در حاشیه نواحی دارای شانکر مشاهده می‌شود. علائم مشاهده شده برروی درخت بسته به میزبان و مرحله توسعه بیماری متفاوت است. چوب زیر کامبیوم قهوه‌ای رنگ شده؛ پوست داخلی و پوست بالای کامبیوم آلوده ممکن است فرورفته و به

رنگ زرد، قهوه‌ای، قهوه‌ای مایل به قرمز، خاکستری یا سیاه به نظر برسد و با پیشرفت بیماری، بافت‌ها آبکی و بدبو شوند (۱۷). تاکنون گونه‌های مختلفی از جنس سیتوسپورا به عنوان عوامل ایجاد شانکر در گونه‌های درختی صنوبر گزارش شده‌اند. گونه *Cytospora salicacearum* از صنوبر *P. nigra*، گونه *C. rusanovii* از *Populus * Sibirica*، گونه‌های *C. pini* و *C. paratranslucens* و *C. chrysosperma* از *P. alba*، گونه *C. joaquiensis* از صنوبر *P. deltoeides* گزارش شده‌اند. گونه *C. chrysosperma* به عنوان گونه تیپ جنس سیتوسپورا، بیمارگری با دامنه میزبانی بالا و قدرت بیماریزایی زیاد که به اعضای خانواده *Salicaceae* حمله نموده و علائم بیماری شدید ایجاد می‌کند (۱۸). قارچ عامل بیماری شانکر سیتوسپورایی صنوبر گونه فرصت‌طلب بوده و به درختان ضعیف و تحت تنش حمله می‌کند. اگرچه نقش تنش‌های محیطی در گسترش شانکر سیتوسپورایی کاملاً مشخص نیست اما پژوهش‌های زیادی اثر گرما و خشکی را عامل تشدید این بیماری در درختان میزبان دانسته است (۱۹). کنترل این بیماگر نیاز به اتخاذ تصمیماتی همسو با محیط زیست دارد. اتخاذ راهکاری مناسب که علاوه بر بالابردن توانایی درخت و نهال‌ها در برابر استرس خشکی به‌خصوص در مناطق با رطوبت پایین، باعث بهبود جذب مواد غذایی و افزایش مقاومت به بیمارگرهای گیاهی شود. یکی از راهکارهایی که امروزه بسیار مورد توجه قرار گرفته‌است، استفاده از قارچ‌های میکوریز می‌باشد. نتایج پژوهش‌های دانگ و همکاران نشان داده‌است استفاده از قارچ اکتومیکوریز *L. bicolor* باعث افزایش مقاومت نهال‌های صنوبر به بیماری شانکر سیتوسپورایی خواهد شد (۲۰).

در این پژوهش، اثر تنش خشکی بر تعامل میان گیاهچه‌های سپیدار (*Populus alba* L.) و قارچ اکتومیکوریز (*Laccaria bicolor* (Maire) P.D. Orton) روی خصوصیات رویشی و فیزیولوژیکی گیاه میزبان مورد بررسی قرار گرفت. هم‌چنین تأثیر قارچ اکتومیکوریز بر بیان آنزیم‌های گیاه میزبان و صفات رشدی آن، در تعامل با قارچ عامل شانکر سیتوسپورایی صنوبر (*Cytospora chrysosperma* (Pers.)) مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی و تکثیر قارچ اکتومیکوریز: اندام باردهی قارچ *L. bicolor* در پاییز سال ۱۴۰۰ از رویشگاه صنوبر جنگل شفارود (N3728376 E4911368) واقع در استان گیلان جمع‌آوری شده و در ظروف مخصوص به آزمایشگاه منتقل شد. پس از ضدعفونی سطحی توسط الکل ۷۰ درصد، قطعه کوچکی (۵ میلی‌متر) از لایه داخلی محل اتصال کلاهک و پایه، بر روی محیط MMN (Modified Melin-Norkrans) کشت داده شد (۲۱) و جهت مراحل بعدی تحقیق در دمای ۲۲ درجه سلسیوس و تاریکی نگه‌داری شد.

کاشت قلمه‌های صنوبر و تلقیح قارچ: قلمه‌های ۲۰ سانتی‌متری سپیدار از مرکز تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور در مجتمع تحقیقاتی البرز تهیه و جهت کشت در گلدان‌های حاوی خاک سترون مورد استفاده قرار گرفت. ترکیب خاک مورد استفاده در این پژوهش شامل (یک قسمت پرلیت + شش قسمت خاک نرم + دو قسمت پیت و یک قسمت ماسه) که پس از اتوکلاو شدن، درون گلدان‌های پلاستیکی ریخته شد (۲۲). از بین قلمه‌های کاشت شده، در مجموع ۸۵ گلدان دارای قلمه استقرار یافته و ریشه دار شده بودند. تلقیح قارچ به گیاهچه‌های صنوبر با

استفاده از روش کریمان و همکاران (۲۰۱۲) انجام شد. بدین‌ترتیب که در مرحله اول، تولید بستر قارچی در دستور کار قرار گرفت. برای تهیه بستر قارچی از ترکیب پیت، پرلیت و ورمیکولیت (۲: ۰/۵: ۲ حجمی/ حجمی) که قبلاً با محیط کشت استاندارد MMN (Modified Melin-Norkrans) مایع مرطوب شده و توسط قارچ اکتومیکوریز به مدت دوماه در دمای ۲۳ درجه سلسیوس کاملاً کلونیزه شده بودند، استفاده شد. ظروف حاوی تیمار شاهد تنها با محیط مایع فاقد ایناکولوم قارچی مرطوب شد. پس از تهیه بستر قارچی، گلدان‌های حاوی گیاهچه‌های صنوبر که از نظر ارتفاع و شاخ و برگ تا حدودی هم‌اندازه یکدیگر بودند را انتخاب نموده و جهت تلقیح سوبسترای قارچی آماده شدند. سوبستراهای حاوی ایناکولوم قارچی به پای ریشه گیاهچه‌های صنوبر منتقل شد و در تیمار شاهد تنها سوبسترای فاقد ایناکولوم به ریشه اضافه شد (۲۳).

برقراری همزیستی: چهارده هفته پس از تلقیح قارچ اکتومیکوریز *L. bicolor* به گیاهچه‌های سپیدار، ریشه‌ی گیاهچه‌های تیمار میکوریز مورد بررسی قرار گرفت (۲٤). پس از خارج کردن ریشه گیاه از خاک و شستن آن، ده قطعه ده سانتی‌متری از ریشه هر نمونه گیاهی تهیه شد تا در نهایت صد قطعه ریشه برای هر گیاه مورد بررسی استریومیکروسکوپی قرار گیرد (۲۵).

جداسازی و شناسایی قارچ عامل شانکر سیتوسپورایی: در فصل پاییز سال ۱٤۰۰ و طی نمونه‌برداری از رویشگاه‌های صنوبر استان گیلان و منطقه دیناچال (N3737434, E4902079)، از درختان صنوبر (*P. deltoeides*) دارای علائم فیتیله نارنجی (شکل a1) نمونه‌برداری شده و در آزمایشگاه، قارچ عامل بیماری بر اساس روش لارنس و همکاران (۲۰۱۸) جداسازی و شناسایی شد. بررسی مشخصات ریخت‌شناسی مانند شکل اسپور، قطر پرگنه و میزان رنگدانه‌ها بر روی محیط کشت PDA (Potato Dextrose Agar) ارزیابی شد (۲٦).

استخراج DNA ژنومی با استفاده از میسلیوم رشد کرده روی محیط کشت PDA (۱٤ روزه) و با استفاده از روش زمانی و همکاران (۱۳۹۹) انجام شد. به‌منظور انجام واکنش زنجیره پلیمراز و تکثیر بخشی از ناحیه ITS1-5.8S-ITS2 از DNA ریبوزومی قارچ، از آغازگرهای ITS1&ITS2 استفاده شد. مواد مورد استفاده و حجم‌های به‌کار رفته در واکنش زنجیره پلیمراز بر اساس روش زمانی و همکاران (۱۳۹۹) (۲۷) تنظیم گردید و محصول PCR جهت تعیین توالی نوکلئوتیدی به شرکت بیومجیک ارسال شد.

تلقیح قارچ عامل شانکر سیتوسپورایی به گیاهچه‌های صنوبر: به منظور تلقیح گیاهچه‌های صنوبر با جدایه‌های قارچ سیتوسپورا، از روش تماس مستقیم با میسلیوم استفاده شد. در این روش، ابتدا جدایه قارچ بر روی محیط کشت PDA کشت داده شده و در دمای مناسب نگه‌داری شد. سپس از قسمت‌های کناری کلنی ۷ روزه قارچ، قطعاتی به ابعاد ۰/۵ سانتی‌متر مربع برش داده‌شد. گیاهچه‌های صنوبر که در دمای ۲۸ درجه سلسیوس و رطوبت ۸۰ درصد نگه‌داری می‌شدند، انتخاب شده، قسمت‌های جوان ساقه منتهی به شاخه فرعی دارای برگ ابتدا با اتانول ۹٦ درصد ضدعفونی سطحی شده، سپس زخمی به ابعاد بلوک آگار جداشده ایجاد نموده و بلوک قارچی حاوی روی آن قرار داده شد. محل زخم را به خوبی با پارافیلم پوشانده و در شرایط مناسب نگه‌داری شد. در نمونه‌های شاهد، از محیط کشت فاقد قارچ استفاده شد (۲۸). برای هر تیمار ۵ تکرار در نظر گرفته شد. در زمان انجام آزمون بیماری‌زایی، آبیاری تیمارها با آب آبیاری و در حد ظرفیت زراعی به صورت روزانه انجام شد.

اعمال تنش خشکی و بررسی خصوصیات رشدی: به منظور بررسی نقش همزیستی اکتومیکوریزایی در مقاومت به تنش خشکی در گیاهچه‌های سپیدار، نیمی از گیاهان تلقیح شده و نیمی از گیاهان تلقیح نشده (۱۰ گلدان از هر تیمار) تحت تنش خشکی قرار گرفتند (تنش خشکی از طریق کاهش تدریجی آب آبیاری تا توقف کامل آبیاری) (۲۹). پس از اعمال تنش خشکی، خصوصیات رشدی گیاهان مانند سطح برگ، وزن تر و خشک برگ، وزن تر و خشک ساقه، قطر و ارتفاع ساقه اصلی، وزن تر و خشک ریشه مورد بررسی قرار گرفتند. از هر تیمار مورد آزمایش، ۳ تکرار شامل شاداب‌ترین گیاهان، انتخاب شدند (۳۰). ارتفاع و قطر ساقه به وسیله خط‌کش با دقت میلی‌متر مورد ارزیابی قرار گرفتند. جهت اندازه‌گیری وزن خشک برگ، ساقه و ریشه، بافت‌های گیاهی به‌مدت ۴۸ ساعت در آون ۶۰ درجه سلسیوس قرار داده شدند. جهت اندازه‌گیری وزن تر برگ، ساقه و ریشه، از ترازو با دقت ۰/۰۰۱ گرم استفاده شد. اندازه‌گیری سطح برگ توسط دستگاه Win Area و برنامه Win Dias 2.0 انجام شد (۳۱).

اندازه‌گیری خصوصیات ریخت‌شناسی: به منظور بررسی میزان فتوسنتز، هدایت روزنه‌ای آب، غلظت CO_2 بین سلولی، میزان تعرق، کمبود فشار بخار بر اساس دمای برگ، نسبت CO_2 بین سلولی بر نسبت CO_2 محیط، از دستگاه LI-COR مدل LI-6400XT استفاده شد. در ساعات اولیه صبح، از جوان‌ترین برگ هر گیاه برای بررسی پارامترهای ذکر شده استفاده گردید (۳۲).

اندازه‌گیری آنزیم‌ها

تهیه بافر استخراج به‌منظور اندازه‌گیری آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی: استخراج آنزیم‌ها و سنجش آن‌ها براساس تلفیقی از روش‌های جیانوپولتیس و ریس (۳۳) و واناکر و همکاران (۳۴) انجام گردید. تمامی مراحل استخراج در سردخانه و در دمای حدود ۴ °C انجام گردید. مقدار ۱۵۰-۱۰۰ میلی‌گرم نمونه (برگ) در هاون چینی ریخته شد و با استفاده از ازت مایع به به حالت پودر درآمد. پودر حاصله در درون میکروتیوب‌های ۲ میلی‌لیتری ریخته و به آن ۱/۵ میلی‌لیتر بافر استخراج اضافه گردید. یک ساعت پس از مخلوط شدن پودر نمونه و بافر استخراج، نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰g سانتریفوژ و بعد از سانتریفوژ، محلول رویی به میکروتیوب‌های جدید منتقل گردید و در دمای ۴ درجه سلسیوس، در یخچال نگهداری شدند.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز بر اساس روش سیمینس و همکاران (۱۹۹۴) (۳۵)، ارزیابی فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز براساس روش جیانوپولیتیس و ریس (۳۳)، ارزیابی فعالیت آنزیم پراکسیداز بر اساس روش غناتی و همکاران (۲۰۰۲) (۳۶)، و سنجش مالون دی آلدئید بر اساس روش کرمر و همکاران (۱۹۹۱) (۳۷) صورت گرفت.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: این آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی در قالب فاکتوریل با شش تیمار و پنج تکرار انجام شد. فاکتورهای آزمایش شامل عامل بیولوژیک در دو سطح (بدون مایکوریز و دارای مایکوریز) و عامل تنش در سه سطح (بدون تنش، تنش خشکی و تنش بیمارگر سیتوسپورا) بودند. داده‌های آزمایشی با استفاده از نرم‌افزار SAS تجزیه و تحلیل شدند.

توالی‌یابی و آنالیز فیلوژنتیکی: توالی‌یابی محصول PCR با روش Sanger توسط شرکت بیومجیک انجام شد. توالی باند خالص به‌دست آمده توسط الگوریتم بلاست (BLAST) با توالی‌های نوکلئوتیدی پایگاه داده NCBI مورد مقایسه قرار گرفت، مقادیر

e-Value و Sequence similarity برای نتیجه‌گیری در مورد بهترین تطابق، مورد بررسی قرار گرفت. 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. تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی از طریق حداکثر احتمال (Maximum Likelihood) (مدل k2)، تحت بوت استرپ کامل انجام شد (۳۸).

نتایج و بحث

برقراری همزیستی اکتومیکوریزایی: بررسی ریشه‌های گیاهان تلقیح شده با قارچ اکتومیکوریز *L. bicolor* ۱٤ هفته پس از برقراری همزیستی، نشان داد که این همزیستی در سیستم ریشه‌ای گیاهان تلقیح شده وجود دارد. ساختارهای شاخص همزیستی اکتومیکوریزایی مانند غلاف هیفی (Hyphal mental) و شبکه هارتیگ (Hartig net) در ریشه‌های صنوبر تلقیح شده، مشاهده شد. در گیاهچه‌های شاهد هیچ‌گونه ساختار همزیستی و کلونیزاسیون ریشه مشاهده نشد.

نتایج شناسایی ریخت‌شناسی و مولکولی عامل شانکرسیتوسپورایی: پرگنه قارچ روی محیط PDA در دمای ۲۵ درجه و تاریکی، دارای رشد سریع بوده، بعد از گذشت ۳ روز به ٤۰ میلی‌متر و پس از گذشت یک هفته به ۹۰ میلی‌متر رسید. رنگ پرگنه در ابتدا سفید و پس از گذشت یک ماه به رنگ کرمی تا خاکستری تغییر یافت و میسلیوم‌های هوایی کوتاه، ظاهر پنبه مانند در سطح پرگنه ایجاد نمود. کنیدیوماتا پیکنیدیال، پراکنده و نیمه فرورفته در بافت میزبان، کنیدیوفورهایی که در امتداد لولکول‌ها وجود دارند شفاف، مستقیم و بدون انشعاب، دیواره نازک و منتهی به سلول‌های کنیدیوژن می‌شوند. کنیدی‌ها شفاف تا قهوه‌ای روشن، تک سلولی و با دیواره نازک، فاقد سپتا، کوچک و با اندازه (۳/۰-)۳/۰-۳/٦ (-٤/۰) × (۱/۰-)۰/۹-۱/۱(-۱/۰) میکرومتر هستند. نتایج به‌دست آمده با نتایج لارنس و همکاران (۲۰۱۸) مطابقت دارد (۳۹).

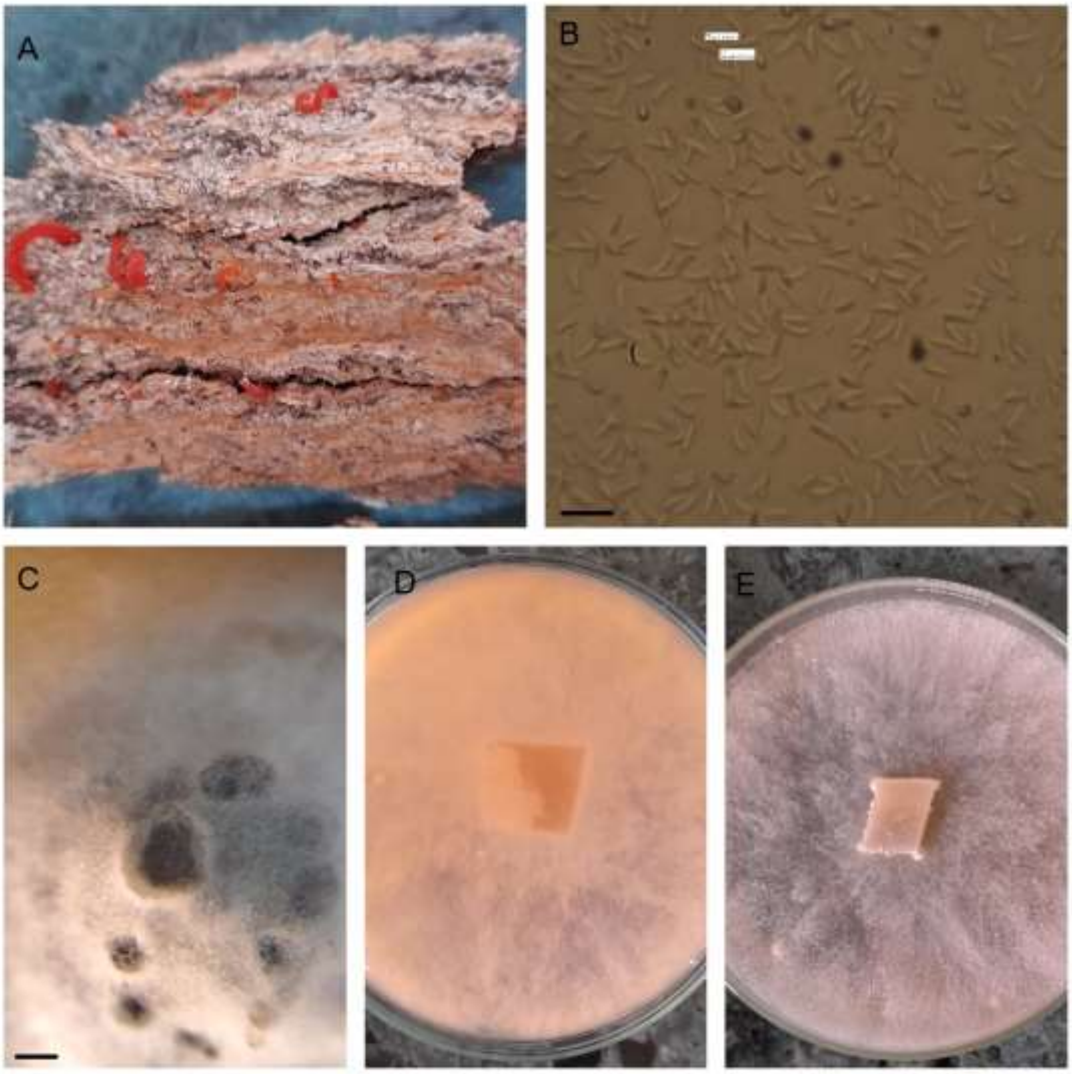
دوماه پس از مایه‌زنی قارچ عامل شانکر بر روی ساقه منتهی به شاخه، علائم زخم در قسمت‌های گیاه مشاهده نشد. زرد شدن برگ‌ها، خشکیدگی حاشیه برگ‌ها و سرخشکیدگی شاخه دوماه پس از مایه‌زنی در گیاهچه‌های تلقیح شده با قارچ *C. chrysosperma* در مقایسه با گونه‌های شاهد اتفاق افتاد.

توالی نوکلئوتیدی جدایه قارچی جداسازی شده با شماره دسترسی OQ132785 در بانک ژن ثبت شده است. نتایج بلاست توالی نوکلئوتیدی جدایه موردنظر در جدول ۱ آورده شده است. درخت فیلوژنتیکی رسم شده بر اساس حداکثر احتمال، نشان می‌دهد که گونه توالی‌یابی شده در این پژوهش، با گونه‌های *C. chrysosperma* مستخرج شده از مقالات معتبر و داده‌های NCBI در یک کلاد قرار می‌گیرد.

جدول ۱- نتایج شناسایی مولکولی قارچ *C. chrysosperma* با استفاده از آنالیز Blast.

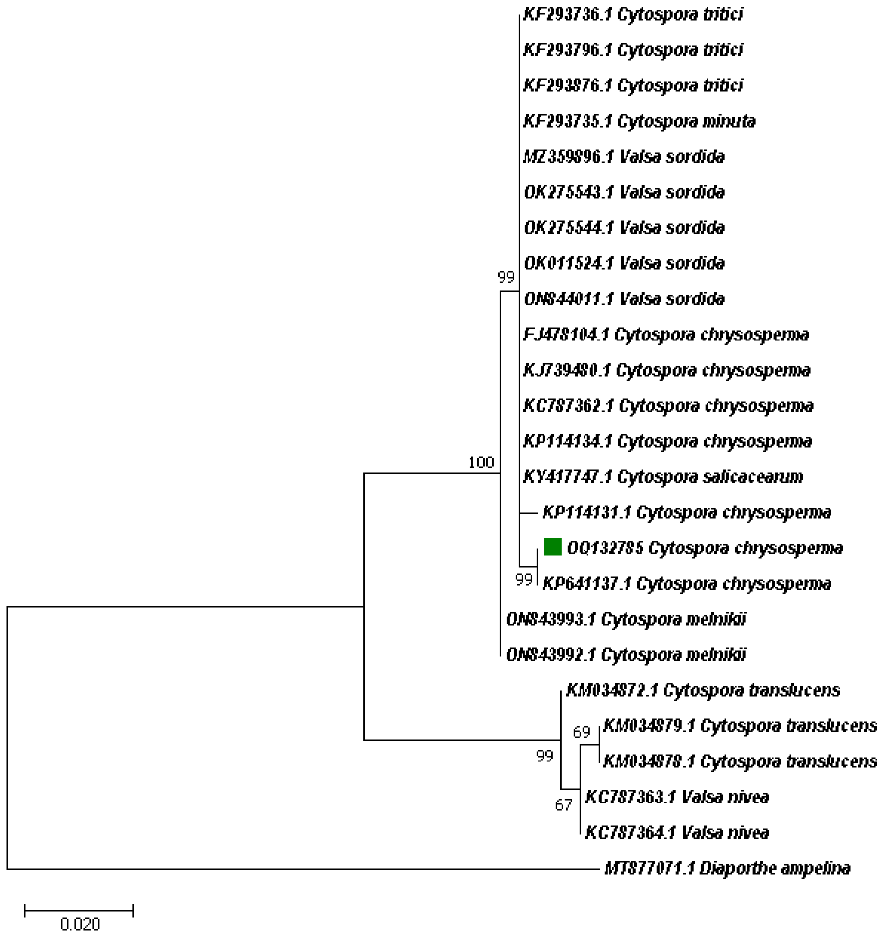
Table 1. Results of molecular identification of *C. chrysosperma* fugi using Blast analysis.

نام قارچ Name of fugi	طول ITS (bp)	کد دسترسی Access code	بالاترین تشابه Highest similarity	درصد تشابه Similarity%	کد دسترسی بالاترین تشابه The highest similarity access code
Cytospora chrysosperma	581 bp	OQ132785	*Valsa sordida*	99.65%	MZ359897



شکل ۱- A: بافت درخت صنوبر آلوده به شانکر سیتوسپورایی B: کنیدی‌های قارچ *C. chrysosperma*، خط‌کش ۱۰ میکرومتر.
C: پیکنید D& E: کشت هفت روزه قارچ بر روی محیط PDA.

Fig. 1. A. infected poplar tree with cytospora canker. B: Conidia, Bar: 10 µm. C: Pycnidia. D & E: 7 days culture of *C. chrysosperma* on PDA.



شکل ۲- درخت فیلوژنی استنباط شده با روش حداکثر احتمال توالی‌های بانک ژن. توسط نرم‌افزار MEGA7. ارتباط و نزدیکی بین توالی قارچ جداسازی شده (OQ132785) با سایر گونه‌های استخراج شده از NCBI. قارچ *Diaporthe ampelina* به عنوان برون‌گروه انتخاب شد.

Fig. 2. Phylogenetic tree by MEGA7. Relationship between the sequence of isolated fungi (OQ132785) with species extracted from NCBI. *Diaporthe amplenia* were used as outgroup.

نتایج ریخت‌شناسی: بر اساس اطلاعات جدول ۲ و شکل ۳، همزیستی میکوریزایی باعث افزایش سطح برگ، وزن تر و خشک برگ، وزن تر و خشک ریشه، وزن تر و خشک ساقه، ارتفاع ساقه در گیاهان دارای همزیستی در شرایط نرمال شده‌است و تحت شرایط تنش خشکی و شانکر سیتوسپورایی، اختلاف معنی‌داری با گیاهچه‌های فاقد همزیستی دارند. قطر ساقه در گیاهچه‌های دارای همزیستی و گیاهچه‌های شاهد اختلاف معنی‌داری نداشته است اما تحت شرایط تنش خشکی، قطر ساقه در گیاهچه‌های شاهد نسبت به گیاهچه‌های دارای همزیستی، دارای اختلاف معنی‌دار با یکدیگر می‌باشد. وزن تر ریشه در شرایط شانکر سیتوسپورایی فاقد اختلاف معنی‌دار بین شاهد و میکوریز بوده اما در وزن خشک ریشه در این تنش با یکدیگر اختلاف معنی‌داری دارند. بالاترین میزان وزن تر و خشک ساقه در گیاهچه‌های دارای همزیستی میکوریزایی در شرایط نرمال بوده و کم‌ترین میزان در شرایط شاهد تحت تنش خشکی مشاهده شده‌است.

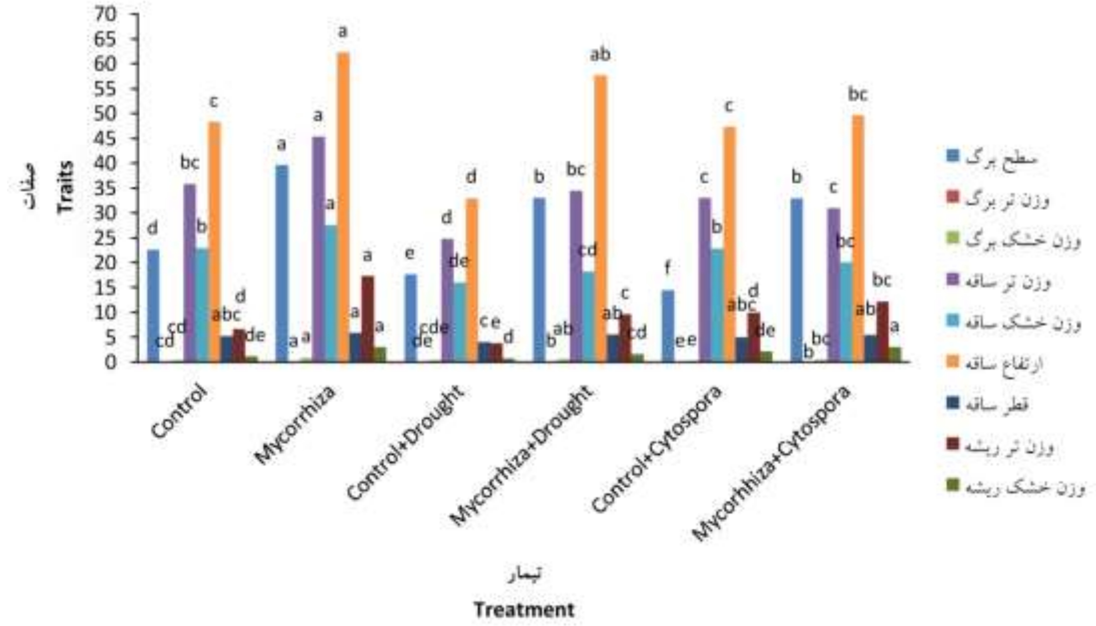
جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس اثر قارچ اکتومیکوریز بر صفات رشدی گیاه سپیدار بر اساس میانگین مربعات.

Table 2. Results of analysis of variance of the effect of ectomycorhizal fungi on morphological traits in poplar based on Means Squares (MS).

وزن خشک ریشه Root dry weight	وزن تر ریشه Root fresh weight	قطر ساقه Stem diameter	ارتفاع ساقه Stem height	وزن خشک ساقه Stem dry weight	وزن تر ساقه Stem fresh weight	وزن خشک برگ Leaf dry weight	وزن تر برگ Leaf fresh weight	سطح برگ Leaf area	درجه آزادی df	منبع تغییرات S.O.V
1.04**	175.28**	3.29**	760.50**	0.06**	149.01**	0.40**	2.69**	1453.53**	1	عامل بیولوژیک Biological factor
25.54**	47.82**	0.85*	151.38**	56.16**	129.35**	0.11**	0.026*	82.40*	2	عامل تنش Stress factor
16.11**	26.71**	0.43^{ns}	223.16**	19.47**	9.70**	0.019*	0.002^{ns}	1.06**	2	عامل بیولوژیک × عامل تنش Biologic × Stress
12.12	0.86	16.61	0.21	22.76	56.67	0.003	0.047	12.02	12	خطا Error
–	–	–	–	–	–	–	–	–	17	کل Total

* و ** به ترتیب نشان‌دهنده تفاوت معنی‌داری در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد می‌باشند

*, ** Respectively are significant difference at 5% and 1% probability levels



شکل ۳- نتایج مقایسه میانگین صفات رشدی گیاهچه‌های سپیدار در همزیستی میکوریزایی و غیر میکوریز و شرایط تنش (خشکی و سیتوسپورا) و غیر تنش (حروف غیرمشابه در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار می‌باشد).

Fig. 3. Results of mean comprasion of morphological traits betweein mycorrhizal and non-mycorrhizal poplar in stress (drought and Cytospora) and normal condition (Different letters in each column indicate a significant difference).

تحلیل داده‌های آنزیمی: سطح آنزیم کاتالاز در شرایط تنش خشکی و تنش سیتوسپورایی در گیاهچه‌های دارای همزیستی اختلاف معنی‌داری با گیاهچه‌های فاقد همزیستی دارد. در شرایط نرمال و بدون ایجاد تنش، سطح این آنزیم در گیاهچه‌های تلقیح شده و شاهد فاقد اختلاف معنی‌دار است که نشان می‌دهد با ایجاد تنش به گیاه، سیستم دفاعی در گیاهان دارای همزیستی زودتر و سریع‌تر واکنش دفاعی لازم را انجام می‌دهد.

میزان افزایش در محتوای MDA در گیاهچه‌های فاقد همزیستی تحت تنش خشکی و سیتوسپورایی افزایش معنی‌داری با گیاهچه‌های دارای همزیستی داشته‌است. در گیاهان دارای همزیستی میکوریزایی ثابت شده‌است که قارچ همزیست دارای مکانیسم‌هایی است که از افزایش این آنزیم و آسیب سلولی در شرایط تنش محافظت می‌کند.

بیش‌ترین مقدار آنزیم SOD در بین تیمارهای مورد بررسی، در گیاهچه‌های دارای همزیستی و در شرایط تنش خشکی به‌دست آمده است که اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها دارد. سوپراکسید دیسموتاز که یکی از اولین خطوط دفاعی گیاه در مقابله با گونه‌های اکسیژن فعال تولید شده در شرایط تنش است، افزایش بیش‌تری در گیاهچه‌های دارای همزیستی در شرایط تنش سیتوسپورایی و خشکی نسبت به تیمارهای فاقد همزیستی دارد.

فعالیت آنزیم پراکسیداز در گیاهچه‌های سپیدار دارای همزیستی در شرایط تنش خشکی، اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها دارد. هم‌چنین در گیاهچه‌های همزیست شده با قارچ در شرایط اعمال شانکر سیتوسپورایی، میزان آنزیم پراکسیداز تفاوت معنی‌داری با تیمارهای فاقد همزیستی داشته‌است ولی اختلاف آن با تیمار همزیست دارای خشکی، معنی‌دار نیست. می‌توان نتیجه گرفت افزایش بیش‌تر این آنزیم در شرایط تنش و در گیاهچه‌های دارای قارچ همزیست، به علت وجود قارچ همزیست و اثر آن بر سیستم دفاعی گیاه می‌باشد (شکل ٤). آنزیم پراکسیداز با جلوگیری از پراکسیداسیون لیپید و خروج الکترولیت‌ها مانع از آسیب غشا طی شرایط تنش خشکی می‌شود. طبق مطالعات انجام شده در گذشته، فعالیت آنزیم‌ها آنتی‌آکسیدانی مانند POD، SOD و کاتالاز، در گونه‌های مقاوم به تنش خشکی افزایش می‌یابد تا رادیکال‌های اکسیژن فعال تولید شده را حذف کنند (٤٠). کاهش فعالیت آنزیم‌هایی مانند کاتالاز می‌تواند سبب تجمع پراکسید هیدروژن و در نتیجه کاهش فعالیت برخی آنزیم‌های چرخه کالوین مانند ریبولوز مونوفسفات، کیناز و بی فسفاتاز گردد (٤١).

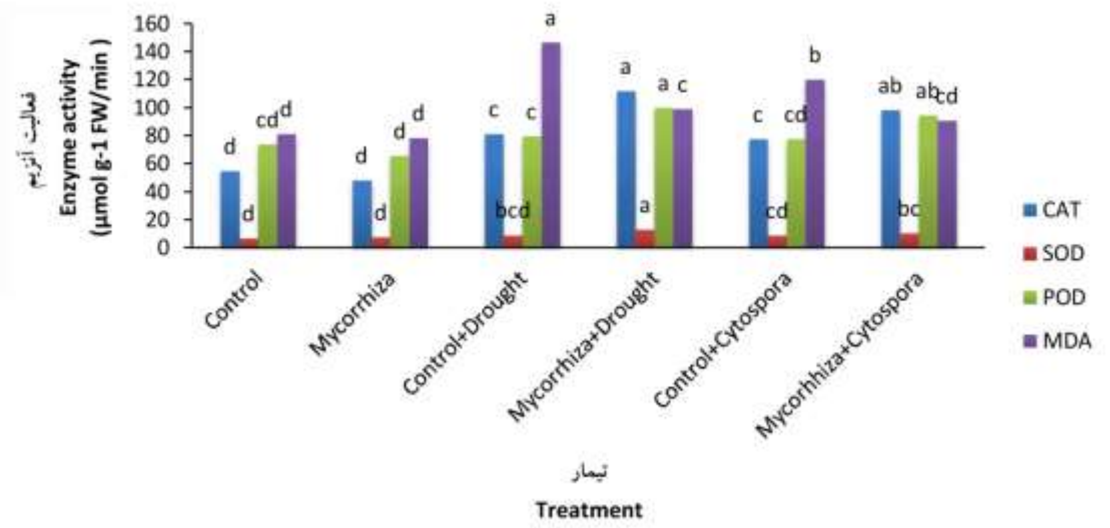
جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس اثر قارچ اکتومیکوریز بر آنزیم‌های گیاه سپیدار بر اساس میانگین مربعات.

Table 3. Results of analysis of variance of the effect of ectomycorhizal fungi on poplar enzymes based on Means Squares (MS).

منبع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	آنزیم کاتالاز Catalase	آنزیم مالون دی آلدئید MDA	آنزیم پراکسیداز POD	آنزیم سوپراکسید دیسموتاز SOD
عامل بیولوژیک Biological factor	1	1213.10*	4024.86**	421.87**	19.00**
عامل تنش Stress factor	2	3172.92**	3432.02**	696.51**	23.14**
عامل بیولوژیک × عامل تنش Biologic × Stress	2	702.01*	901.56*	363.90**	4.31*
خطا Error	12	162.03	167.72	43.96	1.11
کل Total	17	-	-	-	-

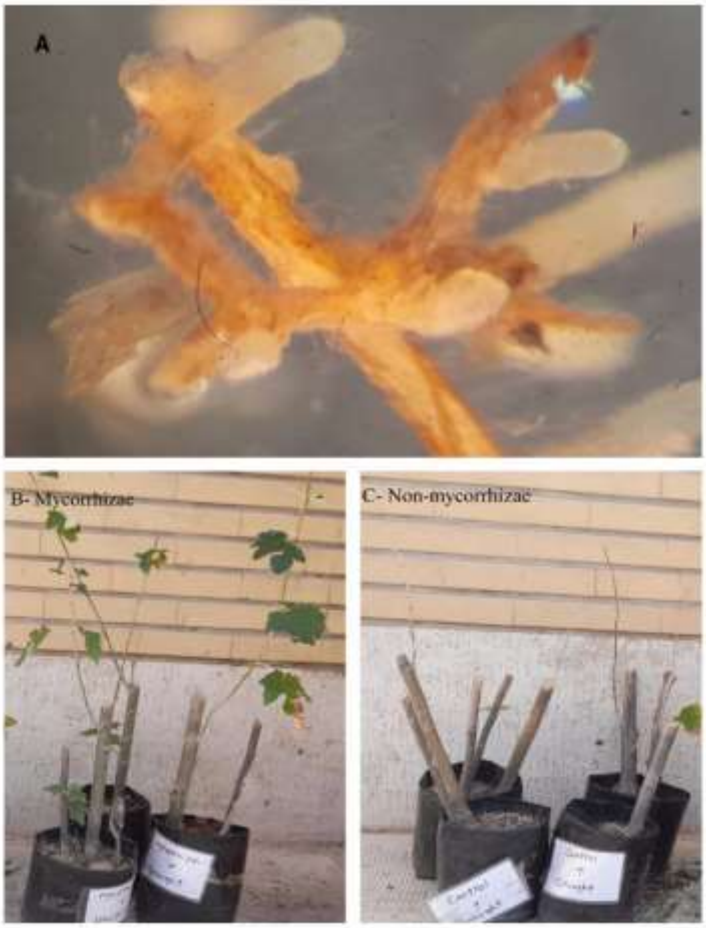
* و ** به ترتیب نشان‌دهنده تفاوت معنی‌داری در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد می‌باشند

*, ** Respectively are significant difference at 5% and 1% probability levels



شکل ٤- نتایج مقایسه میانگین آنزیم‌های گیاهی در تیمارهای میکوریزی و غیر میکوریزی در شرایط تنش (خشکی و سیتوسپورا) و غیر تنش (حروف غیر مشابه در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار می‌باشد).

Fig. 4. Results of mean comparsion of enzymes in mycorrhizal and non-mycorrhizal in stress (drought and Cytospora) and normal condition (Different letters in each column indicate a significant difference).



شکل ٥- A: نوک ریشه‌های گیاهچه‌های سپیدار ١٤ هفته پس از تلقیح قارچ *L. bicolor*.
B و C: گیاهچه‌های میکوریزی و غیر میکوریزی در شرایط تنش خشکی.
Fig. 5. A: Establishing ectomycorrhizal symbiosis in the root tips of poplar 14weeks after inoculation by *L. bicolor*. B & C: Mycorrhizal and Non-mycorrhizal seedlings in water stress.

بر اساس اطلاعات جدول ٤ و شکل ٦، میزان فتوسنتز در گیاهچه‌های میکوریز دارای اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها می‌باشد. با اعمال تنش خشکی و سیتوسپورایی، میانگین میزان فتوسنتز در گیاهچه‌های شاهد+خشکی و شاهد + سیتوسپورا، اختلاف معنی‌داری با گیاهچه‌های میکوریزا + خشکی و میکوریزا + سیتوسپورا داشته و به شدت کاهش یافته‌است که با نتایج هانگ و همکاران (٢٠٢٢) مطابقت دارد. میزان هدایت روزنه‌ای در تیمار گیاهان میکوریزی فاقد تنش، تفاوت معنی‌داری با گیاهان غیر میکوریزی در شرایط تنش خشکی و سیتوسپورایی داشته‌است و در شرایط تنش گیاهان فاقد همزیستی مقادیر کم‌تری از هدایت روزنه‌ای آب را از خود نشان می‌دهند. غلظت CO_2 بین سلولی تنها میان گیاهچه میکوریزی در شرایط غیرتنش و گیاهچه‌های فاقد همزیستی تحت تنش خشکی با یکدیگر تفاوت معنی‌دار دارند. بیش‌ترین میزان تعرق در گیاهچه‌های دارای همزیستی میکوریزایی بوده‌است. بنا بر نتایج به دست آمده، نرخ تعرق در گیاهچه‌های میکوریزی در شرایط تنش کاهش کم‌تری نسبت به گیاهچه‌های فاقد همزیستی در شرایط تنش داشته، که نقش قارچ همزیست در ثابت نگه‌داشتن شرایط گیاه را نشان می‌دهد (٤٢).

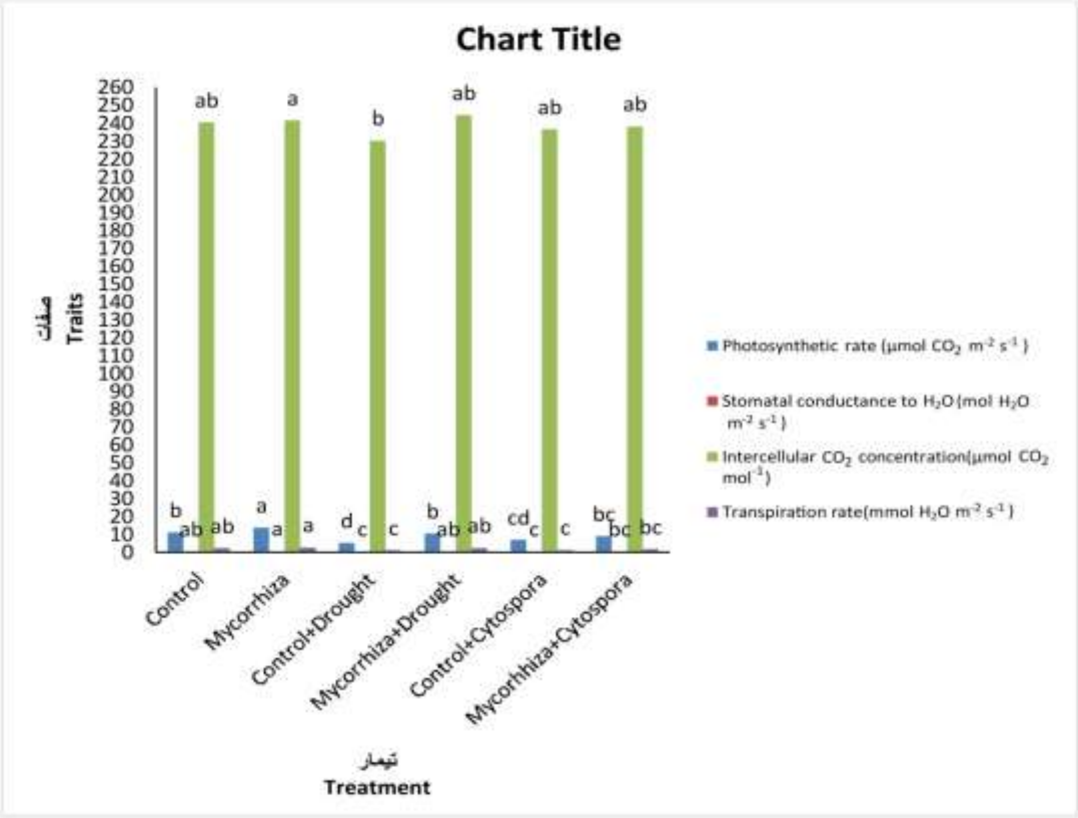
جدول ٤- نتایج تجزیه واریانس اثر قارچ اکتومیکوریز بر خصوصیات فیزیولوژیکی گیاه سپیدار بر اساس میانگین مربعات.

Table 4. Results of analysis of variance of the effect of ectomycorhizal fungi on physiological characteristics of poplar based on Means Squares (MS).

میزان تعرق Transpiration rate	میزان CO_2 بین سلولی Intercellular CO_2	میزان هدایت روزنه‌ای Stomatal conductance	میزان فتوسنتز Photosynthetic rate	درجه آزادی df	منبع تغییرات S.O.V
2.22**	130.22**	0.06**	54.04**	1	عامل بیولوژیک Biological factor
1.76**	286.83*	0.050**	39.78**	2	عامل تنش Stress factor
0.35*	48.05 ns	0.010*	4.59 ns	2	عامل بیولوژیک × عامل تنش Biologic × Stress
0.087	70.78	0.002	2.01	12	خطا Error
-	-	-	-	17	کل Total

* و ** به ترتیب نشان‌دهنده تفاوت معنی‌داری در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد می‌باشند

*, ** Respectively are significant difference at 5% and 1% probability levels



شکل ٦- نتایج مقایسه میانگین خصوصیات فیزیولوژیکی گیاهچه‌های صنوبر دارای همزیستی و فاقد همزیستی در شرایط تنش (خشکی و سیتوسپورا) و غیر تنش (حروف غیر مشابه در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار می‌باشد).

Fig. 6. Results of mean comparison of physiological characteristics between mycorrhizal and non mycorrhizal poplar seddlings in stress and normal conditions (Different letters in each column indicate a significant difference).

گیاهان دارای رابطه همزیستی با قارچ‌های اکتومیکوریز، دارای توانایی رشد و تحمل بالاتری نسبت به تنش‌های زیستی و غیر زیستی هستند که این رابطه هم‌زیستی را برای شیوه‌های جنگل‌داری، دارای اهمیت می‌کند. اکتومیکوریزها باعث افزایش جذب مواد معدنی و آب در گیاهان میزبان خود می‌شوند، با این وجود؛ در بیش‌تر موارد همزیستی اکتومیکوریزایی باعث کاهش اثرات منفی تنش خشکی و مقاوم‌تر شدن گیاه میزبان به خشکی، گزارش شده است (۴۳، ٤٤). مکانیسم‌های متعددی تاکنون پیشنهاد شده‌است که قارچ‌های اکتومیکوریز از طریق آن می‌توانند تحمل به خشکی را افزایش دهند. مکانیسم‌های مستقیم شامل افزایش گسترش سیستم ریشه به دلیل تشکیل ریشه جانبی بیش‌تر در گیاهان اکتومیکوریزی، جذب و انتقال آب توسط میسلیوم‌های خارج سلولی گسترده گونه‌های قارچی اکتومیکوریز که با ایجاد هیف‌های تخصصی، باعث جذب آب و رساندن آن به ریشه میکوریزی می‌شوند (٤٥). این افزایش سطح جذب می‌تواند منجر به هدایت بیش‌تر ریشه و در نتیجه افزایش جذب کربن در شرایط تنش شود. یکی از مکانیسم‌های غیر مستقیم افزایش تحمل به تنش، تسهیل کسب مواد مغذی توسط اکتومیکوریزا است. تغذیه مواد معدنی کافی باعث بهبود کارایی فرایند فتوسنتز گیاه شده که در نتیجه باعث بهبود عملکرد گیاه و بهبودی پس از تنش می‌شود (٤٦). یکی دیگر از مکانیسم‌های پیشنهادی، فعال‌سازی سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاه است که گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) تولید شده در طول خشکسالی را کاهش داده و باعث کم‌تر شدن آسیب خسارت سلولی می‌شوند (٤٧). علاوه بر این، ظرفیت گیاهان میکوریزی برای تحمل خشکی با تنظیم اسمزی مربوط به سطوح قند بالا نیز در مطالعات بسیاری گزارش شده‌است (٤٨). از آن‌جایی‌که سطوح قند در گیاهان میکوریز به نرخ تثبیت CO_2 در مقابل صادرات شکر به قارچ (اثر سینک) بستگی دارد، تثبیت بیش‌تر CO_2 در شرایط خشکسالی، منجر به افزایش سطح قند می‌شود. مطالعات هم‌چنین نشان داده‌است که بهبود فتوسنتز در شرایط تنش خشکی را می‌توان به افزایش فعالیت اثر سینک قند در همزیستی اکتومیکوریزایی نسبت داد (٤٩). تلقیح قارچ همزیست به گیاهچه‌های کبوده در این پژوهش باعث افزایش نرخ فتوسنتز، افزایش هدایت روزنه‌ای، افزایش کربن دی اکسید بین سلولی و میزان تعرق در گیاهان میکوریزی و کاهش آسیب‌های ناشی از تنش خشکی و بیمارگر منجر شده است که با نتایج ماتور و همکاران (۲۰۱۸) و تانگ و همکاران (۲۰۱٤) مطابقت دارد (۵۰، ۵۱).

افزایش صفات رشدی در گیاهچه‌های میکوریزی در این پژوهش را می‌توان به نقش قارچ‌های اکتومیکوریز در افزایش جذب عناصر غذایی و افزایش میزان کلروفیل مربوط دانست. افزایش کلروفیل منجر به افزایش جذب نور و در نتیجه افزایش فتوسنتز شده که باعث افزایش رشد و وزن خشک و تر گیاهچه‌های دارای همزیستی می‌شود که با نتایج مرنکا و همکاران (۲۰۱۰) مطابقت دارد (۵۲). قارچ همزیست هم‌چنین موجب افزایش میزان جذب آب در گیاه میزبان نسبت به تیمارهای غیر میکوریزایی شده، افزایش جذب آب موجب تورژسانس در سلول‌ها می‌گردد که این خود عامل محرک طویل شدن سلول‌ها می‌باشد. گسترش سیستم هیفی در اطراف ریشه گیاه میزبان و در نتیجه افزایش تماس ریشه با خاک، موجب بالابردن توانایی جذب آب در گیاهان میکوریزایی می‌شود. علاوه بر این، قارچ همزیست جذب عناصر غذایی از خاک، فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیر آنزیمی را در میزبان افزایش داده و موجب افزایش رشد اندام‌های هوایی و

ماده خشک آن‌ها می‌گردد (۵۳). پولانکو و همکاران (۲۰۱۹) در نتایج پژوهش‌های خود نشان داده‌اند وجود یک سیستم هماهنگ قارچ-گیاه، مکانیسم‌های مختلف دخیل در جذب آب در صنوبرهای همزیست شده با قارچ *L. bicolor* را در شرایط کم آبی، تنظیم می‌کند (٥٤). مطالعات زیادی در خصوص تأثیرات مثبت قارچ‌های اکتومیکوریز بر رشد نهال‌های جوان صنوبر در شرایط تنش خشکی انجام شده‌است. اسکرزواسکا (۲۰۲۲) در مطالعه اثرات شوری و کم‌آبی بر روی گیاهچه‌های صنوبر بیان نمود غلظت‌های مختلف نمک و خشکی اگر چه برروی میزان عناصر شیمیایی برگ مانند نیتروژن، فسفر و پتاسیم اثر معنی‌داری نداشته است، اما تأثیر معنی‌داری بر روی تعداد برگ، وزن تر و خشک برگ، وزن خشک و تر ساقه داشته است (١٦). دنیلسن و همکاران (٢٠١٤) در مطالعه‌ای بیان کرده‌اند که در شرایط تنش کم‌آبی، میزان هدایت روزنه‌ای در گیاهچه‌های صنوبر دارای همزیستی اکتومیکوریزایی در مقایسه با گیاهچه‌های فاقد همزیستی بالاتر بوده‌است، میزان کاتیون‌ها مانند پتاسیم و قندهای محلول در برگ افزایش داشته و میزان مرگ و میر ریشه در گیاهچه‌های میکوریزی نسبت به غیر میکوریزی کم‌تر بوده‌است (٥٥).

مکانیسم‌های اصلی مهار فعالیت گونه‌های ROS، سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و آسکوربات پراکسیداز (APX) می‌باشند (٥٦). سوپراکسید دیسموتاز به عنوان اولین خط دفاعی علیه ROS عمل نموده و سوپراکسید را به H_2O_2 تبدیل می‌کند. در حالی‌که کاتالاز مستقیماً H_2O و O_2 را تشکیل می‌دهد، آسکوربات پراکسیداز نیازمند آسکوربات و گلوتاتیون از سیکل آسکوربات-گلوتاتیون برای سیستم بازسازی است (٥٧). برخی آنزیم‌های دفاعی مانند پراکسیداز (POD) و ال- فنیل آلانین آمونیاک لیاز (LAP)، نیز قادر به کاهش اثرات منفی ROS می‌باشند. افزایش فعالیت پراکسیداز می‌تواند باعث اکسیداسیون فنول به کینون شده که برای قارچ‌های بیماری‌زا مضر است. PAL نیز یکی از آنزیم‌های مهم متابولیسم فنول است و بر سنتز ترکیبات فنلی تأثیر می‌گذارد (٥٨).

نتایج پژوهش‌های نشان داده‌است که تلقیح گیاه‌چه‌های صنوبر با قارچ‌های میکوریز *Boletus luridus* و *Glomus mosseae* باعث کاهش بروز شانکر در صنوبر؛ افزایش فعالیت POD و PAL در ریشه، ساقه، و برگ؛ و کاهش محتوای MDA شده‌است (٥٩). بر اساس نتایج به‌دست آمده از پژوهش حاضر، تلقیح گیاهچه‌های سپیدار با قارچ *L. bicolor* باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و باعث تغییر محتوای آن‌ها در ریشه می‌شود. هم‌چنین همزیستی اکتومیکوریزایی باعث کاهش محتوای MDA در ریشه شده‌است که نشان می‌دهد قارچ *L. bicolor* می‌تواند به‌طور قابل توجهی اثرات گونه‌های اکسیژن فعال بر روی ریشه‌ها در شرایط تنش بیماری شانکر سیتوسپورایی را کاهش دهد. این تغییرات در فعالیت آنزیم‌ها نتیجه تغییر در سطح بیان برخی ژن‌ها است که این امر می‌تواند تأییدی بر این نکته باشد که قارچ اکتومیکوریز بیان ژن‌های ریشه را در شرایط تنش بیماری، تغییر می‌دهد (٦٠).

گیاهان در فرایند مقاومت به عفونت‌های ایجاد شده توسط قارچ‌های بیمارگر، مجموعه‌ای از مکانیسم‌های پیچیده و کارآمد را تکامل داده‌اند. پس از این‌که گیرنده‌های روی سطح سلول‌های گیاهی، قارچ بیمارگر را شناسایی کنند، سیگنال‌های مقاومت به بیماری تولید می‌شود که در کل گیاه پخش شده و سطح بیان ژن‌ها را تغییر داده و درنهایت تولید مواد ضد بیماری برای مهار یا از بین بردن قارچ بیمارگر،

صورت می‌گیرد. نتایج پژوهش‌های وانگ و همکاران (۲۰۲۱) اثبات نموده‌است که قارچ اکتومیکوریز برای افزایش مقاومت در نهال‌های کاج به بیماری بلایت، با سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی تعامل دارد. آنزیم‌های آنتی اکسیدانی قادر به از بین بردن رادیکال‌های آزاد اضافی در گیاهان و کاهش میزان پراکسیداسیون می‌باشند. نتایج به‌دست آمده در این پژوهش نیز با نتایج وانگ و همکاران (۲۰۲۱) مطابقت دارد (۶۱).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج یافته‌های این پژوهش نشان داد که قارچ *C. chrysosperma* یکی از عوامل ایجاد شانکر سیتوسپورایی در گونه‌های صنوبر است. استفاده از قارچ همزیست *L. bicolor* باعث افزایش مقاومت گونه‌های سپیدار به این بیماری در شرایط گلخانه شد. استفاده از قارچ همزیست تأثیر مثبتی بر فاکتورهای رشد گیاهچه‌های دارای همزیستی نسبت به شاهد داشته‌است و خصوصیات فیزیولوژیک گیاه مانند فتوسنتز و تعرق را افزایش داده‌است. بنابراین این پژوهش می‌تواند گامی موثر در راستای مطالعه‌های جامع‌تر در خصوص بهینه‌سازی استفاده از قارچ‌های اکتومیکوریز به عنوان عاملی کارامد در مقابله با تنش‌های زیستی و سازگار با محیط زیست باشد.

منابع

1. Brundrett, M. C. & Tedersoo, L. (2018). Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. *New Phytology*, 220, 1108-1115.
2. Pan, Y., Birdsey, R. A., Phillips, O. L. & Jackson, R. B. (2013). The structure, distribution, and biomass of the world’s forests. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 44, 593-622.
3. Garcia, K. & Zimmermann, S. D. (2014). The role of mycorrhizal associations in plant potassium nutrition. *Front. Plant Sciences*, 5, 337.
4. Garcia, K., Chasman, D., Roy, S. & Ané, J. M. (2017). Physiological responses and gene co-expression network of mycorrhizal roots under K1 deprivation. *Plant Physiology*, 173, 1811-1823.
5. Xu, H., Kemppainen, M., El-Kayal, W., Lee, S. H., Pardo, A. G. & Cooke, J. E. (2015). Overexpression of *Laccaria bicolor* aquaporin JQ585595 alters root water transport properties in ectomycorrhizal white spruce (*Picea glauca*) seedlings. *New Phytology*, 205, 757-770.
6. Muller, A., Volmer, K., Mishra-Knyrim, M. & Polle, A. (2013). Growing poplars for research with and without mycorrhizas. *Frontiers in Plant Science*, 17, 35-46.
7. Fischer, U. & Polle, A. (2010). *Populus* responses to abiotic stress. In: Jansson, S., Bhalerao, R., Groover, A. (Eds.), Genetics and Genomics of *Populus*. *SpringerVerlag*, Berlin, pp. 225-247.
8. Sixto, H., Aranda, I. & Grau, J. M. (2006). Assessment of salt tolerance in *Populus alba* clones using chlorophyll fluorescence. *Photosynthetica*, 44, 169-173.
9. Ni, B. R., & Pallardy, S. G. (1991). Response of gas exchange to water stress in seedlings of woody angiosperms. *Tree Physiology*, 8 (1), 1-9.
10. Lesk, C., Rowhani, P. & Ramankutty, N. (2016). Influence of extreme weather disasters on global crop production. *Nature*. 529, 84-87.
11. van der Molen, M. K., Dolman, A. J., Ciais, P., Eglin, T., Gobron, N. & Law, B. E. (2011). Drought and ecosystem carbon cycling. *Meteorol*. 151, 765-773.
12. Zwicke, M., Picon-Cochard, C., Morvan-Bertrand, A., Prud'homme, M. P., & Volaire, F. (2015). What functional strategies drive drought survival and recovery of perennial species from upland grassland? *Botany*, 116, 1001-1015.
13. Perrone, I., Pagliarani, C., Lovisolo, C., Chitarra, W., Roman, F. & Schubert, A. (2012). Recovery from water stress affects grape leaf petiole transcriptome. *Planta*, 235, 1383-1396.

14. Wallace, J. G., Zhang, X. C., Beyene, Y., Semagn, K., Olsen, M. & Prasanna, B. M. (2016). Genome-wide Association for Plant Height and Flowering Time across 15 Tropical Maize Populations under Managed Drought Stress and Well-Watered Conditions in Sub-Saharan Africa. *Crop Sci.* 56, 2365-2378.
15. Deeba, F., Pandey, A. K., Ranjan, S., Mishra, A., Singh, R. & Sharma, Y. K. (2012). Physiological and proteomic responses of cotton (*Gossypium herbaceum* L.) to drought stress. *Plant Physiology. Bioch.* 53, 6-18.
16. Kulczyk-Skrzeszewska, M. & Kieliszewska-Rokicka, B. (2022). Influence of drought and salt stress on the growth of young *Populus nigra* 'Italica' plants and associated mycorrhizal fungi and non-mycorrhizal fungal endophytes. *New Forests*, 53, 679-694.
17. Adams, G. C., Roux, J. & Wingfield, M. J. (2005). Phylogenetic relationships and morphology of *Cytospora* species and related teleomorphs (*Ascomycota, Diaporthales, Valsaceae*) from Eucalyptus. *Studies in Mycology*, 52, 1-144.
18. Fan, X., Bezerra, J., Tian., Ch. & W-Crous, P. (2020). *Cytospora* (*Diaporthales*) in China. *Persoonia*, 45(1), 13-28.
19. Abelleira, A., Moura, L., Aguín, O. & Salinero, C. (2019). First Report of *Lonsdalea populi* Causing Bark Canker Disease on Poplar in Portugal. *Plant Disease*, 103, 2121.
20. Dang, F., Wang, Y. & Tang, M. (2021). Effects of *Laccaria bicolor* on Gene Expression of *Populus trichocarpa* Root under Poplar Canker Stress. *Journal of Fungi*. 7(12), 24-33.
21. Lu, N., Yu, M., Cui, M., Luo, Z., Feng, Y., Cao, S., Sun, Y. & Li, Y. (2016). Effects of different ectomycorrhizal fungal inoculates on the growth of *Pinus tabulaeformis* seedlings under greenhouse conditions. *Forests*, 7(12), 316.
22. Otgunsuren, B., Rewald, B., Godbold, D. L. & Goransson, H. (2016). Ectomycorrhizal inoculation of *Populus nigra* modifies the response of absorptive root respiration and root surface enzyme activity to salinity stress. *Flora*. 29p.
23. Kariman, Kh., Barker, S. J., Finnegan, P. M. & Tibbett, M. (2012). Dual mycorrhizal associations of jarrah (*Eucalyptus marginata*) in a nurse-pot system. *Australian Journal of Botany*, 60, 661-668.
24. 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 (15), 11-27. [In Persian]
25. Agerer, R. (1987–2012). Colour atlas of ectomycorrhizae. 1st–15th delivery, Einhorn, Schwäbisch Gmünd.
26. Lawrence, D. P., Holland, L. A., Nouri, M. T., Travadon, R., Abramians, A., Michailides, T. J. & Trouillas, F. P. (2018). Molecular phylogeny of *Cytospora* species associated with canker diseases of fruit and nut crops in California, with the descriptions of ten new species and one new combination. *Fungus*, 9 (2), 333-370.
27. Zamani, S. M., Ghamari Zare, A., Emam, M. & Bayat Tork, D. (2020). Effect of ectomycorrhizal fungi on the acclimatization of micropropageted *Querqus castaneifolia* plantles in greenhouse. *Irannature*, 5, 6-25.
28. Worrall, J. J., Adams, G. C. & Tharp, S. C. (2010). Summer heat and an epidemic of *Cytospora* canker of Alnus. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 32,376-86.
29. Luo, Zh. B., Li, K., Jiang, X. & Polle, A. (2009a). Ectomycorrhizal fungus (*Paxillus involutus*) and hydrogels affect performance of *Populus euphratica* exposed to drought stress. *Annals of Forest Science*, 66, 106-116.
30. Luo, Z. B., Li, K., Jiang, X. & Polle, A. (2009b). The ectomycorrhizal fungus (*Paxillus involutus*) and hydrogels effect drought tolerance of *Populus euphratica*. *Annals of Forest Science*. 66, 106-116.
31. Kafi, M., Daneshvar Hakimi Meybodi, N., Nikbakht, A., Rejali, F. & Daneshkhah, M. (2013). Effect of humic

acid and mycorrhiza fungi on some characteristics of "Speedy green" perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). greenhouse cultivation. *Sciences and Technology greenhouse culture,* 4, 49-58. [In Persian]

32. Garen, J. C., Branch, H. A., Borrego, I., Blonder, B., Stinziano, J. R. & Michaletz, S. T. (2022). Gas exchange analysers exhibit large measurement error driven by internal thermal gradients. *New Phytologist.* 236, 369-384.
33. Giannopolitis, C. N. & Ries, S. K. (1977). Superoxide Dismutases. *Plant Physiology,* 59, 309-314.
34. Vanacker, Carver, & Foyer. (1998). Pathogen-induced changes in the antioxidant status of the apoplast in barley leaves. *Plant Physiology,* 117(3), 1103-14.
35. Siminis, C. I., Kanellis, A. K. & Roubelakis-Angelakis, K. A. (1994). Catalase Is Differentially Expressed in Dividing and Nondividing Protoplasts. *Plant Physiol.* 105(4), 1375-1383.
36. Ghanati, F., Morita, A. & Yokota, H. (2002). Induction of suberin and increase of lignin content by excess boron in tobacco cells. *Soil Sciences Plant,* 48, 357-364.
37. Kramer, G. F., Norman, H. A., Krizek, D. T. & Mirecki, R. M. (1991). Influence of UV-B radiation on polyamines, lipid peroxidation and membrane lipids in cucumber. *Phytochemistry,* 30, 2101-2108.
38. Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance and Maximum parsimony Methods. *Molecular Biology and evolution*.
39. Lawrence, D. P., Holland, L. A., Nouri, M. T., Travadon, R., Abramians, A., Michailides, T. J. & Trouillas, F. P. (2018). Molecular phylogeny of *Cytospora* species associated with canker diseases of fruit and nut crops in California, with the descriptions of ten new species and one new combination. *Fungus,* 9 (2), 333-370.
40. Abrishamchi, P., Ganjeali, A. & Sakeni, H. (2013). Evaluation of morphological traits, proline content and antioxidant enzymes activity in chickpea genotypes (*Cicer arietinum* L.) under drought stress. *Iranian Journal of Pulses Research,* 2, 46-53.
41. Amini, Z., Haddad, R. & Moradi. F. (2008). Effect of water deficit on the activity of antioxidant enzymes in plant reproductive development Barley. *Science and Technology of Agriculture and Natural Resources,* 12, 46-58. [In Farsi]
42. Huang, C., He, X., Shi, R., Zi, Sh., Xi, C., Li, X. & Liu, T. (2022). Mycorrhizal fungi reduce the photosystem damage caused by drought stress on *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*. *Research square,* 7, *35-45*.
43. Mohan, J. E., Cowden, C. C., Baas, P., Dawadi, A., Frankson, P. T., Helmick, K., Hughes, E., Khan, S., Lang, A., Machmuller, M., Taylor, M. & Witt, C. A. (2014). Mycorrhizal fungi mediation of terrestrial ecosystem responses to global change: mini-review. *Fungal Ecology,* 10, 3-19.
44. Kivlin, S. N., Emery, S. M. & Rudgers, J. A. (2013). Fungal symbionts alter plant responses to global change. *Journal of Botany,* 100(7), 1445-1457.
45. Plamboeck, A. H., Dawson, T. E., Egerton-Warburton, L. E., North, M., Bruns, T. D. & Querejeta, J. I. (2007). Water transfer via ectomycorrhizal fungal hyphae to conifer seedlings. *Mycorrhiza.* 17(5), 439-447.
46. Alvarez, M., Huygens, D., Olivares, E., Saavedra, I., Alberdi, M. & Valenzuela, E. (2009a). Ectomycorrhizal fungi enhance nitrogen and phosphorus nutrition of *Nothofagus dombeyi* under drought conditions by regulating assimilative enzyme activities. *Physiol. Plant.* 136(4), 426–436.
47. Alvarez, M., Huygens, D., Fernandez, C., Gacitua, Y., Olivares, E., Saavedra, I., Alberdi, M. & Valenzuela, E. (2009b). Effect of ectomycorrhizal colonization and drought on reactive oxygen species metabolism of

Nothofagus dombeyi roots. *Tree Physiol.* 29(8), 1047-1057.

48. Yooyongwech, S., Phaukinsang, N., Cha-um, S. & Supaibulwatana, K. (2013). Arbuscular mycorrhiza improved growth performance in *Macadamia tetraphylla* L. grown under water deficit stress involves soluble sugar and proline accumulation. *Plant Growth Regul.* 69(3), 285-293.
49. Dosskey, M. G., Boersma, L. & Linderman, R. G. (1991). Role for the photosynthate demand of ectomycorrhizas in the response of Douglas fir seedlings to drying soil. *New Phytol.* 117(2), 327-334.
50. Mathur, S., Sharma, M. P. & Jajoo, A. (2018). Improved photosynthetic efficacy of maize (*Zea mays*) plants with Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) under high temperature stress. *Journal of Photochem Photobiol B,* 180,149-154.
51. Tang, M., Zhu, X. Q. & Chen, et al. (2014). Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on photosynthesis, carbon content, and calorific value of black locust seedlings. *Photosynthetica International Journal for Photosynthesis Research,* 6, 123-132.
52. Mrnka, L., Kuchar, M., Cieslarova, Z., Matejka, P., Szakova, J., Tlustos, P. & Vosatka, M. (2012). Effects of Endo- and Ectomycorrhizal Fungi on Physiological Parameters and Heavy Metals Accumulation of Two Species from the Family *Salicaceae*. *Water, Air, & Soil Pollut*. 223, 399-410.
53. Bian, S. & Jiang, Y. (2009). Reactive oxygen species, antioxidant enzyme activities and gene expression patterns in leaves and roots of Kentucky bluegrass in response to drought stress and recovery. *Sci. Hort*. 120, 264-270. 10.1016/j.scienta.2008.10.014.
54. Calvo-Polanco, M., Armada, E., Zamarreno, A. M., Gracia-Mina, J. M. & Aroca, R. (2019). Local root ABA/cytokinin status and aquaporins regulate poplar responses to mild drought stress independently of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*. *Journal of Experimental Botany*. 70 (21), 6437-6446.
55. Danielsen, L. & Polle, A. (2014). Poplar nutrition under drought as affected by ectomycorrhizal Colonization. *Environmental and Experimental Botany*. 10p.
56. Wu, Q. S., Zou, Y. N., Xia, R. X. & Wangi, M. Y. (2009). Mycorrhiza has a direct effect on reactive oxygen metabolism of drought–stressed citrus. *Soil, Environmental and Atmospheric Sciences,* 55(10), 436-442.
57. Apel, K. & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology,* 55, 373-379.
58. Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S. & Pessarakli, M. (2012). Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany,* 1-26.
59. Zhan, W., Liu, H. & Tang, M. (2010). Physiological and Biochemical Mechanism of Mycorrhizal Fungi Improving the Resistance of Poplar to Canker Disease. *Acta Botany Boreali-Occident. Sin,* 30, 2437-2443.
60. Mekapogu, M., Jung, J. A., Kwon, O. K., Ahn, M. S., Song, H. Y. & Jang, S. (2021). Recent Progress in Enhancing Fungal Disease Resistance in Ornamental Plants. *International Journal of Molecular Sciences,* 22, 7956.
61. Wang, J., Zhang, H., Gao, J., Zhang, Y., Liu, Y. & Tang, M. (2021). Effects of ectomycorrhizal fungi (*Suillus variegatus*) on the growth, hydraulic function, and non-structural carbohydrates of Pinus tabulaeformis under drought stress. *BMC Plant Biology*. 21, 171.