



## بردباری نونهال‌های بلوط ایرانی (*Quercus brantii* Lindl.) تلقیح‌شده با قارچ اکتومیکوریز ترافل تابستانه (*Tuber aestivum* Vittad.) تحت تنش خشکی

دلنیا سپهوند<sup>۱</sup>، وحید اعتماد<sup>۲\*</sup>، انوشیروان شیروانی<sup>۲</sup>، محمد جوان نیکخواه<sup>۳</sup> و توماس دلوکا<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی دکتری جنگل‌شناسی و اکولوژی جنگل، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

<sup>۲</sup> دانشیار، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

<sup>۳</sup> استاد، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

<sup>۴</sup> استاد، دانشکده جنگلداری، دانشگاه ایالتی اورگان، کوروالیس، ایالات متحده آمریکا

(تاریخ دریافت ۱۴۰۳/۰۴/۳۰؛ تاریخ پذیرش ۱۴۰۳/۰۷/۱۴)

### چکیده

**مقدمه:** قارچ‌های اکتومیکوریز ترافل (*Tuber spp.*) می‌توانند با درختان خانواده بلوط رابطه همزیستی قوی برقرار کنند و به‌موجب این ارتباط دوجانبه، امکان رشد بهتر و مقاومت بیشتر در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی نیز فراهم می‌شود. قارچ‌های ترافل از نظر اقتصادی نیز پرارزش‌اند. این تحقیق با هدف بررسی میزان برقراری همزیستی اکتومیکوریزی بلوط ایرانی با قارچ ترافل تابستانه گونه *Tuber aestivum* و نیز ارزیابی میزان بردباری نونهال‌های بلوط ایرانی تلقیح‌شده با این قارچ تحت تنش خشکی با سنجش پارامترهای مورفوفیزیولوژیک آنها انجام گرفت.

**مواد و روش‌ها:** نمونه‌های قارچ ترافل تابستانه از گونه‌های بلوط بلندمازو (*Quercus castaneifolia* C.A.Mey.)، ولیک (*Crataegus monogyna* Jacq.) و کاج سیاه (*Pinus nigra* J.F.Arnold.) در استان مازندران جمع‌آوری شدند و ارزیابی مورفولوژیکی، میکروسکوپی و مولکولی به‌منظور تأیید گونه انجام گرفت. سپس مایه تلقیح از ترافل‌ها تهیه و ریشه نونهال‌های دو ماهه بلوط ایرانی با ۱۰ میلی‌لیتر مایه آغشته شد. پس از تشکیل میکوریز روی ریشه نونهال‌ها بعد از یک سال، تنش خشکی (۲۵، ۵۰ و ۷۵ درصد ظرفیت زراعی) به‌مدت سه ماه اعمال شد. نمونه‌برداری در هر مرحله به‌صورت تصادفی با انتخاب پنج اصله نمونه شاهد و پنج اصله نمونه تلقیح‌شده با قارچ ترافل تابستانه (*T. aestivum*) انجام گرفت. پس از شست‌وشوی ریشه نونهال‌ها، با استفاده از استریو میکروسکوپ ریشه‌ها بررسی و میزان همزیستی آنها ثبت شد و در ادامه با استخراج DNA از ریشه نونهال‌ها با روش CTAB و انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) موفقیت گونه تلقیح‌شده تأیید شد. در نهایت پارامترهای مختلف رویشی و بیوشیمیایی نونهال‌ها شامل ارتفاع نونهال، قطر یقه نونهال، زی‌توده اندام هوایی و ریشه، تعداد برگ‌ها، محتوای نسبی آب (RWC) و محتوای کلروفیل به‌منظور ارزیابی سلامت و رشد گیاه اندازه‌گیری شدند. افزون بر آن، مقدار پروکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ )، مالون دی‌آلدهید (MDA) به‌عنوان شاخص تنش اکسیداتیو و پرولین نیز به‌عنوان شاخصی از تحمل به تنش تعیین شدند. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شامل کاتالاز (CAT)، سوپراکسیددیسموتاز (SOD) و پراکسیداز (POD) نیز به‌منظور ارزیابی سازوکارهای دفاعی گیاه در برابر استرس اکسیداتیو سنجش شدند.

**یافته‌ها:** تلقیح نونهال‌های بلوط ایرانی با ترافل تابستانه در همه سطوح تنش خشکی سبب بهبود صفات رویشی نسبت به تیمار شاهد شد، البته حد اثرگذاری این قارچ در تیمار تنش خشکی ۲۵ درصد ظرفیت زراعی، نسبت به تنش ۵۰ درصد ظرفیت زراعی کمتر بود. تلقیح با ترافل تابستانه با افزایش ۲/۳ برابری وزن خشک اندام هوایی و افزایش ۱/۸ برابری وزن خشک ریشه در تنش خشکی ۵۰ درصد ظرفیت زراعی، بیشترین تأثیر را داشت. مایه‌زنی ریشه نونهال‌های بلوط با ترافل تابستانه مقدار کلروفیل a، b و کل را به‌ترتیب ۱۷، ۱۱ و ۱۵ درصد نسبت به تیمار شاهد افزایش داد. تلقیح بلوط ایرانی با ترافل تابستانه میزان فعالیت آنزیم کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسیددیسموتاز را به‌ترتیب ۳۰، ۲۳ و ۱۳ درصد نسبت به تیمار شاهد افزایش داد. همچنین تیمار تلقیح با ترافل تابستانه موجب کاهش ۱۹ و ۱۰ درصدی مقدار مالون دی‌آلدهید و پروکسید هیدروژن در شرایط تنش شدید (۲۵ درصد ظرفیت زراعی) شد. **نتیجه‌گیری:** با توجه به یافته‌های این پژوهش، به نظر می‌رسد قارچ ترافل تابستانه توانسته با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و تأمین آب بیشتر برای نونهال‌ها در تنش متوسط و حتی شدید اثرهای مخرب کمبود آب بر صفات نونهال‌های بلوط ایرانی را کاهش دهد. پاسخ مناسب نونهال‌های بلوط ایرانی به تلقیح اکتومیکوریزی قارچ ترافل تابستانه و کمک به بردباری نونهال‌ها در برابر تنش خشکی می‌تواند یکی از راهبردهای مناسب برای جنگلکاری باشد و از اثرهای مثبت آن در بهره‌وری اقتصادی جامعه محلی و امکان توسعه مشارکت مردمی در حفظ و توسعه نونهال‌ها بهره برد.

**واژه‌های کلیدی:** آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، احیای زاگرس، ترافل جنگلی، تنش کم‌آبی، همزیستی اکتومیکوریز.

## مقدمه

به‌شدت تحت تأثیر قرار می‌گیرد و فرایندهای فیزیولوژیکی طبیعی به‌خطر می‌افتد و محتوای نسبی آب ( $RWC^3$ ) و پتانسیل آب برگ گیاه کاهش می‌یابد (Xiong et al., 2022). افزون‌بر این، گیاهان روزنه‌های خود را برای جلوگیری از هدررفت آب می‌بندند که می‌تواند جذب  $CO_2$  را محدود کند و سبب کاهش فتوسنتز شود.

متابولیسم گونه‌های اکسیژن فعال<sup>۲</sup> (ROS) پاسخ اولیه گیاهان به استرس است (Xiong et al., 2022). تنش خشکی می‌تواند سبب اختلال در تولید و حذف ROS در گیاهان شود و تجمع بیش از حد ROS موجب استرس اکسیداتیو می‌شود (Ghanbary et al., 2020). گیاهان برای محافظت از خود در برابر استرس اکسیداتیو، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و مواد غیرآنزیمی تولید می‌کنند که ROS را تجزیه می‌کنند (Ghanbary et al., 2020). آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شامل پراکسیداز (POD)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، آسکوربات اکسیداز (APX) و کاتالاز (CAT) و مواد آنتی‌اکسیدانی غیرآنزیمی شامل گلوتاتیون احیاشده (GSH)، اسید اسکوربیک احیاشده (AsA) و کاروتنوئیدها هستند (Ghanbary et al., 2020). شواهد نشان‌دهنده تأثیر مطلوب قارچ‌های اکتومیکوریزا بر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان است. افزایش فعالیت آنزیم SOD و POD در اثر کولونیزه شدن *Quercus acutissima* Caruth. ترافل سیاه چینی گزارش شده است (Zhang et al., 2019). همچنین تلقیح *Quercus acutissima* با *Tuber indicum* سبب فعالیت بیشتر سوپراکسید دیسموتاز ریشه (SOD) و پراکسیداز (POD) شده است (Zhang et al., 2019; Huang et al., 2021). در حال حاضر در مناطق مدیترانه‌ای راهکارهایی برای استفاده اقتصادی بهتر از درختان با کمک همزیستی با قارچ‌های ارزشمند و گران‌قیمت ترافل مطرح است (Zambonelli et al., 2015; Reyna

ترافل‌ها<sup>۱</sup> قارچ‌های زیرزمینی از جنس *Tuber* spp. هستند که با ریشه برخی درختان همزیستی اکتومیکوریزی اجباری برقرار می‌کنند (Bonito et al., 2013). همزیستی اکتومیکوریزی، رابطه گسترده‌ای است که میان برخی قارچ‌های بازیدیومیست و آسکومیست مانند ترافل‌ها (Truffles)، بولت‌ها (Bolets)، آمانیتاها (Amanita) و چانترل‌ها (Chanterelles) با ریشه‌های گونه‌های مهم و غالب درختی در جنگل‌های معتدله، مدیترانه‌ای و نیمه‌گرمسیری شکل می‌گیرد و تأثیر مهمی در تثبیت، عملکرد و تکامل درختان در بوم‌سازگان‌های جنگلی دارد (Read & Smith, 2010). قارچ‌های اکتومیکوریز به‌عنوان اندام‌های انتقال‌دهنده بین خاک و ریشه، کربوهیدرات‌ها را از ریشه برای رشد میسلیوم و اندام بارده قارچ، می‌گیرند و در مقابل آب و مواد مغذی مورد نیاز درخت را تأمین می‌کنند. قارچ‌های اکتومیکوریز، هیف‌هایی با ساختار شبه‌پارانشیم متفاوت به‌نام مانتل را در اطراف ریشه‌ها تشکیل می‌دهند. این قارچ‌ها، هیف‌های سازمان‌یافته دیگری به‌نام هیف‌های خارج ریشه‌ای (Extramatrix) ایجاد می‌کنند که تبادل مواد مغذی را از دیگر بخش‌های خاک بر عهده دارد (Agerer, 2006). قارچ‌های اکتومیکوریز ترافل که به قارچ دنبلان هم معروف شده‌اند (*Tuber* spp.) با درختان خانواده بلوط رابطه همزیستی قوی برقرار می‌کنند و مانند دیگر همزیستی‌های دوطرفه، موجب رشد بهتر و مقاومت بیشتر در برابر تنش‌های زیستی و محیطی برای میزبان می‌شوند (Smith & Read, 2010). در پی تشکیل اکتومیکوریزا، بیان برخی از ژن‌های دفاعی به گیاهان القا می‌شود و بردباری گیاهان میزبان از جمله مقاومت به خشکی، مقاومت به بیماری و مقاومت در برابر آفات را افزایش می‌دهد (Kennedy, 2010; Lilleskov et al., 2011). هنگامی که گیاهان تحت تنش خشکی قرار می‌گیرند، تعادل آب گیاه

2. Relative Water Capacity  
3. Reactive Oxygen Species

1. Truffles

### شیوه‌ی اجرای پژوهش

#### بررسی مورفولوژیکی و میکروسکوپی قارچ‌های جمع‌آوری‌شده

ارزیابی مورفولوژیکی ترافل‌های تازه با استفاده از آب مقطر به‌عنوان محلول پایه برای تجزیه و تحلیل میکروسکوپی انجام گرفت. ویژگی‌های ظاهری قارچ‌های ترافل براساس پارامترهای مختلفی مانند رنگ پریدیم (Peridium)، بافت و رنگ لایه‌ی زیر پوست (Gleba)، شکل، اندازه و رنگ کیسه‌های آسکی (Asci)، تعداد آسکوسپور (Ascospores) در هر کیسه‌ی آسکی، رنگ و تزینات آسکوسپورها بررسی و نمونه‌ها براساس کلیدهای طبقه‌بندی موجود شناسایی شدند (Hawker, 1954; Trappe & Castellano, 1991; ) (Pegler et al., 1993).

#### بررسی مولکولی قارچ‌های جمع‌آوری‌شده

به‌منظور اطمینان از شناسایی گونه‌ی جمع‌آوری‌شده، بررسی مولکولی نیز انجام گرفت. ابتدا DNA کل ژنومی از ترافل‌های تازه استخراج شد. در مرحله‌ی اول، بخشی از قسمت داخلی قارچ ترافل جدا شد (۵ میلی‌گرم تازه)، نمونه در میکروتیوب ۲ میلی‌لیتری و سپس به‌مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم (بن‌ماری) با دمای ۶۵ درجه‌ی سانتی‌گراد حرارت داده شد. سپس نمونه‌ها در نیتروژن مایع پودر شدند و ۳۰۰ میکرولیتر بافر (۲۰۰ میلی‌مولار Tris-HCl با pH ۷/۵، ۲۵۰ میلی‌مولار NaCl، ۲۵ میلی‌مولار EDTA و ۰/۵ درصد) اضافه شد و ورتکس انجام گرفت. سپس نمونه به‌مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ شد تا بقایای سلول رسوب کند. مایع سطحی حاوی اسیدهای نوکلئیک به یک میکروتیوب ۲ میلی‌لیتری جدید منتقل شد. سپس با افزودن حجم مساوی از ایزوپروپانول و نگهداری نمونه در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه رسوب رخ داد. بار دیگر با دور ۱۳۰۰۰ در دقیقه به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفیوژ انجام گرفت. در نهایت DNA نمونه‌ها در

(et al., 2014) که بحث تولید اقتصادی و اشتغال‌زایی برای کشاورزان و ایجاد فضای سبز پایدار را نیز پوشش می‌دهد (Hall & Zambonelli, 2012). در این جهت مزارع گسترده‌ای حاصل از کشت درختان با انواع گونه‌های قارچ ترافل مانند ترافل سیاه فرانسوی *Tuber aestivum* ایجاد شده است (Bach et al., 2021; Schneider-Maunoury et al., 2020). در ایران پژوهش‌هایی در زمینه‌ی تنوع و ساختار جمعیت‌های اکتومیکوریز همراه با ترافل (Zamani et al., 2023) و همچنین شناسایی قارچ‌های ترافل از جنگل‌های هیرکانی و جنگل‌های زاگرس انجام گرفته است (Jamali, 2017; Sepahvand et al., 2021). اما اطلاعاتی در زمینه‌ی ایجاد مزرعه یا احیا با نهال‌های میکوریزی تلقیح‌شده با قارچ ترافل منتشر نشده است.

هدف از تحقیق حاضر، بررسی میزان برقراری همزیستی اکتومیکوریزی بلوط ایرانی (*Quercus brantii*) با قارچ ترافل سیاه تابستانه، گونه‌ی *Tuber aestivum* تحت تنش خشکی و همچنین ارزیابی تلقیح موفق قارچ ترافل تابستانه از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) ریشه‌های کلونیزه‌شده بلوط ایرانی و سپس بررسی پارامترهای مورفوفیزیولوژیکی نهال‌های تلقیح‌شده و شاهد و میزان بردباری آنها در تنش خشکی است.

### مواد و روش‌ها

#### منطقه‌ی پژوهش

#### برداشت قارچ ترافل تابستانه (*Tuber aestivum*)

در این پژوهش، در مرداد ۱۳۹۸، ۱۰ نمونه قارچ ترافل سیاه تابستانه از یک توده جوان جنگلکاری‌شده با سن تقریبی ۲۵ تا ۳۰ سال از گونه‌های بلوط بلندمازو (*Quercus castaneifolia*)، کاج سیاه (*Pinus nigra*) و ولیک (*Crataegus monogyna*) در منطقه‌ی پل سفید استان مازندران با استفاده از سگ آموزش‌دیده ترافل‌یاب جمع‌آوری شد.

جغرافیایی ۴۶ درجه و ۱۰ دقیقه و ۳۴ ثانیه شرقی انتخاب شدند. ۵۰۰ عدد بذر سالم جمع‌آوری و پس از شست‌وشو با آب معمولی، با آب اکسیژنه ۳ درصد به مدت ۳۰ دقیقه استریل شدند. بذرها در ماسه سترون شده مرطوب، در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تیمار شدند. پس از جوانه‌زنی، بذرهای گلدان‌هایی با ترکیب مساوی از ماسه و پرلیت کاملاً سترون شده به مدت دو ماه کشت و در گلخانه با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، به صورت نرمال آبیاری شدند. نهال‌های دوماهه به اتاقک سترون شده منتقل شدند و ریشه نهال‌ها بررسی شد و ۳۰۰ نهال با ریشه کاملاً مناسب که از نظر ظاهری به نسبت همگن بودند برای تلقیح و تیمار شاهد انتخاب شدند. سپس مایه تلقیح از قارچ ترافل تابستانه طبق روش (Iotti et al., 2013) با کمی تغییر، تهیه و ریشه هر نهال با ۱۰ میلی‌لیتر مایه آغشته شد. برای تهیه مایه تلقیح، پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه، سطح خارجی قارچ‌ها با آب معمولی شسته شد و با استفاده از فرچه زبر، آلودگی‌ها و ذرات خاک از سطح ترافل‌ها به طور کامل پاک شد. سپس آب اکسیژنه ۳ درصد به ترافل‌ها افزوده شد و ترافل‌ها ۲۰ دقیقه در دمای اتاق خشک شدند. پس از خشک شدن، وزن آنها با ترازوی دیجیتال توزین شد. ترافل‌ها با اتانول ۷۰ درصد استریل شده و سپس به فریزر با دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. در مرحله بعد، ۲۰۰ گرم از ترافل‌های منجمد شده با ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر در یک مخلوط‌کن استریل ریخته و به مدت ۵ دقیقه در چند مرحله مخلوط شدند و یک سوسپانسیون تهیه شد. برای اطمینان از سلامت اسپورها، در طی فرایند مخلوط شدن، چند اسلاید میکروسکوپی تهیه و اسپورها مشاهده شدند. پس از ۵ دقیقه مخلوط شدن، نزدیک به کل اسپورها بدون آسیب از بافت ترافل جدا شدند. سپس مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون با سرنگ استریل به ریشه نهال‌های تیمار تلقیح تزریق شد. سپس نهال‌های تلقیح شده و شاهد در ترکیب جدیدی از پیت‌ماس،

پایین میکروتیوب رسوب کرد. مایع رویی دور ریخته شد و DNA با ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر دو بار استریل به یک میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Percudani et al., 1999). همچنین، پس از اعمال تیمارها، به منظور ارزیابی مولکولی ریشه‌های تلقیح شده و اطمینان از تشکیل نشدن میکوریزا در نهال‌های شاهد، ریشه نهال‌ها با استفاده از میکروسکوپ دوچشمی (بینوکلار) مشاهده شد و در نهال‌های میکوریزی ریشه‌های موین کلونیزه شده و با تیغ استریل جدا شدند. در ادامه، به روش (CTAB)، DNA قارچ اکتومیکوریزی تشکیل شده روی ریشه نهال‌های تیمار شده استخراج شد (Gryndler et al., 2014). سنجش مولکولی در نهال‌های میکوریزی از اقدامات اساسی به شمار می‌رود، زیرا در صورت دقت ناکافی در مراحل سترون کردن ترافل‌ها و بذرها و همچنین در فرایند نگهداری از نهال‌ها، احتمال جایگزینی قارچ‌های اکتومیکوریزی دیگر به جای قارچ مورد نظر وجود دارد. این موضوع در نهال‌های میکوریزی ترافل، به دلیل هزینه‌های زیاد و زمان طولانی لازم برای بازدهی، از اهمیت بیشتری برخوردار است. به همین دلیل، برای اطمینان از تشکیل موفق همزیستی اکتومیکوریزی گونه هدف، *T. aestivum* روی ریشه نهال‌های بلوط ایرانی *Q. brantii*، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) برای تکثیر ناحیه‌های بین ژنی<sup>۱</sup>، در رشته DNA با استفاده از آغازگرهای ITS1/ITS4 انجام گرفت (Gardes & Bruns, 1993).

#### تلقیح نهال‌های بلوط ایرانی *Quercus brantii*

برای تحقیق حاضر، در پاییز ۱۳۹۸ ابتدا با بررسی مورفولوژیکی، دو درخت سالم دارای بذر فراوان از گونه ذکر شده در شهرستان مریوان با طول جغرافیایی ۳۵ درجه و ۲۹ دقیقه و ۱۹ ثانیه شمالی و عرض

1. internal transcribed spacer (ITS)

### بررسی میزان کلونیزاسیون

پس از استقرار کامل نهال‌ها در شرایط گلخانه نمونه‌برداری از ریشه نهال‌ها طی سه مرحله به ترتیب پس از ۴، ۶ و ۱۲ ماه قبل از شروع تنش انجام گرفت و به صورت تصادفی در هر مرحله از نونهال‌های بلوط ایرانی *Q. brantii*، پنج اصله نمونه شاهد و پنج اصله نمونه تلقیح‌شده با قارچ ترافل تابستانه (*T. aestivum*) انتخاب شدند. پس از شست‌وشوی ریشه نهال‌ها، با استفاده از استریومیکروسکوپ دوچشمی، ریشه‌ها به دقت بررسی شدند و میزان همزیستی آنها ثبت شد. همچنین پس از ۳ ماه اعمال تنش نیز به منظور بررسی تأثیر تنش کمبود آب بر میزان کلونیزاسیون بار دیگر نمونه‌برداری از ریشه نهال‌ها انجام گرفت. میزان کلونیزاسیون با روش مربع متقاطع (Phillips & Hayman, 1970) براساس رابطه ۱ برحسب درصد محاسبه شد.

### بررسی صفات رویشی و فیزیولوژیک نهال‌های بلوط ایرانی

در این آزمایش، ارتفاع نهال با استفاده از متر از محل اتصال ریشه به ساقه تا بالاترین نقطه رشد گیاه در آغاز و پایان دوره تنش اندازه‌گیری شد. قطر یقه نهال نیز با کولیس دیجیتال در محل اتصال ساقه به ریشه سنجش شد. برای اندازه‌گیری زی توده، نهال‌ها از خاک خارج و ریشه‌ها و اندام هوایی جداگانه وزن شدند. سپس نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در آون با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد خشک شدند. زی توده خشک نهال شامل ریشه، ساقه و برگ‌ها، با ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ گرم توزین و پس از خشک شدن در دسیکاتور اندازه‌گیری شد (Yin et al., 2005). تعداد برگ نیز شمارش و برای هر تیمار ثبت شد.

در این آزمایش، برای اندازه‌گیری محتوای نسبی آب (RWC)، از آخرین برگ توسعه‌یافته گیاه نمونه‌برداری شد. برگ‌ها بلافاصله پس از جدا شدن با قیچی، در پوشش آلومینیومی پیچیده و در یخچال یونولیتی نگهداری شدند تا از تبخیر جلوگیری شود.

خاک استریل‌شده و ورمیکولیت به نسبت ۱:۲:۱ کشت شدند. در نهایت نهال‌ها به گلخانه منتقل و به مدت یک سال آبیاری و نگهداری شدند.

### اعمال تنش خشکی

ابتدا ظرفیت زراعی (Field capacity) ۱۰۰ گرم از خاک گلدان در آزمایشگاه اندازه‌گیری شد. در مرحله اول، یک گلدان از ترکیب خاک مورد نظر برای بستر کاشت نهال‌ها، با آب اشباع شد و سپس قسمت فوقانی آن برای کاهش تبخیر سطحی با پلاستیک پوشانده شد، به صورتی که آب اضافی آن خارج شود. پس از ۲۴ ساعت پلاستیک برداشته شد و ۱۰۰ گرم خاک از قسمت میانی گلدان برداشته و وزن شد. این خاک در آون با دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت و وزن خشک آن نیز اندازه‌گیری شد. درصد ظرفیت مزرعه‌ای با محاسبه اختلاف وزن مرطوب و خشک خاک به دست آمد (Cassel & Nielsen, 1986). سپس مقادیر ۷۵، ۵۰ و ۲۵ درصد ظرفیت زراعی برای هر تیمار محاسبه و به صورت وزنی اعمال شد (با توجه به مقاومت زیاد بلوط در برابر خشکی، ۷۵ درصد ظرفیت زراعی به عنوان شاهد در نظر گرفته شد). به این صورت که گلدان‌ها روزانه توزین شدند و براساس مقدار کاهش وزن گلدان‌ها، آبیاری انجام گرفت. نهال‌های تلقیح‌شده و تلقیح‌نشده (شاهد) ۱۲ ماه در گلخانه در شرایط بهینه برای رشد تا زمان استقرار کامل و همچنین پدیدار شدن مانتل‌ها روی ریشه‌های نهال‌های تلقیح‌شده که نشان‌دهنده برقراری همزیستی است نگهداری شدند. پس از بررسی چند نمونه ریشه و مشاهده اندام‌های میکوریزی با درصد قابل قبول میزان کلونیزاسیون حداقل ۳۰ درصد، ۲۰ نهال برای هر تیمار در نظر گرفته شد و تنش خشکی برحسب مقدار ظرفیت زراعی محاسبه‌شده برای هر تیمار، به مدت سه ماه اعمال شد.

در آون با دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شد؛ وزن خشک آنها تعیین شد و در ادامه، محتوای نسبی آب با استفاده از رابطه ۲ محاسبه شد (Sánchez et al., 1998).

$$\text{رابطه ۱} \quad 100 \times \frac{\text{تعداد ریشه‌های میکوریزی شده}}{\text{تعداد کل ریشه‌های مشاهده شده}} = \text{میزان کلونیزاسیون}$$

$$\text{رابطه ۲} \quad 100 \times \frac{(\text{وزن خشک} - \text{وزن تر})}{(\text{وزن خشک} - \text{وزن آماس})} = \text{محتوای آب نسبی (\%)}$$

لیتر رسانده شد و پس از صاف کردن در یخچال نگهداری شد. برای تهیه محلول استوک BSA نیز ۵۰ میلی‌گرم BSA در ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد. سپس استانداردهایی با غلظت‌های مختلف BSA از صفر تا ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تهیه و منحنی استاندارد ساخته شد. برای اندازه‌گیری غلظت پروتئین، ۱ میلی‌لیتر محلول برادفورد و ۵۰ میکرولیتر عصاره پروتئینی در تیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری مخلوط شد و پس از ۲۰ دقیقه، جذب نوری در طول موج ۵۹۵ نانومتر با دستگاه پلیتریدر<sup>۵</sup> اندازه‌گیری شد (Bradford, 1976).

#### استخراج پروتئین کل

استخراج پروتئین کل و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان براساس روش (Giannopolitis & Ries, 1977) با کمی تغییرات انجام گرفت. همه مراحل در دمای ۴±۱ درجه سانتی‌گراد و در یخ انجام گرفت. ابتدا نمونه‌ها در هاون چینی با افزودن نیتروژن مایع به خوبی ساییده و به پودر تبدیل شدند. سپس ۰/۲۵ گرم از پودر به فالكون‌های ۱۵ میلی‌لیتری منتقل و ۲/۵ میلی‌لیتر بافر استخراج به آنها اضافه شد. پس از دو دقیقه ورتکس، نمونه‌ها ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. مایع رویی (سوپرناتانت) حاصل به تیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل و در نیتروژن مایع منجمد شد. استخراج نمونه‌ها به سرعت و با استفاده از بافر تازه

برگ‌ها سپس در آزمایشگاه به قطعات ۱ سانتی‌متری تقسیم شدند و وزن تازه آنها تعیین شد. وزن آماسیده نمونه‌ها پس از خیساندن در آب مقطر به مدت ۱۸ ساعت در دمای اتاق، اندازه‌گیری شد. سپس نمونه‌ها

رابطه ۱

رابطه ۲

برای سنجش صفات فیزیولوژیک، نمونه‌گیری از نهال‌ها انجام گرفت. نمونه‌های برگ در داخل فویل پیچیده و در نیتروژن مایع تثبیت شدند و بی‌درنگ به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد انتقال یافتند. سپس بافر استخراج و محلول‌های لازم برای سنجش صفات تهیه شد.

#### تهیه بافر استخراج و رسم منحنی استاندارد پروتئین با آلومین سرم گاوی (BSA)

ابتدا تمام وسایل لازم با آب مقطر و اتانول ۷۰ درصد شسته و در اتوکلاو سترون شدند. برای آماده‌سازی محلول، ۲/۴۳۳ گرم تریس (Tris) در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد. PH با استفاده از محلول هیدروکلریک<sup>۱</sup> غلیظ (HCl) روی ۷/۸ تنظیم شد. محلول ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگهداری شد و سپس PH آن دوباره بررسی و تنظیم شد. سپس ۲۰ میلی‌لیتر گلیسرول<sup>۲</sup> به محلول افزوده شد و حجم نهایی آن با آب مقطر به ۲۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس محلول برادفورد تهیه شد. ابتدا ۰/۱ گرم کوماسی بلو<sup>۳</sup> با ۵۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درصد و کمی آب مقطر درون ارلن حل شد و با افزودن تدریجی اسید ارتوفسفریک<sup>۴</sup> ۸۵ درصد و هم زدن، PH تنظیم شد. محلول چند ساعت در یخچال نگهداری و سپس با آب مقطر به حجم یک

1. Hydrochloric acid
2. Glycerol
3. Coomassie Blue
4. Orthophosphoric acid

**سنجش میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز (POD)**  
 برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم، ۲ میلی‌لیتر از مخلوط واکنش تهیه شد که شامل عصاره‌ای با ۵۰ میلی‌گرم پروتئین (میزان آن با استفاده از منحنی استاندارد تعیین شد)، گایاکول<sup>۷</sup> ۵ میلی‌مولار و بافر فسفات با غلظت ۲۵ میلی‌مولار  $\text{PH}=7$  بود و حجم نهایی به ۲ میلی‌لیتر رسانده شد. این مخلوط در لوله آزمایش ریخته شد و دستگاه اسپکتروفتومتر نیز با استفاده از این محلول در طول موج ۴۷۰ نانومتر صفر شد. سپس ۵ میکرولیتر پراکسید هیدروژن به مخلوط افزوده و تغییرات جذب نور در فواصل ۱۰ ثانیه به مدت یک دقیقه اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم براساس تغییرات جذب نور بر دقیقه در میلی‌گرم پروتئین محاسبه و بیان شد (Reuveni, 2017).

#### محتوای کلروفیل

ابتدا ۰/۱ گرم نمونه برگ از نهال‌های شاهد و تلقیح‌شده در هاون چینی با ۳ میلی‌لیتر استون<sup>۸</sup> ۸۰ درصد کاملاً ساییده شد و حجم نهایی عصاره به ۱۵ میلی‌لیتر افزایش یافت. سپس عصاره با استفاده از سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ صاف شد. از دستگاه اسپکتروفتومتر برای اندازه‌گیری مقدار جذب نمونه‌ها استفاده شد. ابتدا دستگاه با استون ۸۰ درصد صفر شده و سپس مقدار جذب عصاره استخراج‌شده در طول موج‌های ۶۴۵، ۶۶۳، ۴۸۰ و ۵۱۰ نانومتر ثبت شد. سپس با استفاده از روابط زیر مقدار کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئید محاسبه شد (Arnon, 1949).  
 در رابطه‌های پایین (۳، ۴، ۵ و ۶)، مقدار جذب در طول موج مورد نظر، V حجم نهایی استون ۸۰ درصد برحسب میلی‌لیتر و W اندازه برگ تازه برحسب گرم است.

انجام گرفت. این عصاره برای سنجش مقدار پروتئین کل و اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شامل کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز استفاده شد.

#### سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT)

میزان فعالیت آنزیم در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر<sup>۱</sup> در طول موج ۲۴۰ نانومتر سنجیده شد. محلول‌ها و مواد استفاده‌شده شامل ۳۰۰۰ میکرولیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار  $\text{PH}=7$ ، ۵ میکرولیتر  $\text{H}_2\text{O}_2$ ، ۳۰ درصد و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیم بود و فعالیت آنزیم به مدت ۵ دقیقه در فواصل ۲۰ ثانیه‌ای ثبت شد (Bergmeyer, 2012).

#### سنجش فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به صورت فوتومتريک<sup>۲</sup> بررسی شد. بافر واکنش شامل بافر فسفات با  $\text{PH}=7/8$ ، متیونین<sup>۳</sup> ۱۲ میلی‌مولار، نیتروبلو تترازولیوم<sup>۴</sup> ۷۵ میکرومولار، EDTA ۱۰۰ میکرومولار و تریتون ایکس<sup>۵</sup>-۱۰۰ با غلظت ۰/۰۲۵ درصد آماده شد. ۲۹۰ میکرولیتر از بافر به هر چاهک اضافه و سپس ۵ میکرولیتر بافر ریبوفلاوین<sup>۶</sup> با غلظت ۲ میکرومولار به مخلوط افزوده شد و دستگاه اسپکتروفتومتر نیز بر روی طول موج ۵۶۰ نانومتر صفر شد. برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم، ۱۰ میکرولیتر از عصاره پروتئینی به مخلوط اضافه و فعالیت آنزیم براساس میزان احیای نوری نیتروبلو تترازولیوم و توانایی آنزیم در ممانعت از این واکنش سنجیده شد (Beauchamp & Fridovich, 1971).

1. Spectrophotometer
2. Photometric
3. Methionine
4. Nitroblue Tetrazolium
5. Triton X
6. Riboflavin

7. Guaiacol
8. Acetone

- رابطه ۳  $[(12.7 \times A_{663}) - (2.69 \times A_{645})] \times V / 1000 \times W$  = میلی گرم کلروفیل a در هر گرم برگ تر
- رابطه ۴  $[(22.9 \times A_{645}) - (4.69 \times A_{663})] \times V / 1000 \times W$  = میلی گرم کلروفیل b در هر گرم برگ تر
- رابطه ۵  $[(20.2 \times A_{645}) + (8.02 \times A_{663})] \times V / 1000 \times W$  = میلی گرم کلروفیل کل در هر گرم برگ تر
- رابطه ۶  $7.6 \times (A_{480}) - 14.9 \times (A_{510}) \times V / 1000 \times W$  = میلی گرم کاروتنوئید در هر گرم برگ تر

سولفوسالیسیلیک<sup>۶</sup> ۳ درصد با حل کردن ۳ گرم پودر آن در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر تهیه شد و با حل کردن ۱/۲۵ گرم پودر اسید ناین هیدرین<sup>۷</sup> در ۳۰ میلی لیتر اسید استیک و اضافه کردن ۲۰ میلی لیتر اسید فسفریک<sup>۵</sup> ۶ مولار، محلول اسید ناین هیدرین تهیه شد. تولوئن<sup>۸</sup> نیز برای مراحل بعدی آماده شد. برای تهیه استانداردهای پرولین، مقادیر صفر، ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ میلی لیتر از استاندارد ۱۰۰ میلی گرم در لیتر پرولین، با آب مقطر به حجم ۵۰ میلی لیتر رسانده شد. سپس، ۰/۵ گرم نمونه برگ تازه از تیمارهای مختلف نهال‌ها با ۱۰ میلی لیتر اسید سولفوسالیسیلیک مخلوط و در هاون ساییده شده و به تیوب ۱۵ میلی لیتری منتقل شد. این تیوب‌ها به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. سپس ۲ میلی لیتر عصاره به تیوب‌های جدید منتقل و ۲ میلی لیتر اسید ناین هیدرین و ۲ میلی لیتر اسید گلایسال<sup>۹</sup> به آن افزوده شد. همزمان ۲ میلی لیتر از استانداردهای پرولین نیز به تیوب‌ها اضافه شده و با اسید ناین هیدرین و اسید استیک مخلوط شد. نمونه‌ها یک ساعت در حمام آب گرم حرارت داده شده و سپس خنک شدند؛ سپس ۴ میلی لیتر تولوئن اضافه شده و به مدت ۲۰ ثانیه ورتکس شد. در نهایت، با استفاده از استانداردها، منحنی رگرسیون در طول موج ۵۲۰ نانومتر رسم و مقدار پرولین در فاز تولوئن با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد (Bates et al., 1973).

### استخراج و اندازه‌گیری H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

ابتدا بافر فسفات ۵۰ میلی مولار از رقیق‌سازی محلول فسفات پتاسیم ۱ مولار تهیه و در یخچال (۵ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شد. سپس اسید تری‌کلرواستیک<sup>۱</sup> (TCA) ۱ درصد و محلول یدید پتاسیم<sup>۲</sup> ۱ مولار تهیه و در شرایط مناسب نگهداری شد. برای تهیه استانداردهای H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>، ۱/۱۳۴ گرم H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> در آب مقطر حل شد تا محلول ۱۰۰ میلی مولار به دست آید و از آن برای تهیه استانداردهایی با غلظت‌های مختلف استفاده شد. در مرحله استخراج، ۰/۳۵ گرم نمونه گیاهی تازه به پودر تبدیل شده و به محلول TCA اضافه شد. نمونه‌ها پس از سانتریفیوژ و ترکیب با بافر فسفات و یدید پتاسیم، در تاریکی هم‌وزن شدند. دستگاه اسپکتروفتومتر در دمای خنک و شرایط نیمه‌تاریک با استفاده از محلول بلانک<sup>۳</sup> صفر شد و جذب نمونه‌های استاندارد و گیاهی در طول موج ۳۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. براساس منحنی استاندارد، مقدار H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> در نمونه‌ها برحسب میکرو مول بر گرم نمونه محاسبه شد (Velikova et al., 2000).

### سنجش مقدار پرولین<sup>۴</sup>

مقدار پرولین به کمک اسپکتروفتومتری و در دمای ۱±۲۵ °C سنجیده شد. ابتدا بافرها به شرح زیر تهیه شدند: اسید فسفریک<sup>۵</sup> ۶ مولار با ۴۱/۸ میلی لیتر اسید فسفریک ۸۵ درصد ترکیب و با آب مقطر به حجم نهایی ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد. اسید

6. Sulfosalicylic Acid  
7. Ninhydrin  
8. Toluene  
9. Glycolic Acid

1. Trichloroacetic Acid  
2. Potassium Iodide  
3. Blank  
4. Proline  
5. Phosphoric Acid

## اندازه‌گیری پراکسیداسیون لیپیدی براساس تجمع مالون دی‌آلدهید<sup>۱</sup> (MDA)

میزان اکسیداسیون براساس تجمع مالون دی‌آلدهید برگ با استفاده از تیوباربیتوریک‌اسید<sup>۲</sup> تعیین شد. ۲۰۰ میلی‌گرم نمونه برگ از بخش میانی ساقه در ۲ میلی‌لیتر بافر استخراج (TCA ۱ درصد) هم‌وزن شده و پانزده دقیقه در سانتریفیوژ با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد. ۱ میلی‌لیتر از سوپرناتانت به‌دست‌آمده با ۲ میلی‌لیتر محلول تیوباربیتوریک‌اسید (TBA ۵ درصد) حاوی اسید تری‌کلرواستیک (TCA ۲۰ درصد) مخلوط و در حمام آب جوش (۹۵ درجه سانتی‌گراد) به‌مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. نمونه‌ها در آب یخ قرار داده شده و سپس با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ده دقیقه سانتریفیوژ شدند. جذب نمونه در طول موج ۵۳۲ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین شد. غلظت مالون دی‌آلدهید براساس فرمول زیر محاسبه شد که D چگالی و E ضریب تمایز مولار (مول/سانتی‌متر  $10^5 \times 1/56$ ) است (Hodges et al., 1999).

$$C = \frac{D}{E} \quad \text{رابطه ۷}$$

## روش تحلیل

ابتدا نرمال بودن داده‌های مربوط به اندازه‌گیری صفات مختلف با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف بررسی شد. با توجه به اینکه نتایج این آزمون برای همه صفات معنی‌دار نبود و بقیه پیشفرض‌های لازم برای تجزیه واریانس نیز برقرار بود، از این داده‌ها برای تجزیه واریانس استفاده شد. تجزیه به‌صورت آزمایش فاکتوریل دوعاملی انجام گرفت؛ عامل اول تنش خشکی در سه سطح ۲۵، ۵۰ و ۷۵ درصد ظرفیت زراعی و عامل دوم تلقیح یا نبود تلقیح قارچ (*Tuber aestivum*) در نهال‌های بلوط ایرانی (*Quercus brantii*) بود. این آزمایش در قالب طرح

کاملاً تصادفی با پنج تکرار و با استفاده از نرم‌افزار آماری R 4.3.2 اجرا شد. برای مقایسه میانگین تیمارهای مختلف، از آزمون چنددامنه‌ای دانکن استفاده شد. با توجه به معنی‌دار بودن نتایج در جدول تجزیه واریانس، سطوح معنی‌داری در مقایسه‌ها براساس سطح احتمال ۱ یا ۵ درصد در نظر گرفته شد. برای رسم نمودارها، جدول‌ها و شکل‌های مرتبط از نرم‌افزار آفیس ۲۰۱۹ استفاده شد.

## نتایج

### شناسایی مورفولوژیکی و مولکولی قارچ‌های ترافل تابستانه

پس از بررسی دقیق شکل ظاهر و میکروسکوپی قارچ‌های ترافل برداشت‌شده از جنگل‌های استان مازندران، موارد زیر ارزیابی شد: آسکوکارپ به رنگ سیاه، سطح پوسته زبر و نامنظم، قطر ۱۲-۸ سانتی‌متر، بوی بسیار قوی و معطر، لایه زیر پوست به رنگ قهوه‌ای مایل به سیاه با رگه‌های سفید و قهوه‌ای، بافت پریدیم شبه‌پارانیشیمی، کیسه‌های آسکی حاوی ۳ تا ۶ آسکوسپور، آسکوسپورها به‌رنگ زرد روشن و دارای نقش‌های مکعبی روی غشا و قطر آسکوسپورها ۱۹×۲۷ میکرون. گونه تحت بررسی با ویژگی‌های فوق *Tuber aestivum* معرفی شد (شکل ۱). پس از استخراج rDNA از نمونه ذکرشده و آنالیز حاصل از توالی‌یابی نواحی بین ژنی (ITS1/ITS4)، توالی مدنظر در بانک ژن جهانی (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) با دیگر توالی‌ها مقایسه و صحت گونه شناسایی شده با شماره MW682332 نیز تأیید و ثبت شد.

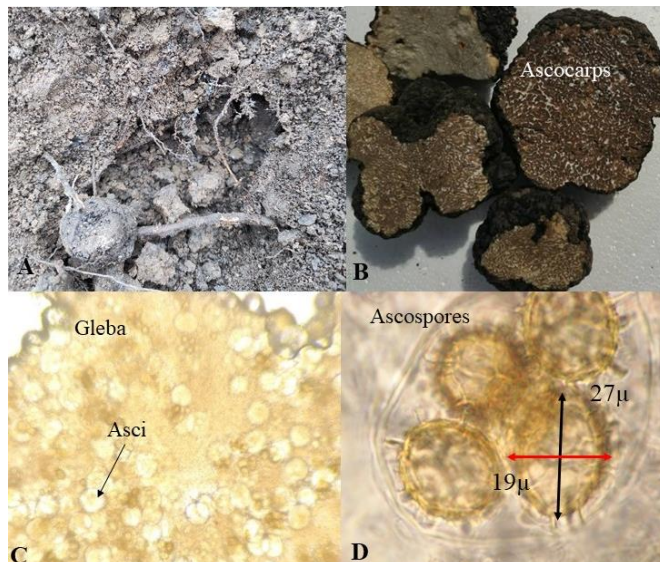
### نتایج بررسی ریشه نهال‌های تلقیح‌شده

مشاهده نهال‌های میکوریزی و شاهد در چهار دوره زمانی پس از ۴، ۶، ۱۲ ماه و پس از ۳ ماه اعمال تنش انجام گرفت و در همه گلدان‌های تلقیح‌شده پس از چهار ماه، نشانه‌های شروع همزیستی با مانتل‌های روشن مایل به طلایی روی ریشه مشهود بود (شکل B ۲). همچنین با ادامه مراقبت از نهال‌ها در گلخانه پس از دو ماه دیگر،

1. Malondialdehyde  
2. Thiobarbituric Acid

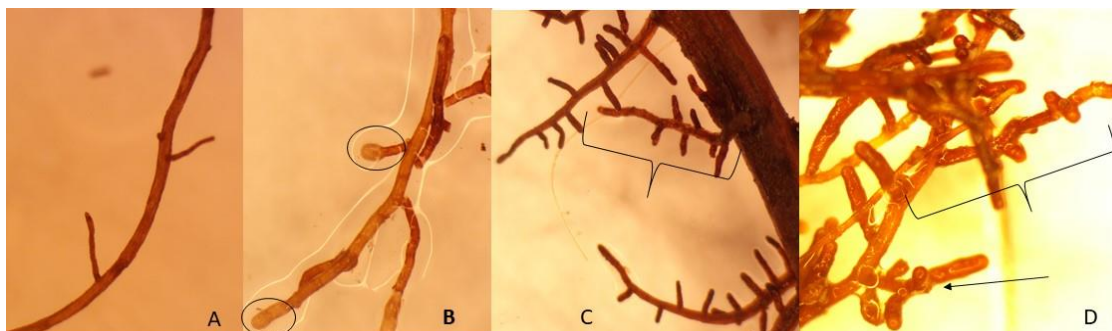
قهوه‌ای روشن و پوشش ضخیم برای ریشه نهال‌های تلقیح‌شده ثبت شد (شکل D ۲). شایان ذکر است که در هیچ‌کدام از نهال‌های شاهد اثری از اندام‌های میکوریزی مشاهده نشد (شکل A ۲). پس از اعمال تنش نمونه‌برداری نهایی انجام گرفت و در تیمارهای مختلف میزان کلونیزاسیون متفاوت بود.

میزان همزیستی افزایش یافت و با تیره‌تر شدن رنگ ریشه مایکوریزاها بالغ‌تر ارزیابی شد؛ ولی میزان پوشش میکوریزی کمتر از ۳۰ درصد محاسبه شد که این مقدار برای شروع تنش مناسب نبود (شکل C ۲) و در نهایت پس از یک سال نگهداری و نمونه‌برداری در مرحله سوم، میزان همزیستی با میانگین ۳۵ درصد و مانتل‌ها با رنگ



شکل ۱- قارچ ترافل تابستانه متصل به ریشه (A)، برش عرضی از قارچ ترافل (B)، بافت درونی قارچ ترافل در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ۱۰× (C)، اسپوروکارپ‌های قارچ ترافل در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ۴۰× (D)

Figure 1. Summer truffle fungi attached to the root (A), transverse section of the truffle fungi (B), the internal tissue of the truffle fungi under the microscope at 10× magnification (C), truffle Ascospores under the microscope at 40× magnification (D)



شکل ۲- اندام‌های میکوریزی نهال‌های تلقیح‌شده، تصویری از ریشه نهال‌های شاهد، نبود مایکوریزا (A)، شروع میکوریزی شدن ریشه‌ها با پوششی روشن و آغاز تشکیل مانتل‌ها پس از چهار ماه در نهال‌های تلقیح‌شده (B)، اندام‌های نابالغ میکوریزی نهال‌های تلقیح‌شده، پس از شش ماه (C)، ریشه میکوریزی‌شده پس از ۱۲ ماه با پوشش کامل از مانتل‌های بالغ ایجادشده در سراسر ریشه (D)

Figure 2. The mycorrhizal forms of the inoculated seedlings. Control seedlings showing the absence of mycorrhiza (A), the beginning of mycorrhization with a clear covering and initial mantle formation after four months in inoculated seedlings (B). Immature mycorrhizal organs in inoculated seedlings after six months (C), and a mycorrhizal root after 12 months with complete coverage of mature mantles developed throughout the root (D)

**سنجش مولکولی قارچ همزیست‌شده ترافل با ریشه**  
بررسی ریشه نهال‌های میزبان و نتایج PCR و همچنین توالی‌یابی قطعات میکوریزی جداشده از ریشه نهال‌های بلوط ایرانی (*Q. brantii*)، همزیستی اکتومیکوریزی قارچ ترافل سیاه تابستانه گونه *(Tuber aestivum)* را با نهال‌های مورد نظر تأیید کرد.

### نتایج صفات رویشی بلوط ایرانی تحت تأثیر تلقیح با ترافل تابستانه و تنش خشکی

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که تأثیر تلقیح با ترافل تابستانه و تنش خشکی و اثر متقابل آن بر صفات مورفولوژیک بلوط ایرانی معنی‌دار بود (جدول ۱). ارتفاع نهال تحت تأثیر متقابل تلقیح با ترافل تابستانه × تنش خشکی در سطح احتمال ۱ درصد قرار گرفت (جدول ۱). نتایج نشان داد که بیشترین ارتفاع نهال در تیمار تلقیح با ترافل تابستانه در تیمار ۷۵ درصد ظرفیت زراعی (۶۰/۶۷ سانتی‌متر) و کمترین ارتفاع در تیمار تلقیح نشدن با ترافل تابستانه در تنش ۲۵ درصد ظرفیت زراعی (۱۵ سانتی‌متر) به‌دست آمد (شکل ۴A). تلقیح بلوط ایرانی با ترافل تابستانه سبب افزایش قطر یقه نیز شد به‌طوری که بیشترین میزان آن در تیمار تلقیح با ترافل تابستانه در ۷۵ درصد ظرفیت زراعی (۴/۵۳ میلی‌متر) حاصل شد (شکل ۴B). بررسی تعداد برگ‌های بلوط نیز نشان داد که این صفت هم تحت تأثیر شدید تیمارهای آزمایش قرار گرفته است که تلقیح بلوط ایرانی با ترافل تابستانه سبب افزایش تعداد برگ‌ها در هر سه سطح تنش خشکی شد (شکل ۴C). نتایج حاصل از اندازه‌گیری مقدار وزن خشک اندام هوایی و ریشه نیز نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای آزمایش وجود دارد. بیشترین مقدار وزن خشک اندام هوایی (۲/۳۸ گرم) و ریشه (۲/۴۵ گرم) در سطح تنش ۷۵ درصد ظرفیت زراعی در تیمار تلقیح با ترافل تابستانه به‌دست آمد. تیمار تلقیح با ترافل تابستانه در همه سطوح تنش خشکی سبب افزایش وزن گیاه

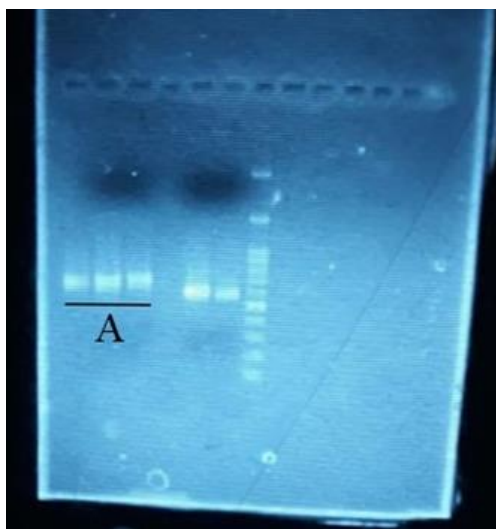
نسبت به تیمار بدون تلقیح شد. در تنش خشکی ۲۵ درصد ظرفیت زراعی تیمار تلقیح با ترافل تابستانه با افزایش ۲/۳ برابر وزن خشک اندام هوایی و افزایش ۱/۸ برابر وزن خشک ریشه در تنش خشکی ۵۰ درصد ظرفیت زراعی بیشترین تأثیر را داشت (شکل ۴D, E). به‌طور میانگین درصد کلونیزاسیون یا تشکیل همزیستی میکوریزی قارچ ترافل تابستانه روی ریشه نهال‌های بلوط ایرانی تلقیح‌شده در سطوح تنش خشکی ۲۵، ۵۰ و ۷۵ درصد ظرفیت زراعی به‌ترتیب ۲۴/۶۷، ۳۸/۶۷ و ۳۹ درصد بود که بین تیمار ۷۵ درصد ظرفیت زراعی و ۵۰ درصد ظرفیت زراعی تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. همچنین نشانه‌ای از تشکیل همزیستی میکوریزی در تیمارهای بدون تلقیح با قارچ ترافل تابستانه مشاهده نشد (شکل ۴F).

### نتایج صفات فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان بلوط ایرانی تحت تأثیر تلقیح با قارچ ترافل تابستانه و تنش خشکی

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که تنش خشکی و تلقیح با ترافل تابستانه اثر معنی‌داری بر محتوای رطوبت نسبی برگ و رنگدانه‌های فتوسنتزی در سطح احتمال ۱ درصد داشته است، درحالی که تأثیر متقابل این دو معنی‌دار نبود (جدول ۱ و ۲). نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که محتوای رطوبت نسبی برگ در تنش خشکی ۷۵ درصد ظرفیت زراعی (۸۵/۲۲ درصد) بیشترین و در تنش خشکی ۲۵ درصد ظرفیت زراعی (۷۲/۷۵ درصد) کمترین بود و هر سه سطح با هم تفاوت معنی‌دار داشتند. همچنین میانگین محتوای رطوبت نسبی برگ در تیمار تلقیح با ترافل تابستانه بیشترین (۸۱/۲۷ درصد) و در تیمار شاهد (بدون تلقیح) کمترین (۷۶/۶۴ درصد) بود و با هم تفاوت معنی‌دار داشتند (شکل ۵A, B). نتایج مقایسه میانگین‌های مقدار کلروفیل نیز نشان داد که تلقیح بلوط با ترافل تابستانه مقدار کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل را به‌ترتیب ۱۷، ۱۱ و ۱۵ درصد نسبت به شرایط بدون تلقیح به‌طور معنی‌داری افزایش داد

ظرفیت زراعی (شاهد) و کمترین مقدار آنها (۰/۹۶)، ۰/۴۲ و ۱/۴۸ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) در تیمار ۲۵ درصد ظرفیت زراعی (تنش شدید) به‌دست آمد (شکل ۵C, D).

(شکل ۵C, D). افزایش سطح تنش خشکی سبب کاهش کلروفیل شد، به‌طوری که بیشترین مقدار کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل (۱/۱۶، ۰/۴۹ و ۱/۷۶ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) در تیمار ۷۵ درصد



شکل ۳- الکتروفورز ژل محصول ITS-PCR، از استخراج ریشه نهال‌های تلقیح‌شده با قارچ (*Tuber aestivum*) (A) با استفاده از جفت آغازگر ITS1/ITS4 روی ژل آگارز ۱ درصد، ۵۵۰ bp

Figure 3. Gel electrophoresis of the ITS-PCR product from root extract of seedlings inoculated with *Tuber aestivum* (A) using ITS1/ITS4 primers on 1% agarose gel, 550 bp

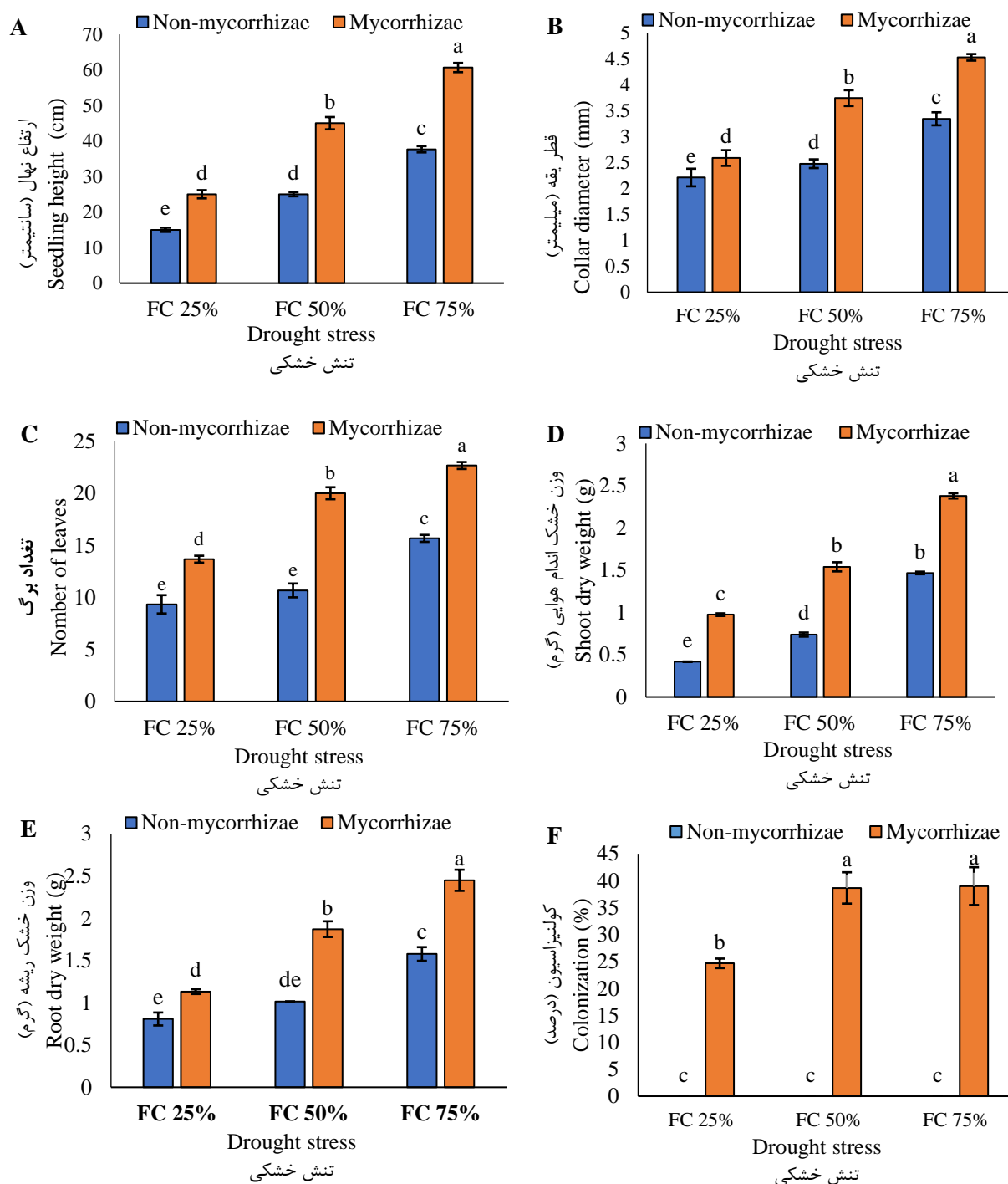
جدول ۱- تجزیه واریانس صفات رویشی بلوط ایرانی تلقیح‌شده با ترافل تابستانه تحت تنش خشکی

Table 1. Analysis of variance of morphological traits of Persian oak inoculated with summer truffle (*Tuber aestivum*) under drought stress

منابع تغییر	درجه آزادی	ارتفاع نهال	قطر	تعداد برگ	وزن خشک اندام هوایی	وزن خشک ریشه	کلونیزاسیون
SOV	df	Seedling height	Shoot diameter	Number of leaves	Shoot dry weight	Root dry weight	Colonization
تلقیح قارچ Inoculation	1	1404.500**	4.004**	213.556**	2.575**	2.110**	5236.056**
تنش خشکی Drought stress	2	1276.389**	3.556**	88.167**	2.317**	1.638**	100.389**
تلقیح قارچ×تنش خشکی Inoculation×Drought stress	2	69.500**	0.364*	9.389**	0.050**	0.146**	100.389**
خطا Error	12	3.736	0.060	0.944	0.002	0.019	10.778
ضریب تغییرات (درصد) (%) CV	-	5.57	7.77	6.34	3.97	9.28	19.25

ns، \* و \*\* به ترتیب معنی‌دار نبودن و معنی‌داری در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

ns, \* and \*\*: not significant, significant at the 5% and 1% of probability levels, respectively



شکل ۴- مقایسه میانگین صفات ارتفاع نهال (A)، قطر (B)، تعداد برگ (C)، وزن خشک اندام هوایی (D)، وزن خشک ریشه (E) و کولونیزاسیون (F) بلوط ایرانی تلقیح شده با ترافل تابستانه (*Tuber aestivum*) تحت تنش خشکی

Figure 4. Mean comparison of plant height (A), collar diameter (B), number of leaves (C), shoot dry weight (D), root dry weight (E) and colonization (F) traits of Persian oak inoculated with summer truffle (*Tuber aestivum*) under drought stress

ستون‌های دارای حداقل یک حرف مشترک، اختلاف معنی‌داری براساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد ندارند  
Columns with at least one letter in common did not have a statistically significant difference based on the Duncan test at %5

جدول ۲- تجزیه واریانس صفات فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان بلوط ایرانی تلقیح‌شده با ترافل تابستانه *(Tuber aestivum)* تحت تنش خشکی

Table 2. Analysis of variance of physiological, biochemical and antioxidant enzyme traits in Persian oak inoculated with summer truffle (*Tuber aestivum*) under drought stress

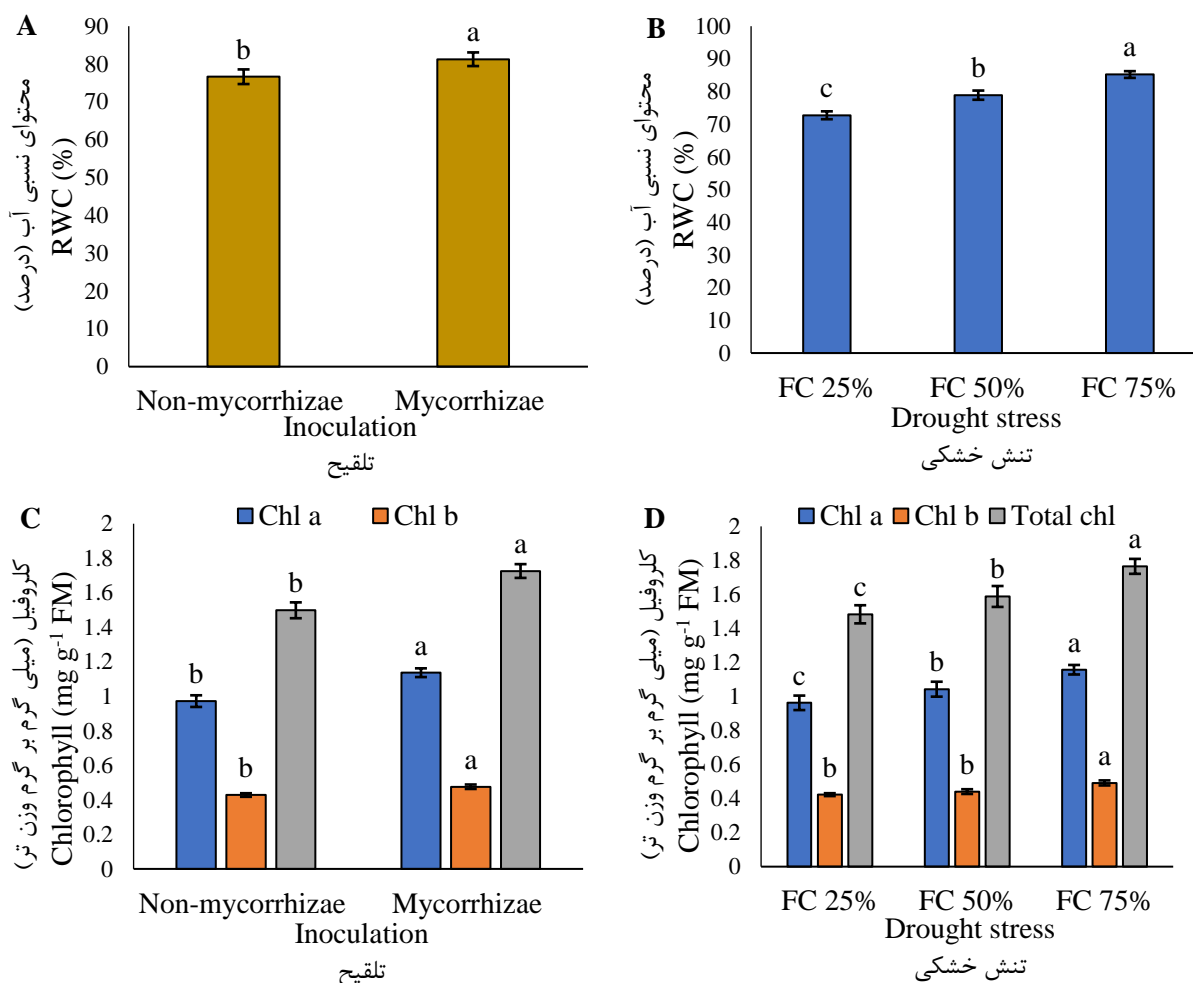
منابع تغییر	درجه آزادی	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	پرولین	پراکسید هیدروژن	مالون دی‌آلدهید	آنزیم سوپراکسید دیسموتاز	آنزیم کاتالاز	آنزیم پراکسیداز	محتوای آب نسبی
SOV	df	Chlorophyll a	Chlorophyll a	Total chlorophyll	Prolin	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	MDA	SOD activity	CAT activity	POD activity	RWC
تلقیح Inoculation	1	0.1221**	0.0103**	0.2330**	3.502**	31.284**	65.972**	63.897**	0.213*	14.037**	96.142**
تنش خشکی Drought stress	2	0.0574**	0.0076**	0.1217**	64.554**	120.574**	440.163**	433.721**	7.458**	140.883**	233.141**
تلقیح قارچ × تنش خشکی Drought × Inoculation stress	2	0.0021 <sup>ns</sup>	0.0004 <sup>ns</sup>	0.0018 <sup>ns</sup>	1.091*	15.835**	2.649**	22.777**	0.942**	3.437**	1.174 <sup>ns</sup>
خطا Error	12	0.0008	0.0003	0.0016	0.355	1.238	0.375	4.417	0.026	0.222	2.993
ضریب تغییرات (درصد) CV (%)		2.67	3.69	2.51	9.83	11.00	3.71	11.76	6.06	3.65	2.19

<sup>ns</sup>, \* و \*\* به ترتیب معنی‌دار نبودن و معنی‌داری در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

<sup>ns</sup>, \* and \*\*: not significant, significant at the 5% and 1% of probability levels, respectively

شرایط تلقیح و عدم تلقیح بلوط ایرانی با ترافل تابستانه افزایش یافت. اما تلقیح بلوط ایرانی با ترافل تابستانه توانست مقدار پراکسید هیدروژن را در شرایط تنش متوسط (۵۰ درصد ظرفیت زراعی) کاهش دهد؛ اما در تنش شدید و کم، تفاوت معنی‌داری بین آنها وجود نداشت (شکل ۶B). به‌منظور بررسی شدت خسارت واردشده به غشای سلولی در گیاهان، مقدار مالون دی‌آلدهید تشکیل‌شده اندازه‌گیری و به‌عنوان شاخص تعیین خسارت در شرایط تنش استفاده شد. بیشترین مالون دی‌آلدهید برگ در تیمار تنش خشکی ۲۵ درصد ظرفیت زراعی در شرایط تلقیح نشدن با ترافل تابستانه (۲۷/۴۰ نانومول بر گرم وزن تر) و کمترین مقدار آن در سطح بدون تنش ۷۵ درصد ظرفیت زراعی × تلقیح با ترافل تابستانه (۶/۱۵ نانومول بر گرم وزن تر) به‌دست آمد. در کل تلقیح بلوط ایرانی با ترافل تابستانه موجب کاهش خسارت وارد بر غشای سلولی (۲۲/۹۷ درصد) شد (شکل ۶C).

صفات بیوشیمیایی از جمله پرولین، مالون دی‌آلدهید و پراکسید هیدروژن برگ بلوط ایرانی نیز تحت تأثیر اثر متقابل تلقیح با ترافل تابستانه × تنش خشکی در سطح احتمال ۱٪ قرار گرفت (جدول ۲). با افزایش مقدار تنش خشکی بر مقدار پرولین برگ در شرایط تلقیح و عدم تلقیح بلوط ایرانی با ترافل تابستانه افزوده شد. بیشترین مقدار پرولین برگ در تیمار تنش خشکی ۲۵ درصد ظرفیت زراعی و در شرایط عدم تلقیح با ترافل تابستانه (۱۰/۴۴ میکرو مول بر گرم وزن تر) مشاهده شد. از طرف دیگر کمترین مقدار آن در سطح آبیاری ۷۵ درصد ظرفیت زراعی در هر دو شرایط تلقیح و عدم تلقیح به‌دست آمد و با هم تفاوت معنی‌دار نداشتند (شکل ۶A). پراکسید هیدروژن به‌عنوان اصلی‌ترین عامل مؤثر در خسارت‌های تنش اکسیداتیو یکی از عوامل مؤثر در بروز پراکسیداسیون لیپیدی است. نتایج نشان داد که مقدار پراکسید هیدروژن با افزایش تنش خشکی در



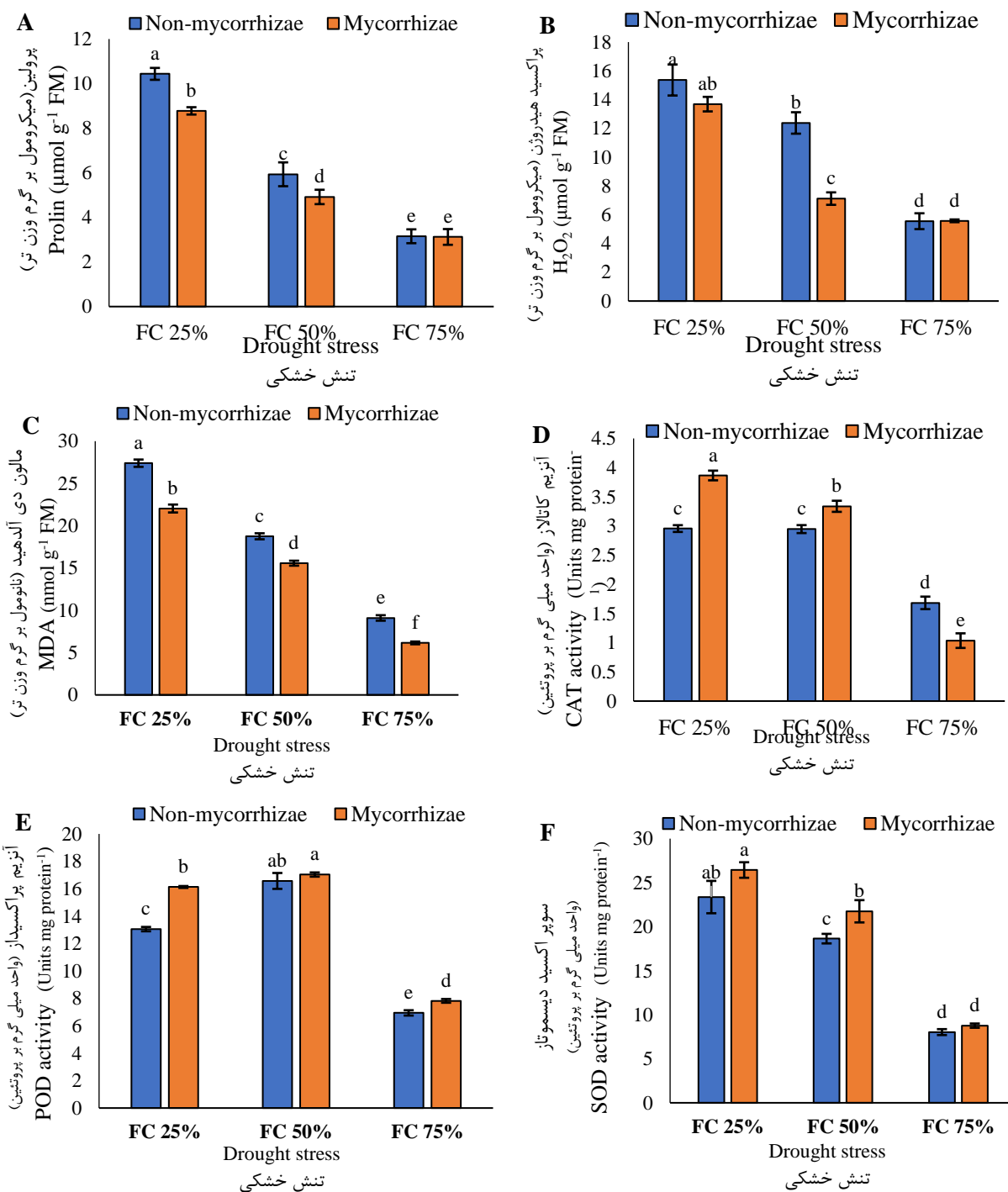
شکل ۵- مقایسه میانگین صفات محتوای نسبی آب (A و B) و کلروفیل (C و D) بلوط ایرانی تلقیح‌شده با ترافل تابستانه (*Tuber aestivum*) تحت تنش خشکی

Figure 5. Mean comparison of RWC (A and B) and chlorophyll (C and D) traits of Persian oak inoculated with summer truffle (*Tuber aestivum*) under drought stress.

ستون‌های دارای حداقل یک حرف مشترک، اختلاف معنی‌داری براساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد ندارند. Columns with at least one letter in common did not have a statistically significant difference based on the Duncan test at %5

با ترافل تابستانه، فعالیت آنزیم کاتالاز را در سطح تنش ۷۵ درصد ظرفیت زراعی (نرمال) ۳۸ درصد کاهش داد، اما فعالیت در تنش متوسط (۵۰ درصد ظرفیت زراعی) و شدید (۲۵ درصد ظرفیت زراعی) به ترتیب ۱۳ و ۳۰ درصد افزایش یافت (شکل ۶D). نتایج مقایسه میانگین فعالیت آنزیم پراکسیداز هم نشان داد که با افزایش تنش خشکی بر مقدار این آنزیم در شرایط تلقیح و بدون تلقیح بلوط ایرانی با ترافل تابستانه ابتدا افزوده شد؛ اما در تنش شدید کاهش معنی‌داری نسبت به سطح تنش متوسط نشان

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که تأثیر تنش خشکی، تلقیح با ترافل تابستانه و اثر متقابل آنها بر مقدار فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان بلوط ایرانی در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). مقدار فعالیت آنزیم کاتالاز در شرایط بدون تلقیح با ترافل تابستانه در سطح تنش ۵۰ درصد ظرفیت زراعی افزایش یافت (۲/۹۴ واحد میلی‌گرم بر پروتئین) اما با افزایش شدت تنش (۲۵ درصد ظرفیت زراعی) مقدار آن تغییر معنی‌داری با سطح تنش متوسط نداشت (۲/۹۵ واحد میلی‌گرم بر پروتئین). تلقیح بلوط ایرانی



شکل ۶- مقایسه میانگین صفات پرولین (A)، مالون دی آلدئید (B)، پراکسید هیدروژن (C)، آنزیم کاتالاز (D)، آنزیم پراکسیداز (E) و آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (F) بلوط ایرانی تلقیح شده با ترافل تابستانه (*Tuber aestivum*) تحت تنش خشکی

Figure 6. Mean comparison of prolin (A), MDA (B), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (C), CAT activity (D), POD activity (E) and SOD activity (F) traits of Persian oak inoculated with summer truffle (*Tuber aestivum*) under drought stress

ستون‌های دارای حداقل یک حرف مشترک، اختلاف معنی‌داری بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد ندارند  
Columns with at least one letter in common did not have a statistically significant difference based on the Duncan test at %5

شدید اثرهای مخرب بر قارچ‌های همزیست داشته است و به‌موجب آن صفات رویشی نیز روند کاهشی داشته‌اند. اما شایان ذکر است که با توجه به معنی‌دار نبودن میزان کلونیزاسیون در نهال‌های تنش ۵۰ و ۷۵ درصد ظرفیت زراعی، می‌توان گفت در تنش ۵۰ درصد، قارچ‌های میکوریز عملکرد مناسبی داشته و توانایی گیاه را معادل ۷۵ درصد سطح آبیاری بهبود بخشیده‌اند و این روند در بهبود فعالیت‌های فیزیولوژیک نهال‌ها نیز مشهود است.

تحقیقات نشان داده‌اند که همزیستی با قارچ‌های ترافل از جمله *T. indicum* و *T. melanosporum* سبب افزایش رشد، ارتفاع و قطر نهال‌ها شده است. تلقیح قارچ‌های اکتومیکوریز جنس *Tuber* با نهال‌های مختلف از جمله *Pinus halepensis* Mill. و *Carya K.Koch* *illinoensis* (Wangenh.) نیز سبب افزایش زیست‌توده و رشد بهتر آنها در تنش‌های متوسط خشکی در محیط طبیعی شده است (Ghanbary et al., 2020; Huang et al., 2021; Dominguez et al., 2012; Karimi et al., 2022).

محتوای رنگدانه کلروفیل نیز شاخصی مهم برای فعالیت فتوسنتز گیاه است و کاهش محتوای کلروفیل تحت تنش خشکی نیز به‌دلیل اکسیداسیون نوری، تخریب کلروفیل یا اختلال در بیوسنتز کلروفیل رخ می‌دهد (Smirnoff, 1993; Ghanbary et al., 2020). در پژوهش حاضر، مقدار کلروفیل نهال‌های بلوط ایرانی تحت تیمارهای تنش خشکی کاهش یافت، اگرچه میزان کاهش در تیمار تلقیح با ترافل تابستانه ملایم‌تر بود. محتوای کلروفیل به‌ویژه غلظت کلروفیل a در برگ نهال‌های میکوریزی نسبت به نهال‌های شاهد (بدون تلقیح) به‌طور معنی‌داری افزایش یافت که بهبود رشد و افزایش صفات رویشی در نهال‌های تلقیح شده را در پی داشت. نتایج پژوهش کنونی با یافته‌های تحقیقات پیشین مبنی بر افزایش غلظت کلروفیل گیاهان تیمار شده با قارچ‌های ترافل بیابانی و جنگلی نسبت به گروه شاهد، همخوانی دارد. این

داد. همچنین نتایج نشان داد که کمترین فعالیت آنزیم پراکسیداز در تیمار بدون تلقیح با ترافل تابستانه در تنش ۷۵ درصد ظرفیت زراعی (۶/۹۴ واحد میلی‌گرم بر پروتئین) و بیشترین فعالیت، در تیمار تلقیح با ترافل تابستانه در تنش ۵۰ درصد ظرفیت زراعی (۱۷/۰۳ واحد میلی‌گرم بر پروتئین) وجود دارد (شکل ۶E). فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز نیز با افزایش شدت تنش افزایش پیدا کرد، به‌طوری که بیشترین فعالیت این آنزیم در تنش ۲۵ درصد ظرفیت زراعی بود. برخلاف بقیه آنزیم‌های اندازه‌گیری‌شده، فعالیت این آنزیم با افزایش شدت تنش کاهش نیافت و در شرایط تلقیح و بدون تلقیح بلوط ایرانی با ترافل تابستانه با افزایش شدت تنش بر مقدار آن افزوده شد که این افزایش در شرایط تلقیح بیشتر بود؛ اما در تیمار ظرفیت مزرعه‌ای ۷۵ درصد وجود نداشت (شکل ۶F).

## بحث

آب و روابط آبی، ارتباط تنگاتنگی با میزان فعالیت حیاتی درخت و سلامت آن دارد. در شرایط خشکسالی روابط آبی گیاه مختل می‌شود و بر فعالیت‌های حیاتی آن تأثیر می‌گذارد و آن را ضعیف می‌کند که به‌صورت خشکیدگی‌های تاجی ظاهر می‌شود (Haase & Hellwig, 2022). قارچ اکتومیکوریزا (ترافل‌ها) نقش مهمی در اکوسیستم جنگلی دارند و با بهبود جذب آب و مواد مغذی و موجب افزایش رشد گیاهان میزبان می‌شوند (Fu et al., 2016). در پژوهش حاضر، قرار گرفتن همزمان نونهال‌های بلوط ایرانی در معرض تنش خشکی و تلقیح با ترافل تابستانه تأثیر معنی‌داری بر زیست‌توده هوایی، ریشه، تعداد برگ و ارتفاع آنها داشت. تنش خشکی سبب کاهش صفات رویشی و تلقیح با ترافل تابستانه همزمان با افزایش کلونیزاسیون ریشه، سبب بهبود رشد در سطوح مختلف تنش خشکی به‌ویژه در سطح تنش ۵۰ درصد ظرفیت زراعی شد. البته نمی‌توان از این نکته غافل شد که تنش‌های بسیار

تلقیح‌شده و غیرتلقیح به‌طور چشمگیری افزایش داد و گیاهان میکوریزی محتوای MDA کمتری نسبت به گیاهان غیرمیکوریزی متناظر داشتند. این نتایج بیان می‌کند که تلقیح قارچ‌های اکتومیکوریز ترافل موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی برای حذف ROS شد که کاهش آسیب اکسیداتیو ناشی از تنش خشکی را در پی دارد و در نتیجه به بهبود یکپارچگی غشای سلولی کمک می‌کند (Huang et al., 2021).

در این پژوهش، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شامل پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در پاسخ به محدودیت آب در نهال‌های بلوط افزایش یافت. افزایش این سازوکارهای دفاعی در نهال‌های بلوط ایرانی تحت شرایط خشکی به‌صورت سازوکار مقابله با تولید زیاد گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) عمل کرده و از تخریب بیش از حد کلروفیل و غشای سلولی جلوگیری کرده است. مشابه نتایج حاضر، بقیه مطالعات، افزایش فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی در بلوط را در پاسخ به تنش محدودیت آب گزارش کرده‌اند (He et al., 2017; Jafarnia et al., 2018; Ghanbary et al., 2020; Karimi et al., 2022; Xiong et al., 2022). یافته‌های حاضر نشان داد که فعالیت SOD به‌طور چشمگیری در نهال‌های تلقیح‌شده با افزایش کلونیزاسیون و در مقایسه با نهال‌های تلقیح‌نشده افزایش یافته است، افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) نشان‌دهنده این است که تلقیح *Tuber aestivum* توانایی گیاهان میزبان را در مقابله با تنش‌های محیطی بهبود بخشیده است. در مراحل اولیه همزیستی، کلونیزه شدن ریشه‌های نهال توسط هیف‌های ترافل، اثر بسزایی بر محیط اطراف ریشه‌ها دارد. این تأثیر سبب افزایش فعالیت متابولیکی برخی مواد در ریشه‌ها و تغییر در تعادل متابولیسم اکسیژن فعال می‌شود که خود، فعالیت SOD را افزایش می‌دهد. تحقیقات قبلی نشان داده است که فعالیت ریشه گیاهان *Pinus massoniana* Lamb. و *Quercus acutissima* در اثر تلقیح با *T. indicum* افزایش یافت. همچنین مشابه نتایج پژوهش

یافته‌ها نشان می‌دهد که تلقیح با قارچ‌های میکوریزی می‌تواند سبب بهبود مقدار کلروفیل و رشد گیاه شود (Krishna et al., 2005; Turgeman et al., 2011; Navarro-Ródenas et al., 2013; Zhang et al., 2019; Álvarez-Lafuente et al., 2018).

پرولین نیز به‌دلیل عملکردهایش به‌عنوان اسمولیت و جاذب ROS اثر مهمی در مقاومت گیاه به تنش‌های زیستی و غیرزیستی دارد (Hackbarth et al., 2018)؛ زیرا همچون مولکول اسمزی عمل کرده و از سلول گیاهی در برابر ROS محافظت می‌کند (Szabados & Savoure, 2010). در پژوهش‌های پیشین، افزایش پرولین برگ بلوط در پاسخ به کمبود آب بارها گزارش شده است (Jafarnia et al., 2018; Ghanbary et al., 2020; Karimi et al., 2022; Xiong et al., 2022). با این حال، نتایج این پژوهش نشان داد که مقدار پرولین در گیاهان تلقیح‌شده با ترافل تابستانه و تحت شرایط تنش خشکی کمتر از گیاهان شاهد (تلقیح‌نشده) بود. این کاهش ممکن است به‌دلیل توانایی بیشتر ریشه‌های میکوریزی در جذب آب باشد که اهمیت زیادی نیز در کاهش اثرهای تنش خشکی دارد. چند گزارش دیگر نیز از کاهش محتوای پرولین در گیاهان تلقیح‌شده با گونه‌های مختلف جنس *Tuber* منتشر شده است (Navarro-Ródenas et al., 2013; Álvarez-Lafuente et al., 2018). تولید بیش از حد ROS مانند  $H_2O_2$ ، از اولین پاسخ‌های متابولیکی گیاهان قرارگرفته در معرض تنش است (Coram et al., 2020; Savi et al., 2008). داده‌های این پژوهش نشان داد که تنش خشکی سبب تولید بیش از حد  $H_2O_2$  شده است که نشان‌دهنده ایجاد شرایط اکسیداتیو در گونه بلوط ایرانی تحت بررسی است. این افزایش در غلظت  $H_2O_2$  احتمالاً به آسیب سلولی منجر می‌شود که به‌وضوح با افزایش مقدار مالون دی‌آلدئید (MDA) سنجدیده می‌شود (Cotrozzi et al., 2016; Ghanbary et al., 2018). تنش خشکی، محتوای MDA برگ بلوط ایرانی را در هر دو تیمار

چشمگیری در پارامترهای رشد بلوط ایرانی تحت شرایط تنش خشکی شد. قارچ ترافل تابستانه دامنه اکولوژیکی گسترده، سازگاری زیاد با محیط‌های مختلف و همچنین توانایی همزیستی اکتومیکوریزی با انواع زیادی از درخت‌های میزبان را دارد. جنگل‌های زاگرس نیز پتانسیل بالقوه فراوانی از نظر گونه درختی و خاک قلیایی مناسب رشد این گونه ترافل دارند. با توجه به ارزش اقتصادی منحصربه‌فرد این قارچ و قدرت رقابت درآمد حاصل از آن در مقایسه با درآمد حاصل از دامداری در هر هکتار از جنگل‌های بلوط زاگرس، به نظر می‌رسد این روش نیز می‌تواند به‌عنوان یکی از روش‌های جنگلکاری در غرب با کسب حمایت و مشارکت جامعه محلی و همچنین توانمندسازی آنها در زاگرس پیشنهاد شود.

#### سپاسگزاری

از گروه تحقیقاتی کوژین برای همکاری در فرایند تلقیح و نگهداری از نهال‌ها و از جناب آقای طاهر عربی برای همکاری در فراهم کردن قارچ ترافل مناسب و بالغ با استفاده از سگ آموزش‌دیده ترافل‌یاب (یلمان) سپاسگزاری می‌شود.

حاضر، افزایش فعالیت آنزیم‌های SOD و POD در گیاهان میکوریزی‌شده با گونه‌های مختلف ترافل گزارش شده است (Huang et al., 2021; Zhang et al., 2019). به‌طور کلی می‌توان گفت با وجود تنش کمبود آب در نهال‌های بلوط ایرانی، ترافل تابستانه توانست به‌طور مطلوبی همزیستی اکتومیکوریزی تشکیل دهد و عملکرد مناسبی در بهبود صفات رویشی و فیزیولوژیکی نهال‌های میزبان داشته باشد.

#### نتیجه‌گیری

در این پژوهش، اثرهای مثبت و معنادار تلقیح قارچ *Tuber aestivum* بر پاسخ‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی بلوط ایرانی *Quercus brantii* در شرایط تنش خشکی بررسی شد. نتایج نشان داد که افزایش کلونیزاسیون ریشه‌ها و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سبب کاهش سطح مالون دی‌آلدهید و پراکسید هیدروژن در نهال‌های تلقیح‌شده با *T. aestivum* نسبت به نهال‌های شاهد شد. این تغییرات بیانگر تقویت سازوکارهای دفاعی گیاه و کاهش استرس اکسیداتیو است. همزیستی و کلونیزاسیون ریشه‌ها توسط هیف‌های قارچ ترافل تأثیرات مثبتی بر محیط ریشه‌ها داشت و سبب بهبود

#### References

- Agerer, R. (2006). Fungal relationships and structural identity of their ectomycorrhizae. *Mycological progress*, 5, 67-107. <https://doi.org/10.1007/s11557-006-0505-x>
- Álvarez-Lafuente, A., Benito-Matías, L.F., Peñuelas-Rubira, J.L., & Suz, L.M. (2018). Multi-cropping edible truffles and sweet chestnuts: Production of high-quality *Castanea sativa* seedlings inoculated with *Tuber aestivum*, its ecotype *T. uncinatum*, *T. brumale*, and *T. macrosporum*. *Mycorrhiza*, 28(1), 29-38. <https://doi.org/10.1007/s00572-017-0805-9>
- Arnon, D.I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant physiology*, 24(1), 1. <https://doi.org/10.1104/pp.24.1.1>
- Bach, C., Beacco, P., Cammaletti, P., Babel-Chen, Z., Levesque, E., Todesco, F., Cotton, C., Robin, B., & Murat, C. (2021). First production of Italian white truffle (*Tuber magnatum* Pico) ascocarps in an orchard outside its natural range distribution in France. *Mycorrhiza*, 31, 383-388. <https://doi.org/10.1007/s00572-020-01013-2>
- Bates, L.S., Waldren, R.P.A., & Teare, I.D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and soil*, 39, 205-207. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>

- Beauchamp, C., & Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical biochemistry*, 44(1), 276-287. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90370-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90370-8)
- Bergmeyer, H.U. (Ed.). (2012). *Methods of enzymatic analysis*. Elsevier.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Cassel, D.K., & Nielsen, D.R. (1986). Field capacity and available water capacity. *Methods of soil analysis: Part 1 Physical and mineralogical methods*, 5, 901-926. <https://doi.org/10.2136/sssabookser5.1.2ed.c36>
- Cotrozzi, L., Remorini, D., Pellegrini, E., Landi, M., Massai, R., Nali, C., Guidi, L., & Lorenzini, G. (2016). Variations in physiological and biochemical traits of oak seedlings grown under drought and ozone stress. *Physiologia plantarum*, 157(1), 69-84. <https://doi.org/10.1111/ppl.12402>
- Dib, S., & Fortas, Z. (2019). Inoculation with desert truffles increases growth of the forest seedlings *Quercus ilex* L. and *Pinus halepensis* M. *Asian Journal of Microbiology Biotechnology & Environmental Sciences*, 21, 907-914.
- Fu, Y., Li, X., Li, Q., Wu, H., Xiong, C., Geng, Q., Sun, H., & Sun, Q. (2016). Soil microbial communities of three major Chinese truffles in southwest China. *Canadian Journal of Microbiology*, 62(11), 970-979. <https://doi.org/10.1139/cjm-2016-0139>
- Gardes, M., & 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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x>
- Ghanbary, E., Kouchaksaraei, M.T., Guidi, L., Mirabolfathy, M., Etemad, V., Sanavi, S.A.M.M., & Struve, D. (2018). Change in biochemical parameters of Persian oak (*Quercus brantii* Lindl.) seedlings inoculated by pathogens of charcoal disease under water deficit conditions. *Trees*, 32, 1595-1608. <https://doi.org/10.1007/s00468-018-1736-6>
- Ghanbary, E., Tabari Kouchaksaraei, M., Zarafshar, M., Bader, K.F.M., Mirabolfathy, M., & Ziaei, M. (2020). Differential physiological and biochemical responses of *Quercus infectoria* and *Q. libani* to drought and charcoal disease. *Physiologia plantarum*, 168(4), 876-892. <https://doi.org/10.1111/ppl.13027>
- Giannopolitis, C.N., & Ries, S.K. (1977). Superoxide dismutases: II. Purification and quantitative relationship with water-soluble protein in seedlings. *Plant physiology*, 59(2), 315-318. <https://doi.org/10.1104/pp.59.2.315>
- Gryndler, M., Černá, L., Bukovská, P., Hřšelová, H., & Jansa, J. (2014). Tuber aestivum association with non-host roots. *Mycorrhiza*, 24, 603-610. <https://doi.org/10.1007/s00572-014-0580-9>
- Haase, D., & Hellwig, R. (2022). Effects of heat and drought stress on the health status of six urban street tree species in Leipzig, Germany. *Trees, Forests and People*, 8, 100252. <https://doi.org/10.1016/j.tfp.2022.100252>
- Hackbarth, C., Soffiatti, P., Zanette, F., Floh, E.I.S., Macedo, A.F., & Laureano, H.A. (2018). Free amino acid content in trunk, branches and branchlets of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae). *Journal of Forestry Research*, 29, 1489-1496. <https://doi.org/10.1007/s11676-017-0581-6>
- Hall, I.R., & Zambonelli, A. (2012). Laying the Foundations, (eds) Edible Ectomycorrhizal Mushrooms. *Soil Biology*, 34. Springer, Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-33823-61>
- He, F., Sheng, M., & Tang, M. (2017). Effects of *Rhizophagus irregularis* on photosynthesis and antioxidative enzymatic system in *Robinia pseudoacacia* L. under drought stress. *Frontiers in Plant Science*, 8, 183. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00183>

- Hodges, D.M., DeLong, J.M., Forney, C.F., & Prange, R.K. (1999). Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, 207, 604-611. <https://doi.org/10.1007/s004250050524>
- Huang, Y., Zou, J., Kang, Z., Zhang, X., Penttinen, P., & Li, X. (2021). Effects of truffle inoculation on a nursery culture substrate environment and seedling of *Carya illinoensis*. *Fungal Biology*, 125(7), 576-584.
- Iotti, M., Piattoni, F., & Zambonelli, A. (2013). Techniques for host plant inoculation with truffles and other edible ectomycorrhizal mushrooms. In *Edible Ectomycorrhizal Mushrooms: Current Knowledge and Future Prospects* (145-161). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-33823-6\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-642-33823-6_9)
- Jafarnia, S., Akbarinia, M., Hosseinpour, B., Modarres Sanavi, S.A.M., & Salami, S.A. (2018). Effect of drought stress on some growth, morphological, physiological, and biochemical parameters of two different populations of *Quercus brantii*. *Forest-Biogeosciences and Forestry*, 11(2), 212. <https://doi.org/10.3832/for2496-010>
- Jamali, S. (2017). First report of identification and molecular characterization of *Tuber aestivum* in Iran. *Agroforestry Systems*, 91, 335-343. <https://doi.org/10.1007/s10457-016-9932-0>
- JM, P. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. British Mycological Society*, 55, 158-160.
- Karimi, A., Tabari, M., Javanmard, Z., & Bader, M.K.F. (2022). Drought effects on morpho-physiological and biochemical traits in persian oak and black poplar seedlings. *Forests*, 13(3), 399. <https://doi.org/10.3390/f13030399>
- Kennedy, P. (2010). Ectomycorrhizal fungi and interspecific competition: species interactions, community structure, coexistence mechanisms, and future research directions. *New Phytologist*, 187(4), 895-910. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03399.x>
- Krishna, H., Singh, S.K., Sharma, R.R., Khawale, R.N., Grover, M., & Patel, V.B. (2005). Biochemical changes in micropropagated grape (*Vitis vinifera* L.) plantlets due to arbuscular-mycorrhizal fungi (AMF) inoculation during ex vitro acclimatization. *Scientia horticultrae*, 106(4), 554-567. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2005.05.009>
- Lilleskov, E.A., Hobbie, E.A., & Horton, T.R. (2011). Conservation of ectomycorrhizal fungi: exploring the linkages between functional and taxonomic responses to anthropogenic N deposition. *Fungal ecology*, 4(2), 174-183. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2010.09.008>
- Navarro-Ródenas, A., Bárzana, G., Nicolás, E., Carra, A., Schubert, A., & Morte, A. (2013). Expression analysis of aquaporins from desert truffle mycorrhizal symbiosis reveals a fine-tuned regulation under drought. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26(9), 1068-1078. <https://doi.org/10.1094/MPMI-07-12-0178-R>
- Pegler, D.N., Spooner, B.M., & Young, T.W. (1993). British truffles: a revision of british hypogeous fungi, *Kew Royal Botanic Gardens*.
- Percudani, R., Trevisi, A., Zambonelli, A., & Ottonello, S. (1999). Molecular phylogeny of truffles (Pezizales: Terfeziaceae, Tuberaceae) derived from nuclear rDNA sequence analysis. *Molecular phylogenetics and evolution*, 13(1), 169-180. <https://doi.org/10.1006/mpev.1999.0638>
- Reuveni, R. (2017). Biochemical markers for disease resistance. In *Molecular methods in plant pathology*. 99-114, CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780203746523>
- Reyna, S., & Garcia-Barreda, S. (2014). Black truffle cultivation: a global reality. *Forest systems*, 23(2), 317-328. <https://doi.org/10.5424/fs/2014232-04771>
- Sánchez, F.J., Manzanares, M., de Andres, E.F., Tenorio, J.L., & Ayerbe, L. (1998). Turgor maintenance, osmotic adjustment and soluble sugar and proline accumulation in 49 pea cultivars in

- response to water stress. *Field crops research*, 59(3), 225-235. [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(98\)00125-7](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(98)00125-7)
- Savi, T., Cotrozzi, L., Beruzzi, S., Nali, C., & Bove, F. (2020). Ecophysiological and biochemical traits of *Quercus ilex* trees growing under urban stress conditions. *Agrochimica: International Journal of Plant Chemistry, Soil Science and Plant Nutrition of the University of Pisa*, 64(1), 41-57.
- Schneider-Maunoury, L., Deveau, A., Moreno, M., Todesco, F., Belmondo, S., Murat, C., & Selosse, M.A. (2020). Two ectomycorrhizal truffles, *Tuber melanosporum* and *T. aestivum*, endophytically colonise roots of non-ectomycorrhizal plants in natural environments. *New Phytologist*, 225(6), 2542-2556. <https://doi.org/10.1111/nph.16321>
- Schütz, J.P. (1999). Close-to-nature silviculture: is this concept compatible with species diversity?. *Forestry*, 72(4), 359-366. <https://doi.org/10.1093/forestry/72.4.359>
- Sepahvand, D., Shirvany, A., Etemad, V., Javan-Nikkhah, M., DeLuca, T.H., & Khalilabad, A.A. (2021). The first report of *Choiromyces venosus* and a new report of *Tuber aestivum* from north Hyrcanian forest of Iran. *Central Asian Journal of Plant Science Innovation*, 1(3), 151-159. 10.22034/CAJPSI.2021.03.03
- Slankis, V. (1974). Soil factors influencing formation of mycorrhizae. *Annual Review of Phytopathology*, 12(1), 437-457. 10.1146/annurev.py.12.090174.002253
- Smirnov, N. (1993). Tansley Review No. 52. The Role of Active Oxygen in the Response of Plants to Water Deficit and Desiccation. *The New Phytologist*, 125(1), 27-58. <http://www.jstor.org/stable/2557905>
- Smith, S.E., & Read, D.J. (2010). *Mycorrhizal symbiosis*. Academic press.
- Szabados, L., & Savouré, A. (2010). Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in plant science*, 15(2), 89-97. 10.1016/j.tplants.2009.11.009
- Trappe, J.M., & Castellano, M.A. (1991). Keys to the genera of truffles (Ascomycetes). *McIlvanea*, 10, 47-65.
- Turgeman, T., Ben Asher, J., Roth-Bejerano, N., Kagan-Zur, V., Kapulnik, Y., & Sitrit, Y. (2011). Mycorrhizal association between the desert truffle *Terfezia boudieri* and *Helianthemum sessiliflorum* alters plant physiology and fitness to arid conditions. *Mycorrhiza*, 21, 623-630. <https://doi.org/10.1007/s00572-011-0369-z>
- Velikova, V., Yordanov, I., & Edreva, A.J.P.S. (2000). Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. *Plant science*, 151(1), 59-66. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(99\)00197-1](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(99)00197-1)
- Xiong, S., Wang, Y., Chen, Y., Gao, M., Zhao, Y., & Wu, L. (2022). Effects of drought stress and rehydration on physiological and biochemical properties of four oak species in China. *Plants*, 11(5), 679. <https://doi.org/10.3390/plants11050679>
- Yin, C., Wang, X., Duan, B., Luo, J., & Li, C. (2005). Early growth, dry matter allocation and water use efficiency of two sympatric *Populus* species as affected by water stress. *Environmental and Experimental Botany*, 53(3), 315-322. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2004.04.007>
- Zamani, S.M., Kazerani, F., Rabbani Nasab, H., & Ghanaei, S. (2023). Diversity and population structure of ectomycorrhizal fungi in forest habitats of summer truffle (*Tuber aestivum* Vittad. *Iranian Journal of Forest*, 14(4), 407-424. in Persian 10.22034/ijf.2022.333059.1860
- Zambonelli, A., Iotti, M., & Hall, I. (2015). Current status of truffle cultivation: recent results and future perspectives. *Italian journal of mycology*, 44, 31-40. <https://doi.org/10.6092/issn.2465-311X/5593>
- Zhang, X., Ye, L., Kang, Z., Zou, J., & Li, X. (2019). Mycorrhization of *Quercus acutissima* with Chinese black truffle significantly altered the host physiology and root-associated microbiomes. *PeerJ*, 7, e6421. <https://doi.org/10.7717/peerj.6421>



## Assessing Drought Stress Tolerance in Persian Oak Seedlings (*Quercus brantii* Lindl) Inoculated with Summer Truffle Ectomycorrhizal Fungus (*Tuber aestivum* Vittad)

D. Sepahvand<sup>1</sup>, V. Etemad<sup>2\*</sup>, A. Shirvany<sup>3</sup>, M. Javan-Nikkhah<sup>4</sup>, and T. DeLuca<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Ph.D. candidate., Dept. of Forestry, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, I. R. Iran

<sup>2</sup>Associate Prof., Dept. of Forestry, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, I. R. Iran

<sup>3</sup>Prof., Dept. Mycology and Plant Pathology, Faculty of Agriculture, University of Tehran, Karaj, I. R. Iran

<sup>4</sup>Prof., Dept. of Forestry, , University of Oregon State, Corvallis, USA

(Received: 20 July 2024; Accepted: 5 October 2024)

### Abstract

**Introduction:** Ectomycorrhizal truffle fungi (*Tuber* spp.) can establish a strong symbiotic relationship with trees in the beech family (Fagaceae), which enhances the trees growth and resilience against both biotic and abiotic stresses. Moreover, truffle fungi are economically valuable. This study aimed to assess the ectomycorrhizal colonization between Persian oak (*Quercus brantii*) and the summer truffle fungus (*Tuber aestivum*), as well as to evaluate the drought tolerance of Persian oak seedlings by measuring their morpho-physiological parameters.

**Materials and Methods:** Summer truffle samples were collected from a planted area of *Quercus castaneifolia* C.A.Mey., *Crataegus monogyna* Jacq., and *Pinus nigra* J.F.Arnold. in Mazandaran Province. Morphological, microscopic, and molecular assessments were conducted to confirm the species. Truffle inoculum was prepared and 10 mL of inoculum was injected into the roots of two-month-old Persian oak seedlings. After one year, during which mycorrhizae had formed, drought stress (25%, 50%, and 75% of field capacity) was applied for three months. Random sampling was performed by selecting five control seedlings and five inoculated with the summer truffle (*T. aestivum*). After washing the roots, they were examined under a stereomicroscope, and the percentage of colonization was recorded. DNA was extracted from the seedlings' roots using the CTAB method, and the success of the inoculation was confirmed by polymerase chain reaction (PCR). Finally, various growth and biochemical parameters of the seedlings were measured to assess plant health and development. These parameters included seedling height, collar diameter, shoot and root biomass, number of leaves, relative water content (RWC), and chlorophyll content. Additionally, oxidative stress indices such as hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), malondialdehyde (MDA), and proline (as an index of stress tolerance) were determined. The activities of antioxidant enzymes, including catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), and peroxidase (POD), were also measured to evaluate the plant's defense mechanisms against oxidative stress.

**Results:** Inoculating Persian oak seedlings with the summer truffle improved all growth traits compared to the control under all levels of drought stress, though the effect was less pronounced at 25% field capacity than at 50% field capacity. Inoculation with the summer truffle resulted in a 2.3-fold increase in shoot dry weight and a 1.8-fold increase in root dry weight under 50% field capacity drought stress, showing the most significant effect. Root inoculation with the summer truffle increased chlorophyll a, chlorophyll b, and total chlorophyll content by 17 mg, 11 mg, and 15 mg, respectively, compared to the control. Inoculation of Persian oak with the summer truffle increased CAT, POD, and SOD activities by 30%, 23%, and 13%, respectively, compared to the control. Additionally, inoculation with the summer truffle reduced MDA and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels by 19% and 10%, respectively, under severe drought stress (25% field capacity).

**Conclusion:** The summer truffle (*Tuber aestivum*) appears to have alleviated the detrimental effects of water deficit on the physiological traits of Persian oak seedlings, even under moderate to severe drought stress. The positive response of Persian oak seedlings to ectomycorrhizal inoculation with the summer truffle and their enhanced drought tolerance, this fungus can be used for planting mycorrhizal seedlings. The positive effects of this experiment could benefit local communities economically and encourage public participation in the conservation and development of these seedlings.

**Keywords:** Antioxidant enzymes, Drought stress, Ectomycorrhizal symbiosis, Truffle, Zagros restoration.