مقاله تحقیقی

تأثیر همزیستی اکتومیکوریزایی بر تحمل به خشکی در صنوبر سفیدپلت (*Populus caspica*)

سیده معصومه زمانی، محمدابراهیم فراشیانی و فرزانه کازرانی

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

مسئول مکاتبات: سیده معصومه زمانی، ایمیل: mzamani@rifr-ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۴/۰۳ ۸(۱) ۱۱-۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۸/۱۸

چکیده

کاهش منابع چوبی و نیاز فزاینده به چوب، تمایل به جنگلکاری با گونه‌های سریع‌الرشد مانند صنوبرها را افزایش داده است. اما اغلب گونه‌های صنوبر نسبت به خشکی حساس هستند. قارچ‌های میکوریز می‌توانند وضعیت آب در گیاهان را بهبود بخشند و بقا و رشد گیاهان را تحت شرایط خشکی افزایش دهند. این نوع حفاظت با متابولیسم اسیدهای آمینه تحمل گیاه به تنش خشکی را افزایش می‌دهد. در این تحقیق گیاهچه‌های سفیدپلت (*Populus caspica*) از طریق کشت بافت تکثیر، برقراری همزیستی اکتومیکوریزایی با قارچ *Pisolithus arhizus* انجام و اثر همزیستی تحت تنش خشکی بر پارامترهای فیزیولوژیکی و تجمع اسیدهای آمینه در سفیدپلت بررسی شد. نتایج نشان داد برقراری همزیستی روی گیاهچه‌ها اثرات منفی تنش خشکی را کنترل و موجب افزایش ارتفاع ساقه، بیومس ساقه و برگ، فتوسنتز، تعرق، هدایت روزنه‌ای و کلروفیل برگ شده است. پس از بررسی اسیدها آمینه در ریشه مستقل و ریشه همزیست گیاهچه‌ها و در دو حالت خشکی و آبیاری مشخص شد ریشه‌های اکتومیکوریزایی در هر دو حالت در مقایسه با شاهد دارای غلظت بالاتری از اغلب اسیدهای آمینه بودند؛ که اثبات می‌کند اسیدهای آمینه مهمترین محصولات هضم و فرم انتقال نیتروژن در بافت همزیست هستند. تجمع معنی‌دار اغلب اسیدهای آمینه مانند آسپاراژین، گلوتامین، اسید گلوتامیک، هیستیدین، تیروزین، ترئونین، آلانین و متیونین در ریشه‌های اکتومیکوریزایی تحت شرایط تنش (نسبت به ریشه‌های اکتومیکوریزایی تحت آبیاری و نیز ریشه‌های شاهد) مشاهده شد که نشان می‌دهد تجمع اسیدهای آمینه آزاد ارتباط نزدیکی با تحمل به خشکی در ریشه‌های همزیست دارند. از سوی دیگر تجمع آرژینین، سیترولین و اسید آسپارتیک در ریشه‌های مستقل سفیدپلت در شرایط آبیاری در مقایسه با ریشه‌های همزیست مشاهده شد که مؤید بکارگیری این اسیدهای آمینه در مسیرهای متابولیکی در سیستم ریشه‌ای میکوریزایی بود. ارتباط این تغییرات با عملکرد همزیستی اکتومیکوریزایی و افزایش تحمل به خشکی میزبان بحث شده است.

واژه‌های کلیدی: اسیدهای آمینه، تحمل، خشکی، همزیستی اکتومیکوریزایی، *Populus caspica*.

مقدمه

خشکی عامل محدودکننده مهمی برای رشد گیاهان و تولیدات آن‌ها بشمار می‌رود (Ciais *et al*., 2005). در حال حاضر حدود یک سوم از اراضی زمین به دلیل خشک بودن زیاد برای کشت و کار گیاهان مناسب نیستند؛ پیش‌بینی می‌شود گرم شدن همه‌گیر زمین شدت و گسترش خشکی را به چالشی اساسی در کشاورزی و نیز محصولات درختان جنگلی مبدل خواهد نمود (Hogg *et al*., 2008; Allan *et al*., 2010).

نظر به محدودیت سطح جنگل‌های طبیعی کشور، توان تولیدی کم رویشگاه‌های جنگلی و نیاز روزافزون به ماده اولیه چوب، کشت و توسعه درختان سریع الرشد می‌تواند

بخش قابل ملاحظه‌ای از احتیاجات صنایع چوب را تأمین نماید. اهمیت ویژه درختان صنوبر از نقطه نظر اکولوژیکی، سریع‌الرشد بودن، قابلیت کشت انبوه و خالص، قابلیت استفاده در بسیاری از صنایع و نقش عمده آن در اقتصاد و بازار چوب، ضرورت توجه ویژه به آن‌ها را اجتناب ناپذیر می‌نماید (Sannigrahi *et al*., 2010). راهکارهایی که موجب افزایش کمی و کیفی تولید چوب صنوبر می‌شوند، نه تنها از منظر اقتصادی به افزایش اشتغال و درآمد می‌انجامد بلکه با گسترش کاشت گونه‌های این جنس در مناطق مختلف، منجر به برخورداری از مزایای زیست محیطی نیز می‌گردد (Asadi *et al*., 2005). اما گونه‌های صنوبر معمولاً در زمین‌های مرطوب رشد می‌کنند و اغلب ژنوتیپ‌های آن نسبت به خشکی حساس هستند (Sixto *et al*., 2006).

بطور مثال خشکی گسترده و موج گرما در سال ۲۰۰۳ در اروپا تاثیر منفی معنی‌داری روی رشد گیاهان و سلامت جنگل‌ها داشته است (Breda *et al*., 2006). همچنین خشکی مهمترین فاکتور محدودکننده پایداری و استقرار نهال‌ها در طی جنگل‌کاری‌ها و احیاء جنگل‌های تخریب شده، می‌باشد (Rennenberg *et al*., 2006). اگرچه پاسخ دقیق گیاهان به تنش خشکی خاک وابسته به گونه است، اما وقوع ناگهانی خشکی به طور معمول باعث بسته شدن روزنه‌ها و در نهایت از بین رفتن گیاهان را به دنبال خواهد داشت(Pinheiro & Chaves, 2011)؛ از اینرو برای غلبه نمودن و چیره شدن بر خشکی، راهکارهایی لازم است که توانایی درختان یا نهال‌ها را در برابر استرس خشکی، بخصوص در مناطق با رطوبت پایین از طریق بهبود جذب آب و عناصر غذایی افزایش دهد و بدین ترتیب برنامه‌های جنگل‌کاری و مدیریت جنگل را با موفقیت روبرو سازد.

یکی از راهکارهایی که در سال‌های اخیر بسیار مورد توجه واقع شده است، استفاده از قارچ‌های میکوریز می‌باشد. قارچ‌های میکوریز می‌توانند وضعیت آب در گیاهان را بهبود بخشند و بدین ترتیب بقا و رشد گیاهان را تحت شرایط خشکی افزایش دهند (Smith & Read, 2008). اما وابستگی میکوریزایی گونه‌های مختلف صنوبر، میزان وابستگی آنها به میکوریزا برای تولید حداکثر رشد و اثربخشی تلقیح نهالستان‌های صنوبر با قارچ‌های میکوریز به طور کامل ارزیابی نشده است (Quoreshia & Khasaa, 2008; Cicatelli *et al*., 2019). گزارشی وجود دارد که نشان می‌دهد در نهال‌های صنوبر که با قارچ‌های اکتومیکوریز تلقیح شدند، توانایی جذب آب در ریشه‌ها افزایش یافته و میزان آب در شاخ و برگ بیشتر از گیاهان شاهد بوده است (Landhausser *et al*., 2002). همچنین تأثیر مثبت برقراری این همزیستی در بهبود وضعیت آبی نهال‌های *P. euphratica* Olivier که تحت تنش خشکی قرار داشتند در مقایسه با شاهد مشخص شده است (Luo *et al*., 2009b). مکانیسم این نوع حفاظت هنوز بدرستی روشن نشده است.

در سال‌های اخیر با توسعه علوم بیوتکنولوژی، مکانیسم مولکولی پاسخ به خشکی در گیاهان به تدریج از طریق رویکردهای ژنومی عملکردی دنبال می‌شود. محرک‌های بیرونی خشکی توسط حسگرهای ناشناخته روی غشا درک می‌شوند و سپس سیگنال‌ها از طریق مسیرهای مختلف و پیچیده سیگنال‌دهی منتقل می‌گردند، در نتیجه بیان ژن‌های پاسخ‌دهنده به خشکی و درنهایت تحمل به خشکی در گیاهان اتفاق می‌افتد (Hirayama & Shinozaki, 2010). از مکانیسم‌های تحمل خشکی در گیاهان میکوریزایی تنظیم اسمزی است که از طریق تغییر تجمع مواد محلول درون سلول‌ها (مانند پروتئین و اسیدهای آمینه) صورت می‌گیرد(Auge & Moore, 2005). تنظیم اسمزی (از طریق تجمع اسیدهای آمینه)، سمیت‌زدایی گونه‌های اکسیژن فعال و تنظیم pH درون سلولی، قسمتی از نقش اسیدهای آمینه در تحمل گیاهان به تنش خشکی می‌باشد (Ahmed *et al*., 2013). در گیاهان همزیست اکتومیکوریزایی نیز تحت تاثیر تنش رطوبتی محتوای اسیدهای آمینه به طور معنی‌داری تغییر می یابد؛ از این‌رو گفته می‌شود متابولسیم اسیدهای آمینه، نقش مهمی در تحمل این گیاهان به تنش خشکی ایفا می‌کنند (Correa & Martins–Loucao, 2011).

سفید پلت (*Populus caspica* Bornm.) از گونه‌های بومی و ارزشمند جنگل‌های جلگه‌ای هیرکانی و متعلق به جنس

صنوبر (*Populus*)، بخش (*Leuce*)، زیربخش (*Albide*) و خانواده بیدیان (Salicaceae) می‌باشد و تنها گونه صنوبر در ایران است که توان گسترش در نواحی جنگلی را دارد (Marvi Mohajer, 2005). متاسفانه این گونه صنوبر به دلیل فشارهای محیطی و اقتصادی حاکم، به شدت در معرض تخریب قرار گرفته است (Asadi *et al.*, 2005).

در این تحقیق، اثر تنش خشکی بر تعامل میان صنوبر سفیدپلت و قارچ اکتومیکوریز *Pisolithus arhizus* (Scop.) Rauschert روی خصوصیات فیزیولوژیکی و رویشی گیاه میزبان مورد بررسی قرار گرفت. همچنین جهت تعیین پاسخ گیاهان به وجود قارچ‌ها و تنش آبی، اثر همزیستی اکتومیکوریزایی تحت تنش خشکی بر تجمع اسیدهای آمینه در صنوبر سفیدپلت بررسی شد.

مواد و روش‌ها

تلقیح گیاهچه‌های *Populus caspica* توسط قارچ اکتومیکوریز

تکثیر گیاهچه‌های سفید پلت از طریق کشت بافت صورت گرفت. شاخه‌زایی این گیاهچه‌ها در محیط MS، (Murashige & Skoog, 1962). حاوی ۰/۵ mg/l از سیتوکینین BAP (6–Benzylaminopurine) صورت گرفت و برای ریشه‌زایی، شاخه‌های تولید شده به محیط MS با غلظت نصف از املاح نیترات و عناصر ماکرو و حاوی هورمون ریشه‌زایی اکسین NAA (۰/۳ mg/lit از Naphthalene Acetic Acid) و IBA (۰/۱ mg/lit از 3– Indolebutyric acid) منتقل و پس از دو هفته ریشه‌دار شدند. نگهداری کشت‌ها در اتاقک‌های رشد تحت دمای ۲۳ درجه سلسیوس و دوره نوری ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی صورت گرفته و کشت‌ها مداوم هر ۴ تا ۵ هفته به محیط جدید منتقل شدند. قارچ مورد استفاده برای تلقیح همزیستی *Pisolithus arhizus* (Scop.) Rauschert بود که از دانشگاه تربیت مدرس از آقای دکتر محمدی دریافت گردید و نگهداری آن روی محیط کشت استاندارد (Lambilliotte *et al.*, 2004) صورت گرفت. محیط کشت استاندارد شامل Glucose ۸۵ میلی‌مولار، Glutamic acid ۵ میلی‌مولار، Asparagine ۳.۳ میلی‌مولار، Ferric citrate ۵ میلی‌گرم بر لیتر، KCl ۳ میلی‌مولار، KH_2PO_4 یک میلی‌مولار، $MgSO_4$ دو میلی‌مولار، $CaCl_2$ یک میلی‌مولار، Thiamine-HCl ۰/۳ میکرومولار و ۰/۲ میلی‌لیتر بر لیتر از Stock solution of Micronutrient حاوی H_3BO_3 (۲/۸۶ گرم)، $MnCl_2$ (۱/۸۱ گرم)، $ZnSO_4$ (۰/۲۲ گرم)، $CuSO_4$ (۰/۰۸ گرم)، و Na_2MoO_4 (۰/۰۲ گرم)، به اضافه ۱/۵ درصد آگار [pH= 6.0] می‌باشد.

برای برقراری همزیستی اکتومیکوریزایی روش Marx و Bryan (۱۹۷۵) با بهینه‌سازی‌هایی مورد استفاده قرار گرفت. بدین ترتیب که از انتقال گیاهچه‌های ریشه‌دار و هم اندازه صنوبر به گلدان‌های حاوی بستر کشت پیت، پرلیت و ورمیکولیت (۲: ۰/۵: ۲، حجمی/ حجمی) استفاده شد که قبلاً توسط محیط کشت استاندارد مایع (pH= 6.0) مرطوب و توسط قارچ اکتومیکوریز به مدت دو ماه در دمای ۲۳ درجه سلسیوس کاملاً کلونیزه شده بودند. در مورد شاهد محیط مایع بدون میسلیوم قارچ به خاک اضافه شده بود. به منظور طی نمودن مراحل سازگارسازی، گیاهچه‌ها به همراه گلدان‌های مربوطه در داخل کیسه‌های پلاستیکی شفاف برای حفظ رطوبت نگهداری شدند و بعد از گذشت هفت روز از انتقال، سازگاری با هوادهی روزانه به تدریج شروع و پس از گذشت حدود چهار هفته مراحل آن تکمیل شد.گلدان‌ها دارای منفذی در انتها بوده؛ یک گیاهچه به هریک از گلدان‌ها منتقل و هریک از گیاهان روزانه با مقادیر مساوی از محیط کشت استاندارد مایع و آب، آبیاری شدند. نگهداری این گیاهان در گلخانه (دمای ۲۳ درجه سلسیوس) به مدت ۱۴ هفته صورت گرفت (Luo *et al.*, 2009b).

جهت بررسی میزان کلونیزاسیون ریشه توسط قارچ، پس از شستن کامل ریشه‌ها از خاک، ۱۰ قطعه ریشه به طول ده سانتی‌متر از هر نمونه گیاهی (۴ تکرار) جداسازی و به طور جداگانه در پتری‌های حاوی آب به قطعات یک سانتی‌متری تفکیک شدند تا در نهایت ۱۰۰ قطعه ریشه در هر نمونه گیاهی تحت مشاهدات استریومیکروسکوپی قرار گیرد.

برای محاسبه میزان کلونیزاسیون قارچی ریشه از فرمول زیر استفاده شد (Agerer, 1987–2012):

$$CRE=ER/(ER+VNR) \times 100(\%)$$

CRE: نرخ کلونیزاسیون اکتومیکوریزایی
(The colonization rate of ectomycorrhiza)
ER: تعداد نوک‌ریشه‌های اکتومیکوریزایی
(the number of ectomycorrhizal root tips)
VNR: تعداد ریشه‌های زنده فاقد اکتومیکوریزا
(the number of vital non– ectomycorrhizal root tips)

اعمال تنش خشکی و بررسی خصوصیات رشدی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی

پس از ۱۴ هفته، به‌منظور اعمال تنش خشکی، آبیاری نیمی از گیاهان تلقیح شده و نیز نیمی از گیاهان شاهد متوقف گردید. بعد از پنج روز استرس خشکی، ۱۵ گیاهچه از هر تیمار به طور تصادفی انتخاب و برای بررسی خصوصیات رشدی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مورد استفاده قرار گرفتند (Luo *et al*., 2009a).

متغیرهای فیزیولوژیک مورد ارزیابی شامل میزان کلروفیل، فتوسنتز، تعرق و هدایت روزنه‌ای بود. جهت اندازه‌گیری میزان کلروفیل برگ از دستگاه اندازه‌گیری مقدار کلروفیل (Chlorophyll Content Meter) استفاده شد. فتوسنتز، تعرق و هدایت روزنه‌ای توسط دستگاه LCA–4, ACD بین ساعت ۱۰ تا ۱۱ صبح ثبت گردید. از میان متغیرهای رشد نیز ارتفاع ساقه (به وسیله خط‌کش تا دقت میلی‌متر) مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت اندازه‌گیری وزن خشک ساقه، بافت به مدت ۴۸ ساعت در آون ۶۰ درجه سلسیوس قرار داده شد (Dominguez Nunez *et al*., 2008). به منظور تعیین وزن تورژسانسی یا آماسی، برگ‌ها به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی (برای آنکه کاهش وزنی در اثر فعالیت تنفسی رخ ندهد) در ظرف فالکون داخل آب مقطر قرار داده شده و پس از اندازه‌گیری وزن برگ‌ها در این شرایط، برگ‌ها به مدت ۴۸ ساعت در آون ۶۰ درجه سلسیوس قرار گرفته و وزن خشک آن‌ها نیز اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری وزن‌ها از ترازوی دقیق ۰/۰۰۱ گرم استفاده شد. همچنین وضعیت آبی گیاهان با اندازه‌گیری محتوای نسبی آب برگ (Leaf Relative Water Content) بر اساس فرمول زیر تخمین زده شد (Barrs & Weatherley, 1962):

محتوای نسبی آب برگ ٪ =
(وزن تر برگ – وزن خشک برگ)/ (وزن تورژسانسی برگ – وزن خشک برگ)×۱۰۰

بمنظور بررسی آمینواسیدهای ریشه‌ها، ضمن خارج نمودن این گیاهچه‌ها از گلدان، بلافاصله با استفاده از قیچی تیزی به دو قسمت شاخ و برگ و ریشه تقسیم شدند. ریشه‌ها توسط آب مقطر سترون شستشو داده شده و از سوبسترا عاری شدند و سپس در نیتروژن مایع منجمد و در فریزر ۷۰– درجه سلسیوس نگهداری شدند تا در نهایت برای بررسی‌های بیوشیمیایی به کار گرفته شوند.

جهت شناسایی و اندازه‌گیری اسیدهای آمینه بر اساس روش Henriques و همکاران (۱۹۹۲)، ۰/۰۵ گرم بافت استوک (حاصل از ادغام وزن‌های مساوی از ریشه‌های پودر شده از ۱۵ گیاهچه‌ی هر تیمار) به میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل و به آن ۱ میلی‌لیتر اتانول ۸۰٪ اضافه شد. بعد از یکنواخت کردن، میکروتیوب‌های حاوی نمونه به مدت ۱ ساعت در دمای ۸۰ درجه سلسیوس و دور ۱۰۰ دور در دقیقه داخل ترمومیکسر قرار داده شدند. سپس به مدت ۱۵ دقیقه دستگاه خاموش شده تا نمونه‌ها با محیط هم‌دما شوند. بعد از این مدت نمونه‌ها به مدت ۷ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه و دمای چهار درجه سلسیوس سانتریفوژ شدند. محلول شفاف رویی به میکروتیوب ۲ میلی‌لیتری جدید منتقل شد. سپس جهت تغلیظ این نمونه‌ها تا تبخیر کامل محلول موجود در ویال‌ها در دستگاه تغلیظ‌کننده (Consentrator) نگهداری شدند. در زمان اندازه‌گیری اسیدهای آمینه به هر نمونه تغلیظ شده یک میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر سترون اضافه، خوب مخلوط و سپس با فیلتر سر سرنگی ۰/۴۵ میکرومتر صاف شد. ۲۵۰ میکرولیتر از این محلول صاف شده به میکروتیوب دو میلی‌لیتری جدیدی منتقل و با ۲۰۰ میکرولیتر بافر بورات (۲۸۵ میلی‌گرم سدیم تترابورات ($Na_2B_4O_7$) در آب دو بار تقطیر تا حجم ۱۰ میلی‌لیتر [pH= 9.5]) و ۱۰۰ میکرولیتر مشتق‌ساز ارتوفتال آلدئید(*ortho*–phthalaldehyde= OPA)

(۵۰ میلی‌گرم ارتوفتال آلدئید، ۴/۵ میلی‌لیتر متانول، ۵۰۰ میکرولیتر بافر بورات و ۵۰ میکرولیتر بتا–مرکاپتواتانول) به مدت دو دقیقه واکنش داده شد. به محض اتمام این دو دقیقه، مقدار ۵۰ میکرولیتر اسید هیدرو کلریک نیم مولار به محلول افزوده و بعد از یکنواخت کردن از آن برای تزریق به دستگاه HPLC (Knauer, Germany) استفاده شد. برای جداسازی اسیدهای آمینه از ستون مخصوص جداسازی آمینواسیدها (HALO C18, 4.6×50mm, 2.7µm, advancedmaterialstechniligy, USA) استفاده شد، آشکارساز مورد استفاده از نوع فلورسانس (RF–10Axl) و سنجش در طول موج ۵۷۰ نانومتر بود. دمای ستون ۶۵ درجه سلسیوس، فاز متحرک مورد استفاده آب مقطر با درجه خلوص HPLC و سرعت جریان فاز متحرک ۰/۷ میلی‌متر در دقیقه بود. پس از انجام تنظیمات دستگاه و پایدار شدن آن، ۲۰ میکرولیتر از هریک از نمونه‌ها به وسیله سرنگ هامیلتون به دستگاه تزریق و کروماتوگرام مربوطه ثبت شد. این روش برای هر نمونه سه بار تکرار گردید. جهت تجزیه کمی آمینواسیدهای جداسازی شده، از روش رسم منحنی استاندارد خارجی استفاده شد. برای این منظور، استاندارد اسیدهای آمینه مختلف (Sigma Aldrich) در چندین غلظت تهیه و به دستگاه تزریق شد. سپس منحنی استاندارد (سطح زیر پیک در برابر غلظت) برای هر اسیدآمینه در نرم‌افزار Excel رسم شد. در نهایت با توجه به زمان بازداری، نوع اسیدهای آمینه موجود در نمونه و با توجه به سطح زیر پیک و نمودارهای کالیبراسیون، غلظت اسیدآمینه مورد نظر در نمونه محاسبه شد.

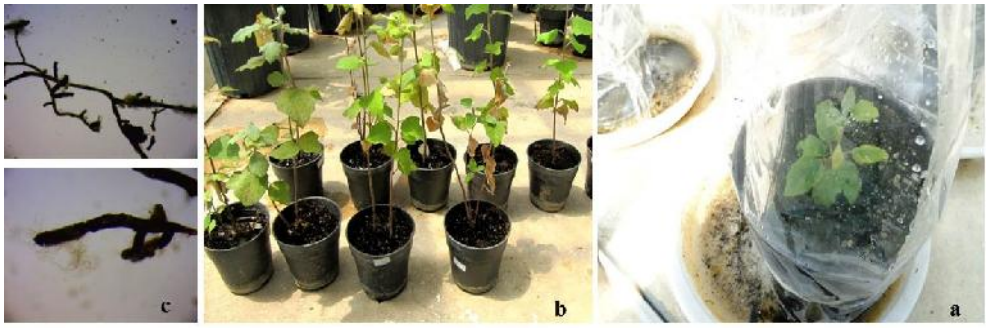
آنالیز آماری

برای بررسی نرمال بودن داده‌ها از آزمون کولموگروف–اسمیرنوف و همگنی واریانس از آزمون لون استفاده شد. تعیین سطح معنی‌داری داده‌ها توسط آزمون تجزیه واریانس فاکتوریل دو فاکتوری (میکوریز و آبیاری) و در قالب طرح پایه کاملا تصادفی صورت گرفت. مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن و با استفاده از نرم‌افزار SPSS17 انجام شد.

نتایج و بحث

– تلقیح گیاهچه‌های *Populus caspica* توسط قارچ اکتومیکوریز

پس از ۱۴ هفته نگهداری گیاهچه‌های صنوبر تلقیح شده با قارچ اکتومیکوریز در گلخانه، همزیستی اکتومیکوریزایی در ۷۱±۲ درصد سیستم ریشه‌ای این گیاهچه‌ها وجود داشت. ریشه‌های صنوبر تلقیح شده با قارچ *P. arhizus* در سوبسترای پیت، پرلیت و ورمیکولیت ساختارهای شاخص همزیستی اکتومیکوریزایی مانند غلاف هیفی (Hyphal Mantle) و شبکه هارتیگ (Hartig net) را ایجاد کردند (شکل ۱). در گیاهان غیرمیکوریزایی هیچ گونه کلونیزاسیون و تغییر ساختار مشاهده نشد.



شکل ۱– برقراری همزیستی میان گیاهچه‌های سفید پلت و قارچ اکتومیکوریز *Pisolithus arhizus*؛ a: سازگارسازی گیاه با شرایط گلخانه، b: ایجاد همزیستی در گلخانه، c: مشاهده ریشه‌های همزیست توسط استریومیکروسکوپ

Fig 1. Ectomycorrhization between *Populus caspica* and *Pisolithus arhizus*, a: Acclimatization the plant to greenhouse conditions, b: Ectomycorrhization in the greenhouse, c: Observing ectomycorrhizal roots by stereomicroscope

ورمیکولیت، پیت و ترکیب آن‌ها از مناسب‌ترین سوبستراهای مورد استفاده در این نوع سیستم سنتز همزیستی است؛ چراکه امکان توسعه طبیعی ریشه‌ها و تشکیل ریشه‌های جانبی محل استقرار قارچ اکتومیکوریز را به نحو مناسب‌تر و نیز با راندمان بالاتر فراهم می‌آورد (Duponnois & Garbay 1991; Qu *et al*., 2003).

اعمال تنش خشکی و بررسی خصوصیات رشدی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی

نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد که اثرات ساده و متقابل تنش خشکی و میکوریزا بر صفات میزان فتوسنتز، تعرق و میزان کلروفیل در سطح ۰/۰۵ درصد معنی‌دار بود. میزان هدایت روزنه‌ای تنها از همزیستی میکوریزایی تاثیر پذیرفت و صفات ارتفاع ساقه، بیومس برگ و بیومس ساقه تحت تاثیر اثرات ساده فاکتورها قرار گرفتند (جدول ۱). با مقایسه میانگین داده‌ها مشخص شد که تنش خشکی موجب کاهش معنی‌دار صفات فیزیولوژیکی مورد بررسی (شامل میزان فتوسنتز، تعرق، هدایت روزنه‌ای و کلروفیل) در گیاهان غیرمیکوریزایی شده است (جدول ۲). در مورد صفات رشدی، اگرچه تنش خشکی منجر به کاهش ارتفاع و بیومس اندام هوایی گیاه در گیاهان غیرمیکوریزایی شد؛ اما این اختلاف میان تیمارها معنی‌دار نبود (جدول ۲). علت معنی‌دار نبودن اختلاف صفات رشدی میان تیمارها احتمالاً مربوط به طولانی نبودن دوره تنش خشکی در تحقیق حاضر می‌باشد و با طولانی‌تر نمودن طول دوره خشکی مسلماً کاهش خصوصیات رشدی درگیاه به دلیل کاهش محتوای نسبی آب و متعاقباً کوچک شدن اندازه سلول‌ها، کاهش تقسیم سلول‌های مریستمی و در نتیجه کند شدن رشد برگ، توقف تولید برگ، تسریع پیری و متعاقب آن ریزش برگ‌ها اتفاق خواهد افتاد (Osuagwu *et al*., 2010).

همچنین مشخص گردید تلقیح قارچ اکتومیکوریز نسبت به تیمار آبیاری تاثیر مشابه و حتی بالاتری روی بهبود خصوصیات رشدی و فیزیولوژیکی گیاهچه‌های سفیدپلت دارد. به‌طوری که میانگین اغلب صفات رشدی و فیزیولوژیکیِ مورد بررسی، در تیمار همزیستی میکوریزایی همراه با خشکی در سطح بالاتری نسبت به میانگین این مشخصه‌ها در تیمار آبیاری قرار گرفت (جدول ۲).

کلونیزه شدن گیاهان توسط قارچ اکتومیکوریز موجب تنظیم اسمزی بهتر و بهبود وضعیت آبی گیاه می‌گردد. قارچ همزیست موجب افزایش میزان جذب آب در گیاه میزبان نسبت به تیمارهای غیرمیکوریزایی شده، افزایش جذب آب موجب تورژسانس در سلول‌ها می‌گردد که این خود عامل محرک طویل شدن سلول‌ها می‌باشد. همچنین قارچ میکوریز موجب گسترش سیستم هیفی در اطراف ریشه میزبان و در نتیجه افزایش تماس ریشه با خاک می‌گردد و در نهایت توانایی جذب آب در گیاهان میکوریزایی افزایش خواهد یافت. علاوه بر این، قارچ همزیست جذب عناصر غذایی از خاک، فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی در میزبان را افزایش داده و این عامل افزایش رشد اندام‌های هوایی و عملکرد ماده خشک آن‌ها می‌باشد (Wu *et al*., 2007; 2009). بهبود صفات رشدی (افزایش ارتفاع و بیومس هوایی گیاه) مشاهده شده در تحقیق حاضر در گیاهان میکوریزایی نسبت به گیاهان غیرمیکوریزایی با دلایل ذکر شده و نیز با نتایج تحقیقات سایر محققین مانند (Dominguez Nunez *et al*., 2008; Turgeman *et al*., 2011; Lehto & Zwiazek, 2011) مطابقت دارد.

بر اساس نتایج جدول تجزیه واریانس (جدول ۱)، اثرات ساده و متقابل تنش خشکی و همزیستی اکتومیکوریزا بر میزان نسبی آب برگ معنی‌دار بود.

تحت تنش خشکی، استفاده از اکتومیکوریزا سبب افزایش معنی‌دار میزان نسبی آب برگ نسبت به شرایط عدم استفاده از میکوریزا شد، بطوریکه استفاده از میکوریزا در شرایط خشکی افزایش ۹/۳ درصدی محتوی نسبی آب را نسبت به عدم استفاده از میکوریزا در پی داشت. این در حالی است که تحت شرایط آبیاری، استفاده از میکوریزا نسبت به تیمار عدم استفاده از میکوریزا، تنها موجب افزایش ۱/۷ درصدی محتوی نسبی آب گردید (جدول ۲). بر اساس این نتایج در شرایط تنش، اکتومیکوریزا تأثیر مثبت بالاتری بر محتوای نسبی آب برگ دارد.

جدول ۱– نتایج تجزیه واریانس برخی صفات مورفوفیزیولوژیکی گیاه سفید پلت تلقیح شده با اکتومیکوریزا تحت شرایط تنش خشکی

Table 1. Analysis of variance of some morphophysiological traits of *Populus caspica* inoculated with ectomycorrhiza under drought stress conditions

Traits	df	Mean square			
		Mycorrhizae (M)	Drought stress (D)	D×M	Error
Stem height (cm)	1	71.03⋆	20.72⋆	0.91	1.31
Leaf biomass (g)	1	19.51⋆	1.41⋆	0.02	0.1
Stem biomass (g)	1	121.152⋆	8.45⋆	0.34	1.25
Photosynthesis (umol $m^{-2}s^{-1}$)	1	19.2⋆	16.03⋆	2.7⋆	0.1
Respiration (mmol $m^{-2}s^{-1}$)	1	13.63⋆	5.27⋆	0.4⋆	0.04
Stomatal conductance (mmol $m^{-2}s^{-1}$)	1	166.65⋆	7.97	10.58	1.1
Chlorophyll (µg cm^{-2})	1	14.19⋆	21.1⋆	11.31⋆	0.4
Relative water content (%)	1	102.38⋆	30.34⋆	21.25⋆	2.14

⋆ معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ درصد

⋆Significant at 5% probability level

جدول ۲– مقایسه میانگین اثر اکتومیکوریزا و تنش خشکی بر برخی صفات رشدی و فیزیولوژیکی گیاه سفید پلت

Table 2. Mean comparisons of ectomycorrhiza and drought stress on some growth and physiological traits of *Populus caspica*

Treatment	Stem height (cm)	Leaf biomass (g)	Stem biomass (g)	Photosynthesis (umol $m^{-2}s^{-1}$)	Respiration (mmol $m^{-2}s^{-1}$)	Stomatal conductance (mmol $m^{-2}s^{-1}$)	Chlorophyll (µg cm^{-2})	Relative water content (%)
Drought	30.2±1.5b	5.2±0.58b	22.5±3.1b	3.3±0.2c	1.4±0.05c	0.06±0.01d	4.1±0.6c	68.56±0.89c
Irrigation	32.1±2.3b	5.7±0.79b	23.7±2.2b	6.8±0.55b	2.6±0.13b	0.12±0.0c	8.31±0.8ab	81.4±1.11b
Mycorrhizae +Drought	38.5±2.4ab	7.8±1.3a	27.7±2.4a	7.1±0.49ab	3.4±0.24b	0.25±0.09b	8.81±0.7a	77.81±2.23ab
Mycorrhizae + Irrigation	42.2±1.3a	8.2±1.2a	29.1±3.3a	8.5±0.71a	5.1±0.32a	0.34±0.06a	9.12±0.4a	83.1±0.59a

میانگین‌های هر ستون که دارای حروف مشترک می‌باشند براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ تفاوت معنی‌دار ندارند.

Means in each column followed by similar letter(s) are not significantly different at the 5% probability level using Duncan's multiple range tests.

مشخص شده است هورمون‌های گیاهی به عنوان مولکول‌های سیگنال به تنش خشکی پاسخ می‌دهند و وضعیت آب در گیاهان را تحت تنش تنظیم می‌نمایند (Wolters & Jürgens, 2009). در میان هورمون‌های

گیاهی، آبسیزیک اسید (ABA)، سالیسیلیک اسید (SA) و جاسمونیک اسید (JA) در پاسخ به خشکی القا می‌شوند؛ در حالی که تولید سایر هورمون‌ها مانند سیتوکینین‌ها (CK) در پاسخ به این تنش به طور معمول کاهش می‌یابد (Cortleven *et al*., 2019). در این میان یک شبکه تنظیمی پیچیده، مسیرهای متفاوت را به هم متصل می‌کند و هر هورمون را قادر می‌سازد تا در پاسخ به تنش با سایر هورمون‌ها همکاری نماید یا در تضاد عمل کند (Wilkinson & Davies, 2010; Juvany *et al*., 2013). محققان معتقدند که کاهش میزان محتوای نسبی آب در گیاه در اثر تنش خشکی مربوط به بسته‌تر شدن روزنه‌ها بوده و علت بسته شدن روزنه‌ها را مرتبط با تجمع آبسیزیک اسید می‌دانند؛ به طوری که آبسیزیک اسید به عنوان فراوان‌ترین هورمون در شرایط کمبود آب معرفی شده است. این هورمون تحت تنش خشکی در ریشه ساخته شده، در سلول‌های روزنه‌ای تجمع می‌یابد و در بسته شدن روزنه و پیری برگ ایفای نقش می‌نماید(Wilkinson & Davies, 2010). همچنین مشخص شده است آبسیزیک اسید در تنش خشکی هدایت هیدرولیکی ریشه را نیز متاثر می‌سازد (Kudoyarova *et al*., 2011). هنوز ابهامات متعددی در مورد چگونگی عملکرد هورمون‌ها و برهم کنش‌های متعدد آنها وجود دارد.

از سوی دیگر قارچ‌های اکتومیکوریزا که شبکه هیفی گسترده‌ای در خاک در همزیستی با درختان تشکیل می‌دهند؛ قادرند وضعیت کلی محتوای آب و تغذیه گیاه میزبان را بهبود بخشند (Nehls *et al*., 2010). اثرات مثبت قارچ‌های اکتومیکوریز در جذب و انتقال آب به گیاه میزبان، به تغییر در مورفولوژی ریشه و طویل کردن سیستم ریشه گیاه میزبان و افزایش سطح جذب از طریق شبکه هیفی قارچی و نیز افزایش بیان آکوآپورین‌های گیاهی نسبت داده شده است. همچنین افزایش هدایت هیدرولیکی ریشه میزبان در حضور برخی از قارچ‌های اکتومیکوریزا گزارش شده است؛ در این شرایط تجمع یون‌ها یا مواد آلی در واکوئل سلول‌های گیاهی تحت تنش خشکی، در گیاهان میکوریزایی بیشتر صورت گرفته و این مسئله موجب کاهش پتانسیل اسمزی سلول‌های گیاه می‌گردد. مجموع این تغییرات موجب تغییر نسبت آب در گیاهان میکوریزایی می‌شود (Luo *et al*., 2009a). مطابق با نتایج تحقیق حاضر گزارش‌های مشابهی نیز از افزایش میزان نسبی آب برگ در نتیجه همزیستی گیاهان با قارچ‌های اکتومیکوریزا وجود دارد (Rincón *et al*., 2005; Lehto & Zwiazek, 2011).

آنالیز داده‌های مربوط به محتوای آمینواسیدی توسط HPLC در ریشه مستقل (شاهد) و ریشه همزیست گیاهچه‌ها و در دو حالت خشکی و آبیاری، تفاوت‌های قابل توجهی را میان آن‌ها نشان داد (شکل ۲). پس از بررسی اسیدهای آمینه مشخص شد در مجموع ریشه‌های اکتومیکوریزایی سفیدپلت در هر دو حالت خشکی و آبیاری در مقایسه با شاهد دارای غلظت بالاتری از اغلب اسیدهای آمینه بودند. بعلاوه روند تغییرات غلظت هر یک از اسیدهای آمینه به تنهایی نشان داد که این افزایش، در اغلب اسیدهای آمینه در گیاهان میکوریزایی تحت تنش خشکی نرخ بالاتری نسبت به گیاهان میکوریزایی آبیاری شده داشته است. بسیاری از محققان بر این باورند که محتوای اسیدهای آمینه در گیاهان مقاوم به خشکی در شرایط تنش آبی نسبت به شاهد افزایش بیشتری دارند (Good & Zaplachinski 1994; Drossopoulos *et al*., 1995; Showler *et al*., 2007; Ahmed *et al*., 2013). اسیدهای آمینه از مهم‌ترین متابولیت‌های گیاهی هستند که نقش مهمی را در تحمل گیاهان به تنش‌های محیطی و تنظیم فعالیت‌های درونی گیاه ایفا می‌نمایند (Rampino *et al*., 2006). و همانگونه که ذکر شد در گیاهان مقاوم به خشکی نسبت به گیاهان حساس افزایش معنی‌داری در محتوای اسیدهای آمینه در شرایط تنش اتفاق می‌افتد (Obata *et al*., 2015). Ahmed و همکاران (۲۰۱۳) گزارش نمودند که در شرایط تنش خشکی در ارقام متحمل جو، محتوای اغلب اسیدهای آمینه نسبت به شرایط بدون تنش افزایش معنی‌داری می‌یابد. تاجایی‌که Good & Zaplachinski (۱۹۹۴) در مورد گیاه کلزا این افزایش را در برخی اسیدهای آمینه تا پنج برابر گزارش نموده‌اند. بر این اساس کاهش محتوای اسیدهای آمینه در گیاهان غیرمیکوریزایی سفیدپلت در شرایط تنش

نسبت به این گیاهان در شرایط آبیاری (شکل ۲) را می‌توان به غیر متحمل بودن گیاهان سفیدپلت در برابر تنش خشکی نسبت داد؛ چراکه برقراری همزیستی اکتومیکوریزایی موجب اصلاح وضعیت آبی گیاه و تحمل آن به خشکی شده و از اینرو ریشه‌های اکتومیکوریزایی سفیدپلت در حالت خشکی و در مقایسه با ریشه‌های اکتومیکوریزایی در شرایط آبیاری (شکل ۲) دارای غلظت بالاتری از اغلب اسیدهای آمینه بودند. به عبارت بهتر در تحقیق حاضر تجمع اغلب اسیدهای آمینه از جمله گلوتامیک اسید، آسپاراژین، گلوتامین، هیستیدین، تیروزین، ترئونین، آلانین و متیونین در ریشه‌های اکتومیکوریزایی تحت شرایط تنش (نسبت به ریشه‌های اکتومیکوریزایی تحت آبیاری و نیز ریشه‌های غیرمیکوریزایی) مشاهده شد که بر اساس آن می‌توان نتیجه گرفت تجمع اسیدهای آمینه آزاد ارتباط نزدیکی با تحمل به خشکی در ریشه‌های همزیست داشته و گیاهچه‌های اکتومیکوریزایی از مکانیسم‌های کارآتر و فعال‌تری در مواجه با تنش خشکی برخوردار می‌باشند.

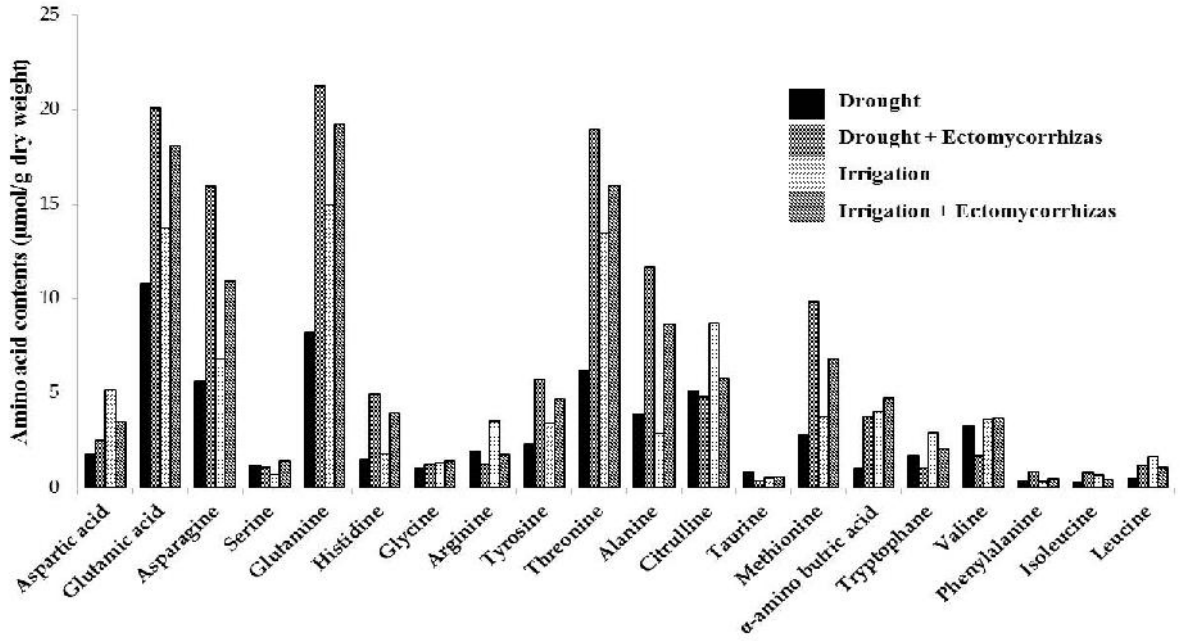
متابولیسم آمینواسیدها در همزیستی اکتومیکوریزایی تاکنون در اندک مطالعاتی مورد بررسی قرار گرفته است، اما Alvarez و همکاران (2009a) نشان داد که در ریشه‌های اکتومیکوریزی *Nothofagus dombeyi* (Mirb.) آنزیم‌های دخیل در متابولیسم آمینواسیدی فعالیت بیشتری نسبت به ریشه‌های غیرمیکوریزایی در هردو شرایط بدون تنش و (به ویژه) در شرایط تنش آبی داشته است که ظاهراً این مسئله به افزایش مقاومت در گیاهان میکوریزایی کمک کرده است. در مطالعه ایشان گیاهان اکتومیکوریزایی نسبت به شاهد بزرگتر بوده و غلظت بالاتری از مواد مغذی داشتند. بیان آنزیم‌های دخیل در متابولیسم آمینواسیدی در قارچ درگیر در همزیست اکتومیکوریزایی در مقایسه با قارچ اکتومیکوریز در کشت خالص بیشتر بود (Alvarez *et al*., 2009a).

از سوی دیگر افزایش غلظت اسیدهای آمینه در ریشه‌های اکتومیکوریزایی سفیدپلت در هر دو حالت خشکی و آبیاری در مقایسه با شاهد اثبات می‌کند اسیدهای آمینه مهمترین محصولات هضم و فرم انتقال نیتروژن در بافت همزیست هستند. افزایش غلظت اسیدهای آمینه در ریشه گیاهان میکوریزایی در یافته‌های دیگر پژوهشگران نیز آمده است (Henriques *et al*., 1992; Guescini *e al*., 2003; Morel *et al*., 2005; Luo *et al*., 2009a). همچنین گزارش شده است که غلظت این ترکیب‌های آلی بسته به نوع ترکیب قارچ– میزبان حتی در یک گونه میزبان نیز متفاوت است (Luo *et al*., 2009a; Matsubara *et al*., 2009).

گیاهان به عنوان موجودات غیر متحرک مجبور به سازگاری با شرایط محیطی که رشد بهینه و توسعه آن‌ها را متاثر می‌سازد می‌باشند. این سازگاری مبتنی بر مکانیسم‌های ادراک و ارسال سیگنال‌هایی است که در نهایت موجب می‌شود اندام‌های گیاهی فیزیولوژی و مورفولوژی خود را در پاسخ به محرک‌های مختلف تغییر داده و اصلاح کنند؛ مانند تغییرات ساختاری، بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و مولکولی که در گیاه میزبان همزیستی اکتومیکوریزایی روی می‌دهد تا همزیستی متعادلی را با قارچ همزیست برقرار سازد (Smith & Read, 2008). در این میان میزان دسترسی به نیتروژن و وضعیت نیتروژنی گیاه مهمترین فاکتور محدود کننده رشد در بسیاری از اکوسیستم‌هاست و برقراری همزیستی میکوریزایی راهکار مهمی برای بهینه‌سازی آن می‌باشد(Chalot *et al*., 2006).

جذب نیتروژن برای گیاه میکوریزایی توسط میسلیوم خارج ریشه‌ای در فرم‌های آلی یا معدنی روی می‌دهد؛ اما گفته می‌شود که اسیدهای آمینه مهمترین منبع مورد استفاده برای هضم نیتروژن بوده و فرم نیتروژنی که درون میسلیوم قارچی و غلاف قارچ (یعنی ناحیه‌ای که جذب عناصر غذایی توسط سیستم ریشه میزبان روی می‌دهد) انتقال می‌یابد و در نهایت به سلول گیاهی ارسال می‌شود، همین اسیدهای آمینه می‌باشند (Correa & Martins–Loucao, 2011). در واقع حتی پس از جذب فرم‌های معدنی نیتروژن، تبدیل آن‌ها به این اسیدهای آلی صورت می‌گیرد تا در نهایت آمینواسیدها از خلال میسلیوم خارج ریشه‌ای، میسلیوم درون‌ریشه‌ای و سطح مشترک همزیستی عبور کرده و به سلول گیاه ارسال شوند (Chalot *et al*., 2006; Correa & Martins–Loucao, 2011). با در نظر گرفتن این گزارش‌ها،

تغییر و به عبارت بهتر افزایش در محتوای اغلب آمینواسیدهای ریشه‌های اکتومیکوریزایی سفیدپلت در مقایسه با شاهد در این تحقیق دور از انتظار نبود.



شکل ۲– اثر قارچ اکتومیکوریز *Pisolithus arhizus* و تنش خشکی بر غلظت اسیدهای آمینه در ریشه گیاه صنوبر سفید پلت

Fig. 2. Effect of ectomycorrhiza *Pisolithus arhizus* and drought stress on different amino acids concentration in *Populus caspica* root

همچنین مطابق با آنچه سایر پژوهشگران گزارش نمودند (Henriques *et al*., 1992; Guescini *et al*., 2003; Morel *et al*., 2005; Luo *et al*., 2009a) و در این تحقیق نیز مشاهده شد، مسلماً افزایش جذب نیتروژن در گیاهچه‌های میکوریزایی به واسطه حضور قارچ همزیست، موجب افزایش معنی‌دار گلوتامیک اسید، آسپاراژین و گلوتامین، که از مهمترین ترکیبات آلی نیتروژنی در گیاهان محسوب شده و به عنوان منابع مهم ذخیره و فرم انتقال نیتروژن در درون خود گیاه ایفای نقش می‌کنند (Masclaux–Daubresse *et al*., 2010)، می‌گردد؛ و مطابق با این مسئله مقادیر این آمینواسیدها در ریشه اکتومیکوریزایی سفیدپلت نسبت به ریشه غیرهمزیست به ترتیب بطور معنی‌داری افزایش یافت. بنابراین می‌توان این فرضیه را تایید نمود که در بافت اکتومیکوریزایی نیز این آمینواسیدها (که به عنوان سوبسترا و یا محصول در واکنش‌های آنزیمی متعددی در متابولیسم نیتروژن نقش دارند (Blaudez *et al*., 1998) به عنوان ذخیره کننده و انتقال دهنده نیتروژن از قارچ به گیاه و نیز درون خود ریشه ایفای نقش می‌کنند (Guescini *et al*., 2003). با در نظر گرفتن شباهت همزیستی قارچ‌های اکتومیکوریز، همزیستی میکوریزایی آرباسکولار و همزیستی ریزوبیومی از نظر انتقال ترکیبات نیتروژنی به میزبان، این فرضیه تحقق بیشتری می‌یابد. در همزیستی ریزوبیومی *Alnus* گزارش شده است که نیتروژن مازاد به صورت گلوتامین و آسپاراژین ذخیره می‌شود (Skokut *et al*., 1982; Minamisawa *et al*., 1983)؛ همچنین در این نوع همزیستی ذخیره‌سازی نیتروژن در فرم گلوتامیک اسید نیز گزارش شده است (Vance 2008). همچنین افزایش معنی‌دار گلوتامیک اسید در همزیستی میکوریزایی آربوسکولار قارچ *Funneliformis mosseae* (T.H. Nicolson & Gerd.) C. Walker & A. Schüßler مشاهده شده است (Matsubara *et al*., 2009).

همانگونه که ذکر شد در خصوص متابولیسم آمینواسیدها در همزیستی اکتومیکوریزایی، بویژه در بافت ریشه، مطالعات چندانی وجود ندارد. از اندک مطالعات صورت گرفته

می‌توان به مطالعه Alvarez et al. (2009b) اشاره نمود که نشان داد در ریشه‌های گیاه اکتومیکوریزایی *N. dombeyi* نسبت به ریشه گیاهان غیرمیکوریزایی تجمع قابل ملاحظه‌ای از نیتروژن و فسفر وجود دارد که این تجمع همراه با افزایش فعالیت آنزیم‌های دخیل در سنتز آمینواسیدهای گلوتامیک اسید و گلوتامین بوده است.

با تعمیم‌دهی این نتایج به تحقیق حاضر می توان چنین استنباط نمود که مکانیسم کلی همزیست‌های انتقال دهنده نیتروژن و افزایش نیتروژن در بافت همزیست در اینجا نیز حاکم است و با ذخیره‌سازی نیتروژن در فرم گلوتامیک اسید، آسپاراژین و گلوتامین و سپس آزادسازی تدریجی نیتروژن از آن‌ها منجر به کارآمدتر شدن سنتز پروتئین در هر دو همزیست در شرایط محیطی با نیتروژن تقلیل یافته می‌گردد. به علاوه شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد آلانین نیز واسطه مهمی در هضم و انتقال نیتروژن در مجموعه قارچ اکتومیکوریز– ریشه میزبان می‌باشد (Finlay *et al*., 1992; Blaudez *et al*., 2001) و این مسئله توجیه کننده افزایش بالای آلانین در ریشه‌های اکتومیکوریزایی سفیدپلت نسبت به ریشه‌های مستقل می‌باشد.

از سوی دیگر تجمع آسپارتیک‌اسید، آرژینین و سیترولین در ریشه‌های مستقل سفیدپلت در مقایسه با ریشه‌های همزیست مشاهده شد (شکل ۲) که می‌تواند مؤید بکارگیری این اسیدهای آمینه در مسیرهای متابولیکی در سیستم ریشه‌ای میکوریزایی باشد. به عبارت دیگر افزایش مقدار این اسیدهای آمینه گیاه در شرایط غیرهمزیست ممکن است مرتبط با کاهش سنتز پروتئین‌ها و تحریک بیوسنتز اسیدهای آمینه و پروتئولیز پروتئین‌ها باشد.

همچنین کاهش آمینواسیدهای آرژنین و سیترولین در ریشه‌های میکوریزایی و حضور مقادیر بالاتر آرژنین و سیترولین در محتوای آمینواسیدی سیستم ریشه‌ای تلقیح نشده سفیدپلت مطابق با یافته‌های تعدادی از دیگر دانشمندان بوده (Henriques *et al*., 1992; Morel *et al*., 2005) و ممکن است نشانگر غیر فعال شدن چرخه اورنیتین در گیاهچه‌های شاهد باشد. طبق نتایج سایر پژوهشگران، در بافت‌هایی که وضعیت فیزیولوژیکی و سرعت رشد مناسبی دارند یافتن مقادیر زیاد آرژنین، ارنیتین و سیترولین معمول نیست و این افزایش را در گیاهانی می‌توان دید که دچار کمبود عناصر غذایی (نظیر نیتروژن، فسفر و پتاسیم) هستند(Ugalde *et al*., 1995). در واقع گیاهان فاقد همزیستی اکتومیکوریزایی به سطوح پایین‌تری از عناصر نیتروژن، فسفر و پتاسیم دسترسی دارند (Smith & Read, 2008)؛ از این‌رو مسدود شدن چرخه ارنیتین در این گیاهان در نتیجه کمبود عناصر غذایی و تجمع سوبستراهای این چرخه یعنی آرژنین، ارنیتین و سیترولین دور از انتظار نیست و کاهش معنی‌دار آرژنین و سیترولین در سیستم ریشه میکوریزایی سفیدپلت نشان دهنده دسترسی بالاتر به عناصر غذایی و در نتیجه مرتفع شدن انسداد این چرخه می‌باشد. مشخص شده است که آرژنین، ارنیتین و سیترولین در مقایسه با دیگر آمینواسیدها به طور چشمگیری در ترکیب پروتئین‌ها به کار گرفته نمی‌شوند، لذا مرتفع شدن انسداد این سایت‌ها ممکن است منتج به بیوسنتز بالاتر بسیاری از دیگر اسیدهای آمینه، بخصوص افزایش تشکیل گلوتامیک اسید و آسپاراژین، و در نتیجه راندمان بالاتری از سنتز پروتئین در میزبان میکوریزایی گردد و یا اینکه ممکن است وقوع این چرخه در ریشه میزبان گیاهی در ارسال ترکیبات کربنی، نظیر ارنیتین، به هیف‌های قارچ همزیست برای تداوم فعالیت هیفی نقش داشته باشد (Morel *et al*., 2005).

بعلاوه بررسی روند تغییرات غلظت هر یک از اسیدهای آمینه آسپارتیک‌اسید، آرژنین و سیترولین به تنهایی نشان می‌دهد افزایش سه اسید آمینه مذکور در گیاهان سفیدپلت در شرایط آبیاری نرخ بالاتری نسبت به گیاهان تحت تنش خشکی داشته است (شکل ۲). مطالعاتی وجود دارد که نشان می‌دهند اسید آمینه آرژنین نقش مهمی در مکانیسم‌های تحمل گیاهان به خشکی ایفا می‌کند. این اسیدآمینه نقش کلیدی در تنظیم pH درون سلولی دارد. اسیدهای ضعیفی که تحت تنش آبی موجب کاهش pH درون‌سلولی می‌شوند، موجب تحریک تجمع آرژنین در این سلول‌ها شده و در نهایت تجمع این اسیدآمینه قلیایی شدن محیط سلول را در پی دارد (Maksup *et al*., 2014). همچنین گزارشاتی وجود دارد که نشان می‌دهند تجمع آرژنین، سبب

کاهش محتوای پراکسید هیدروژن، پراکسیداسیون لیپید و فعالیت آنزیم لیپواکسیژناز و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (مانند کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز)، محتوای پروتئین و پرولین تحت شرایط تنش می‌شود و به این ترتیب آرژنین می‌تواند تحمل گیاه به تنش کم آبی را از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان بالا ببرد (Galston & Sawhney, 1990). همچنین گزارش شده است که در شرایط تنش رطوبتی فعالیت آنزیم آرژنین دکربوکسیلاز تحریک می‌گردد. این آنزیم شروع تبدیل اسیدآمینه آرژنین به پوترسین که ترکیبی از دسته پلی‌آمین‌هاست را موجب می‌شود. پلی‌آمین‌ها در تنظیم pH دورن سلول، تنظیم تقسیم سلولی و به تعویق انداختن پیری در گیاه نقش ایفاء می‌کنند (Zeid *et al.*, 2009).

همچنین بخش دیگری از این اختلافات میان محتوای آمینواسیدهای ریشه‌های تلقیح شده و شاهد را نیز می‌توان به فعال شدن برخی مسیرهای متابولیکی ویژه همزیستی در ریشه‌های میزبان قارچ اکتومیکوریز نسبت داد. در این تحقیق مشخص شد که میزان اسید آمینه آسپارتات در سیستم ریشه‌ای تلقیح شده نسبت به تلقیح نشده کاهش یافته است (شکل ۲)؛ که این یافته مطابق با نتایج برخی دیگر محققین می‌باشد (Blaudez *et al.*, 1998; Guescini *et al.*, 2003). کاهش اسید آمینه آسپارتیک اسید در بافت همزیستِ فعال در این تحقیق را می‌توان بدین ترتیب توجیه نمود که برخی منابع ذخیره آمینواسیدی ممکن است تحت شرایط با فعالیت متابولیکی بالا در هیف قارچی و سلول میزبان کاهش یابند (Blaudez *et al.*, 1998). همچنین آسپارتات که سنتز آن درون خود گیاه و نشأت گرفته از تبادلات گازی (respiration) است، پیش‌سازه بسیاری از مسیرهای متابولیکی می‌باشد؛ که عمده‌ترین این مسیرها شامل این موارد است: مسیر متابولیکی منتج به تولید آسپاراژین، که همان گونه که ذکر شد ترکیب کلیدی مورد استفاده گیاه برای انتقال و نیز ذخیره نیتروژن آلی مازاد می‌باشد؛ مسیر تولید نوکلئوتیدهای پیریدین (pyridine nucleotide) که در میان آن‌ها NAD (nicotinamide adenine dinucleotide) از مهمترین‌هاست که نقش اساسی را در چرخه اکسایشی (redox recycling)، پروسه‌ای که برای بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی نظیر تبادلات گازی محوری است، ایفا می‌کند؛ همچنین آسپارتات پیش‌سازه بسیاری از دیگر آمینواسیدها مانند لایزین، ترئونین، ایزولوسین، هیستیدین و متیونین می‌باشد (Azevedo *et al.*, 1997; 2006) که مطابق با این مسئله، در این تحقیق افزایش بالای میزان اسید آمینه‌های ترئونین، هیستیدین و متیونین در ریشه‌های میکوریزایی نسبت به ریشه مستقل مشاهده شد (شکل ۲).

بخشی دیگر از اختلافات موجود در محتوای آمینواسیدی ریشه‌های میکوریزایی و غیرمیکوریزایی می‌تواند مربوط به سنتز پروتئین‌های جدید در بافت قارچ باشد. در این تحقیق در واقع محتوای آمینواسیدی بافت هزیستی (شامل ریشه گیاه و میسلیوم قارچ) بررسی شد و سهم قارچ میکوریز از محتوای آمینواسیدهای سیستم ریشه‌ایِ قابل تفکیک نبود؛ اما مسلماً حداقل بخشی از این تفاوت‌ها مربوط به محتوای آمینواسیدی و نیز سنتز پروتئین‌های قارچی درون ریشه‌ای می‌باشد. تاکنون محققین mRNAهای کد کننده پروتئین‌های قارچی متعدد (Acioli–Santos *et al.*, 2011) و نیز پلی‌پپتیدهایی (Tarkka 2000; Bestel–Corre *et al.*, 2004) را از ریشه‌های تلقیح شده با قارچ‌های اکتومیکوریز شناسایی و جداسازی نموده‌اند و بر این اساس می‌توان نتیجه‌گیری نمود که پس از برقراری همزیستی در فیزیولوژی ریشه‌های تلقیح شده توسط قارچ میکوریز تغییرات بیوشیمیایی رخ می‌دهد که متضمن سنتز پروتئین‌های ویژه همزیستی هم برای قارچ و هم برای گیاه میزبان می‌باشد؛ در واقع آنچه رخ می‌دهد فعالیت تغییر یافته برخی آنزیم‌های دخیل در هضم نیتروژن در هر دو همزیست است که در نهایت موجب تغییر در پروفایل آمینواسیدی می‌گردد.

در مجموع می‌توان گفت در ترکیبات مختلف قارچ–میزبان تغییر در غلظت اسیدهای آمینه در سیستم ریشه میکوریزایی و تفاوت‌های مشاهده شده در مقایسه با سیستم ریشه شاهد، مشخصاً بسته به شکل‌گیری و تبدیلات این اسیدهای آمینه بوسیله انتقال گروه آمینی (transamination) در هر دو

همزیست، نرخ انتقال اسیدهای آمینه به دیگر بافت‌ها، میزان استفاده توسط قارچ میکوریز و وسعت تشکیل پیوند و به کارگیری در بخش‌های پروتئینی متفاوت است (Correa & Martins–Loucao, 2011).

نتیجه‌گیری آن‌که تجمع اغلب اسیدهای آمینه (از جمله گلوتامیک اسید، آسپاراژین، گلوتامین، هیستیدین، تیروزین، ترئونین، آلانین و متیونین در تحقیق حاضر) در ریشه‌های اکتومیکوریزایی تحت شرایط تنش نسبت به ریشه‌های اکتومیکوریزایی تحت آبیاری و نیز ریشه‌های غیرمیکوریزایی نشان‌دهنده نقش اسیدهای آمینه آزاد با تحمل به خشکی در ریشه‌های همزیست بوده و بر این اساس می‌توان گفت گیاهچه‌های اکتومیکوریزایی از مکانیسم‌های کارآتر و فعال‌تری در مواجه با تنش خشکی برخوردارند. بطور کلی نتایج این تحقیق نشان داد می‌توان از طریق برقراری همزیستی اکتومیکوریزایی، گونه‌های گیاهی با توانمندی مقاومت بالاتر به خشکی را ایجاد و برای فضای سبز شهری و جنگلکاری در مناطق خشک و نیمه خشک معرفی نمود.

References

Acioli–Santos, B., Vieira, H.E.E., Lima, C.E.P. & Maia, L.C. 2011. The Molecular Ectomycorrhizal Fungus Essence in Association: A Review of Differentially Expressed Fungal Genes During Symbiosis Formation. In: Rai, M. & Varma, A. (Editors). Diversity and Biotechnology of Ectomycorrhizae. Vol 25, Soil Biology, Springer, Berlin, 87–121.

Agerer, R. 1987–2012. Colour atlas of ectomycorrhizae. 1st–15th delivery, Einhorn, Schwäbisch Gmünd.

Ahmed, I.M., Cao, F., Han, Y., Nadira, U.A., Zhang, G. & Wu, F. 2013. Differential changes in grain ultra structure, amylase, protein and amino acid profiles between Tibetan wild and cultivated barleys under drought and salinity alone and combined stress. Food Chemistry, 141: 2743–2750.

Allan, C.D., Macalady, A.K., Chenchouni, H., Bachelet, D., McDowell, N., Vennetier, M., Kizberger, T., Rigling, A., Breshears, D.D., Hogg, E.H., Gonzalez, P., Fensham, R., Zhang, Z., Castro, J., Demidova, N., Lim, J.H., Allard, G., Running, S.W., Semerci, A., & Cobb, N. 2010. A global overview of drought and heat–induced tree mortality reveals emerging climate change risks for forests. Forest Ecology and Management, 259:660–684.

Alvarez, M., Huygens, D., Fernandez, C., Gacitua, Y., Olivares, E., Saavedra, I., Alberdi, M. & Valenzuela, E. 2009a. Effect of ectomycorrhizal colonization and drought on reactive oxygen species metabolism of *Nothofagus dombeyi* roots. Tree Physiology, 29:1047–1057.

Alvarez, M., Huygens, D., Olivares, E., Saavedra, I., Alberdi, M. & Valenzuela, E. 2009b. Ectomycorrhizal fungi enhance nitrogen and phosphorus nutrition of *Nothofagus dombeyi* under drought conditions by regulating assimilative enzyme activities. Physiologia Plantarum,136: 426–436.

Asadi, F., Mirzaei–Nadushan, H., Modirrahmati, E. & Naderi–shaahab, M.E. 2005. Identification of poplar clones using morphological markers. Iranian Journal of Forest and Poplar Research, 12: 267–300.

Augé, R.M, & Moore, J.L. 2005. Arbuscular mycorrhizal symbiosis and plant drought resistance. In: Mehrotra, VS (Editor) Mycorrhiza: Role and Applications. Allied Publishers Limited, New Dehli.

Azevedo, R.A., Arruda, P., Turner, W.L. & Lea, P.J. 1997. The biosynthesis and metabolism of the aspartate derived amino acids in higher plants. Phytochemistry, 46(3):395–419.

Azevedo, R.A., Lancien, M. & Lea, P.J. 2006. The aspartic acid metabolic pathway, an exciting and essential pathway in plants. Amino Acids, 30: 143–62.

Barrs, H.D., & Weatherley, P.E. 1962. A re–examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. Australian Journal of Biological Sciences, 15:413–428.

Bestel–Corre, G., Dumas–Gaudot, E.·& Gianinazzi, S. 2004. Proteomics as a tool to monitor plant–microbe endosymbioses in the rhizosphere. Mycorrhiza, 14:1–10.

Blaudez, D., Botton, B., Dizengremel, P. & Chalot, M. 2001. The fate of [^{14}C] glutamate and [^{14}C] malate in birch roots is strongly modified under inoculation with *Paxillus involutus*. Plant, Cell and Environment, 24:449–457.

Blaudez, D., Chalot, M., Dizengremel, P. & Botton, B. 1998. Structure and function of the ectomycorrhizal association between *Paxillus involutus* and *Betula pendula*. II. Metabolic changes during mycorrhiza formation. New Phytologist, 138: 543–552.

Breda, N., Huc, R., Granier, A. & Dreyer, E. 2006. Temperate forest trees and stands under severe drought: a review of ecophysiological responses, adaptation processes and long–term consequences. Annals of Forest Science, 63: 625–644.

Chalot, M., Blaudez, D. & Brun, A. 2006. Ammonia: a candidate for nitrogen transfer at the mycorrhizal interface. Trends in Plant Science, 11: 263–266.

Ciais, P.H., Reichstein, M., Viovy, N., Granier, A., Allard, V., et al. 2005. Europe–wide reduction in primary productivity caused by the heat and drought in 2003. Nature, 437: 529–533.

Cicatelli, A., Ferrol, N., Rozpadek, P. & Castiglione, S. 2019. Editorial: Effects of Plant–Microbiome Interactions on Phyto– and Bio–Remediation Capacity. Frontiers in Plant Science, 10: 533.

Correa, A. & Martins–Loucao, M.A. 2011. C:N Interactions and the cost:benefit balance in ectomycorrhizae: 387–403. In: Rai, M. & Varma, A. (Editors). Diversity and Biotechnology of Ectomycorrhizae, Soil Biology. Springer–Verlag, Berlin, Heidelberg.

Cortleven, A., Leuendorf, J.E., Frank, M., Pezzetta, D., Bolt, S. & Schmulling, T. 2019. Cytokinin action in response to abiotic and biotic stresses in plants. Plant, Cell and Environment, 42: 998–1018.

Dominguez Nunez, J.A., Gonzalez, R.P., Rodriguez Barreal, J.A. & de Omenaca Gonzalez, J.A.S. 2008. The effect of *Tuber melanosporum* Vitt. mycorrhization on growth, nutrition, and water relations of *Quercus petraea* Liebl., *Quercus faginea* Lamk., and *Pinus halepensis* Mill. seedlings. New Forests, 35(2): 159–171.

Drossopoulos, J.B., Karamanos, A.J. & Niavis, C.A. 1985. Changes in free amino compounds during the development of two wheat cultivars subjected to different degrees of water stress. Annals of Botany, 56: 291–305.

Duponnois, R. & Garbaye, J. 1991. Techniques for controlled synthesis of Douglas–fir – *Laccaria laccata* ectomycorrhizal symbiosis. Annals of Forest Science, 48: 641–650.

Finlay, R.D. & Soderstrom, B. 1992. Mycorrhiza and carbon flow to the soil. In: Allen, M.F. (Editor). Mycorrhizal Functioning. New York, Chapmaan & Hall. 134–160.

Galston, A.W. & Kaur–Sawhney, R. 1990. Polyamines in plant physiology. Plant Physiology, 94: 406–410.

Good, A.G. & Zaplachinski, S.T. 1994. The effects of drought stress on free amino acid accumulation and protein synthesis in *Brassica napus*. Physiologia Plantarum, 90: 9–14.

Guescini, M., Pierleoni, R., Palma, F., Zeppa, S., Vallorani, L., Potenza, L., Sacconi, C., Giomaro, G. & Stocchi, V. 2003. Characterization of the *Tuber borchii* nitrate reductase gene and its role in ectomycorrhizae. Molecular Genetics and Genomics, 269(6): 807–16.

Henriques, A.B., Cambraia, J., Pacheco, S. & Muchovej, R.M.C. 1992. Nitrogen partitioning in *Pinus caribaea* var. *hondurensis* colonized with *Pisolithus tinctorius*. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, 4(2): 91–94.

Hirayama, T. & Shinozaki, K. 2010. Research on plant abiotic stress responses in the post–genome era: past, present and future. Plant Journal, 61: 1041–1052.

Hogg, E.H., Brandt, J.P. & Michaelian, M. 2008. Impacts of a regional drought on the productivity, dieback and biomass of western Canadian aspen forests. Canadian Journal of Forest Research, 38: 1373–1384.

Juvany, M., Müller, M. & Munné–Bosch, S. 2013. Photo–oxidative stress in emerging and senescing leaves: a mirror image? Journal of Experimental Botany, 64, 3087–3098.

Kudoyarova, G., Veselova, S., Hartung, W., et al. 2011. Involvement of root ABA and hydraulic conductivity in the control of water relations in wheat plants exposed to increased evaporative demand. Planta, 233(1):87–94.

Lambilliotte, R., Cooke, R., Samson, D., Fizames, C., Gaymard, F., Plassard, C., Tatry, M.V., Berger, C., Laudie, M., Legeai, F., Karsenty, E., Delseny, M., Zimmermann, S. & Sentenac, H. 2004. Large–scale identification of genes in the fungus *Hebeloma cylindrosporum*paves the way to molecular analyses of ectomycorrhizal symbiosis. New Phytologist, 164: 505–513.

Landhausser, S.M., Muhsin, T.M., & Zwiazek, J.J. 2002. The effect of ectomycorrhizae on water relations in aspen (*Populus tremuloides*) and white spruce (*Picea glauca*) at low soil temperatures. Canadian Journal of Botany, 80: 684–689.

Lehto, T. & Zwiazek, J.J. 2011. Ectomycorrhizas and water relations of trees: a review. Mycorrhiza, 2: 71–90.

Luo, Z.B., Janz, D., Jiang, X., Gobel, C., Wildhagen, H., Tan, Y., Rennenberg, H., Feussner, I. & Polle, A. 2009a. Upgrading Root Physiology for Stress Tolerance by Ectomycorrhizas: Insights from Metabolite and Transcriptional Profiling into Reprogramming for Stress Anticipation. Plant Physiology, 151(4): 1902–1917.

Luo, Z.B., Li, K., Jiang, X. & Polle, A. 2009b. The ectomycorrhizal fungus (*Paxillus involutus*) and hydrogels affect drought tolerance of *Populus euphratica*. Annals of Forest Science, 66: 106.

Maksup, S, Roytrakul, S & Supaibulwatana, K. 2014. Physiological and comparative proteomic analyses of Thai jasmine rice and two check cultivars in response to drought stress. Journal of Plant Interactions, 9: 43–55.

Marvi Mohajer, M. 2005. Silviculture. Tehran University Presss, Tehran, 387 p.

Marx, D.H. & Bryan, W.C. 1975. Growth and ectomycorrhizal development of loblolly pine seedlings in fumigated soil infested with the fungal symbiont *Pisolithus tinctorius*. Forest Science, 21: 245–254.

Masclaux–Daubresse, C., Daniel–Vedele, F., Dechorgnat, J., Chardon, F., Gaufichon, L. & Suzuki, A. 2010. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. Annals of Botany, 105: 1141–1157.

Matsubara, Y.I., Ishigaki, T. & Koshikawa, K. 2009. Changes in free amino acid concentrations in mycorrhizal strawberry plants. Scientia Horticulturae, 119(4):392–396.

Minamisawa, K., Arima, Y. & Kumazawa, K. 1983. Transport of fixed nitrogen from soybean nodules inoculated with *Rhizobium japonicum* strains. Soil Science and Plant Nutrition, 29(1): 85–92.

Morel, M., Jacob, C., Kohler, A., Johansson, T., Martin, F., Chalot, M. & Brun, A. 2005. Identification of genes differentially expressed in extraradical mycelium and ectomycorrhizal roots during *Paxillus involutus–Betula pendula* ectomycorrhizal symbiosis. Applied and Environmental Microbiology, 71: 382–391.

Murashige, T. & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobaco tissue culture. Physiology of Plants, 15: 437–442.

Nehls, U., Gohringer, F., Wittulsky, S. & Dietz, S. 2010. Fungal carbohydrate support in the ectomycorrhizal symbiosis: a review. Plant Biology, 12: 292–301.

Obata, T., Witt, S., Lisec, J., Palacios–Rojas, N., Florez–Sarasa I., Yousfi, S., Araus, J.L., Cairns, J.E., Fernie, A.R. 2015. Metabolite profiles of maize leaves in drought, heat, and combined stress field trials reveal the relationship between metabolism and grain yield. Plant Physiology, 169: 2665–2683.

Osuagwu, G.G.E., Edeoga, H.O. & Osuagwu, A.N. 2010. The influence of water stress (drought) on the mineral and vitamin potential of the leaves *Ocimum gratissimum* L. Recent Research in Science and Technology, 2: 27–33.

Pinheiro, C. & Chaves, M.M. 2011. Photosynthesis and Drought: Can We Make Metabolic Connections from Available Data? Journal of Experimental Botany, 62: 869–882.

Qu, L., Quoreshi, A.M., Iwase, K., Tamai, Y., Funada, R. & Koike, T. 2003. *In vitro* ectomycorrhiza formation on two larch species of seedling with six different fungal species. Eurasian Journal of Forest Research, 6(1): 65–73.

Quoreshi, A.M. & Khasa, D.P. 2008. Effectiveness of mycorrhizal inoculation in the nursery on root colonization, growth, and nutrient uptake of aspen and balsam poplar. Biomass Bioenergy, 32: 381–391.

Rampino, P., Pataleo, S., Gerardi, C., Mita, G., & Perrotta, C. 2006. Drought stress response in wheat: Physiological and molecular analysis of resistant and sensitive genotypes. Plant Cell Environ, 29(12): 2143–52.

Rennenberg, H., Loreto, F., Polle, A., Brilli, F., Fares, S., Beniwal, R.S. & Gessler, A. 2006. Physiological responses of forest trees to heat and drought. Plant Biology, 8: 556–571.

Rincon, A., Priha, O., Lelu–Walter, M.A., Bonnet, M., Sotta, B. & Tacon, F.L. 2005. Shoot water status and ABA responses of transgenic hybrid larch *Larix kaempferi* x *L. decidua* to ectomycorrhizal fungi and osmotic stress. Tree Physiology, 25: 1101–1108.

Sannigrahi, P., Ragauskas, A.J., & Tuskan, G.A. 2010. Poplar as a feedstock for biofuels: a review of compositional characteristics. Biofuels, Bioproducts and Biorefining, 4: 209–226.

Showler, A.T., Cavazos, J.O. & Moran, P.J., 2007. Dynamics of free amino acid accumulations in cotton leaves measured on different timelines after irrigation. Subtropical Plant Science, 59: 38–55.

Sixto, H., Aranda, I. & Grau, J.M., 2006. Assessment of salt tolerance in *Populus alba* clones using chlorophyll fluorescence. Photosynthetica, 44: 169–173.

Skokut, T.A., Varner, J.E., Schaefer, J., Stejskal, E.O. & McKay, R.A. 1982. [N]NMR determination of asparagine and glutamine nitrogen utilization for synthesis of storage protein in developing cotyledons of soybean in culture. Plant Physiology, 69(2): 308–13.

Smith, S.E. & Read, D.J. 2008. Mycorrhizal Symbiosis, third ed. Academic Press, San Diego, CA.

Szuba, A. 2015. Ectomycorrhiza of Populus. Forest Ecology and Management, 347: 156–169.

Tarkka, M. 2000. Developmentally regulated proteins in *Pinus sylvestris* roots and ectomycorrhiza. University of Helsinki, Finland.

Turgeman, T., Asher, J.B., 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.

Ugalde, T.D., Maher, S.E., Nardell, N.E. & Wallgrove, R.M. 1995. Amino acid metabolisin and protein deposition in the endosperm of wheat; synthesis of proline via ornithine. In: Wallgrove, R.M. (Editor). Amino Acids and Their Derivatives in Higher Plants. Cambridge University Press, 7–86.

Vance, C.P. 2008. Carbon and Nitrogen Metabolism in Legume Nodules. In: Nitrogen–fixing Leguminous Symbioses. Dilworth, M.J., James, E.K., Sprent, J.I. & Newton, W.E. (Editors). Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, ISBN 978–1–4020–3548–7, 293–315.

Wilkinson, S., Kudoyarova, G.R., Veselov, D.S., Arkhipova, T.N. & Davies, W.J. 2012. Plant hormone interactions: innovative targets for crop breeding and management. Journal of Experimental Botany 63: 3499–3509.

Wolters, H. & Jurgens, G. 2009. Survival of the flexible: hormonal growth control and adaptation in plant development. Nature Reviews Genetics, 10: 305–317.

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.

Wu, Q.S., Zou, Y.N., Xia, R.X., & Wangi, M.Y. 2007. Osmotic solute responses of mycorrhizal citrus (Poncitrus trifoliate) seedling to drought stress. Acta Physiologica Plantarum, 29: 543–549.

Zeid, F.A., El Shihy, O., Ghallab, A.E.M. & Ibrahim, F.E.A. 2009. Effect of exogenous ascorbic acid on wheat tolerance to salinity stress conditions. Arab Journal of Biotechnology, 12: 149–174.

The effect of ectomycorrhizal symbiosis on drought tolerance in *Populus caspica*

Seyedeh Masoomeh Zamani, Mohammad Ebrahim Farashiani, Farzaneh Kazerani
Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran
Corresponding author: Seyedeh Masoomeh Zamani, email: mzamani@rifr-ac.ir

Received: June, 23, 2020 8(1) 11-27 Accepted: Nov., 08, 2020

Abstract

Increasing need for wood and on the other hand declining wood resources have caused desire for afforestation with fast–growing species such as poplars, but poplar species usually are susceptible to drought. Ectomycorrhizal fungi can improve the water status of host plants and increase plant survival and growth under drought conditions. The precise mechanism of this function is still not clear, but amino acid metabolism has been reported to play an important role in plant tolerance to drought stress. In this study seedlings of *Populus caspica* were propagated through tissue culture and their symbiosis with *Pisolithus arhizus* was carried out to evaluate the plantlets resistance to drought in acclimatization process. It was found that establishment of this symbiosis enhanced seedling height, biomass of root, shoot and leaves, photosynthesis, transpiration, stomatal conductance and leaf chlorophyll. Determination of amino acids in ectomycorrhizal and non–ectomycorrhizal roots of *P. caspica* plantlets (in both drought and irrigation conditions) showed that generally, the concentration of most amino acids increased in ectomycorrhizal root systems, which proved amino acids are the most important assimilation and nitrogen transfer forms in ectomycorrhizal tissue. Significant accumulation of many amino acids such as asparagine, glutamine, glutamic acid, histidine, tyrosine, threonine, alanine and methionine in ectomycorrhizal roots under stress conditions (compared to the ectomycorrhizal roots under irrigation and the control roots) was found, thus it can conclude that tolerance of ectomycorrhizal roots to drought stress is closely associated with their accumulation of free amino acids. Arginine, citrulline and aspartic acid accumulated in non–inoculated *P. caspica* root systems under irrigation conditions (compared to the mycorrhizal root systems), which confirmed the use of these amino acids in some metabolic pathways in the mycorrhizal root systems. Implications of these changes in the functioning of the ectomycorrhizal symbiosis are discussed.

Keywords: amino acids, drought, ectomycorrhizal symbiosis, *Populus caspica*, tolerance.