https://bjm.ui.ac.ir/?lang=en

Journal of Microbial Biology
E-ISSN: 3060-7647
14rd Year, Vol. 14, No. 54, 2025 pp. 49-65
Received: 13/05/2025 Accepted: 16/09/2025

(Research Paper)

Investigation of the Symbiotic Relationship Between Oak and the Fungus *Tuber aestivum* in Enhancing Vegetative Growth

Parvin Bagherifar
Silviculture and Forest Ecology, Department of Silviculture and Forest Ecology, Faculty of Forest Sciences, Gorgan University of Agriculture Sciences and Natural Resources, Gorgan, I.R. Iran.
parvinbaqerifar@yahoo.com

Seyed Mohammad Waez-Mousavi [1]
Department of Silviculture and Forest Ecology, Faculty of Forest Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, I.R. Iran.
waezmousavi@gau.ac.ir

Kamran Rahnama
Department of Plant Protection, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, I.R. Iran.
rahnama@gau.ac.ir

Abstract
Quercus macranthera, as one of the important forest species in Iran, requires special attention in forest restoration and development programs due to its ecological and economic characteristics .The present study examined the effect of the ectomycorrhizal symbiosis between the summer black truffle fungus, *T. aestivum*, and *Quercus macranthera* seedlings over a period of 16 months (March 2020 to September 2021) at the Shast Kalateh Forest Educational and Research Nursery in Gorgan. One-year-old seedlings were divided into two groups: a control group and a treatment group inoculated with fungal spores. The spore suspension was applied to the potting substrate, followed by manual watering. Formation of mycorrhizal symbiosis was assessed microscopically using both visual inspection and the gridline intersect method. Evaluation of growth parameters, including stem height, collar diameter, and number of leaves, after two inoculation stages, revealed a highly significant difference ($p < 0.01$) between the treatment groups. Seedlings inoculated with the fungus exhibited marked improvements in growth indices alongside the development of extensive mycorrhizal networks on their roots. Microscopic observations showed that the roots of inoculated seedlings were more robust and better organized, enhancing water and nutrient uptake efficiency .The findings of this study demonstrated that inoculation of *Q. macranthera* seedlings with the ectomycorrhizal fungus *T .aestivum* significantly enhanced vegetative growth parameters and markedly increased the development of extensive mycorrhizal networks in the roots. This growth enhancement plays a crucial role in improving plant resilience against environmental stresses, particularly drought and salinity. From an ecological standpoint, ectomycorrhizal symbiosis has the potential to augment biodiversity and accelerate the sustainable restoration of oak forest ecosystems. Furthermore, sustainable cultivation of *T. aestivum* can contribute to local economic development and generate sustainable employment opportunities in rural communities. The results indicate that inoculation of *Q. macranthera* seedlings with *T. aestivum* constitutes an effective, sustainable, and environmentally friendly strategy for promoting growth, enhancing productivity, and increasing seedling survival in reforestation projects. For the widespread application of this technology, it is essential to conduct interdisciplinary and long-term field studies to assess seedling persistence and survival in natural habitats, as well as to evaluate the environmental and ecological effects of this symbiosis on diverse plant species. Furthermore, sustainable cultivation of *T. aestivum* can contribute to local economic development and generate sustainable employment opportunities in rural communities. The results indicate that inoculation of *Q. macranthera* seedlings with *T. aestivum* constitutes an effective, sustainable, and environmentally friendly strategy for promoting growth, enhancing productivity, and increasing seedling survival in reforestation projects. For the widespread application of this technology, it is essential to conduct interdisciplinary and long-term field studies to assess seedling persistence and survival in natural habitats, as well as to evaluate the environmental and ecological effects of this symbiosis on diverse plant species.

Keywords: Ectomycorrhizal fungus, Symbiosis, Plant growth, Woody plant.

[1]Corresponding Author
3060-7647/ © 2025 The Authors

This is an open access article under the CC BY-NC-ND/4.0/ License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/) .
Bagherifar, P., Waez-Mousavi, S. M., Rahnama, K. Investigating the role of symbiosis between oak and Tuber aestivum fungus in improving vegetative growth. *Journal of Microbial Biology*, 2025; 14(54): 49-65. doi: 10.22108/bjm.2025.145257.1634

Introduction

The widespread application of chemical fertilizers has a detrimental effect on soil ecosystems, including the proliferation of pathogenic fungi. By contrast, organic and biofertilizers, particularly mycorrhizal fungi, play a pivotal role in enhancing soil quality by forming symbiotic associations with plant roots, thereby improving nutrient and water uptake efficiency. Mycorrhizal symbiosis, which occurs in over 80% of vascular plants, significantly contributes to biodiversity, ecosystem resilience, and the restoration of degraded habitats. There are two main types of mycorrhizae: ectomycorrhizae, which form hyphal sheaths around root epidermal cells and are primarily found in temperate tree species, and endomycorrhizae, which penetrate the cortical cells of roots and include subtypes such as arbuscular, ericoid, and arbutoid mycorrhizae. Ectomycorrhizal fungi enhance nutrient acquisition by their host plants by forming extensive extraradical mycelial networks that access soil microsites beyond the reach of plant roots. These symbiotic networks can interconnect multiple plants, facilitating the exchange of nutrients and water across the soil matrix, and improving overall soil health and plant community dynamics. Truffle *fungi of the genus Tuber* are significant ectomycorrhizal symbionts both from an ecological and economic perspective, forming mutualistic associations with various host plant genera, including *Quercus*. The summer black truffle (*Tuber aestivum*), which is widely distributed across Europe and parts of Asia, is particularly important ecologically and commercially in Iran. The endemic oak species *Quercus macranthera* adapted to the Hyrcanian-Caucasian region, exhibits remarkable tolerance to drought and cold, occupying diverse ecological niches across elevations ranging from 800 to 2700 meters. Although truffle-oak symbioses are well documented in Europe, the specific interaction between *T. aestivum* and *Q. macranthera* has not been studied in Iran. Given the critical role of this symbiosis in forest health, nutrient cycling and stress resilience, investigating this relationship could provide valuable insights into sustainable forest restoration and management. The aim of this study is to evaluate the feasibility of, and the physiological effects of, ectomycorrhizal colonization by *T. aestivum* on the vegetative growth of *Q. macranthera* seedlings under controlled nursery conditions. The findings will provide foundational data to inform conservation strategies in Hyrcanian forests, significantly contributing to reforestation efforts and supporting ecological preservation.

Materials and Methods

This study was conducted over a 16-month period from March 2020 to September 2021 in an open-air nursery at the Shast Kalateh Educational and Research Forest, which is affiliated with the Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources. The forest is located within the Hyrcanian forest ecosystem, between 36°41′ and 36°45′ N and 54°20′ to 54°24′ E at an elevation of 100 to 1000 m a.s.l. The region's temperate climate, with an average annual precipitation of around 650 mm and favorable soil physicochemical properties, provides suitable ecological conditions for the establishment of *Quercus macranthera* and its potential symbiont *T .aestivum*. Twelve physiologically uniform, one-year-old *Q. macranthera* seedlings were randomly assigned to two treatment groups: a mycorrhizal-inoculated group and a non-inoculated control group. The growth substrate was a 1:9 (v/v) mixture of pristine forest soil and leaf litter, collected from the top 0–30 cm of soil. This mixture was designed to preserve the native microbial communities and simulate natural edaphic conditions. Seedlings were cultivated in 5 kg plastic pots under ambient environmental conditions, with manual irrigation and without the application of chemical fertilizers or pesticides, to avoid interference with ectomycorrhizal colonization. The inoculum consisted of a commercially sourced spore suspension of *T .aestivum* at a concentration of 10^8 spores per gram. This was applied manually at four equidistant points around the root zone, at a depth of 3-8 cm, with two successive applications in early spring. The maximized contact between the fungal propagules and actively growing root tips, thereby enhancing the efficiency of colonization and the development of the mycelial network. Five months after the second inoculation, vegetative growth parameters were assessed, including stem height, which was measured in centimeters using a flexible measuring tape; stem diameter, which was recorded in millimeters using a digital caliper with an accuracy of 0.02 mm, and leaf count, which was determined by direct enumeration per seedling. Root colonization was quantified using a combined microscopic and grid-based approach, whereby the roots were cleared and stained to enable visual estimation of colonization frequency. This was supplemented by the gridline intersect method to enable precise quantification of colonized root length. The experimental design followed a completely randomized layout, with six biological replicates per treatment. Statistical analyses were performed using SPSS version 26. Data normality was verified using the Kolmogorov–Smirnov test, and treatment means were compared using an independent-samples t-test at a 95 % confidence level to determine the significance of the observed differences.

Discussion of Results and Conclusions

The ectomycorrhizal colonization of *Quercus macranthera* seedlings inoculated with *T .aestivum* was quantitatively estimated at 61% through stereomicroscopic visual assessment and 52% via the gridline intersect method with microscopic analyses revealing well-developed fungal mantles and Hartig nets enveloping the root apices of inoculated seedlings. Statistical analyses confirmed a significant enhancement at $p < 0.01$ in key vegetative growth parameters, including stem height, root collar diameter and leaf number, in inoculated seedlings compared to uninoculated controls. Observed increases of approximately 30%, 44% and 34%, respectively, were recorded, thereby substantiating the positive influence of ectomycorrhizal symbiosis on seedling vigor. The discrepancy between colonization estimates obtained by visual versus gridline methods highlights the importance of employing multi-modal quantification approaches to reduce observer bias and enhance measurement accuracy. The significant enhancement of growth observed in seedlings **inoculated seedlings** can be explained by the presence of extensive extraradical mycelial networks in *T. aestivum.* These networks increase the surface area available for root absorption by forming fungal mantles and Hartig nets. This process optimizes the uptake of immobile nutrients, such as phosphate and essential macronutrients, including nitrogen. It has been demonstrated that these symbiotic networks have the capacity to simultaneously improve rhizosphere soil structure and permeability. Furthermore, it has been shown that they are able to modulate phytohormonal pathways in order to stimulate root and shoot development. In addition to this, they enhance the host plant's tolerance to abiotic stressors such as drought and cold. The observed symbiotic efficacy is consistent with the documented benefits of growth and stress resilience in other *Quercus* species associated with ectomycorrhizal truffle fungi. This further corroborates the ecological compatibility of *Q. macranthera* and *T. aestivum* within montane temperate ecosystems. Recent studies have indicated that climate change trends are contributing to an expansion in the elevational distribution of *T. aestivum*. This phenomenon has the potential to increase host-fungus phenological synchrony, thereby enhancing the establishment and persistence of the symbiosis. It is imperative to acknowledge the obligate ectomycorrhizal nature of *T. aestivum*, as this is pivotal to its fruiting body formation. This underscores the strategic value of inoculation, which is not only crucial for forest restoration but also for sustainable truffle cultivation. In addition to nutritional facilitation, ectomycorrhizal fungi enhance the host's antioxidant capacity, improve osmotic regulation and significantly reduce seedling mortality under environmental stress. Inoculating *Q. macranthera* seedlings with *T. aestivum* is a robust, ecologically sustainable phytotechnological strategy that improves seedling performance, reduces dependency on chemical inputs, and elevates nursery stock quality. This low-impact biological intervention shows great potential for advancing conservation and sustainable forestry initiatives in Iran's Hyrcanian forests. Future long-term interdisciplinary field studies are essential in order to fully characterize fungal biodiversity, host specificity and environmental interaction dynamics, and to refine inoculation protocols at the ecosystem level. This will ensure the effective integration of these protocols into adaptive forest management frameworks in the context of ongoing global climate change.

زیست‌شناسی میکروبی
سال چهاردهم، شماره ۵۴، ۱۴۰۴، صفحه ۴۹-۶۵
تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۲/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۶/۲۵

مقاله پژوهشی

بررسی رابطه همزیستی بین بلوط اوری و قارچ *Tuber aestivum* در بهبود رشد رویشی

پروین باقری فر
گروه جنگلشناسی و اکولوژی جنگل، دانشکده علوم جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
parvinbaqerifar@yahoo.com

سید محمد واعظ موسوی *
گروه جنگلشناسی و اکولوژی جنگل، دانشکده علوم جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
waezmousavi@gau.ac.ir

کامران رهنما
گروه گیاهپزشکی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
rahnama@gau.ac.ir

چکیده

بلوط اوری (*Quercus macranthera*) به‌عنوان یکی از گونه‌های مهم جنگلی در ایران، به‌دلیل ویژگی‌های بوم‌شناختی و اقتصادی خود، نیازمند توجه ویژه‌ای در برنامه‌های احیا و توسعه جنگل‌ها است. در پژوهش حاضر تأثیر همزیستی قارچ ترافل سیاه تابستانی *Tuber aestivum* بر رشد نهال‌های بلوط اوری در طی ۱۶ ماه (فروردین ۱۳۹۹ تا شهریور ۱۴۰۰) در نهالستان آموزشی و پژوهشی جنگل شصت کلاته گرگان بررسی شده است. نهال‌های یک‌ساله به دو گروه شاهد و تلقیح‌شده با هاگ قارچ تقسیم شدند. سوسپانسیون هاگ به خاک گلدان اضافه شد و آبیاری دستی انجام گرفت. ارزیابی تشکیل همزیستی در زیر میکروسکوپ نوری با استفاده از روش‌های چشمی و خطوط مشبک انجام شد. ارزیابی متغیرهای رشدی شامل ارتفاع ساقه، قطر یقه و تعداد برگ‌ها پس از دو مرحله تلقیح نشان داد تفاوت معنی‌دار ۹۹ درصد بین گروه‌ها وجود دارد. نهال‌های تلقیح‌شده با قارچ بهبود چشمگیری در شاخص‌های رشدی و تشکیل شبکه‌های میکوریزی گسترده روی ریشه‌ها داشتند. تصاویر میکروسکوپی ساختار ریشه‌های تلقیح‌شده را قوی‌تر و سازمان‌یافته‌تر نشان دادند که باعث افزایش جذب آب و مواد غذایی شده است. یافته‌های این مطالعه نشان دادند تلقیح نهال‌های بلوط اوری با قارچ اکتومیکوریزی *T. aestivum* موجب بهبود چشمگیر شاخص‌های رشد رویشی و افزایش قابل توجه شبکه‌های وسیع میکوریزی در ریشه‌ها شد. این بهبود رشد نقشی مهم در تقویت مقاومت گیاهان در برابر تنش‌های محیطی، به‌ویژه خشکی و شوری دارد. از منظر بوم‌شناختی، همزیستی اکتومیکوریزی ظرفیت بالقوه‌ای در افزایش تنوع زیستی و تسریع روند احیای پایدار بوم‌سازگان‌های جنگل بلوط دارد. همچنین، بهره‌برداری پایدار از قارچ *T. aestivum* می‌تواند به توسعه اقتصاد محلی و ایجاد فرصت‌های شغلی پایدار در جوامع روستایی کمک کند. نتایج نشان می‌دهند تلقیح نهال‌های بلوط اوری با قارچ *T. aestivum* راهکاری مؤثر، پایدار و سبز در افزایش رشد، بهبود عملکرد و بقای نهال‌ها در پروژه‌های جنگل‌کاری است. برای اجرای گسترده این فناوری، انجام مطالعات میدانی میان‌رشته‌ای و بلندمدت به‌منظور ارزیابی پایداری و بقای نهال‌ها در عرصه‌های طبیعی و بررسی تأثیرات محیط زیستی و بوم‌شناختی همزیستی بر گونه‌های مختلف گیاهی ضروری است. همچنین، بهره‌گیری از تکنیک‌های مولکولی و بیوشیمیایی پیشرفته مانند ارزیابی فعالیت آنزیم‌های ریشه و تحلیل بیان ژن‌های مرتبط با جذب مواد غذایی، می‌تواند سازوکارهای این همزیستی را به‌صورت جامع و دقیق تبیین کند. این یافته‌ها گامی راهبردی در ادغام دانش بوم‌شناسی و فناوری‌های نوین برای مدیریت پایدار و سبز، احیای بوم‌سازگان‌های جنگلی و توسعه راهکارهای نوآورانه، پاک و سازگار با محیط زیست در حفظ، ارتقای کیفیت و افزایش کارایی جنگل‌ها محسوب می‌شوند.

واژه‌های کلیدی: همزیستی، گیاه چوبی، رشد گیاه، قارچ اکتومیکوریز

---

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

باقری فر، پروین، واعظ موسوی، سید محمد، رهنما، کامران. بررسی نقش همزیستی بین بلوط اوری و قارچ Tuber aestivum در بهبود رشد رویشی. *زیست شناسی میکروبی*، ۱۴۰۴؛ ۱۴(۵۴): ۴۹-۶۵. doi: 10.22108/bjm.2025.145257.1634

3060-7647/ © 2025 The Authors
This is an open access article under the CC BY-NC-ND/4.0/ License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

مقدمه

استفاده گسترده از کودهای شیمیایی تأثیرات منفی چشمگیر بر بوم‌سازگان‌های خاکی دارد؛ ازجمله افزایش فراوانی قارچ‌های بیماری‌زا. در مقابل، کودهای آلی و زیستی می‌توانند این اثرات را کاهش داده و به بهبود کیفیت خاک کمک کنند (۱). قارچ‌های میکوریزی به‌عنوان یکی از ریزاندامگان مؤثر در تولید کودهای زیستی، از طریق تشکیل همزیستی با ریشه گیاهان، نقش مهمی در جذب مواد غذایی و آب دارند (۲). این همزیستی در بیش از ۸۰ درصد گیاهان آوندی دیده می‌شود و ریشه‌های میکوریزایی به‌عنوان اندام‌های اصلی جذب در بوم‌سازگان‌ها شناخته می‌شوند (۳، ۴). همزیستی میکوریزایی علاوه بر اینکه تنوع زیستی و تجدیدپذیری را افزایش می‌دهد، ابزاری مؤثر برای احیای مناطق آسیب‌دیده از تخریب خاک و پوشش گیاهی است (۵). استفاده از جدایه‌های میکوریزی چشم‌اندازهای نوینی را در پرورش نهال و جنگل‌کاری به‌منظور بهبود رشد گیاهان ایجاد کرده است (۶) و درک سازوکارهای مؤثر بر استقرار و کارایی این همزیستی حائز اهمیت است (۷). امروزه دو نوع اصلی میکوریز شناخته شده است. دسته اول، اکتومیکوریزا، قارچ‌هایی هستند که در سطح خارجی پوست ریشه گیاه، غلاف هیفی تشکیل می‌دهند و بیشتر با ریشه گیاهان مناطق معتدله ارتباط همزیستی دارند. دسته دوم، اندومیکوریزا، قارچ‌هایی هستند که هیف‌های خود را بین و داخل سلول‌های ریشه گیاه میزبان مستقر می‌کنند (۸). این گروه شامل زیرشاخه‌هایی مانند میکوریزای آربوسکولار (*arbuscular mycorrhiza*)، اریکوئید (*Ericoid*)، اکتواندومیکوریزا (*Ectendomycorrhizae*)، آربوتوئید (*Arbutoid*)، ارکید (*Orchid*) و مونوتروپوئید (*Monotropoid*) می‌شود (۹). قارچ‌های آربوسکولار و اکتومیکوریز (*Ectomycorrhizal* fungi)، اشکال غالب همزیستی میکوریزایی هستند که به‌ترتیب حدود ۸۰ و ۲ درصد از گونه‌های گیاهی را در بر می‌گیرند (۱۰، ۱۱).

قارچ‌های اکتومیکوریز با تشکیل شبکه‌ای از ریسه‌های گسترده در خاک، قادر به نفوذ به شکاف‌های ریز غیرقابل دسترس برای ریشه گیاهان هستند (۱۲). این ویژگی، جذب آب و مواد معدنی را به‌طور چشمگیری افزایش می‌دهد. تلقیح ریشه با قارچ‌های اکتومیکوریز منجر به بهبود هدایت روزنه‌ای و کارایی فتوسنتز می‌شود که درنتیجه، تولید کربوهیدرات و رشد گیاه را تقویت می‌کند (۱۳). از سوی دیگر، قارچ‌های اکتومیکوریز به کربوهیدرات‌های تولیدشده توسط گیاه میزبان وابسته‌اند (۱۴). این قارچ‌ها معمولاً با خانواده‌های گیاهی مانند *Pinaceae*، *Fagaceae*، *Salicaceae* و *Betulaceae* همزیستی تشکیل می‌دهند (۱۵، ۱۶). قارچ‌های ترافل (سماروغ) شامل گونه‌های جنگلی و صحرایی هستند (۱۷). در میان آنها، ترافل سیاه تابستانی متعلق به جنس *Tuber* و خانواده *Tuberaceae*، به‌دلیل عطر و طعم متمایز و ارزش اقتصادی بالا، جایگاه ویژه‌ای در جهان دارد. پراکنش آن در آسیا (ایران، هند، چین، مغولستان و ژاپن)، اروپا و آمریکای شمالی گزارش شده است؛ اما در نیمکره جنوبی یافت نشده است (۱۸-۲۲). نخستین گزارش از تشکیل موفق همزیستی ترافل با گیاه میزبان به اواخر دهه ۱۹۶۰ در ایتالیا بازمی‌گردد (۲۳). ماهیت اکتومیکوریزی ترافل‌ها از منظر بوم‌شناختی و اقتصادی اهمیت بالایی دارد. *Tuber aestivum* Vittad. که بیشتر با نام سماروغ یا ترافل سیاه تابستانی در ایران شناخته می‌شود، یکی از پرطرفدارترین گونه‌های ترافل در جهان است (۲۴).

اندام باردهٔ (*Ascocarp*) قارچ که به‌صورت خوراکی در زیر زمین شکل می‌گیرد، با گونه‌های مختلفی از جنس‌های بلوط *Quercus*، ممرز *Carpinus*، راش *Fagus*، نمدار، سپیدار *Populus* و فندق همزیستی اکتومیکوریزی یا قارچ و ریشه‌ای برقرار می‌کند (۲۵، ۲۶). همزیستی آن با *Picea abies* نیز گزارش شده که نشان‌دهندهٔ انعطاف‌پذیری فنوتیپی بالای این قارچ است (۲۷). در سال‌های اخیر، همزیستی قارچ‌های اکتومیکوریزی با گیاهان میزبان به‌عنوان

10.22108/bjm.2025.145257.1634

عامل مهمی در بهبود رشد و کارایی فیزیولوژیک گیاهان درخور توجه گسترده پژوهشگران قرار گرفته است. مطالعات متعددی نشان داده‌اند این روابط همزیستی نقش مؤثری در افزایش بازدهی تولید، بهبود عملکرد رویشی و تقویت پایداری بوم‌سازگان‌ها دارند؛ برای نمونه، پژوهش (۲۸) اثبات کرد تلقیح نهال‌های *Arbutus unedo* با قارچ اکتومیکوریز *T. borchii* به‌طور معنی‌داری ارتفاع ساقه و تعداد برگ‌ها را نسبت به شاهد بهبود می‌بخشد. همچنین مطالعه‌ای روی نهال‌های کاج جنگلی مغولی (*Pinus sylvestris* var. mongolica) نشان داد همزیستی با قارچ اکتومیکوریز با *Suillus luteus* در شرایط تنش آبی موجب افزایش چشمگیر ارتفاع و قطر پایه نهال‌ها شد (۲۹). همچنین، تلقیح نهال‌های توت با چهار گونه قارچ محرک رشد باعث رشد چشمگیری در شاخص‌های رویشی شامل تعداد برگ، زیست‌توده و طول اندام‌های هوایی و ریشه شد (۳۰). این یافته‌ها نشان می‌دهند تعامل قارچ–ریشه دارای ظرفیت بالقوه‌ای برای بهبود عملکرد گیاهان، به‌ویژه در شرایط نامساعد محیطی است. گونه ارزشمند بلوط اوری (*Quercus macranthera*)، یک گونه بومی ناحیه قفقازی–هیرکانی، گستره پراکندگی آن از قفقاز تا دامنه‌های جنوبی البرز امتداد یافته است و عمدتاً در ارتفاعات ۸۰۰ تا ۲۴۰۰ متر از سطح دریا حضور دارد؛ هرچند گزارش‌هایی از رشد آن تا ارتفاع ۲۷۰۰ متر نیز به ثبت رسیده است (۳۱). این گونه دارای نیاز نوری بالا بوده است و به‌عنوان یکی از مقاوم‌ترین گونه‌های بلوط در برابر تنش‌های خشکی و سرما شناخته می‌شود. افزون بر این، بلوط اوری توانایی انطباق با شرایط آب‌وهوایی متنوع را دارد و می‌تواند در نواحی با بارش سالانه حداقل ۶۰۰ میلی‌متر به خوبی رشد کند. دامنه تحمل دمایی این گونه بین ۱۰ تا ۱۵ درجه سانتی‌گراد است و حداقل دمای صفر درجه سانتی‌گراد را نیز به‌خوبی تحمل می‌کند؛ این ویژگی‌ها نشان‌دهندهٔ سازگاری بالا با نوسانات دمایی به‌ویژه در مناطق کوهستانی و نیمه‌خشک است (۳۲، ۳۳). مطالعات بوم‌شناختی نشان داده‌اند که در نواحی جنوبی دریای خزر، این گونه معمولاً به‌صورت گروهی با درختان لور (*Carpinus orientalis*) و افرای خزری (*Acer hyrcanum*) حضور یافته است و نقش مؤثری در حفاظت خاک و افزایش نفوذپذیری آب دارد. همچنین، بلوط اوری در حفظ تنوع زیستی و حمایت از حیات وحش بوم‌سازگان‌های مرتفع اهمیت ویژه‌ای دارد (۳۴، ۳۵). گونه بلوط (*Quercus* spp.) به‌عنوان یکی از گونه‌های مهم جنگل‌های پهن‌برگ، به‌طور گسترده مطالعه شده است (۳۶)؛ با این حال، داده‌های محدود دربارهٔ عملکرد درختان میکوریزی و غیرمیکوریزی، به‌ویژه بلوط اوری، درک تعاملات بوم‌شناختی و فیزیولوژیکی این گونه‌ها را دشوار کرده است. مطالعات پیشین نقش همزیستی قارچ‌های ترافل با گونه‌های مختلف بلوط را به‌ویژه در اروپا نشان داده‌اند؛ اما تاکنون پژوهشی پیرامون بررسی همزیستی بین بلوط اوری، گونه‌ای بومی و از گونه‌های مهم جنگل‌های هیرکانی، با قارچ ترافل سیاه تابستانی در ایران انجام نشده است. با توجه به اهمیت اقتصادی و بوم‌شناختی قارچ‌های ترافل و چالش‌های حفاظتی جنگل‌های هیرکانی ازجمله تخریب، تغییر کاربری اراضی و تغییرات آب‌وهوایی، بررسی این همزیستی از اهمیتی بیش از پیش برخوردار است. هدف اصلی این پژوهش، ارزیابی امکان برقراری همزیستی بین ترافل سیاه تابستانی و نهال‌های بلوط اوری و تأثیر آن بر رشد رویشی نهال‌ها است. برای این منظور، هاگ‌های قارچ به ریشه نهال‌ها در شرایط نهالستان روباز تلقیح شدند تا امکان بررسی همزیستی در شرایط طبیعی‌تر محیط جنگل فراهم شود. نتایج این مطالعه می‌تواند الگویی کاربردی برای پژوهش‌های مرتبط با گونه‌های درختی و قارچ‌های میکوریزی در کشور باشد و گامی مؤثر در جهت حفظ و احیای جنگل‌های هیرکانی بردارد. همزیستی مدنظر علاوه بر بهبود جذب مواد غذایی و آب توسط گیاهان، مقاومت آنها را در برابر تنش‌های محیطی افزایش داده است و به

10.22108/bjm.2025.145257.1634

ارتقای تنوع زیستی و پایداری بوم‌سازگان‌های جنگلی کمک می‌کند.

مواد و روش‌ها

منطقه مطالعه‌شده

این پژوهش با هدف ارزیابی تأثیر همزیستی میکوریزی با قارچ ترافل سیاه تابستانی بر پارامترهای رشد نهال‌های بلوط اوری در دوره ۱۶ ماهه (فروردین ۱۳۹۹ تا شهریور ۱۴۰۰) در نهالستان روباز جنگل آموزشی-پژوهشی شصت کلاته، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. منطقه مطالعه‌شده که بخشی از جنگل‌های هیرکانی محسوب می‌شود، در مختصات جغرافیایی ′۴۵ °۳۶-′۴۱ °۳۶ شمالی و ′۲۴ °۵۴-′۲۰ °۵۴ شرقی واقع شده و ارتفاع آن بین ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ متر از سطح دریا است. با توجه به میانگین بارندگی سالانه حدود ۶۵۰ میلی‌متر و ویژگی‌های خاک (۳۷)، این منطقه می‌تواند به‌عنوان زیستگاهی مناسب برای گونه‌های بلوط و قارچ ترافل معرفی شود. در این پژوهش، نهال‌های بلوط اوری با هاگ قارچ ترافل سیاه تابستانی تلقیح شدند و تأثیر این همزیستی بر پارامترهای رشد رویشی مانند ارتفاع، قطر ساقه و تعداد برگ بررسی شد.

آماده‌سازی خاک و گلدان

در این مطالعه، دوازده اصله نهال یکساله بلوط اوری با ویژگی‌های فیزیولوژیکی مشابه (ارتفاع و قطر ساقه) از نهالستان جنگل شصت کلاته دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان به‌صورت تصادفی به دو گروه شاهد و تلقیح‌شده تقسیم شدند. محیط کشت ترکیبی از خاک جنگلی بکر و خاکبرگ به نسبت ۱:۹ بود که از عمق ۳۰-۰ سانتی‌متری جنگل پژوهشی شصت کلاته، برداشت و به‌منظور حفظ ساختار طبیعی و جمعیت میکروبی بومی انتخاب شد. استفاده از محیط کشت غیراستریل جهت شبیه‌سازی شرایط طبیعی و بررسی تأثیر همزیستی میکوریزی در زیستگاه مشابه انجام شد. گلدان‌های پلاستیکی سیاه‌رنگ با ظرفیت پنج کیلوگرم به‌عنوان ظرف کشت انتخاب شدند. نهال‌ها پس از تلقیح در فضای باز نهالستان و تحت شرایط آب‌وهوایی طبیعی منطقه نگهداری شدند. آبیاری به‌صورت دستی و متناسب با نیاز گیاه و شرایط منطقه انجام شد. همچنین در طول دوره آزمایش، مصرف کود شیمیایی، قارچ‌کش و آفت‌کش خودداری شد تا از تداخل با روابط همزیستی جلوگیری شود. مشخصات فیزیکوشیمیایی خاک استفاده‌شده از عمق ۳۰-۰ سانتی‌متری در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱- برخی از ویژگی‌های فیزیکی-شیمیایی خاک مطالعه‌شده

Table 1- selected Physical-Chemical characteristics of the studied soil.

Characteristic	pH	Electrical Conductivity (mmohs/cm)	Soil texture	Organic Carbon (%)	Total Nitrogen (%)	Phosphorus (Available Phosphorus) (ppm)	Potassium (Available Potassium) (ppm)
Value	۷/۶۸	۰/۷۶	(Silty Clay)	۱/۴	۰/۱۰	۶/۵۸	۲۶۰

تهیه و روش تلقیح مایه قارچ میکوریزی *Tuber aestivum*

در این مطالعه، از مایه تلقیح میکوریزی حاوی اسپورهای زنده قارچ ترافل سیاه تابستانی استفاده شد که به‌صورت بسته تجاری از شرکت دانش‌بنیان پویا فناوران زیستی توسکا تهیه شد. هر گرم این مایه حاوی 10^8 هاگ است. ایجاد همزیستی بین قارچ ترافل و ریشه گیاه میزبان معمولاً از طریق تلقیح با سوسپانسیون هاگ انجام می‌شود (۳۸).

براساس دستورالعمل شرکت تولیدکننده، ابتدا پودر مایه تلقیح در آب مقطر، حل و سوسپانسیونی آماده شد. سپس ۲۵ میلی‌لیتر از این سوسپانسیون در عمق سه تا هشت سانتی‌متری خاک اطراف ریشه هر نهال به‌صورت دستی و در چهار جهت مختلف تزریق شد تا اطمینان حاصل شود که هاگ‌ها به‌طور یکنواخت توزیع شده‌اند. فرایند تلقیح طی دو مرحله، در اوایل فروردین (۱۳۹۹) و اوایل اردیبهشت ماه (۱۴۰۰) انجام گرفت. عمق انتخاب‌شده به‌منظور فراهم‌کردن تماس مستقیم هاگ‌ها با ریشه‌های جوان و تکرار تلقیح برای افزایش احتمال موفقیت همزیستی در نظر گرفته شد. بهره‌گیری از مایه تلقیح با کیفیت بالا و روش اصولی تلقیح ضمن افزایش کارایی برقراری همزیستی، از آسیب به محیط زیست نیز جلوگیری می‌کند. این رویکرد شرایط بهینه‌ای برای برقراری همزیستی بین قارچ و ریشه نهال‌های بلوط اوری فراهم می‌آورد که می‌تواند موجب بهبود رشد و توسعه نهال‌ها و افزایش مقاومت آنها در برابر تنش‌های محیطی شود.

اندازه‌گیری پارامترهای رویشی

برای ارزیابی تأثیر همزیستی میکوریزی بر رشد نهال‌های بلوط اوری، پنج ماه پس از انجام تلقیح دوم، سه پارامتر مهم شامل تعداد برگ، ارتفاع ساقه و قطر یقه به‌طور دقیق اندازه‌گیری شدند. ارتفاع ساقه با استفاده از متر نواری و قطر یقه با کولیس دیجیتال (مدل APX CD۱۵، شرکت Mitutoyo، با دقت ۰/۰۲ میلی‌متر) تعیین شد. همچنین، تعداد برگ هر نهال به‌صورت مستقیم شمارش شد. پارامترهای انتخاب‌شده به‌دلیل حساسیت بالا نسبت به تغییرات ناشی از همزیستی قارچ و ریشه و کاربرد گسترده آنها در مطالعات رشد گیاهی استفاده شدند.

ارزیابی میزان کلونیزاسیون ریشه‌های نهال‌ها

برای سنجش میزان کلونیزاسیون ریشه‌های نهال‌ها از ترکیبی از روش‌های ارزیابی به روش چشمی (بدون رنگ‌آمیزی) (۳۹، ۴۰) و روش تلاقی خطوط مشبک (رنگ‌آمیزی‌شده) (۴۱) استفاده شد. نخست، پس از رنگ‌آمیزی ریشه‌ها با روش فیلیپس و هایمن (۴۲)، درصد کلونیزاسیون به‌صورت تقریبی به روش چشمی برآورد شد. در مرحله بعد، برای افزایش دقت، درصد طول ریشه‌های کلونیزه‌شده با به‌کارگیری روش تلاقی خطوط مشبک و معادله (۱) محاسبه شد.

معادله (۱)

$$\text{درصد کلونیزاسیون} = (\text{تعداد نقاط دارای همزیستی میکوریزی}) / (\text{تعداد کل نقاط}) \times 100$$

طرح آزمایش و روش تحلیل آماری

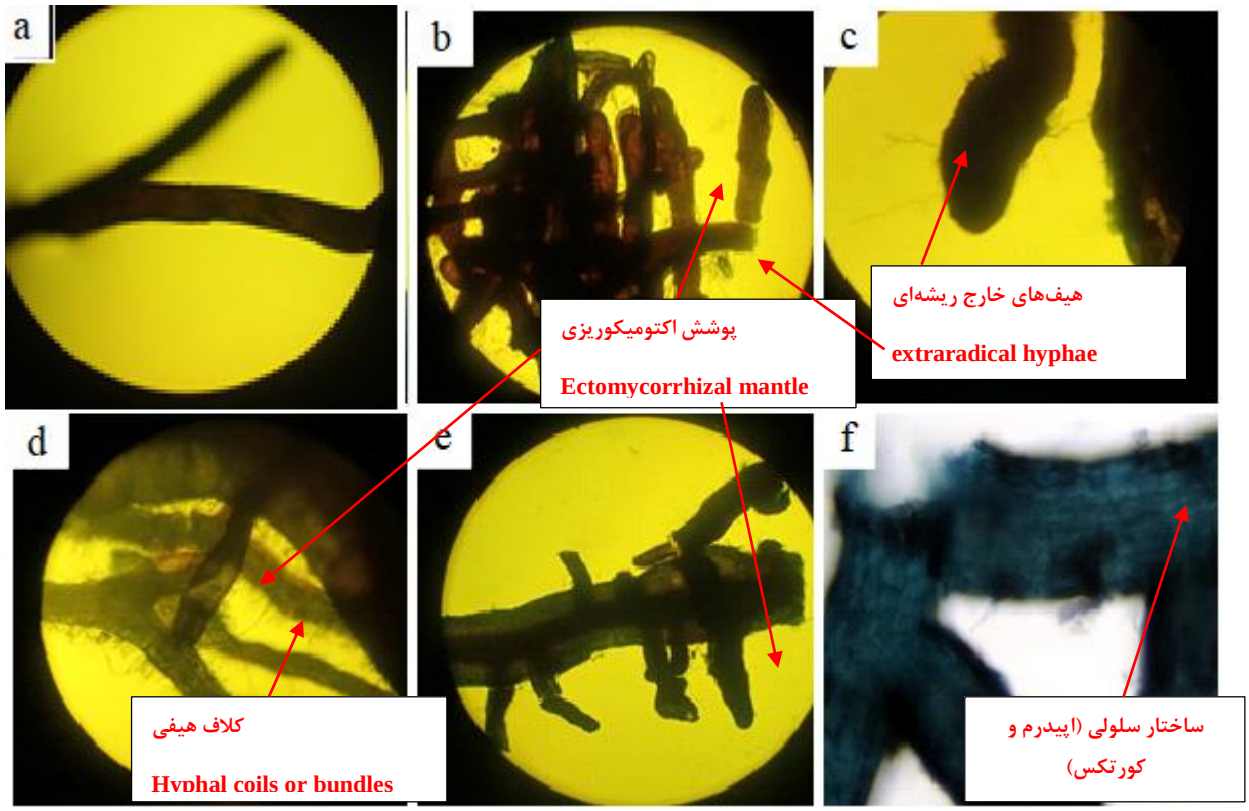
این مطالعه با هدف بررسی تأثیر همزیستی میکوریزی قارچ ترافل سیاه تابستانی بر شاخص‌های رشد نهال‌های بلوط اوری، در قالب یک طرح آزمایشی کاملاً تصادفی طراحی شد. دو تیمار اصلی شامل گروه شاهد (بدون تلقیح) و گروه تلقیح‌شده با قارچ ترافل سیاه تابستانی در نظر گرفته شدند. هر تیمار شامل شش تکرار بود که هر تکرار به‌صورت یک نهال در گلدان مستقل کاشته شد. تخصیص تصادفی تیمارها به واحدهای آزمایشی (گلدان‌ها) با هدف کاهش خطاهای احتمالی و افزایش دقت اندازه‌گیری انجام گرفت. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۶ تحلیل شدند. ابتدا بررسی نرمال‌بودن توزیع داده‌ها برای هر پارامتر اندازه‌گیری‌شده با آزمون کولموگروف–اسمیرنوف صورت گرفت. سپس برای مقایسه میانگین پارامترهای رشد بین گروه شاهد و تلقیح‌شده، آزمون تی مستقل با سطح معنی‌داری ۹۵ درصد اعمال شد.

نتایج

درصد کلونیزاسیون میکوریزی نهال‌ها

درصد کلونیزاسیون میکوریزی در نهال‌های بلوط اوری با روش ارزیابی چشمی حدود ۶۱ درصد و با روش تقاطع خطوط مشبک ۵۲ درصد تخمین زده شد. تصاویر

میکروسکوپی ریشه‌های نهال‌های تلقیح‌شده و شاهد برای گونه بلوط اوری در شکل 1 ارائه شده‌اند.



شکل ۱- مشاهده ریشه‌های بلوط اوری *Q. macranthera* تلقیح‌شده و بدون تلقیح با قارچ زیر میکروسکوپ. (a): ریشه رنگ‌آمیزی‌نشده بدون همزیستی با قارچ *T. aestivum*. (b, c): ریشه‌های اکتومیکوریزی رنگ‌آمیزی‌نشده همراه با قارچ و نشان قرمز. (d, e): ریشه‌های اکتومیکوریزی رنگ‌آمیزی‌شده همراه با قارچ و نشان قرمز . (f): ریشه رنگ‌آمیزی‌شده بدون همزیستی با قارچ *T. aestivum*. بزرگنمایی X100.

Figure 1– Observation roots of *Q. macranthera* inoculated and uninoculated with fungus under the microscope. (a): Unstained roots without symbiosis with the fungus *T. aestivum*. (b, c): Unstained ectomycorrhizal roots with the fungus with red arrows. (d, e): Stained ectomycorrhizal roots with red arrow. (f): Stained roots without symbiosis with the fungus *T. aestivum* x100.

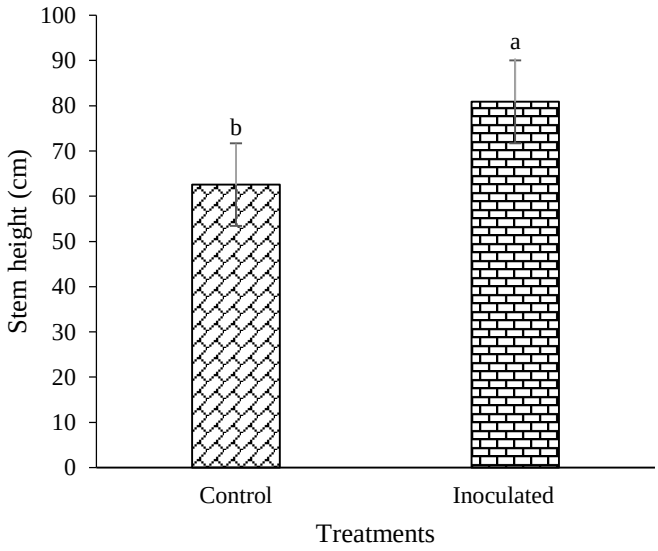
پارامترهای رویشی

نتایج آزمون تی مستقل نشان دادند تفاوت ارتفاع نهال‌های بلوط اوری بین گروه تلقیح‌شده با قارچ ترافل سیاه تابستانی و گروه شاهد به‌طور معنی‌داری مثبت بود (P =۰/۰۰۳). همچنین تفاوت قطر یقه نهال‌ها (p <۰/۰۰۱) و تعداد برگ‌ها (P= ۰/۰۰۲) در سطح اطمینان ۹۹ درصد معنی‌دار گزارش شد. این یافته‌ها تأثیر مثبت تلقیح قارچ ترافل بر رشد رویشی نهال‌ها را تأیید می‌کند. نتایج آزمون تی مستقل برای مقایسه ویژگی‌های رویشی شامل ارتفاع ساقه، قطر یقه و تعداد برگ در نهال‌های تلقیح‌شده و گروه شاهد گونه بلوط اوری، در جدول ۲ و مقایسه میانگین‌ها در شکل 2، شکل 3 و شکل 4 ارائه شده است.

جدول ۲- نتایج آزمون تی مستقل برای مقایسه ویژگی‌های رویشی نهال‌های تلقیح‌شده و شاهد بلوط اوری

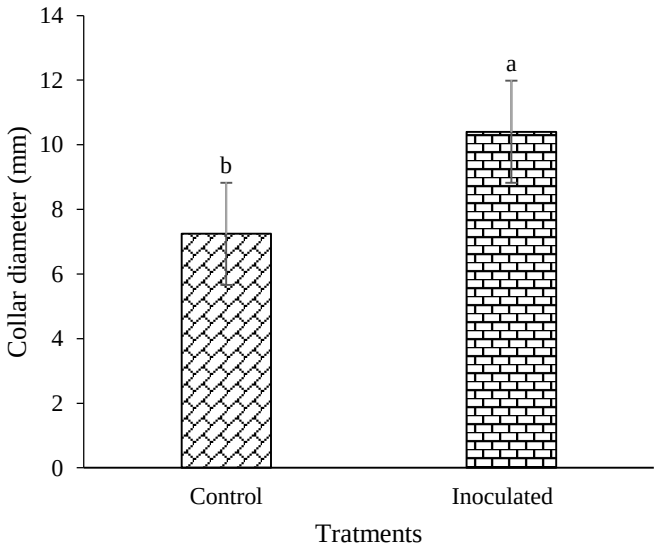
Table 2- Independent t-test results comparing the growth characteristics of inoculated seedlings and control *Quercus macranthera*

t	(df)	Sig. (2- tailed)	Parameters
-3.829	10	0.003	Stem height
-9.999	10	<0.001	Collar diameter
-4.271	10	0.002	Leaf number



شکل ۲- مقایسه میانگین ارتفاع ساقه در نهال‌های تلقیح‌شده و شاهد

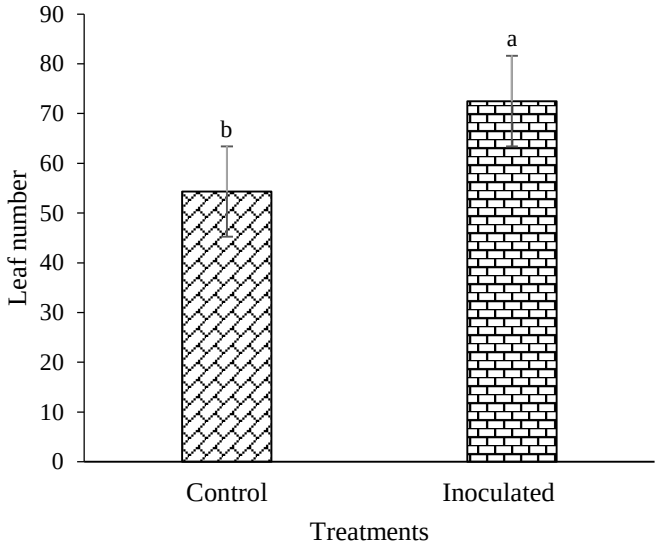
Figure 2- Comparison of mean stem height in inoculated and control seedlings



شکل ۳- مقایسه میانگین قطر یقه در نهال‌های تلقیح‌شده و شاهد

Figure 3- Comparison of mean collar diameter in inoculated and control seedlings

10.22108/bjm.2025.145257.1634



شکل ۴- مقایسه میانگین تعداد برگ در نهال‌های تلقیح‌شده و شاهد

Figure 4- Comparison of mean leaf number in inoculated and control seedlings

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه، تأثیر همزیستی قارچ اکتومیکوریزی ترافل سیاه تابستانی با گونه بومی بلوط اوری در شرایط نهالستان روباز ایران به‌صورت دقیق بررسی شد. نتایج حاصل نشان دادند تلقیح نهال‌ها با این قارچ به‌طور معنی‌داری پارامترهای رشد رویشی شامل ارتفاع ساقه، قطر یقه و تعداد برگ‌ها را به‌ترتیب به‌میزان ۳۰، ۴۴ و ۳۴ درصد نسبت به گروه شاهد افزایش داد (۴۳-۴۶). این یافته‌ها برای نخستین‌بار تأییدی صریح بر تأثیر مثبت و مستقیم همزیستی با ترافل سیاه تابستانی در ارتقای رشد بلوط اوری در زیست‌بوم طبیعی ایران محسوب می‌شوند. تفاوت معنی‌دار در برآورد درصد کلونیزاسیون قارچ بین روش ارزیابی چشمی و تحلیل تصاویر میکروسکوپی (روش تقاطع خطوط مشبک)، اهمیت استفاده از روش‌های دقیق و تصویربرداری در تحلیل ساختار همزیستی و کاهش خطاهای انسانی را آشکار می‌کند. بهره‌گیری هم‌زمان از این رویکردهای چندجانبه امکان افزایش دقت ارزیابی و درک عمیق‌تر از رابطه همزیستی بین قارچ و ریشه گیاه را فراهم می‌آورد. سازوکارهای ارتقای رشد رویشی نهال‌ها را می‌توان براساس فرایندهای شناخته‌شده همزیستی اکتومیکوریزی توضیح داد؛ توسعه شبکه‌های هیفی وسیع شامل غلاف قارچی (mantle) و شبکه هارتیگ (Hartig net) به افزایش سطح جذب آب و عناصر غذایی مهمی مانند فسفر و نیتروژن منجر می‌شود (۳، ۱۸، ۴۷، ۴۸). افزون بر این، این شبکه‌ها بهبود ساختمان و نفوذپذیری خاک، تقویت شرایط فیزیکوشیمیایی محیط ریشه و تحریک تولید هورمون‌های رشد را تسهیل می‌کنند و باعث تسریع توسعه اندام‌های رویشی می‌شوند (۴۹-۵۲). این روندها با نتایج مطالعات مشابه در اروپا و دیگر مناطق که اهمیت همزیستی قارچ‌های جنس *Tuber* با گونه‌های بلوط را نشان می‌دهند، کاملاً هم‌راستا است (۵۲، ۵۳). بلوط اوری به‌واسطهٔ مقاومت ذاتی به خشکی و سرما و سازگاری در ارتفاعات کوهستانی (بین ۸۰۰ تا ۲۴۰۰ متر)، زمینه‌ای مساعد برای شکل‌گیری همزیستی پایدار با ترافل سیاه تابستانی فراهم می‌آورد. گرمایش جهانی و تغییرات آب‌وهوایی، دامنه ارتفاعی این قارچ را توسعه داده و موجب بهبود تطابق زیستگاهی بین قارچ و میزبان شده‌اند که از این طریق اثربخشی همزیستی را در ارتقای رشد و مقاومت نهال‌ها تسهیل می‌کنند. شبکه‌های هیفی قارچ با نفوذ به

ساختار خاک و تسریع تبادل کربوهیدرات‌های گیاهی و مواد معدنی قارچی، سامانه‌ای پایدار و هماهنگ ایجاد کرده‌اند که با حمایت جوامع میکروبی میکوریزوسفری، به‌ویژه باکتری‌ها، سلامت قارچ و کیفیت اندام‌های بارده را ارتقا می‌دهند (۵۴، ۵۵). نقش همزیستی اکتومیکوریزی فراتر از تأمین عناصر غذایی بوده است و به‌عنوان سازوکاری مهم در افزایش مقاومت گیاه میزبان در برابر تنش‌های محیطی، به‌ویژه کم‌آبی شناخته می‌شود (۵۶–۵۸). برخی مطالعات پاسخ‌های متفاوتی را گزارش کرده‌اند؛ اما اکثریت داده‌های علمی نشان‌دهندهٔ افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، بهبود تعادل ترکیبات تنظیم‌کنندهٔ اسمزی و کاهش چشمگیر مرگ‌ومیر نهال‌ها در گیاهان تلقیح‌شده با قارچ‌های میکوریزی است (۵۹–۶۶). از منظر کاربردی، تلقیح نهال‌های بلوط اوری با قارچ‌های اکتومیکوریزی سازگار، رویکردی زیست‌سازگار و نوین است که علاوه بر افزایش رشد، مصرف کودهای شیمیایی را کاهش می‌دهد و کیفیت کمّی و کیفی نهال‌ها را بهبود می‌بخشد؛ این امر اهمیت بالایی در توسعه جنگلداری پایدار و حفاظت محیط زیست دارد (۴۳، ۴۴، ۴۹، ۶۷). همچنین مطالعات مشابه در گونه‌های دیگر بلوط مانند *Q. coccifera*، *Q. robur* و قارچ‌های ترافل نظیر *T. melanosporum* و *T. borchii* نتایج همسو در افزایش رشد رویشی و بقای نهال‌ها را گزارش کرده‌اند که اعتبار علمی و قابلیت تعمیم‌یافته‌های این مطالعه را تقویت می‌کنند (۱۸، ۴۶،۵۰، ۵۱، ۶۴، ۶۵ و ۶۶). چرخه زندگی ترافل سیاه تابستانی کاملاً وابسته به همزیستی اکتومیکوریزی با گیاه میزبان است و این وابستگی برای تولید اندام بارده قارچ ضروری است؛ بدون این تعامل، چرخه زندگی قارچ ناقص باقی می‌ماند (۱۹، ۴۷، ۶۸ و ۶۹)؛ بنابراین، تلقیح نهال‌های بلوط اوری با ترافل سیاه تابستانی به‌عنوان فناوری نوین، مؤثر و زیست‌سازگار می‌تواند نقش اساسی در موفقیت برنامه‌های احیای جنگل‌های هیرکانی و ارتقای کیفیت نهال‌ها داشته باشد. بهره‌برداری پایدار و گسترده از این فناوری نیازمند مطالعات میدانی میان‌رشته‌ای، طولانی‌مدت و فراگیر برای بررسی جامع تعاملات بوم‌شناختی، تنوع گونه‌ای قارچ‌ها و تأثیر عوامل محیطی و میکروبی وابسته است (۴۵، ۵۲، ۵۳، ۶۹، ۷۰).

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله تمایل دارند تا قدردانی عمیق خود از کارکنان محترم جنگل شصت کلاته گرگان را به سبب حمایت‌های همه‌جانبه، به‌ویژه در نگهداری نهال‌ها و فراهم‌کردن امکانات پژوهش ابراز کنند که نقش تعیین‌کننده‌ای در موفقیت این تحقیق علمی داشته است.

References

(1) Paungfoo-Lonhienne C, Yeoh YK, Kasinadhuni NR, Lonhienne TG, Robinson N, Hugenholtz P, et al. Nitrogen fertilizer dose alters fungal communities in sugarcane soil and rhizosphere. *Scientific Reports*. 2015; 5(1):8678. https://doi.org/10.1038/srep08678

(2) Sharma AK, Johri BN. *Arbuscular mycorrhizae: Interaction in plants, rhizosphere and soils*. Enfield, NH: Science Publishers; 2002. https://agry.um.ac.ir/index.php/arable/article_35557.html?lang=en

(3) Brundrett MC, Tedersoo L. Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. *New Phytologist*. 2018; 220(4):1108-15. https://doi.org/10.1111/nph.14976

(4) Tester M, Smith SE, Smith FA. The phenomenon of "nonmycorrhizal" plants. *Canadian Journal of Botany*. 1987; 65(3):419-31. http://dx.doi.org/10.1139/b87-051.

(5) White JA, Tallaksen J, Charvat I. The effects of arbuscular mycorrhizal fungal inoculation at a roadside prairie restoration site. *Mycologia*. 2008; 100(1):6-11. https://doi.org/10.3852/mycologia.100.1.6

(6) Brundrett MC, Bougher N, Dell B, Grove T, Malajczuk N. *Working with mycorrhizas in*

forestry and agriculture (ACIAR Monograph 32). Canberra: Australian Centre for International Agricultural Research; 1996. http://dx.doi.org/10.13140/2.1.4880.5444

(7) Wipf D, Krajinski F, van Tuinen D, Recorbet G, Courty PE. Trading on the arbuscular mycorrhiza market: From arbuscules to common mycorrhizal networks. *New Phytologist*. 2019; 223(3):1127-42. https://doi.org/10.1111/nph.15775

(8) Quilambo OA. *Functioning of peanut (Arachis hypogaea L.) under nutrient deficiency and drought stress in relation to symbiotic associations* [Doctoral dissertation]. University of Groningen; 2000. https://B2n.ir/mg1073

(9) Peterson RL, Massicotte HB, Melville LH. *Mycorrhizas: anatomy and cell biology*. Ottawa: NRC Research Press; 2004. https://B2n.ir/ne9307

(10) Smith SE, Read DJ. *Mycorrhizal symbiosis*. London and New York: Academic Press; 2008. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370526-6.X5001-1

(11) Wang B, Qiu YL. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza*. 2006; 16(5):299-363. https://doi.org/10.1007/s00572-005-0033-6

(12) Allen MF. Mycorrhizal fungi: Highway for water and nutrients in arid soils. *Vadose Zone Journal*. 2007; 6(2):291-7. http://dx.doi.org/10.2136/vzj2006.0068

(13) Rasouli F, Amini T, Skrovankova S, Asadi M, Hassanpouraghdam MB, Ercisli S, et al. Influence of drought stress and mycorrhizal (*Funneliformis mosseae*) symbiosis on growth parameters, chlorophyll fluorescence, antioxidant activity, and essential oil composition of summer savory (*Satureja hortensis* L.) plants. *Frontiers in Plant Science*. 2023; 14:1151467. https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1151467

(14) Casieri L, Lahmidi NA, Doidy J, Veneault-Fourrey C, Migeon A, Bonneau L, et al. Biotrophic transportome in mutualistic plant-fungal interactions. *Mycorrhiza*. 2013; 23(8):597-625. https://doi.org/10.1007/s00572-013-0496-9

(15) Vaario L, Xing S, Xie Z, Lun Z, Sun Y. In situ and in vitro colonization of *Cathaya argyrophylla* (*Pinaceae*) by ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*. 2006; 16:137-42. https://doi.org/10.1007/s00572-005-0026-5

(16) Wang Y, Gao C, Chen L, Ji N, Wu B, Li X, et al. Host plant phylogeny and geographic distance strongly structure *Betulaceae*-associated ectomycorrhizal fungal communities in Chinese secondary forest ecosystems. *FEMS Microbiology Ecology*. 2019; 95(4):fiz037. https://doi.org/10.1093/femsec/fiz037

(17) Habibi R, Rahnama K, Razavi SE, Khomeiri M, Asef MR. Studies on the physical and chemical characteristics of soil and mycoflora from native desert truffle (*Terfezia claveryi*) and *Helianthemum* plant in Golestan province. *J Plant Ecosyst Conserv*. 2019; 7(15):181-95. http://pec.gonbad.ac.ir/article-1-471-en.html [In Persian]

(18) Bonito G, Smith ME, Nowak M, et al. Historical biogeography and diversification of truffles in the *Tuberaceae* and their newly identified Southern Hemisphere sister lineage. *PLoS One*. 2013; 8(1):e52765. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052765

(19) Daba GM, Elkhateeb WA, Wen TC, Thomas PW. The continuous story of truffle-plant interaction. In: *Microbiome in plant health and disease*. 2019:375-83. https://doi.org/10.1007/978-981-13-8495-0

(20) Díaz P, Ibáñez E, Señorans FJ, Reglero G. Truffle aroma characterization by headspace solid-phase microextraction. *J Chromatogr A*. 2003; 1017(1-2):207-14. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.08.016

(21) Jeandroz S, Murat C, Wang Y, Bonfante P, Le Tacon F. Molecular phylogeny and historical biogeography of the genus Tuber, the 'true truffles'. *J Biogeogr*. 2008; 35(5):815-29. http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2699.2007.01851.x

(22) Wang S, Marcone MF. The biochemistry and biological properties of the world's most expensive underground edible mushroom: Truffles. *Food Res Int*. 2011; 44(9):2567-81. http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.008

(23) Fassi B, Fontana A. Sintesi micorrizica tra *Pinus strobus* e *Tuber maculatum*. I. Micorrize e sviluppo dei semenzali nel secondo anno. *Allionia*. 1967; 13:177-86. https://B2n.ir/pb2816

(24) Bonito G, Gryganskyi AP, Trappe JM, Vilgalys R. A global meta-analysis of Tuber ITS rDNA sequences: Species diversity, host associations and long-distance dispersal. *Mol Ecol*. 2010; 19(22):4994-5008. https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.2010.04855.x

(25) Chevalier G, Frochot H. *La truffe de Bourgogne*. Pétrarque: Paris, France; 1997; 49(Spécial):201-13. https://www.mycosphere.org/pdf/Mycosphere_5_1_5.pdf

(26) Granetti B, De Angelis A, Materozzi G. *Umbria: Terra di tartufi*. Regione Umbria: Terni, Italy; 2005. https://www.provincia.perugia.it/umbria-terra-tartufi

(27) Stobbe U, Egli S, Tegel W, Peter M, Sproll L, Büntgen U. Potential and limitations of Burgundy truffle cultivation. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013; 97(12):5215-24. http://dx.doi.org/10.1007/s00253-013-4956-0

(28) Plácito F, Ferreira I, Clemente M, Figueiredo P, Barrento MJ, Machado H, et al. Mycorrhizal synthesis between *Tuber borchii* and *Arbutus unedo* L. seedlings and micropropagated plants. In: *VII International Symposium on Production and Establishment of Micropropagated Plants* (Acta Horticulturae; Vol 1224): 91-100. http://dx.doi.org/10.17660/ActaHortic.2018.1224.13

(29) Yin D, Song R, Qi J, Deng X. Ectomycorrhizal fungus enhances drought tolerance of *Pinus sylvestris* var. mongolica seedlings and improves soil condition. *J For Res*. 2018; 29(6):1775-88. http://dx.doi.org/10.1007/s11676-017-0583-4

(30) Ou T, Zhang M, Gao H, Wang F, Xu W, Liu X, et al. Study on the potential for stimulating mulberry growth and drought tolerance of plant growth-promoting fungi. *Int J Mol Sci*. 2023; 24(4):4090. https://doi.org/10.3390/ijms24044090

(31) Zohary M. *Geobotanical foundations of the Middle East* (Vol 1). Stuttgart: Gustav Fischer Verlag; 1973. https://archive.org/details/geobotanicalfoun0001zoha

(32) Browicz K. *Chorology of trees and shrubs in South-West Asia and adjacent regions* (Vol 1). Warszawa/Poznan: Polish Scientific; 1982. https://B2n.ir/kp1239

(33) Menitsky YL. *Oaks of Asia* (Translated from Russian). Enfield, NH, USA: Science Publishers Inc.; 2005. https://B2n.ir/bk1687

(34) Chafjiri ANS, Abkenar KT, Navroudi IH, Pourbabaei H. Distribution of plant species and their relation to soil properties in protected and degraded stands of *Quercus macranthera* in Northern Iran. *Ecologia Balkanica*. 2016; 8(2). https://B2n.ir/uz7885

(35) Papini A, Simeone MC, Bellarosa R, Spada F, Schirone B. *Quercus macranthera* Fisch & Mey ex Hohen and *Quercus iberica* M. Bieb.: Taxonomic definition and systematic relationships with European oaks inferred from nuclear internal transcribed spacer (ITS) data. *Plant Biosyst*. 2011; 145(1):37-49.

http://dx.doi.org/10.1080/11263504.2010.502684

(36) Jarcuska B. Growth, survival, density, biomass partitioning and morphological adaptations of natural regeneration in *Fagus sylvatica*: A review. *Dendrobiologia*. 2009; 61:3-11. https://B2n.ir/uz7885

(37) Habashi H, Waez-Mousavi SM. Single-tree selection system effects on forest soil macrofauna biodiversity in mixed oriental beech stands. *Appl Soil Ecol*. 2018; 123:441-6. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.09.023

(38) Nakano S, Kinoshita A, Obase K, Nakamura N, Furusawa H, Noguchi K, et al. Influence of pH on in vitro mycelial growth in three Japanese truffle species: *Tuber japonicum*, *T. himalayense*, and *T. longispinosum*. *Mycoscience*. 2019; 61(2):58-61. https://doi.org/10.1016/j.myc.2019.12.001

(39) Benucci GMN, Bonito G, Falini LB, Bencivenga M. Mycorrhization of pecan trees (*Carya illinoinensis*) with commercial truffle species: *Tuber aestivum* Vittad. and *Tuber borchii* Vittad. *Mycorrhiza*. 2012; 22:383–92. https://doi.org/10.1007/s00572-011-0413-z

(40) Oliferchuk VP, Fedorovych DV. Application of mycorrhizal fungus *Tuber melanosporum* to stimulate the growth and development of soybean and spring barley. *Faktori Eksperimental'noi Evolucii Organizmiv*. 2019; 24:133–8. http://dx.doi.org/10.7124/FEEO.v24.1092

(41) Giovannetti M, Mosse B. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol*. 1980:489–500. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1980.tb04556.x

(42) Phillips JM, Hayman DS. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans Br Mycol Soc*. 1970; 55(1):158–66. https://doi.org/10.1016/s0007-1536(70)80110-3

(43) Grossnickle SC, MacDonald JE. Why seedlings grow: Influence of plant attributes. *New For*. 2018; 49:1–34. https://doi.org/10.1007/s11056-017-9606-4

(44) Zimmer D, Baum C, Leinweber P, Hrynkiewicz K, Meissner R. Associated bacteria increase the phytoextraction of cadmium and zinc from metal-contaminated soil by mycorrhizal willows. *Int J Phytoremediation*. 2009; 11:200–13. http://dx.doi.org/10.1080/15226510802378483

(45) Villeneuve N, Le Tacon F, Bouchard D. Survival of inoculated *Laccaria bicolor* in competition with native ectomycorrhizal fungi and effects on the growth of outplanted Douglas fir seedlings. *Plant Soil*. 1991; 135:95–107. https://doi.org/10.1007/BF00014782

(46) Chowdhury AR, Hussain MM, Mia MS, Karim AMMS, Haider J, Bhuyan NI, Shifuddin K. Effect of organic amendments and EM on crop production in Bangladesh. In: *Kyusei Nature Farming: Proceedings of the 2nd International Conference on Kyusei Nature Farming*; Piracicaba, Brazil; 1994:155–63. https://B2n.ir/uk1056

(47) Iotti M, Piattoni F, Leonardi P, Hall IR, Zambonelli A. First evidence for truffle production from plants inoculated with mycelial pure cultures. *Mycorrhiza*. 2016; 26(6):793–8. http://dx.doi.org/10.1007/s00572-016-0703-6

(48) Liu Y, Li X, Kou Y. Ectomycorrhizal fungi: Participation in nutrient turnover and community assembly pattern in forest ecosystems. *Forests*. 2020; 11(4):453. http://dx.doi.org/10.3390/f11040453

(49) Augé RM. Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza*. 2001; 11(1):3–42. http://dx.doi.org/10.1007/s005720100097

(50) Marx DH. *Ectomycorrhizal fungus inoculations: A tool for improving forestation practices.* Forest Research and Development; 1981. https://archive.org/details/marx-1980

(51) Molina R, Trappe JM. *Applied aspects of ectomycorrhizae. In: Subba Rao NS, ed. Advances in agricultural microbiology*. Oxford & IBH Publishing Company: New Delhi; 1982:305–324. https://archive.org/details/molina-trappe-1982

(52) Perry DA, Molina R, Amaranthus MP. Mycorhizae, mycorrhizospheres, and reforestation: Current knowledge and research needs. *Canadian Journal of Forest Research.*1987; 17(8): 929–940. https://doi.org/10.1139/x87-145

(53) Garbaye J. Utilisation des mycorhizes en sylviculture. In: *Strullu DG, editor. Les mycorhizes des arbres et plantes cultivées*. Paris, France: Lavoisier; 1991. p. 197-248. https://books.openedition.org/irdeditions/3300

(54) Barbieri E, Bertini L, Rossi I, Ceccaroli P, Saltarelli R, Guidi C, Zambonelli A, Stocchi V. New evidence for bacterial diversity in the ascoma of the ectomycorrhizal fungus *Tuber borchii* Vittad. *FEMS Microbiol Lett*. 2005; 247(1):23-35. https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.04.027

(55) Vahdatzadeh M, Deveau A, Splivallo R. The role of the microbiome of truffles in aroma formation: a meta-analysis approach. *Appl Environ Microbiol*. 2015; 81(20):6946-52. https://doi.org/10.1128/aem.01098-15

(56) Zhang X, Zhang J, He J, Li M, Matsushita N, Geng Q, Lian C, Zhang S. Physiological and transcriptome responses of *Pinus massoniana* seedlings inoculated by various ecotypes of the ectomycorrhizal fungus *Cenococcum geophilum* during the early stage of drought stress. *J Fungi (Basel).* 2024; 10(1):71. https://doi.org/10.3390/jof10010071

(57) Kivlin SN, Emery SM, Rudgers JA. Fungal symbionts alter plant responses to global change. *Am J Bot*. 2013; 100(7):1445-57. https://doi.org/10.3732/ajb.1200558

(58) Brunner I, Herzog C, Dawes MA, Arend M, Sperisen C. How tree roots respond to drought. *Front Plant Sci*. 2015; 6:547. https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00547

(59) Nardini A, Salleo S, Tyree MT, Vertovec M. Influence of the ectomycorrhizas formed by *Tuber melanosporum* Vitt on hydraulic conductance and water relations of *Quercus ilex* L. seedlings. *Ann For Sci*. 2000; 57(4):305-12. http://dx.doi.org/10.1051/forest:2000121

(60) Colpaert JV, Van Assche JA, Luijtens K. The growth of the extramatrical mycelium of ectomycorrhizal fungi and the growth response of *Pinus sylvestris* L. *New Phytol*. 1992; 120(1):127-35. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1992.tb01065.x

(61) Lerat S, Lapointe L, Piche Y, Vierheilig H. Variable carbon-sink strength of different *Glomus mosseae* strains colonizing barley roots. *Can J Bot*. 2003; 81(8):886-9. http://dx.doi.org/10.1139/b03-070

(62) Fidelibus MW, Martin CA, Wright GC, Stutz JC. Effect of arbuscular mycorrhizal (AM) fungal communities on growth of 'Volkamer' lemon in continually moist or periodically dry soil. *Sci Hortic*. 2000; 84(1-2):127-40. http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4238(99)00112-0

(63) Walling SZ, Zabinski CA. Defoliation effect on arbuscular mycorrhizae and plant growth of two native bunchgrasses and on invasive forb. *Appl Soil Ecol*. 2006; 32(1):111-7. http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2005.02.017

(64) Flykt E, Timonen S, Pennanen T. Variation of ectomycorrhizal colonisation in Norway spruce seedlings in Finnish forest nurseries. *Silva Fenn*. 2008; 42:571-85. https://doi.org/10.14214/sf.234

(65) Beram RC, Mahsun M, Lehtijarvi H. Comparison of mycorrhizal colonization success in oak species inoculated with *Tuber aestivum* Vitt. and *Tuber borchii* Vitt. *Düzce Üniversitesi Orman Fakültesi Ormancılık Dergisi.* 2022; 18(2):405-20. https://dergipark.org.tr/tr/pub/duzceod/issue/74736/1210598

(66) Wang J, Zhang H, Gao J, Zhang Y, Liu Y, Tang M. Effects of ectomycorrhizal fungi (*Suillus variegatus*) on the growth, hydraulic function, and non-structural carbohydrates of *Pinus tabulaeformis* under drought stress. *BMC Plant Biol*. 2021; 21:1-13. https://doi.org/10.1186/s12870-021-02945-3

(67) Ruiz-Lozano JM. Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress: New perspectives for molecular studies. *Mycorrhiza*. 2003; 13(6):309-17. https://doi.org/10.1007/s00572-003-0237-6

(68) Merényi Z, Varga T, Hubai AG, Pitlik P, Erős Á, Trappe JM, Bratek Z. Challenges in the delimitation of morphologically similar species: A case study of *Tuber brumale* agg. (Ascomycota, Pezizales). *Mycol Prog*. 2017; 16(6):613-24. https://doi.org/10.1007/s11557-017-1302-9

(69) Mello A, Murat C, Bonfante P. Truffles: Much more than a prized and local fungal delicacy. *FEMS Microbiol Lett*. 2006; 260(1):1-8. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00252.x

(70) Sepahvand D, Matinizadeh M, Etemad V, Shirvany A. Changes in morphological and biochemical properties of *Celtis caucasica* L. mycorrhizal fungi-inoculated under drought stress condition. *Cent Asian J Environ Sci Technol Innov*. 2021; 2(4):142-55. https://doi.org/10.22034/CAJESTI.2021.04.01