بسم الله الرحمن الرحیم

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور

معرفی روش مولکولی اختصاصی
برای تکثیر ژنوم قارچ‌های آربوسکولار

به‌منظور تشخیص حضور قارچ‌های همزیست میکوریزی درون ریشه بادام وحشی

نگارش:

محمد بیرانوند، محمد متینی‌زاده، جعفر همت و الهام نوری

۱۴۰۴

ISBN : 978-964-473-628-5

9 789644 736285

شماره مصوب	عنوان طرح منتج به نشریه
۴۰۱۵۳۲۲	شناسایی قارچ‌های همزیست آربوسکولار بادام وحشی وامچک (*Amygdalus arabica* Olive.) و بررسی تحمل نهال‌های میکوریزی شده آن به تنش خشکی

عنوان: معرفی روش مولکولی اختصاصی برای تکثیر ژنوم قارچ‌های آربوسکولار به‌منظور تشخیص حضور قارچ‌های همزیست میکوریزی درون ریشه بادام وحشی

نگارش:

محمد بیرانوند- استادیار، بخش تحقیقات جنگل‌ها و مراتع، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمان، سازمان آموزش و ترویج کشاورزی، کرمان، ایران.

محمد متینی‌زاده- دانشیار، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.

جعفر همت- استادیار، پژوهشکده زیست‌فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران.

الهام نوری- کارشناس پژوهش، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.

مدیر داخلی: فاطمه عباسپور

ویراستار ادبی: اصغر احمدی

صفحه‌آرا: مریم نوبخت

تهیه شده در: مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، اداره ترویج و انتقال یافته‌های تحقیقاتی/ بخش تحقیقات جنگل

نشانی: بزرگراه تهران-کرج، خروجی پیکانشهر، شهرک سرو آزاد، خیابان شهید گودرزی، بلوار باغ گیاه‌شناسی ملی ایران، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور.

صندوق پستی: ۱۱۶-۱۳۱۸۵ **تلفن:** ۵-۴۴۷۸۷۲۸۲-۰۲۱ **وب‌سایت:** www.rifr-ac.ir

شمارگان: الکترونیکی

سال انتشار: ۱۴۰۴

این نشریه به شماره ۶۸۱۴۵ در تاریخ ۱۴۰۴/۰۷/۲۶ در مرکز اطلاعات و مدارک علمی کشاورزی به ثبت رسیده است.

❖ **مخاطبان نشریه:**

- **پژوهشگران دانشگاه‌ها و مراکز تحقیقاتی علوم محیطی،**
- **کارشناسان سازمان منابع طبیعی و آبخیزداری کشور،**
- **مدیران ادارات منابع طبیعی و تولیدکنندگان نهال و کودهای میکروبی**

❖ **شما با مطالعه این نشریه با موارد زیر آشنا می‌شوید:**

- **تشخیص و بررسی وجود یا عدم وجود قارچ‌های میکوریزی همزیست آربوسکولار بومی با گونه بادام وحشی**
- **معرفی روش آزمون شده استخراج و تکثیر ژنوم قارچ‌های همزیست با ریشه بادام وحشی**
- **معرفی روش PCR آشیانه‌ای و نشانگرهای مولکولی اختصاصی برای تکثیر ژن قارچ‌های میکوریزی آربوسکولار**

این طرح با پشتیبانی اعتباری بنیاد علم ایران و همکاری سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، به‌ویژه پژوهشکده زیست‌فناوری و آزمایشگاه زیست‌فناوری محیطی و ایمنی زیستی آن سازمان انجام شده است.

فهرست

چکیده..... ۱
همزیستی قارچ‌های میکوریزی آربوسکولار با ریشه درختان ۲
روش مولکولی استخراج و تکثیر ژنوم قارچ‌های میکوریزی آربوسکولار در ریشه ۵
درخت بادام وحشی و اهمیت آن در جنگل‌های زاگرس..... ۶
ریزوسفر و ریز ریشه‌های درخت بادام وحشی..... ۷
ضرورت و جنبه نوآوری ۸
روش مطالعه قارچ‌های میکوریزی درون ریشه درختان ۹
نمونه‌برداری از ریشه گونه درختی بادام وحشی ۱۰
آماده‌سازی مواد اولیه و ریشه‌ها..... ۱۱
استخراج DNA از نمونه‌های ریشه بادام وحشی ۱۲
ارزیابی DNA استخراج‌شده با ژل آگاروز ۱۴
واکنش زنجیره‌ای پلیمراز آشیانه‌ای (Nested-PCR)..... ۱۴
مرحله اول واکنش PCR..... ۱۶
مرحله دوم واکنشPCR..... ۱۸
نتایج ۱۸
نتیجه‌گیری..... ۱۹
سپاسگزاری..... ۲۱
منابع ۲۲

چکیده

قارچ‌های میکوریز آربوسکولار ((Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) با بهبود جذب آب و مواد مغذی، نقش مهمی در افزایش تحمل گیاهان به تنش‌های محیطی و استقرار موفق آنها در مناطق خشک و نیمه‌خشک ایفا می‌کنند. از این‌رو، شناسایی دقیق همزیستی AMF با ریشه درختان جنگلی، برای مدیریت کارآمد منابع طبیعی ضروریست. در این بین، گونه بادام وحشی (*Amygdalus arabica* Olive.) به دلیل مقاومت به خشکی، گونه‌ای ارزشمند برای احیای جنگل‌های منطقه زاگرس است. با این حال، میزان پایین استقرار و بقای نهال‌های آن یک چالش محسوب می‌شود. در این راستا، به منظور شناسایی دقیق همزیستی AMF با ریشه بادام وحشی و ارائه یک روش‌شناسی با قابلیت تعمیم برای سایر گونه‌های درختی جنگلی، این پژوهش انجام شد. برای این منظور، نمونه‌های ریشه بادام وحشی از جنگل‌های منطقه کره‌بس در استان چهارمحال و بختیاری جمع‌آوری و برای استخراج ژنوم DNA به آزمایشگاه منتقل شدند. در این پژوهش، نوع همزیستی قارچ‌های موجود در ریشه بادام وحشی (آربوسکولار بودن) و روش شناسایی آنها با استفاده از نشانگرهای مولکولی بررسی شد. بدین منظور، از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز آشیانه‌ای (Nested PCR) و نشانگرهای اختصاصی AMF استفاده شد. این پژوهش با توجه به استفاده از نشانگرهای اختصاصی، همزیستی AMF با ریشه درخت بادام وحشی را تأیید کرد. این نتایج نه تنها وجود این همزیستی را اثبات می‌کند، بلکه می‌تواند به عنوان یک روش‌شناسی معتبر برای شناسایی AMF همزیست با سایر گونه‌های جنگلی نیز مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: بادام وحشی، همزیستی قارچ و ریشه، PCR آشیانه‌ای، نشانگر مولکولی، استرس‌های محیطی

همزیستی قارچ‌های میکوریزی آربوسکولار با ریشه درختان

قارچ‌های میکوریزایی، گونه‌های مختلف قارچی و همزیست با ریشه گیاهان بیش از ۸۰ درصد گونه‌های گیاهی هستند. سابقه این همزیستی به حدود ۴۶۰ میلیون سال پیش برمی‌گردد و نقش مهمی در استقرار گیاهان خشکی‌زی از دریا به روی زمین داشته است (Atala *et al*., 2023). قارچ‌های میکوریزی آربوسکولار به عنوان یک شاخه مجزا از قارچ‌ها، گلومرومیکوتا (Glomeromycota) نامیده می‌شوند. این قارچ‌ها عمدتاً در خاک و ریزوسفر (Rhizosphere) گیاهان یافت می‌شوند و با ایجاد همزیستی اندومیکوریزی با گیاهان، اندام‌هایی مانند آربوسکول، وزیکول و اسپور تولید می‌کنند. شایع‌ترین انواع این قارچ‌ها، میکوریزا آربوسکولارها (AMF) هستند (Bhupenchandra *et al*., 2024). گیاهان اولیه خود را با گروهی قدیمی از قارچ‌های گلومرومیکوتا یا قارچ‌های میکوریزا آربوسکولار کلونیزه می‌کردند، زیرا همزیستی قارچ با گیاه، سازوکار سودمندانه برد-بردی است که گیاه، کربن قارچ را تأمین می‌کند و قارچ‌ها به گیاه در جذب فسفات و دیگر مواد معدنی از خاک کمک می‌کنند (پوریوسف و همکاران، ۱۳۹۷). نتیجه این همزیستی، افزایش زیست‌توده گیاهی و مقاومت گیاه به تنش‌ها و عوامل بیماری‌زا است. قارچ‌های میکوریزی با ایجاد همزیستی با ریشه گیاهان، به جذب مواد غذایی و آب از خاک (شکل ۱) و افزایش مقاومت گیاه در برابر تنش‌های محیطی کمک می‌کنند (Bonfante and Genre, 2010; Bhupenchandra *et al*., 2024; Chaudhary *et al*., 2025). اخیراً، توجه پژوهشگران به نقش میکروارگانیسم‌های خاک در افزایش مقاومت گیاهان به تنش‌های محیطی، به‌ویژه خشکی، جلب شده است. در این میان، قارچ‌های میکوریزی آربوسکولار نقش بسیار مهمی در کاهش اثرهای خشکی بر گیاهان ایفا می‌کنند. این قارچ‌ها با افزایش جذب آب و مواد مغذی، بهبود فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و اصلاح محیط ریشه، مقاومت گیاهان را در برابر تنش خشکی افزایش می‌دهند (Tarazona *et al*.,

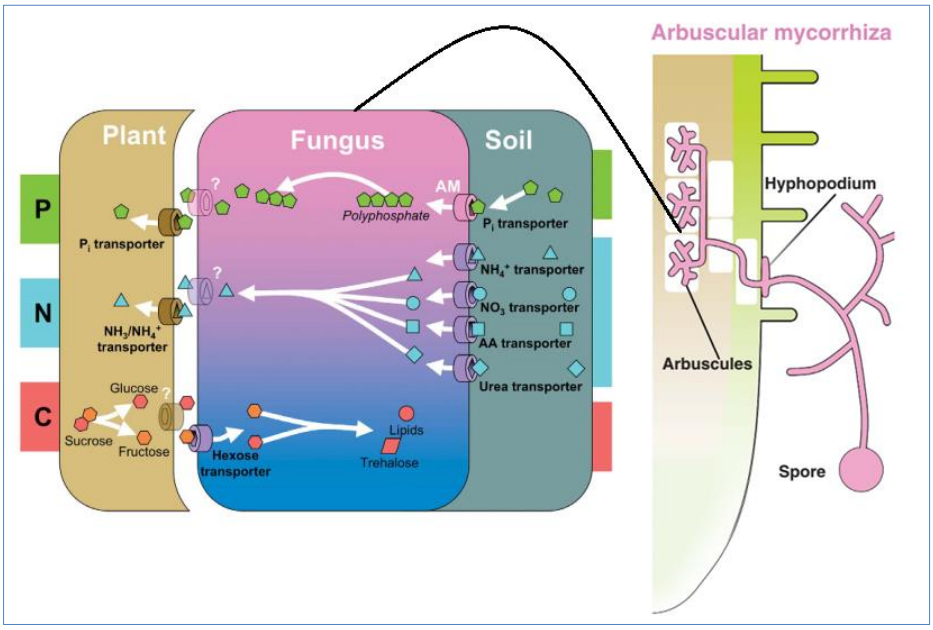
2011). این قارچ‌ها با گسترش شبکه هیفی خود در خاک به گیاه کمک می‌کنند تا شرایط نامساعد محیطی را بهتر تحمل کند.

یکی از دلایل اصلی شکست پروژه‌های جنگل‌کاری، عدم تشکیل همزیستی میکوریزی بین نهال‌ها و قارچ‌های خاک پس از کاشت است (Johnson *et al*., 1991). قارچ‌های میکوریزی آربوسکولار بومی با ایجاد همزیستی با گیاهان، علاوه بر تأمین مواد غذایی مورد نیاز آنها، مقاومت گیاهان را در برابر تنش‌های محیطی مانند خشکی افزایش داده و به بهبود و بازسازی زیست‌بوم‌های جنگلی تخریب‌شده کمک می‌کنند (Atala *et al*., 2023). نتایج مطالعات Atala و همکاران (۲۰۲۳) نشان می‌دهد که قارچ‌های میکوریزی بومی می‌توانند تناسب گیاهان با شرایط محیطی و شاخص‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی آنها را پس از وقوع اختلالاتی مانند آتش‌سوزی بهبود ببخشند. بنابراین، استفاده از این قارچ‌ها در برنامه‌های احیای گونه‌های بومی در زیست‌بوم‌های مدیترانه‌ای بسیار مهم است. شبکه هیفی تولید شده توسط قارچ‌های میکوریزی می‌تواند به رشد و مقاومت درختان کمک کرده و در نهال‌کاری مورد استفاده قرار گیرد. این میکروارگانیسم‌های مفید به دلیل نقش مؤثر، پویا و بی‌ضرر خود به عنوان کود زیستی در نهالستان‌های جنگلی و اراضی کشاورزی مورد استفاده قرار می‌گیرند. بنابراین، با توجه به اهمیت قارچ‌های میکوریزی آربوسکولار در رشد و مقاومت نهال‌ها، استفاده از آنها برای موفقیت جنگل‌کاری‌ها ضروریست (Caravaca *et al*., 2003).

یکی از دلایل تحمل درختچه بادام به خشکی، می‌تواند همزیستی آن با قارچ‌های میکوریزی آربوسکولار باشد. وجود قارچ‌های میکوریزی در بادام وحشی می‌تواند نقش مهمی در سازگاری این گیاه با شرایط محیطی سخت داشته باشد (Kalamulla *et al*., 2024; Li *et al*., 2025). در مناطق رویشی زاگرس، بسیاری از گونه‌های درختی و درختچه‌ای با مشکلاتی مانند کاهش زادآوری و عدم استقرار مناسب روبرو هستند.

در مطالعات گذشته با روش رنگ‌آمیزی و مطالعه ریختی در زیر میکروسکوپ، همزیستی قارچ‌های میکوریزی در ریشه بادام را مشاهده کرده‌اند (جعفریان و همکاران، ۱۳۹۷). اما یکی از چالش‌های پژوهش‌های میکوریزی، ارائه روش شناسایی دقیق آن است.

هدف این پژوهش، این بود که مشخص کند آیا در زیست‌بوم مورد مطالعه کلونیزه شدن قارچی وجود دارد؟ و در صورت وجود آیا نوع آربوسکولار با ریشه بادام وحشی همزیست است؟ و می‌توان روش کارآمد و بهینه شده‌ای برای مطالعه مولکولی انواع میکوریزی آربوسکولار را در ریشه بادام وحشی با نشانگرهای مولکولی مورد بررسی قرار داد. زیرا با این تکنیک‌ها می‌توان با اطمینان بالا به همزیستی قارچ‌های میکوریزی با ریشه این گیاه پی برد (Manga *et al.*, 2025).



شکل ۱) نحوه ارتباط و تبادل مواد معدنی و آلی بین قارچ‌های میکوریزی آربوسکولار و ریشه گیاهان (اقتباس شده از مقاله Bonfante and Genre, 2010)

روش مولکولی استخراج و تکثیر ژنوم قارچ‌های میکوریزی آربوسکولار در ریشه

تاکنون، مطالعات متعددی در ایران، همزیستی قارچ‌های میکوریزی آربوسکولار را در ریشه گونه‌های گیاهی مختلف، با استفاده از روش‌های رنگ‌آمیزی ریشه، گزارش کرده‌اند (آرمند و همکاران، ۱۳۹۷؛ جعفریان و همکاران، ۱۳۹۷؛ پوریوسف و همکاران، ۱۳۹۷). این پژوهش‌ها، عمدتاً بر مشاهدات میکروسکوپی اندام‌های قارچی مانند هیف، وزیکول و آربسکول مبتنی بوده‌اند. با این حال، مشاهده آربسکول در بسیاری از موارد دشوار است و اغلب به آسانی انجام نمی‌شود (جعفریان و همکاران، ۱۳۹۷).

شایان ذکر است که تاکنون، هیچ گزارشی از به‌کارگیری روش‌های مولکولی پیشرفته برای بررسی دقیق آربوسکولار بودن قارچ‌های درون‌زی در ریشه گونه‌های درختچه‌ای مهم مانند بادام وحشی منتشر نشده است. این در حالی است که روش‌های مولکولی و استفاده از نشانگرهای اختصاصی، امکان تشخیص دقیق همزیستی قارچ‌های میکوریزی آربوسکولار را با اطمینان بالا فراهم می‌کنند (Matinizadeh *et al*., 2024; Manga *et al*., 2025). بنابراین، این پژوهش نحوه مطالعه قارچ‌های میکوریزی آربوسکولار همزیست با ریشه بادام وحشی، با استفاده از روش‌های پیشرفته مولکولی مانند PCR آشیانه‌ای را مورد بررسی قرار داده است (Dong & Zhao, 2006; Mueller *et al*., 2016). برای انجام مطالعات مولکولی، به مقدار کافی DNA ژنومی نیاز است. با توجه به اینکه قارچ‌های میکوریزی آربوسکولار به صورت اجباری درون ریشه گیاهان زندگی می‌کنند، استخراج DNA این قارچ‌ها از ریشه با چالش‌هایی همراه است (Hamelin *et al*., 1996). محققان برای غلبه بر این مشکل از آغازگرهای عمومی و اختصاصی برای تکثیر بخش‌هایی از ژنوم این قارچ‌ها، ازجمله نواحی ITS، SSU و LSU در DNA ریبوزمی استفاده کرده‌اند (Lord *et al*., 2002؛ Mueller *et al*., 2016). بنابراین، هدف از این پژوهش بررسی و معرفی نحوه مطالعه مولکولی این قارچ‌ها در ریشه درختچه بادام وحشی است و اینکه آیا قارچ‌های تلقیح شده به ریشه بادام از نوع آربوسکولار است یا خیر.

درخت بادام وحشی و اهمیت آن در جنگل‌های زاگرس

بادام وحشی (وامچک) (Amygdalus arabica Olive.)، به عنوان یکی از گونه‌های بومی و ارزشمند درختچه‌ای در زاگرس (شکل ۲)، از اهمیت اکولوژیکی و اقتصادی بالایی برخوردار است. این گونه یکی از رستنی‌های ارزشمند ایران است که در بخش کوهستانی منطقه ایران – تورانی در مرکز، شرق و غرب ایران پراکندگی دارد. این گونه با دامنه تحمل گسترده نسبت به شرایط محیطی، ظرفیت بالایی برای احیاء و توسعه جنگل‌های زاگرس دارد (شریف‌پورلاتونی و همکاران، ۱۳۹۴). مطالعات پیشین نشان داده‌اند که بادام وحشی به دلیل دارا بودن خواص دارویی، صنعتی و غذایی، علاوه بر نقش مؤثر در کنترل فرسایش خاک، از لحاظ اقتصادی نیز حائز اهمیت است (حقیقیان و جهانبازی، ۱۳۹۶). تحقیقات انجام شده در منطقه کره‌بس استان چهارمحال و بختیاری حکایت از آن دارد که جهت جغرافیایی، تأثیر قابل توجهی بر توزیع و رشد بادام وحشی دارد.

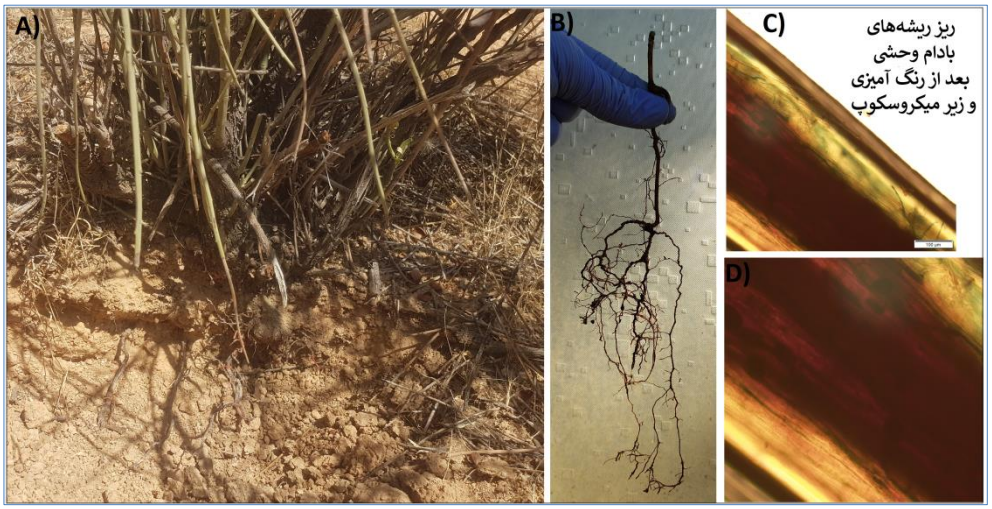
نتایج این مطالعات نشان می‌دهد که رویشگاه‌های شمالی به دلیل شرایط آب و هوایی مناسب‌تر، زیستگاه مطلوب‌تری برای این گونه فراهم می‌کنند (Jahanbazi Goujani و همکاران، ۲۰۱۴). همچنین، بادام وحشی مقاومت بالاتری نسبت به شوری و خشکی در مقایسه با سایر گونه‌های بادام از خود نشان می‌دهد (حقیقیان و جهانبازی، ۱۳۹۶). درخت بادام وحشی به دلیل ریشه قوی و عمیق خود، گزینه مناسبی برای کاشت در مناطقی است که با مشکل کم‌آبی و فرسایش خاک مواجه هستند. با توجه به ویژگی‌های منحصر به فرد بادام وحشی مانند مقاومت به خشکی، شوری و سرما، احتمالاً وجود قارچ‌های میکوریزی در اطراف ریشه این گیاه (ریزوسفر) نقش مهمی در سازگاری آن با شرایط محیطی سخت ایفا می‌کند. ازاین‌رو، هدف از این پژوهش، بررسی وجود قارچ‌های میکوریزی همزیست آربوسکولار در ریشه بادام وحشی با استفاده از نشانگرهای اختصاصی مولکولی این قارچ‌هاست.

شکل ۲) گونه درختچه‌ای بادام وحشی در رویشگاه کره‌بس استان چهارمحال بختیاری

ریزوسفر و ریز ریشه‌های درخت بادام وحشی

ریشه بادام وحشی تا عمق زیادی در خاک فرو می‌رود تا به منابع آب زیرزمینی دسترسی پیدا کند. این ویژگی به درخت کمک می‌کند تا در شرایط خشکسالی مقاومت کند (حقیقیان و جهانبازی، ۱۳۹۶). ریشه درختان بادام وحشی به صورت گسترده در اطراف درخت پخش می‌شود (شکل A۳) و به آن کمک می‌کند تا مواد مغذی بیشتری از خاک جذب کند. ریشه این درخت با گسترش در خاک و با جذب مواد مغذی از خاک و انتقال آن به درخت، ضمن تأمین نیازهای درخت، با ایجاد تعاملات با خاک و موجودات میکروسکوپی به غنی شدن خاک و به تثبیت و کاهش فرسایش آن کمک می‌کند (جعفریان و همکاران، ۱۳۹۷). ریشه این درختان

در برابر آفات و بیماری‌ها بسیار مقاوم است و به همین دلیل می‌تواند عمر طولانی داشته باشد. همچنین ریشه‌های بسیار محکم و قوی آن به درخت کمک می‌کند تا در برابر باد مقاومت نشان دهد. از سوی دیگر، مشاهدات آزمایشگاهی در این پژوهش نشان داد که ریز ریشه‌های این درخت با توجه به اینکه دارای رنگ زیاد و قهوه‌ای است برای رنگ‌آمیزی و رنگ‌بری آن با اسید بسیار مشکل است (شکل ۳C-D) و استخراج ژنوم قارچ‌های همزیست با آن نیز مشکل می‌باشد.



شکل ۳) نمونه‌برداری از ریزوسفر

(A)، نمونه ریشه (B) و ریز ریشه‌های بادام وحشی در زیر میکروسکوپ (**C** و **D**)

ضرورت و جنبه نوآوری

از آنجا که در بوم‌نظام جنگلی و مرتعی سازگاری گیاهان و درختان به شرایط محیطی بسیار مهم است. ازاین‌رو، پی بردن به رابطه این گیاهان با قارچ‌های میکوریزی آربوسکولار که از میکروارگانیسم‌های مفید در کاهش اثرهای خشکی بر گیاهان مؤثر هستند، بسیار ضروریست.

تحقیقات گذشته در ایران برای نشان دادن همزیستی قارچ‌ها با ریشه گیاهان بیشتر معطوف به مشاهدات اندام‌های قارچی در ریشه آنها با استفاده از روش‌های رنگ‌آمیزی ریشه و مشاهده اندام‌های قارچی در زیر میکروسکوپ بوده است. ازاین‌رو، بررسی دقیق همزیستی این قارچ‌ها با روش‌های مولکولی و نشانگرهای اختصاصی بسیار ضروری و ارزشمند است. از آنجایی که ماهیت ساختاری ریشه بر کیفیت استخراج ژنوم گیاهی و ژنوم قارچ‌های همزیست تأثیرگذار است و برای تکثیر موفقیت‌آمیز ژن‌های هدف قارچ‌های همزیست، راهبرد خاص و اختصاصی بهینه شده لازم است، بنابراین با توجه به عدم وجود گزارش قبلی، این گزارش فنی به دنبال معرفی روش مولکولی PCR کارآمد بررسی قارچ‌های همزیست اندومیکوریزی و نحوه مطالعه و تشخیص این قارچ‌ها در ریشه بادام وحشی با روش مولکولی است.

روش مطالعه قارچ‌های میکوریزی درون ریشه درختان

مطالعات مولکولی نقش حیاتی و بسیار مهمی در شناسایی دقیق میکروارگانیسم‌ها، ازجمله قارچ‌ها، ایفا می‌کنند (Wang *et al*., 2025). انجام این بررسی‌های ژنتیکی، نیازمند دسترسی به آزمایشگاه‌هایی با تجهیزات پیشرفته و روش‌های دقیق و جدید توالی‌یابی نوکلئوتیدی مولکول‌های DNA و RNA است (Jobim *et al*., 2019). با این حال، مطالعه قارچ‌های میکوریزی درون ریشه گیاهان، با چالش‌هایی روبروست؛ زیرا استخراج ژنوم آنها همزمان با ژنوم گیاه انجام می‌شود و این موضوع، تفاوت‌هایی را در روش مطالعه آنها نسبت به سایر میکروارگانیسم‌ها ایجاد می‌کند. برای رفع این مشکلات و تفاوت‌ها، محققان برای مطالعه قارچ‌های میکوریزی آربوسکولار از روش‌های مختلفی بهره گرفته‌اند. با توجه به تنوع بالای این قارچ‌ها، نشانگرهای مولکولی متعددی معرفی و مورد استفاده قرار گرفته‌اند.

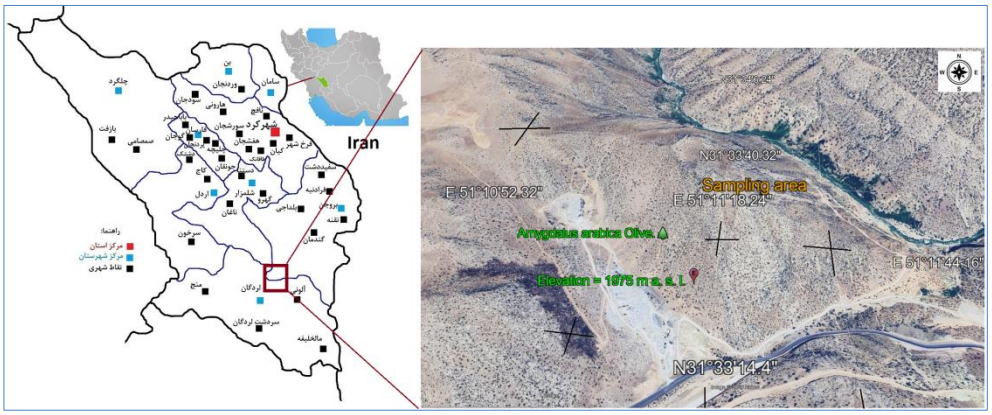
در این مطالعه، از روش تکثیر آشیانه‌ای (Nested PCR) با استفاده از نشانگرهای عمومی و اختصاصی قارچ‌های میکوریزی آربوسکولار استفاده شد و نتایج مورد نظر به دست آمد.

مراحل مطالعه مولکولی قارچ‌های میکوریزی آربوسکولار درون ریشه بادام وحشی به شرح زیر است:

- ✓ نمونه‌برداری ریز ریشه‌ها از محیط (ریشه گیاهان)؛
- ✓ استخراج ژنوم و اسید نوکلئیک (با کیت‌های اختصاصی)؛
- ✓ استفاده از PCR آشیانه‌ای یا چند مرحله‌ای با آغازگرهای عمومی و اختصاصی قارچ‌های میکوریزی.

نمونه‌برداری از ریشه گونه درختی بادام وحشی

در این پژوهش، برای بررسی همزیستی میکوریزی آربوسکولار، گونه‌های درختی بادام وحشی از جنگل‌های زاگرس در منطقه کره‌بس انتخاب و نمونه‌برداری شدند. منطقه کره‌بس در جنوب‌غربی استان چهارمحال بختیاری و در شهرستان لردگان قرار دارد (شکل ۴) و به دلیل پوشش گیاهی غنی، به‌ویژه وجود گونه‌های جنگلی زاگرسی، از اهمیت اکولوژیکی بالایی برخوردار است. ارتفاع از سطح دریا در این مناطق بین ۱۸۵۰ تا ۱۹۵۰ متر و جهت دامنه شمال‌غربی بود. برای نمونه‌برداری از ریشه‌های بادام وحشی، ۱۵ پایه با خصوصیات مورفولوژیک یکسان از سه منطقه (هر منطقه ۵ پایه با فواصل میانگین ۲۰۰ متر)، با فاصله تقریبی ۲ کیلومتر از یکدیگر، انتخاب شدند. از این پایه‌ها، ریشه‌هایی با قطر حدود ۱ میلی‌متر، از نقاط مختلف برداشت گردید. نمونه‌های ریشه پس از پاکسازی اولیه از خاک، در کیسه‌های نایلونی داخل یخدان به آزمایشگاه منتقل و بعد برای نگهداری طولانی‌مدت، در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.



شکل ۴) موقعیت محدوده مورد مطالعه در استان چهارمحال بختیاری

آماده‌سازی مواد اولیه و ریشه‌ها

مشاهدات آزمایشگاهی نشان داد که ریز ریشه‌های این درخت با توجه به اینکه دارای رنگ زیاد و قهوه‌ای است برای رنگ‌آمیزی و رنگ‌بری آن با اسید بسیار مشکل است (شکل ۲ C-D). برای آماده‌سازی نمونه‌ها، ریشه‌های گیاهی ابتدا با آب مقطر به دقت شستشو داده شدند تا هرگونه آلودگی سطحی و ذرات خاک حذف گردد.

سپس، قطعات کوچکی از ریشه (حدود ۵۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم وزن تر) از بخش‌هایی که بیشترین آلودگی قارچی ظاهری را داشتند، انتخاب شدند. به منظور پودر کردن ریشه‌ها، هاون‌ها و دسته هاون‌ها پس از شستشوی کامل با آب مقطر، در آون با دمای ۲۰۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت استریل گردیدند. در ادامه، تیوب‌های میکروفیوژ، هاون و دسته هاون در نیتروژن مایع کاملاً سرد شدند.

استخراج DNA از نمونه‌های ریشه بادام وحشی

استخراج ژنوم قارچ‌های همزیست با گیاه با چالش‌هایی مواجه است. در این مرحله، به منظور بهینه‌سازی روش مناسب برای استخراج DNA از روش‌های مختلف، ازجمله روش دستی CTAB و کیت تجاری محصول شرکت MBST (Molecular Biological System Transfer) واقع در شهر تهران (کشور ایران) استفاده شد. در این بین کیت MBST دارای بهترین عملکرد برای استخراج DNA بود که فرایند آن در زیر تشریح می‌شود.

توجه: پیش از شروع فرایند استخراج ژنوم، تمام وسایل مورد نیاز شامل تیوب‌ها، سرسمپلرها (تیپ‌ها) و ظروف شیشه‌ای کاملاً استریل شدند.

استخراج DNA طی مراحل زیر انجام گردید.

- ✓ وزن کردن نمونه‌های ریشه آماده شده به اندازه ۵۰ میلی‌گرم؛
- ✓ پودر کردن ریز ریشه‌ها با ازت مایع و انتقال به ویال ۲ میلی‌لیتری؛
- ✓ مقدار ۶۰۰ µl از بافر لیز یا بافر استخراج (lysis buffer) به نمونه‌ها اضافه شد؛
- ✓ سپس ۲۰ µl آنزیم پروتیئاز k اضافه شد؛
- ✓ ویال‌های حاوی مواد، با استفاده از دستگاه ورتکس به مدت کوتاهی (تقریباً ۱۰تا ۱۵ ثانیه) و با سرعت بالا تکان داده شدند تا محتویات درون هر ویال به‌طور کامل مخلوط گردد؛
- ✓ سپس نمونه‌ها به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سلسیوس در داخل هیتربلاک قرار داده شدند؛
- ✓ ویال به مدت ۱۰ دقیقه با دور xg ۸۰۰۰ سانتریفوژ شد؛
- ✓ بخش بالایی (سوپرناتانت) به لوله‌های ۱/۵ میلی‌لیتری انتقال پیدا کرد؛
- ✓ سپس ۵۸۰µl باندینگ بافر (binding buffer) اضافه شد و محتویات ویال‌ها با

استفاده از دستگاه ورتکس، به مدت ۱۰ تا ۱۵ ثانیه و با سرعت بالا به‌طور کامل مخلوط شدند؛

- ✓ نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سلسیوس در داخل هیتربلاک قرار داده شدند؛
- ✓ ویال‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۸۰۰۰ xg سانتریفوژ شدند؛
- ✓ بخش رویی (سوپرناتانت) به ستون A انتقال داده شد و دو مرتبه و هر بار به مدت ۴ دقیقه با دور ۸۰۰۰ xg سانتریفوژ گردید و بعد ستون‌ها حذف شدند؛
- ✓ در این مرحله، ۴۴۰µl اتانل ۱۰۰ درصد اضافه و مخلوط شد؛
- ✓ در این مرحله، ژنوم استخراج شده با ستون B فیلتر شد و به‌مدت ۱ دقیقه با دور ۸۰۰۰ xg سانتریفوژ گردید؛
- ✓ سپس، ستون B با ۵۰۰ میکرولیتر محلول شستشوی ژنوم (wash buffer) شستشو داده شد. در ادامه، به مدت ۱ دقیقه با دور ۸۰۰۰xg سانتریفوژ شد؛
- ✓ مرحله ۱۵ با ویال جدید تکرار شد؛
- ✓ در این مرحله، نمونه‌ها به مدت ۲ دقیقه با دور تند (full speed) سانتریفوژ شدند؛
- ✓ ستون B در ویال‌های جدید قرار داده شدند. همزمان الوشن بافر (Elution buffer) در دمای ۷۰ درجه سلسیوس قرار داده شد؛
- ✓ در این مرحله، ۵۰µl الوشن بافر روی ستون B ریخته شد و به‌مدت ۳ دقیقه در دمای اتاق (۲۵ درجه سانتی‌گراد) نگهداری گردید؛
- ✓ به مدت ۱ دقیقه با دور ۸۰۰۰ xg سانتریفوژ انجام شد؛
- ✓ محصول حاصل از مرحله ۲۰، دوباره طبق مرحله ۱۹ روی ستون B افزوده شد و به‌مدت ۱ دقیقه با دور ۸۰۰۰ xg سانتریفوژ گردید؛
- ✓ ژنوم استخراج شده برای کمیت و کیفیت سنجی در فریزر ۲۰- قرار داده شد.

ارزیابی DNA استخراج‌شده با ژل آگاروز

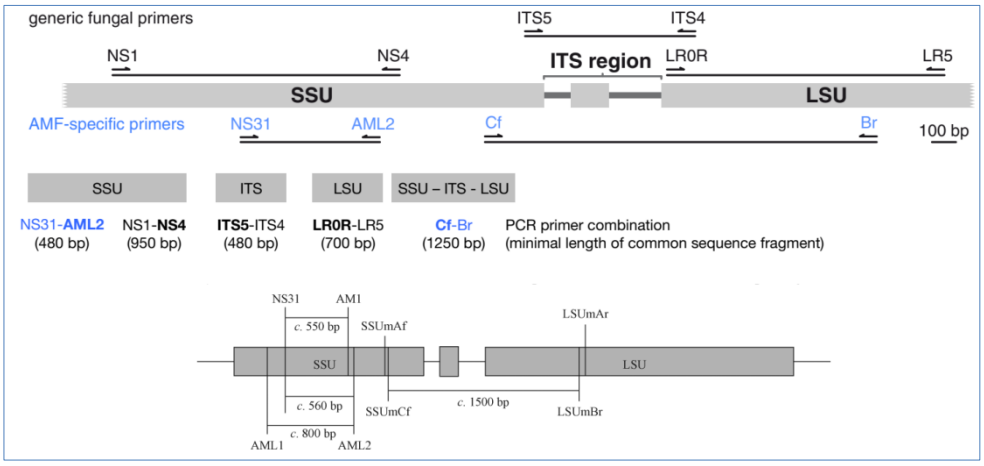
برای تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج‌شده، از روش الکتروفورز درون ژل آگارز (۱ درصد) استفاده شد. به این منظور، ۵ میکرولیتر از نمونه‌های DNA به همراه یک میکرولیتر محلول بافر بارگذاری (Loading Buffer 6X) مخلوط شده و بعد این مخلوط درون چاهک‌های ژل آگارز ۱ درصد بارگذاری و فرایند الکتروفورز انجام شد.

در نهایت، تنها DNA استخراج‌شده‌ای انتخاب شد که بدون شکستگی بود و حداقل میزان آلودگی با پروتئین، کربوهیدرات و RNA را داشت. این DNA با تشکیل یک باند پررنگ و مشخص روی ژل آگارز قابل تشخیص بود. در صورتی که کیفیت DNA نامناسب تشخیص داده می‌شد، فرایند استخراج DNA از نمونه‌های مربوطه تکرار شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز آشیانه‌ای (Nested-PCR)

برای تکثیر ژن ریبوزومی (rRNA) که شامل ژن‌های کدشونده S18 است، از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و مجموعه‌ای از آغازگرها و واکنش‌های متعدد استفاده شده است. براساس تجارب قبل ما و مرور منابع جدید، چند مجموعه آغازگر طراحی و واکنش تکثیری زنجیره‌ای اجرا شد که براساس نتایج حاصل و با هدف جلوگیری از آلودگی‌های جانبی، کاهش اثر مواد بازدارنده و اختصاصی‌تر کردن واکنش، روش تکثیر آشیانه‌ای منتخب شد.

در این پژوهش، از دو واکنش تکثیر پی در پی و دو مجموعه پرایمر اختصاصی به‌طور خاص ناحیه ژنومی زیرواحد کوچک (SSU) به‌عنوان هدف تکثیر استفاده شد. به‌طوری‌که این ناحیه به دلیل اختصاصی بودن آن برای مطالعه قارچ‌های میکوریزی آربوسکولار، انتخاب شده است (شکل ۵).



شکل ۵) منطقه DNA ریبوزومی

شامل ژنوم زیرواحد کوچک (SSU) و محل اتصال آغازگرها به ژن‌های AMF

(اقتباس از Schlaeppi ***et al.*, 2016**)

بدین ترتیب که از جفت آغازگرهای NS1 و NS4 در مرحله اول و جفت آغازگرهای AML1 و AML2 در مرحله دوم PCR برای تکثیر منطقه SSU rRNA استفاده شد.

آغازگرهای عمومی‌تر قارچ‌های میکوریز آربوسکولار شامل: NS1 (5´-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3´) و NS4 (5´-GTTCCGTCAATTCC TTTAAG-3´) برای تکثیر قطعه‌ای به طول ۱۲۰۰ bp و جفت آغازگرهای اختصاصی برای قارچ‌های میکوریزی آربوسکولار شامل AML1 (5´-ATCAACTTTCGATGGTAGGATAGA-3´) و AML2 (5´-GAACCCAAACACTTTGGTTTCC-3´) در مرحله دوم PCR، برای تکثیر قطعه‌ای به طول ۸۰۰ bp استفاده شدند (پوریوسف و همکاران، ۱۳۹۷؛ Zhao *et al.*, 2025).

در این پژوهش، به‌طور خاص از ناحیه ژنومی زیرواحد کوچک (SSU) استفاده شد؛ این ناحیه به دلیل اختصاصی بودن آن برای مطالعه قارچ‌های میکوریزی آربوسکولار، انتخاب شده است (شکل ۵). برای آماده‌سازی واکنش PCR، ابتدا مخلوطی از آب دو بار تقطیر، مستر

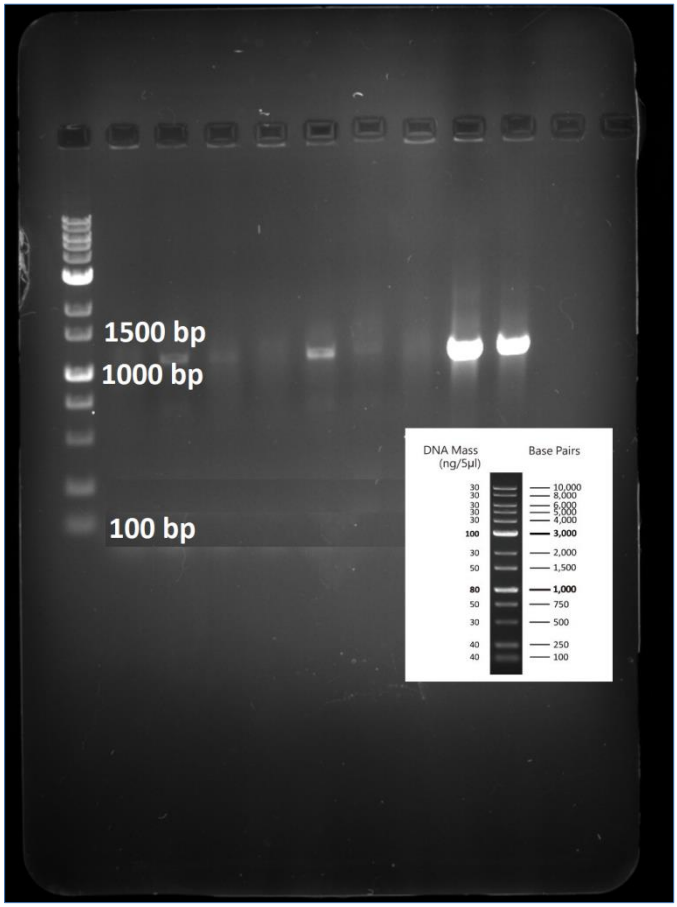
میکس و جفت آغازگر تهیه شد. سپس، ۱۹ میکرولیتر از این مخلوط به هر چاهک پلیت PCR منتقل گردید و در نهایت، ۱ میکرولیتر از نمونه DNA به هر چاهک اضافه شد (Lisek et *al*., 2011). به‌منظور کاهش تبخیر محتویات محصول PCR در دستگاه، در هنگام تکثیر از روغن مخصوص استفاده شد.

مرحله اول واکنش PCR

برای آماده‌سازی آغازگرهای پیش‌انتخابی، ابتدا ۱۰ میکرولیتر از محلول‌های ذخیره هر آغازگر با غلظت ۱۰۰ پیکومول در میکرولیتر (pmol/µl) برداشته شد و ۹۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر به آن اضافه گردید تا رقت نهایی ۱:۱۰ و غلظت ۱۰ پیکومول در میکرولیتر (۱۰ pmol/µl) حاصل شود. در مرحله تکثیر پیش‌انتخابی (pre-amplification)، آغازگرهای مورد استفاده که در انتهای '۳ دارای یک نوکلئوتید اضافی بودند، برای غنی‌سازی و آماده‌سازی الگوهای DNA مناسب برای مرحله تکثیر انتخابی (selective amplification) استفاده شدند.

پیش از آغاز این مرحله، نمونه‌های DNA متصل‌شده از مرحله قبل، به نسبت ۱:۱۰ رقیق گردیدند. برای انجام واکنش PCR اولیه (pre-amplification PCR)، اجزای زیر به ازای هر واکنش ترکیب شدند: ۱ میکرولیتر DNA رقیق‌شده از مرحله قبل (به نسبت ۱:۱۰۰ یا ۱:۱۰، با توجه به غلظت اولیه DNA) به‌عنوان الگو، ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس PCR (PCR Master mix 2X)، ۸ میکرولیتر آب دی‌یونیزه و ۱ میکرولیتر از هریک از آغازگرهای NS1 و NS4 (با غلظت ۱۰ پیکومول در میکرولیتر). مخلوط واکنش پس از آماده‌سازی، برای تکثیر در دستگاه PCR قرار داده شد. برای تأیید موفقیت‌آمیز بودن واکنش و بررسی محصول تکثیر، ۵ میکرولیتر از محصول PCR به همراه ۱ میکرولیتر بافر بارگذاری (Loading Buffer 6X آبی) در

چاهک‌های ژل آگارز ۱ درصد (تهیه‌شده با بافر TAE 6X) بارگذاری و بعد الکتروفورز تحت ولتاژ ثابت ۹۰ ولت به مدت ۴۰ دقیقه انجام گردید. مشاهده باند (هاله) واضح در اندازه تقریبی ۱۲۰۰ جفت باز (bp) تحت اشعه فرابنفش، به عنوان معیار موفقیت‌آمیز بودن تکثیر در این مرحله تلقی شد (شکل ۶).



شکل ۶) الگوی الکتروفورز

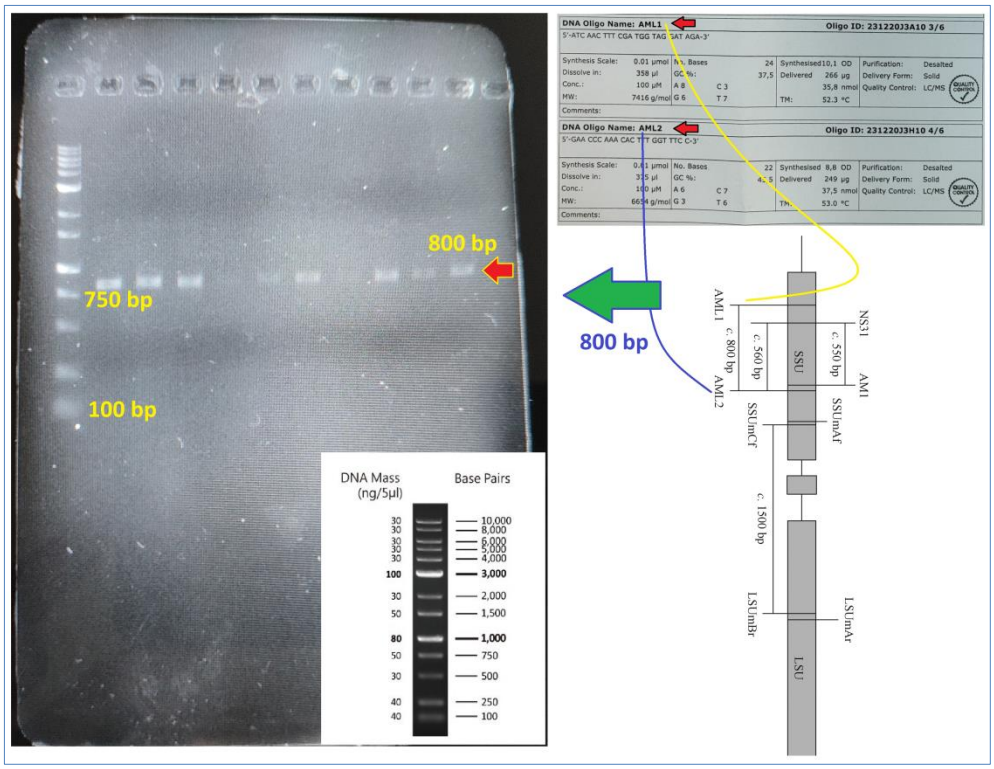
ژل آگارز ۱ درصد محصول واکنش **PCR** با آغازگرهای NS1 و **NS4**. باندهای **DNA** تکثیر یافته **AMF** با طول ۱۲۰۰ جفت باز مشاهده می‌شوند.

مرحله دوم واکنشPCR

قبل از آغاز این مرحله نمونه‌های اتصال شده مرحله قبل به نسبت ۱:۱۰ رقیق شدند. به‌منظور انجام PCR اولیه، ۱ میکرولیتر DNA رقیق‌شده از مرحله قبل (به نسبت ۱:۱۰۰) به عنوان الگو، ۱۰ میکرولیتر PCR Master mix 2X، ۸ میکرولیتر آب یون زدوده و ۱ میکرولیتر از هریک از آغازگرهای AML1 و AML2 با هم ترکیب شدند و حجم نهایی به ۲۰ میکرولیتر رسید. برای تأیید مراحل انجام واکنش، ۵ میکرولیتر از محصول تکثیر به همراه یک میکرولیتر رنگ (بافر بارگذاری آبی) در ژل آگارز (۱ درصد) در بافر TAE 1X تحت ولتاژ ثابت ۹۰ ولت به مدت ۴۰ دقیقه الکتروفورز شد. مشاهده هاله روی ژل تحت اشعه ماوراءبنفش به عنوان معیاری برای اجرای موفق روش تا این مرحله تلقی خواهد شد. در این مرحله قطعه‌ای به اندازه ۸۰۰ جفت باز (bp) تکثیر گردید.

نتایج

برای تکثیر قطعه کامل AML در ناحیه ژنومی زیرواحد کوچک (SSU)، از آغازگرهای اختصاصی AML1 و AML2 استفاده شد. محصول PCR حاصل، در ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز گردید. مشاهده باندی واضح به طول تقریبی ۸۰۰ جفت باز (bp) در موقعیت مورد انتظار بر روی ژل (شکل ۷)، تأییدکننده اولیه تکثیر موفقیت‌آمیز ناحیه ژنی هدف بود. این محدوده ژنی تکثیر شده، با توجه به اختصاصی بودن آغازگرهای طراحی‌شده، به‌طور مشخص در محدوده قارچ‌های میکوریزی آربوسکولار قرار داشت و شناسایی مولکولی آنها را امکان‌پذیر کرده است.



شکل ۷) الگوی الکتروفورز

ژل آگارز ۱ درصد محصول واکنش **PCR** با آغازگرهای اختصاصی AML1 و **AML2**. باندهای **DNA** تکثیریافته **AMF** با طول ۸۰۰ جفت باز مشاهده می‌شوند.

نتیجه‌گیری

این مطالعه با موفقیت، حضور قارچ‌های میکوریزی آربوسکولار را در ریشه بادام وحشی با استفاده از روش PCR آشیانه‌ای تأیید کرد. برای این منظور، از آغازگرهای اختصاصی AML1 و AML2 که ناحیه ۸۰۰ جفت بازی از ژنوم ریبوزومی زیرواحد کوچک AMF (SSU rDNA) را هدف قرار می‌دهند، استفاده شد. محصول PCR حاصل پس از الکتروفورز داخل ژل آگارز ۱ درصد و رنگ‌آمیزی با بافر بارگذاری مخصوص DNA، باندی واضح به طول ۸۰۰ جفت باز را

نشان داد که تأییدی بر تکثیر موفقیت‌آمیز ناحیه ژنی مورد نظر و وجود قارچ‌های میکوریزی آربوسکولار بود. شایان ذکر است با توجه به اختصاصی بودن آغازگرهای استفاده شده، این روش فقط قادر به شناسایی AMF (که نوعی اندومیکوریزا محسوب می‌شوند) است و برای شناسایی سایر انواع قارچ‌های میکوریزی مانند اکتومیکوریزاها کاربرد ندارد.

در راستای تکمیل این پژوهش، توالی‌یابی محصول PCR می‌تواند اطلاعات دقیقی در مورد شناسایی گونه‌ای این قارچ‌ها فراهم کند. در مجموع، این رویکرد امکان شناسایی دقیق AMF همزیست با ریشه‌های گونه‌های درختی جنگلی و گیاهان مرتعی را فراهم می‌سازد. این دستاورد می‌تواند برای تولیدکنندگان کودهای میکروبی از اهمیت بالایی برخوردار باشد، زیرا قابلیت شناسایی و تکثیر بهترین سویه‌های AMF همزیست با گونه‌های گیاهی مختلف را امکان‌پذیر می‌سازد و راه را برای تولید کودهای زیستی مؤثر بر مبنای الگوهای طبیعی هموار می‌نماید. بر همین اساس، پیشنهاد می‌شود:

- ✓ برای تولید انبوه، گونه‌های قارچی میکوریزی آربوسکولار همزیست با ریشه بادام وحشی باید توالی‌یابی و شناسایی شوند.
- ✓ وضعیت میکوریزی گونه‌های درختی دیگر در مناطق خشک و نیمه‌خشک با استفاده از این روش به‌طور دقیق مشخص و شناسایی سویه‌های قارچی غالب برای هر گونه درختی در دستور کار قرار گیرد.
- ✓ نتایج این تحقیقات در بخش‌های تحقیقاتی و آموزشی مربوط مورد استفاده و ترویج قرار گیرد.

سپاسگزاری

از همکاران محترم مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، به‌دلیل همکاری در بخش آزمایشگاهی تهیه مواد آزمایشگاهی، به‌ویژه آزمایشگاه بیولوژی خاک تشکر می‌شود.

همچنین بنیاد علم ایران به‌دلیل پشتیبانی اعتباری (شماره طرح: ۴۰۱۵۳۲۲) و سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، به‌ویژه پژوهشکده زیست فناوری و آزمایشگاه زیست فناوری محیطی و ایمنی زیستی آن سازمان که در انجام این پژوهش با ما همکاری شایسته‌ای داشتند، سپاسگزاری می‌شود.

منابع

آرمند، ن.، شیروانی، ا.، متینی‌زاده، م.، خوشنویس، م. ۱۳۹۷. تغییرات فصلی فراوانی قارچ‌های آربوسکولار محلب (*Cerasus mahaleb* L. Mill) و ارتباط آنها با فعالیت برخی آنزیم‌های ریزوسفر (مطالعه موردی: چهارطاق اردل). مجله جنگل ایران، دوره: ۱۰، شماره: ۱، ص: ۱-۱۲.

پوریوسف، ح.، همت، ج.، واعظ، م. ۱۳۹۷. مقایسه روش‌های مولکولی و ریخت‌شناسی در مطالعه همزیستی قارچ‌های میکوریزی آربوسکولار گیاه زعفران (*Crocus sativus* L.)، زیست‌شناسی میکروبی، دوره: ۷، شماره: ۲۶، ص: ۱-۱۰.

جعفریان، ن.، میرزایی، ج.، مرادی، م.، حیدری، م. ۱۳۹۷. تنوع زیستی و کلنیزاسیون قارچ‌های میکوریز آربوسکولار با برخی گونه‌های جنگلی زاگرس. نشریه جنگل و فراورده‌های چوب، دوره: ۷۱، شماره: ۱، ص: ۳۵-۴۷.

حقیقیان، ف.، جهانبازی، ح. ۱۳۹۶. معرفی آفات بادام وحشی در منطقه کره‌بس استان چهارمحال بختیاری. دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات حمایت و حفاظت جنگلها و مراتع ایران. جلد: ۱۵، شماره: ۲، ص: ۱۴۷-۱۵۲.

شریف‌پورلاتونی، ر.، جعفری، ع.، جهانبازی گوجانی، ح.، عسگری، ی. ۱۳۹۴. برآورد تولید و ارزش اقتصادی بذر بادام وامچک در رویشگاه کره‌بس استان چهارمحال و بختیاری. فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات جنگل و صنوبر ایران، جلد: ۲۳، شماره: ۲، ص: ۳۴۲-۳۵۳.

Atala, C., Reyes, S.A., and Molina-Montenegro, M.A. (2023). Assessing the Importance of Native Mycorrhizal Fungi to Improve Tree Establishment after Wildfires. Journal of Fungi, 9(4): 421.

Bhupenchandra, I., Chongtham, S.K., Devi, A.G., Dutta, P., Sahoo, M.R., Mohanty, S., Kumar, S., Choudhary, A.K., Devi, E.L., Sinyorita, S. and Devi, S.H. (2024). Unlocking the Potential of Arbuscular Mycorrhizal Fungi: Exploring Role in Plant Growth Promotion, Nutrient Uptake Mechanisms, Biotic Stress - Alleviation, and Sustaining Agricultural Production Systems. Journal of Plant Growth Regulation, 1-39.

Bonfante, P. and Genre, A. (2010). Mechanisms underlying beneficial plant–fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. Nature communications, 1(1): p.48.

Caravaca, F., Alguacil, M.M., Figueroa, D., Barea, J.M. and Roldan, A. (2003). Re-establishment of Retama sphaerocarpa as a target species for reclamation of soil

physical and biological properties in a semi-arid Mediterranean area, Forest Ecology and Management, 182: 49-58.

Chaudhary, A., Poudyal, S. and Kaundal, A. (2025). Role of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Maintaining Sustainable Agroecosystems. Applied Microbiology, 5(6): p.1.

Dong, X. and Zhao, B. (2006). Nested multiplex PCR—a feasible technique to study partial community of arbuscular mycorrhizal fungi in field-growing plant root. Science in China Series C: Life Sciences, 49: 354-361.

Hamelin, R.C., Bérubé, P., Gignac, M. and Bourassa, M. (1996). Identification of root rot fungi in nursery seedlings by nested multiplex PCR. Applied and Environmental Microbiology, 62(11): 4026-4031.

Jahanbazi Goujani, H., Hosseini Nasr S.M., Sagheb Talebi, K. and Hojati, S.M. (2014). Tolerance comparison of four wild almonds to salinity in Chaharmahal and Bakhtiari province. Journal of Natural Environment, 67(3): 267-278.

Jobim, K., Błaszkowski, J., Niezgoda, P., Kozłowska, A., Zubek, S., Mleczko, P., Chachuła, P., Ishikawa, N.K. and Goto, B.T. (2019). New sporocarpic taxa in the phylum Glomeromycota: Sclerocarpum amazonicum gen. et sp. nov. in the family Glomeraceae (*Glomerales*) and Diversispora sporocarpia sp. nov. in the Diversisporaceae (*Diversisporales*). Mycological Progress, 18: 369-384.

Johnson, N.C., Zak, D.R. and Tilman, D., (1991). Dynamic of vesicular - arbuscular mycorrhizae during old field succession. Oecologia, 86: 349 - 358.

Kalamulla, R., Dayasena, Y.A.P.K., Stephenson, S. L., Tibpromma, S., Chen, X.M., Yapa, N., and Karunarathna, S.C., 2024. Roles of mycorrhizal fungi in phytoremediation of contaminated eco-systems. New Zealand Journal of Botany, 1-18.

Li, J., Zhou, L., Chen, G., Yao, M., Liu, Z., Li, X., Yang, X., Yang, Y., Cai, D., Tuerxun, Z. and Li, B. (2025). Arbuscular mycorrhizal fungi enhance drought resistance and alter microbial communities in maize rhizosphere soil. Environmental Technology & Innovation, 37: 103947.

Lisek, A., Paszt, L. and Kulisiewicz, A. (2011). Detection of arbuscular mycorrhizal fungi in the roots of strawberry with nested PCR technique. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research, 75(1): 91-103.

Lord, N.S., Kaplan, C.W., Shank, P., Kitts, C.L. and Elrod, S.L. (2002). Assessment of fungal diversity using terminal restriction fragment (TRF) pattern analysis: comparison of 18S and ITS ribosomal regions. FEMS microbiology ecology, 42(3): 327-337.

Manga, A.G.B., Sene, G., Diatta, A.A., Diop, T.A., Barroso, G. and Tuinen, D.V. (2025). Molecular Diversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungi Associated with the Rhizosphere of Vachellia seyal Del. from Selected Saline Soils in Senegal. Microbiology Research, 16(1): p.19.

Matinizadeh, M., Nouri, E., Bayranvand, M., Kolarikova, Z. and Janoušková, M. (2024). Arbuscular mycorrhiza and rhizosphere soil enzymatic activities as modulated by grazing intensity and plant species identity in a semi-arid grassland. Rhizosphere, 30: 100893.

Mueller, R.C., Gallegos-Graves, L.V. and Kuske, C.R. (2016). A new fungal large subunit ribosomal RNA primer for high-throughput sequencing surveys. FEMS Microbiology

Ecology, 92(2): fiv153.

Schlaeppi, K., Bender, S.F., Mascher, F., Russo, G., Patrignani, A., Camenzind, T., Hempel, S., Rillig, M.C. and van der Heijden, M.G. (2016). High- resolution community profiling of arbuscular mycorrhizal fungi. New Phytologist, 212(3): 780-791.

Tarazona, P., García-Garrido, J.M. and Tester, M. (2011). The role of arbuscular mycorrhizal fungi in the plant response to drought stress: a review. Frontiers in Plant Science, 2, 12.

Wang, X., Wang, Y., Wang, Y., Yang, J., He, H., Ren, Y., Wang, C., Li, H., Zhang, X., Zhang, H. and Wang, J. (2025). Tree mycorrhizal associations strongly mediate soil microbial β-diversity along an elevational gradient in a warm-temperate forest. Applied Soil Ecology, 205: 105776.

Wu, X.H., Ma, C.Y., Jiang, H.J., Zhang, X.Y., Wang, H.M., Li, H.R., Zhao, Z.H., Sun, K., Zhang, W. and Dai, C.C. (2024). Root Endophyte-Manipulated Alteration in Rhizodeposits Stimulates Claroideoglomus in the Rhizosphere to Enhance Drought Resistance in Peanut. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 72(36): 20211-20223.

Zhao, Z., Tu, T., Zhang, Y., Meng, R., Shi, M., Fan, L., Merckx, V.S., Saunders, R.M. and Zhang, D. (2025). Not only transitions in nutritional modes but also niche shifts facilitate mycorrhizal fungal specialization in Burmannia. Functional Ecology, 39(1): 209-225.