

Comparison of the colonization percentage and spore density of *Arbuscular mycorrhizal* fungi in the soil under the canopy of three shrub species

Foruzan Fazelinejad Delfan¹, Reza Erfanzadeh^{2*}  and Samad Jamali³

1-Rangeland Management Department, Faculty of Natural Resources, Tarbiat Modares University, Noor, Iran.

2*- Corresponding author, Rangeland Management Department, Faculty of Natural Resources, Tarbiat Modares University, Noor, Iran, Email: rezaerfanzadeh@modares.ac.ir

3- Department of Phytomedical Engineering, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Razi University, Kermanshah, Iran.

Received: 02/22/2025

Revised: 05/18/2025

Accepted: 06/01/2025

Published: 08/26/2025

Abstract

Background and Objectives

Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and plants are critical for ecosystem function; however, these interactions remain poorly characterized in mountainous and cold environments. This research aimed to investigate the effect of three shrub species (*Berberis integerrima*, *Onobrychis cornuta*, and *Juniperus sabina*) on root colonization, spore population, and fungal species diversity in the rhizosphere of these plants.

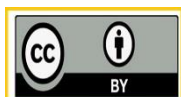
Materials and Methods

This research was conducted in the Belde highlands, Helooposhteh village, in the southern part of Nur County, Mazandaran Province, Iran. A field survey was initially performed to select 13 plots as replicates. Each plot contained three adjacent shrub species. Soil sampling was carried out in the spring of 2023. A total of 52 rhizosphere soil samples (4 samples under each shrub and 1 sample from outside the shrub canopy in each plot) and 39 root samples were collected.

Soil samples were taken from a depth of 0-30 cm in each of the 13 plots. To observe fungal structures (vesicles, arbuscules, and hyphae), root samples were stained. Also, 200 grams of each soil sample were taken, and spores were isolated and counted using a washing, wet sieving, and centrifugation method in a sucrose solution. Then, identification was performed.

Results

The results indicated that the diversity of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) was significantly influenced by the canopy of different shrub species. In control (areas outside the understory), *Diversispora aurantia* was identified. Understory *Onobrychis cornuta*, *Glomus flavisporum*, and *Acaulospora* sp. were found. Additionally, Understory *Berberis integerrima* canopy, *Gigaspora gigantea*, *Acaulospora colombiana*, and *Acaulospora jejuensis* were identified, and Understory *Juniperus sabina* canopy, *Cetranspora pellucida*, and *Glomus flavisporum* were observed. The results also showed that *Acaulospora* had the highest abundance among these fungi. Furthermore, root colonization rate and spore counts showed significant differences among the shrub species. The root colonization percentage for *O. cornuta* was 79.46% with a spore count of 4038 per 200g of soil. The relative abundance of *J. sabina* was 53.46% (3952 spores), while *B. integerrima* constituted 41.30% (3593 spores) of the total spore count.



Conclusion

The results of this study emphasize the significance of species diversity in shrub communities within mountainous and cold habitats, highlighting their pivotal role in shaping fungal communities and enhancing ecosystem functions. Shrubs are recognized as key drivers in ecological interactions and in maintaining the sustainability of ecosystem processes.

Keywords: *Arbuscular mycorrhizal* fungi, molecular identification, shrub plants, spore.

مقایسه درصد کلونیزاسیون و تراکم اسپور قارچ‌های میکوریزا آربوسکولار در خاک زیر اشکوب سه گونه بوته‌ای

فروزان فاضلی‌نژاد^۱، رضا عرفانزاده^{۲*} و صمد جمالی^۳

۱- گروه مرتع‌داری، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران

۲- نویسنده مسئول، گروه مرتع‌داری، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران، پست الکترونیک: rezaerfanzadeh@modares.ac.ir

۳- گروه مهندسی گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۲/۰۴ تاریخ اصلاح نهایی: ۱۴۰۴/۰۲/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۳/۱۱ تاریخ چاپ: ۱۴۰۴/۰۶/۰۴

چکیده

سابقه و هدف

تعاملات بین قارچ‌های میکوریزا آربوسکولار و گیاهان نقش مهمی در عملکرد اکوسیستم‌ها دارند اما این تعاملات در رویشگاه‌های کوهستانی و سرد به خوبی شناخته نشده است. هدف از این تحقیق، بررسی تأثیر سه گونه بوته‌ای (زرشک، اسپرس خاردار و مای‌مرز) بر میزان کلونیزاسیون ریشه، جمعیت اسپور و تنوع گونه‌های قارچی در ریزوسفر گیاهان بود.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در استان مازندران، جنوب شهرستان نور، ارتفاعات بلده در روستای هلو پشته انجام شد. ابتدا بازدید میدانی منطقه انجام و بعد ۱۳ قطعه نمونه به عنوان ۱۳ تکرار تعیین شد. در هر قطعه نمونه، سه گونه بوته‌ای مجاور هم حضور داشتند. نمونه‌برداری از خاک در بهار ۱۴۰۲ انجام شد. تعداد ۵۲ نمونه خاک ریزوسفر (به‌طوری‌که در هر قطعه نمونه، ۴ نمونه خاک زیر اشکوب بوته و یک نمونه از فضای بیرون از بوته) برداشت شد و ۳۹ نمونه ریشه انتخاب گردید. نمونه‌های خاک از عمق صفر تا ۳۰ سانتی‌متری در ۱۳ قطعه نمونه‌برداری شدند. برای مشاهده ساختارهای قارچی (وزیکول، آربوسکول و هیف)، نمونه‌های ریشه رنگ‌آمیزی گردیدند. همچنین، از هر نمونه خاک ۲۰۰ گرم برداشته شد و اسپورها با استفاده از روش شستشو، الک مرطوب و سانتریفوژ، در محلول ساکارز جداسازی و شمارش شدند. سپس اقدام به شناسایی آنها گردید.

نتایج

تنوع قارچ‌های میکوریزا آربوسکولار به‌طور قابل‌توجهی تحت تأثیر تاج گونه‌های مختلف بوته‌ای قرار دارد. در فضای بیرون از اشکوب بوته‌ها (شاهد)، *Diversispora aurantia* شناسایی شد، در حالی که در زیر تاج *Onobrychis cornuta*، قارچ‌های *Glomus flavisporum* و *Acaulospora sp.* یافت شدند. علاوه بر این، در زیر تاج *Berberis integerrima*، گونه‌های *Gigaspora juniperus sabina*، قارچ‌های *Cetranspora pellucida* و *Glomus flavisporum* مشاهده شدند. در میان این قارچ‌ها، جنس *Acaulospora* بیشترین فراوانی را داشت. از سوی دیگر، میزان کلونیزاسیون ریشه و تعداد اسپور میان گونه‌های مختلف بوته‌ای تفاوت معناداری را نشان داد. درصد کلونیزاسیون ریشه در گونه *O. cornuta* برابر با ۷۹/۴۶ درصد و تعداد اسپور ۴۰۳۸ در ۲۰۰ گرم خاک بود. این مقادیر برای گونه‌های *J. sabina* و *B. integerrima* به ترتیب ۵۳/۴۶ درصد و ۳۹۵۲ اسپور و ۴۱/۳۰ درصد و ۳۵۹۳ تعداد اسپور بودند.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش بر اهمیت تنوع گونه‌ای در بوته‌ای‌ها در رویشگاه‌های کوهستانی و سرد تأکید دارد و نقش بنیادین آنها را در شکل‌گیری جوامع قارچی و ارتقای کارکردهای زیست‌بومی برجسته می‌سازد. گیاهان بوته‌ای به‌عنوان محرک‌هایی کلیدی در تعاملات اکولوژیکی و پایداری عملکرد اکوسیستم‌ها شناخته می‌شوند.

واژه‌های کلیدی: اسپور، شناسایی مولکولی، گیاهان بوته‌ای، میکوریزا آربوسکولار.

مقدمه

مراتع به عنوان منابع طبیعی حیاتی، در تأمین علوفه، حفظ تنوع زیستی، جلوگیری از فرسایش خاک و تنظیم چرخه آب نقش دارند. اما عواملی مانند چرای بی‌رویه و بهره‌برداری ناپایدار موجب تخریب آنها شده است. حفظ و احیای مراتع نه تنها به محیط زیست کمک می‌کند، بلکه در توسعه پایدار و بهبود معیشت جوامع محلی نیز مؤثر است. مطالعات مختلفی به شناسایی عوامل تخریب مراتع و راهکارهای حفاظتی پرداخته‌اند ([Aladdin Vandi, 2021](#)). در این راستا، گیاهان روزانه با تنش‌های محیطی مواجه می‌شوند و مجبورند ارتباطات نزدیکی با همسایگان خود برقرار کنند. در این میان، قارچ‌های میکوریزا آربوسکولار (AMF) یکی از مهمترین روابط همزیستی در طبیعت هستند، این قارچ‌ها به شاخه گلوومیکوتا تعلق دارند و معمولاً همزیست‌های اجباری هستند که روابط سودآوری با گیاهان برقرار می‌کنند ([Guisande-Collazo et al., 2016](#)). میکوریزا ترکیبی از برخی قارچ‌ها و ریشه‌های گیاهان است. قارچ‌های میکوریزا آربوسکولار ارتباط مستقیمی بین ریشه‌ها و خاک دارند ([Saia and Jansa., 2022](#)). قارچ‌های میکوریزا اعضای مهم میکروبیوتای گیاه هستند و می‌توانند با ریشه بیشتر گیاهان روی زمین رابطه‌ای همزیستی برقرار کنند ([Averill et al., 2019](#)). بیش از ۹۲٪ از گونه‌های گیاهی با قارچ‌های مایکوریزا همزیست هستند ([Sizonenko et al., 2020](#)). شواهد نشان می‌دهند که همزیستی‌های میکوریزا می‌توانند نقش‌های کلیدی در تعیین تنوع زیست‌بوم‌ها ایفا کنند و قادرند ساختار و عملکرد جوامع گیاهی را به شیوه‌های پیچیده‌ای تحت تأثیر قرار دهند ([Eom et al., 2000](#)). بنابراین قارچ‌های میکوریزا آربوسکولار در ارتباط همزیستی با گیاهان، کربن را از گیاه میزبان جذب کرده و در کنار آن، به فرایند جذب مواد معدنی، به ویژه فسفر کمک

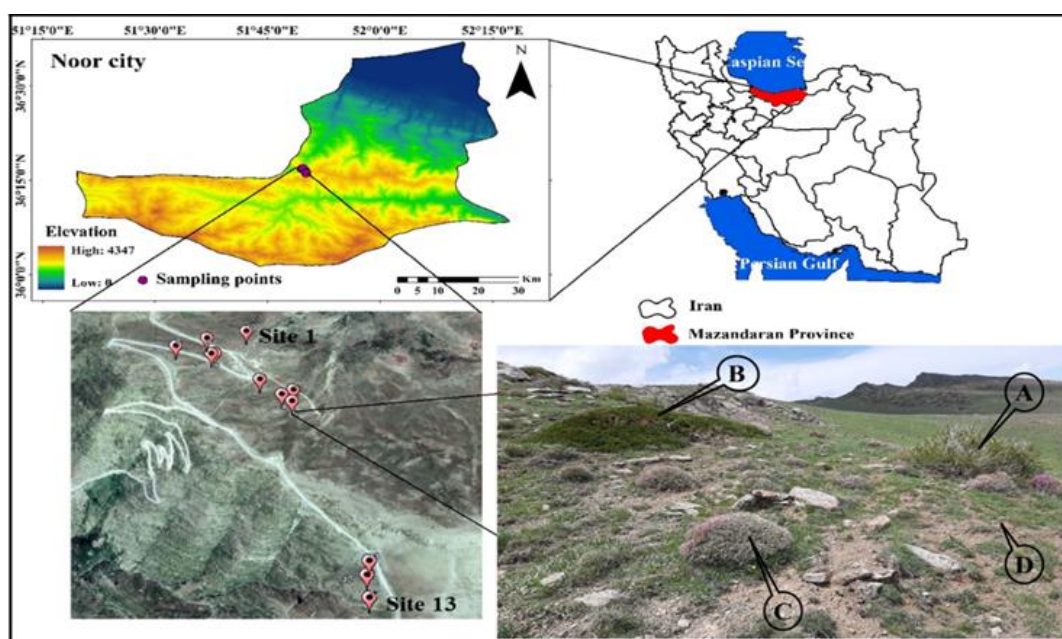
می‌کنند ([Martínez-García et al., 2011](#)). شواهد نشان می‌دهند که همزیستی گیاه میکوریزا برای حفظ چرخه‌های بیوژئوشیمیایی و عملکردهای زیست‌بوم‌ها ضروریست ([Van der Heijden., 2015](#)). مطالعات نشان می‌دهند که AMF رشد بوته‌ها را تحریک کرده و تحمل آنها به خشکی را افزایش می‌دهد، در حالی که بوته‌ها نیز بر گونه‌های AMF تأثیر متفاوتی اعمال می‌کنند ([Martínez-García et al., 2011](#)). تنوع و بهره‌وری گیاهان در زیست‌بوم‌ها به شدت به تنوع قارچ‌های AMF در خاک وابسته است ([Torrecillas et al., 2012](#)). در تحقیقاتی نشان داده شده است که تنوع و توزیع قارچ‌های AMF در خاک تحت تأثیر ویژگی‌هایی مانند سطح آب زیرزمینی، بافت خاک و شیمی خاک قرار دارد و این عوامل در کنار ترجیحات میزبان گیاهی AMF تعیین‌کننده هستند ([Martínez-García and Pugaire., 2011](#)). در همین راستا، افزایش گونه‌های گیاهی برای احیای اراضی تخریب‌شده، باعث افزایش تنوع AMF خاک و تقویت تعاملات مثبت زیرزمینی می‌شود. بنابراین، فهم بهتر ترکیب جامعه AMF در این زیست‌بوم‌ها اهمیت زیادی دارد ([Alguacil et al., 2009](#)). گونه‌های مرتعی از نظر ویژگی‌های ساختاری مانند تراکم، ضخامت ساقه، شاخه و برگ‌ها با یکدیگر تفاوت دارند. برخی علفی و برخی چوبی هستند و بوته‌ها از مهمترین گونه‌های چوبی در مراتع محسوب می‌شوند. برخی از گونه‌های درختی دارای ارتفاع زیاد و تاج پوششی کوتاه‌تر و تاج پوششی فشرده‌تری دارند. این تفاوت‌ها می‌توانند تأثیرات متنوعی بر همزیستی و ساختار جامعه قارچی میکوریزا داشته باشند. در این پژوهش، گونه‌های انتخاب‌شده از نظر ساختار و فیزیونومی تاج تفاوت‌های قابل توجهی دارند که این تفاوت‌ها می‌توانند تأثیرات مهمی بر محیط زیست و تعاملات گیاهی-قارچی داشته باشند.

بوته‌ای‌ها از طریق افزایش رطوبت و مواد آلی و غیره می‌تواند بر جامعه قارچ‌های میکوریزایی، میزان کلونیزاسیون و تراکم اسپور قارچ‌های میکوریزا آربوسکولار تأثیرگذار باشد که این می‌تواند ناشی از تفاوت‌های ساختاری و فیزیولوژیکی در نحوه تعاملات زیرزمینی میان گیاهان و قارچ‌ها باشد.

مواد و روش‌ها

منطقه مورد مطالعه در استان مازندران، جنوب شهرستان نور، بخش بلده و مراتع روستای هلوپشته قرار دارد. این مراتع در ارتفاعات البرز میانی و بالادست روستای هلوپشته واقع شده‌اند و بخشی از مرز مشترک بخش مرکزی و بخش بلده را شامل می‌شوند. مختصات جغرافیایی منطقه بین عرض‌های $36^{\circ} 19' 19''$ تا $36^{\circ} 16' 30''$ و طول‌های $51^{\circ} 49' 30''$ تا $51^{\circ} 51' 17''$ شرقی است. ارتفاع منطقه بین ۲۸۴۴ تا ۲۹۶۳ متر از سطح دریا و اقلیم منطقه کوهستانی سرد با میانگین بارندگی سالانه ۳۹۴/۱ میلی‌متر است (Khaleghi, 1998). میانگین حداکثر مطلق دمای سالانه ۱۶/۴، میانگین حداقل مطلق دمای سالانه ۲/۶ و میانگین دمای سالانه ۹/۸ درجه سانتی‌گراد است. شیب عمومی آن ۲۰ تا ۳۰ درصد با جهت شرقی-غربی است. مساحت این منطقه حدود ۱۰۰ هکتار است (شکل ۱). خاک مرتع از نظر بافت، شنی-لومی می‌باشد که جزء خاک‌های نیمه سبک بوده و جنس سنگ مادر نیز از نوع آهکی می‌باشد. پوشش گیاهی منطقه با غلبه گونه‌های بوته‌ای مانند *J. sabina* (مای‌مرز)، *O. cornuta* (اسپرس‌خاردار) و *B. integerrima* (زرشک) با گراس‌های پایه مانند *Poa*, *Bromus tomentellus*, *Artemisia*, *Thymus fedtschenkoi*, *bulbosa* *Agropyron sieberi* است.

گونه اسپرس‌خاردار (*Onobrychis cornuta*)، گیاهی چندساله از خانواده *Fabaceae* با تاج بالشتکی متراکم و فشرده، برگ‌های مرکب با ۲ تا ۵ جفت برگچه سرنیزه‌ای و کرک‌دار است. این گیاه با ارتفاعی تا ۵۰ سانتی‌متر و گل‌های آن بنفش و صورتی است، طول برگچه‌ها ۲ تا ۲/۵ میلی‌متر است، شاخه‌های خاردار در زمین‌های خشک رشد می‌کند (Tamartash et al., 2010). بوته مای‌مرز (*Juniperus sabina*)، یک گونه بوته‌ای چندساله از خانواده *Cupressaceae* با تاج پوشش همیشه‌سبز و نیمه‌چسبیده است که می‌تواند تا ارتفاع حدود ۴ متر رشد کند (میانگین ارتفاع در محدوده پژوهش ۴۰ سانتی‌متر بود) و دارای برگ‌هایی به شکل سوزنی و فلس‌مانند متقابل است، ۱-۳ بذر تخم‌مرغی، شیاردار و ۴ میلی‌متر طول دارد، برگ‌ها بسیار تیز و با بوی نامطبوع هنگام له شدن می‌باشد (Pan et al., 2024; Asili et al., 2010). علاوه بر این، زرشک (*Berberis integerrima* Bunge.) یک بوته چندساله از خانواده *Berberidaceae* با تاج برافراشته و باز، برگ‌های زودافت و شاخه‌های خاردار است که تا ارتفاع ۱/۵ متر رشد می‌کند و ساقه‌هایی چوبی با شاخه‌های شکننده دارد. همچنین یک گیاه دارویی مهم با برگ‌های بیضوی، گل‌های زرد و میوه‌های قرمز مستطیل شکل است (Arayne et al., 2010). خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد سرطانی دارد و کاهش‌دهنده چربی است (Majd et al., 2008). در مطالعات قبلی نشان داده شده است که این تفاوت‌ها در فیزیونومی تاج گیاهان می‌تواند بر ویژگی‌های بانک بذر خاک و مشخصه‌های شیمیایی و بیولوژیکی خاک تأثیر بگذارد (Shaysteshh et al., 2017). در این تحقیق، اثر ساختار ریشه‌های گونه‌های بوته‌ای بر میزان کلونیزاسیون و جوامع قارچ‌های میکوریزا آربوسکولار در ریزوسفر گیاهان بررسی گردید. همچنین تاج پوشش



شکل ۱- موقعیت منطقه مورد مطالعه در مراتع حواشی روستای هلوپشته. (A): زرشک (*Berberis integerrima*), (B): مای مرز

(*Juniperus sabina*), (C): اسپرس خاردار (*Onobrychis cornuta*) و (D): پوشش علفی (شاهد)

Figure 1- Location of the study area in rangelands of Haloposhteh village. (A): *Berberis integerrima*, (B): *Juniperus sabina*, (C): *Onobrychis cornuta*, and (D): Grass patch (Control).

نمونه برداری

ابتدا از منطقه مورد نظر بازدید میدانی انجام و بعد منطقه مورد مطالعه انتخاب شد. بنابراین در پژوهش ۱۳ قطعه نمونه به عنوان ۱۳ تکرار انتخاب شدند. در هر قطعه نمونه هر سه گونه بوته‌ای در کنار هم با شرایط توپوگرافی یکسان حضور داشتند. نمونه برداری از عمق صفر تا ۳۰ سانتی متر ناحیه ریزوسفر هر گیاه و فضای بیرون از گیاه شامل خاک و ریشه‌های نازک موئین در فصل بهار ۱۴۰۲ انجام شد و به منظور اثبات رابطه همزیستی قارچ‌های میکوریزا آربوسکولار با این گونه، رنگ آمیزی ریشه‌ها و جداسازی اسپور از خاک انجام شد. بنابراین در ۱۳ قطعه نمونه، ۵۲ نمونه خاک از زیراشکوب هر گونه و بیرون از زیراشکوب گونه‌ها (کنترل) برای شمارش اسپور و شناسایی مولکولی قارچ‌های میکوریزا آربوسکولار برداشت شد و به آزمایشگاه منتقل گردید. علاوه بر این، ۳۹ نمونه ریشه برای بررسی میزان همزیستی جمع‌آوری گردید. به طوری که در هر قطعه نمونه، چهار تا نمونه خاک از زیر اشکوب گونه‌ها و فضای بیرون از

گونه‌ها (کنترل) و سه نمونه ریشه از گیاهان برداشت شد.

مشاهده ساختارهای میکوریزایی در ریشه گیاهان در این مطالعه برای مشاهده اندام‌های میکوریزایی در ریشه گیاهان، از روش [Hayman و Phillips \(۱۹۷۰\)](#) برای رنگ آمیزی ریشه‌های میکوریزایی استفاده شد. برای شفاف سازی اندام‌ها، قطعات ریشه جدا شده به مدت ۴۵ دقیقه در محلول پتاس ۱۰ درصد (KOH) در بن ماری جوشان قرار گرفتند. سپس با آب مقطر شستشو و به مدت ۳-۵ دقیقه در محلول ۱ درصد HCL قرار داده شدند. برای رنگ آمیزی، ریشه‌ها در محلول ۰/۰۵ درصد آنیلین بلو در لاکتوفنل به مدت ۴۵ دقیقه در بن ماری جوشان رنگ آمیزی و بعد در لاکتوفنل رنگ‌بری شدند ([Phillips and Hayman, 1970](#); [Wilkes, 2021](#)).

اندازه‌گیری درصد کلونیزاسیون ریشه گیاه

برای تعیین درصد کلونیزاسیون، در این روش، ابتدا

ساختارهای قارچی (هیف، وزیکول و آربوسکول) موجود در قطعات ریشه رنگ آمیزی شده بررسی شدند. در نهایت، درصد کلونیزاسیون ریشه با استفاده از رابطه ۱ محاسبه گردید.

$$\text{رابطه (۱)} \quad \text{درصد} = \frac{\text{تعداد قطعات دارای میکوریزا}}{\text{کل قطعات مشاهده شده}} * 100$$

استریل قرار گرفتند و برای حذف ذرات خاک و میکروارگانیسم‌های متصل، به مدت ۳۰ ثانیه در حمام اولتراسونیک (37 KHz) قرار گرفتند و سه بار با آب تقطیر شسته شدند. پس از تهیه سوسپانسیون اسپورها، نمونه زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی بالا مورد بررسی قرار گرفت. یک اسپور با توجه به اندازه، شکل و رنگ آن انتخاب و با استفاده از یک میکروبیورت (پیت شیشه‌ای بسیار ظریف) برداشت شد و در ۲۰ میکرولیتر محلول شامل ۱۰ میکرولیتر بافر PCR و ۱۰ میکرولیتر آب استریل با سوزن استریل خرد شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۶۰-۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از سانتریفوژ با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه، بخش رویی به‌عنوان DNA الگو جداسازی شد (Hatami et al., 2019).

تکنیک DNA:

برای تکنیک DNA استخراج شده از تک اسپور، از روش PCR آشیانه‌ای در دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، دانشگاه رازی (آزمایشگاه گیاه‌پزشکی) استفاده شد. ابتدا، اسپورهای سالم AMF از طریق روش‌های الک مرطوب جداسازی شدند. سپس این اسپورها به یک ظرف پتری که حاوی ۳۰ میلی‌لیتر توئین ۲۰ بود، منتقل گردیدند. برای حذف مواد زائد سطحی، اسپورها با یک شیکر مخلوط شدند. یک اسپور تنها به دقت انتخاب و به آب استریل تازه منتقل شد تا آلودگی به حداقل برسد (Rini et al., 2021). DNA از این اسپورهای پاک‌سازی شده با استفاده از کیت استخراج

ریشه‌های رنگ‌آمیزی شده به قطعاتی به طول ۱ سانتی‌متر تقسیم شدند (حداقل ۵۰ قطعه) و بعد با استفاده از پنس، این قطعات به روی لام حاوی چند قطره اسید لاکتیک منتقل گردیدند. در ادامه، با به‌کارگیری میکروسکوپ نوری،

جداسازی و شمارش اسپورهای قارچ میکوریزا آربوسکولار از خاک و ریشه

برای جداسازی اسپورهای AMF از روش الک مرطوب و سانتریفوژ با محلول ساکارز (Nicolson و Gerdemann ۱۹۶۳)، Jenkins (۱۹۶۴) استفاده شد. برای این منظور، ۲۰۰ گرم خاک (Gholamalizadeh et al., 2014) از هر ریزوسفر گیاه در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب معلق شد. مخلوط را به مدت ۱۰ دقیقه با همزن مغناطیسی هم‌زده و بعد از مجموعه‌ای از الک‌ها (۲۰، ۸۰، و ۴۰۰ مش) عبور داده شد. بخش خاکی باقی‌مانده روی الک آخر جمع‌آوری و به یک بشر منتقل شد. در ادامه، ۲۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون اسپور به لوله‌های سانتریفوژ ۵۰ میلی‌لیتری انتقال یافت و با ۲۵ میلی‌لیتر محلول ۵۵ درصد ساکارز به مدت ۲ دقیقه در ۲۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد. محلول بالایی (سوپرناتانت) از یک الک ۴۰۰ مش عبور داده شد. شسته و به پتری‌دیش منتقل گردید. شمارش اسپورها با استفاده از میکروسکوپ استریوسکوپیک در پتری‌دیش انجام شد. تراکم اسپورها به صورت تعداد کل اسپورها در هر ۲۰۰ گرم خاک محاسبه شد. در پایان، سوسپانسیون به یک لوله ۲۰ میلی‌لیتری منتقل و تا زمان استخراج DNA در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

شناسایی مولکولی گونه‌های قارچی استخراج DNA از اسپور برای شناسایی مولکولی، از تک اسپور جدا شده از خاک هر نمونه استفاده شد. اسپورها در میکروتیوب‌های حاوی آب

سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه انجام شد. در پایان، یک مرحله توسعه نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام گردید. با این روش، توالی ۱۸S rRNA تقویت و آماده برای تجزیه و تحلیل‌های بیشتر شد. محصول PCR اول به عنوان الگوی DNA برای PCR دوم استفاده شد. PCR دوم با استفاده از پرایمرهای اختصاصی قارچ‌های میکوریزایی AML1 و AML2 انجام شد و شامل ۳۲ چرخه بود که شامل یک چرخه تغییر ساختار اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، سپس ۳۰ چرخه شامل تغییر ساختار، اتصال و توسعه در دماهای مشخص بود. محصول نهایی PCR روی یک ژل آگارز ۱٪ در بافر TAE ۵/۵× تحلیل و با سیف آستین رنگ‌آمیزی شد و تحت نور UV بررسی گردید تا تأیید شود که DNA به خوبی تقویت شده است. سپس برای تعیین توالی‌یابی سنگر به شرکت توپاز ژن در کرج فرستاده شد (Pouryousef et al., 2017; Lee et al., 2006).

DNA قارچ (DENA Zist Co) استخراج گردید. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) با استفاده از دستگاه ترمال سایکلر T-Personal (ساخت شرکت Biometra، آلمان) برای تکثیر بخشی از توالی ۱۸S rRNA قارچ‌های میکوریزا آربوسکولار به صورت تودرتو انجام شد (Lee et al., 2008). در مرحله اول، PCR برای تقویت توالی ۱۸S rRNA انجام شد. این واکنش با استفاده از پرایمر جهانی NS1 و پرایمر معکوس NS4 در حجم کل ۲۵ میکرولیتر انجام شد. برای این منظور، ۳ میکرولیتر از DNA رقیق‌شده (رقت ۱:۱۰) از عصاره اصلی، ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس، ۵/۵ میکرولیتر آب دیونیزه و ۲ میکرولیتر از هر پرایمر (با غلظت ۱۰ میلی‌مولار) به ترکیب اضافه شد. شرایط تقویت شامل یک مرحله تغییر ساختار اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه بود. سپس ۳۰ چرخه انجام شد که در هر چرخه تغییر ساختار به مدت ۶۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، اتصال در ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه، و توسعه در ۷۲ درجه

جدول ۱- پرایمرهای استفاده شده برای PCR آشیانه‌ای و تعیین ترادف‌ها

Table 1- Primers Used for Nested PCR and Sequencing

Primer Name	Sequence (5'-3')	Primer orientation	Polymerase Chain Reaction (PCR)
AML1	ATC-AAC-TTT-CGA-TGG-TAG-GAT-AGA	Forward	Second round
AML2	GAA-CCC-AAA-CAC-TTT-GGT-TTC-C	Reverse	Second round
NS1	GTAGTCATATGCTTGTCTC	Forward	First round
NS4	CTT CCG TCA ATT CCT TTA AG	Reverse	First round

نشان داد که گونه *B. integerrima* دارای بیشترین و لکه‌های علفی دارای کمترین تعداد گونه قارچی بودند. به طور خاص، گونه قارچی *Diversispora aurantia* در فضای بیرون از اشکوب بوته‌ها (کنترل) مشاهده شد. در زیر اشکوب *O. cornuta*، قارچ‌ها در حد جنس و گونه *Glomus* و *Acaulospora sp. flavisporum* در شرکت دانش‌بنیان توپاز ژن شناسایی شدند. همچنین، در زیر اشکوب *Acaulospora sp.* نیز گونه‌های *B. integerrima* و *Acaulospora colombiana*، *Gigaspora gigantea* و *Acaulospora jejuensis* یافت شدند. علاوه بر این،

تجزیه و تحلیل آماری

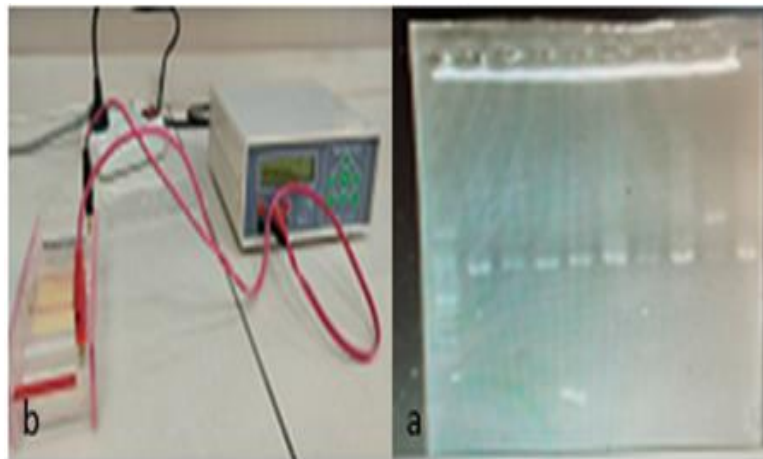
پس از ثبت داده‌های مربوط به میانگین تعداد اسپورها و درصد همزیستی ریشه، از تجزیه واریانس یک طرفه برای مقایسه میزان کلونیزاسیون ریشه و تعداد اسپور با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۶ و رسم نمودار در نرم‌افزار Excel 2013 انجام شد. برای گروه‌بندی و مقایسه میانگین‌ها نیز از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده گردید.

نتایج

نتایج شناسایی مولکولی قارچ‌های میکوریزا آربوسکولار

ریشه‌های رنگ‌آمیزی شده از گونه‌های بوته‌ای برای مشاهده ساختار میکوریزایی مشخص گردید که وزیکول‌ها و هیف‌های قارچی، متداول‌ترین و بیشترین ساختارها قابل مشاهده بودند (شکل ۳).

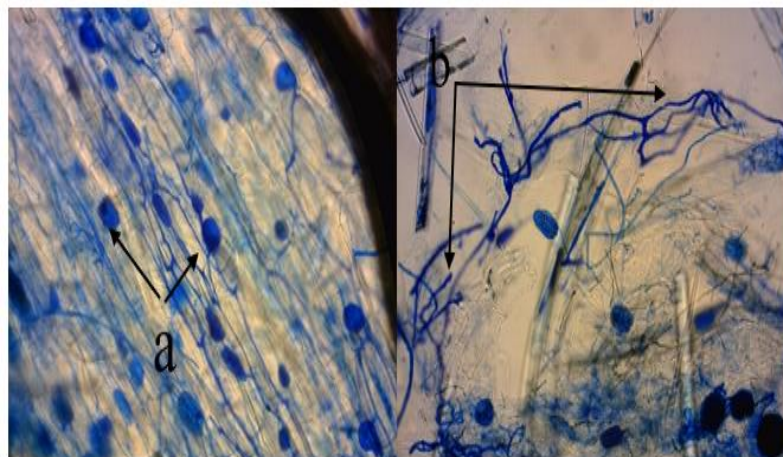
در نمونه‌های *G. flavisporum* و *Cetraspora pellucida* خاک جمع‌آوری شده در زیر تاج گونه بوته‌ای *J. sabina* مشاهده گردید. با بررسی نمونه خاک‌های جمع‌آوری شده از سایت‌های مختلف، در تمام نمونه‌های خاک، تراکم اسپور قارچ‌های میکوریزا آربوسکولار مشاهده گردید. با بررسی



شکل ۲- تصویر ژل‌گذاری روی دستگاه و موقعیت باندها

a: موقعیت باندها b: دستگاه ژل‌گذاری

Figure 2- Gel image and band positions
a: Band positions b: Gel casting apparatus



شکل ۳- اندام‌های قارچی مشاهده شده در ریشه‌های رنگ‌آمیزی شده. (a) وزیکول، (b) هیف‌های درون ریشه‌ای

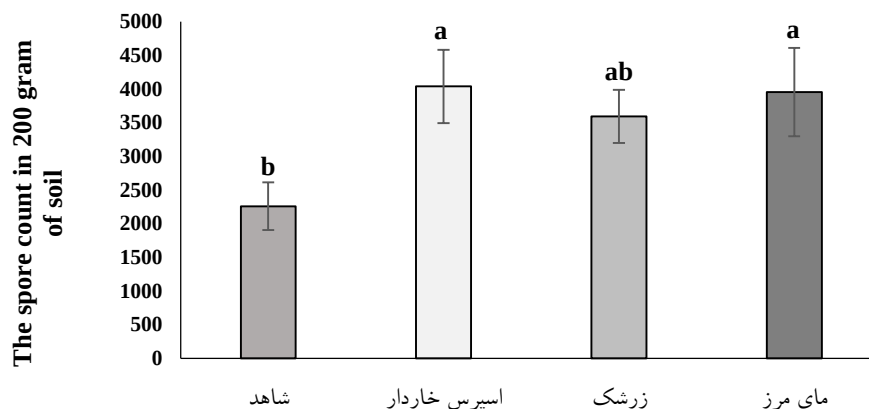
Figure 3- Fungal structures observed in stained roots. (a) Vesicle, (b) Intraradical hyphae.

دارد. بررسی تعداد اسپورها نشان داد که بین خاک زیر اشکوب گونه‌های بوته‌ای و فضای بیرون از بوته‌ها (کنترل) تفاوت معنی‌داری وجود دارد. جمعیت اسپور قارچ‌های

بررسی تعداد اسپور
آنالیز نتایج شمارش اسپور در ریزوسفر گیاهان نشان داد که در تمامی نمونه‌های خاک ریزوسفر، اسپور حضور

میکوریزا آربوسکولار بین ۴۰۳۸/۶۴ تا ۲۲۶۰ عدد اسپور بود. بیشترین جمعیت مربوط به ریزوسفر گونه فضای بیرون از بوته‌ها مشاهده شد (جدول ۱ و شکل ۳).

میکوریزا آربوسکولار بین ۴۰۳۸/۶۴ تا ۲۲۶۰ عدد اسپور بود. بیشترین جمعیت مربوط به ریزوسفر گونه فضای بیرون از بوته‌ها مشاهده شد (جدول ۱ و شکل ۳).



شکل ۴- مقایسه تعداد اسپور قارچ میکوریزا بین گونه‌های بوته‌ای با شاهد در منطقه مورد مطالعه

Figure 4- The spore count of mycorrhizal fungi among shrub species and the control in the study area.

بررسی درصد کلونیزاسیون ریشه گیاهی نشان داد که میانگین درصد کلونیزاسیون در گونه‌های مختلف بوته‌ای متفاوت است. بیشترین میزان کلونیزاسیون با میانگین ۷۹/۴۶ در *Onobrychis cornuta* مشاهده شد (جدول ۱ و شکل ۴). تحلیل آماری نیز نشان داد که ساختار ریشه گونه‌های بوته‌ای، اثر معنی‌داری بر میزان کلونیزاسیون ریشه با قارچ میکوریزا دارد.

بررسی درصد کلونیزاسیون ریشه

نتایج بررسی میزان کلونیزاسیون ریشه گونه‌های مختلف گیاهی نشان داد که میانگین درصد کلونیزاسیون در گونه‌های بوته‌ای متفاوت است. بیشترین میزان کلونیزاسیون با میانگین



شکل ۵- میانگین درصد کلونیزاسیون ریشه زیر اشکوب گونه‌های بوته‌ای در منطقه مورد مطالعه

Figure 5- The average percentage of root Colonization understory of shrub species in the study area

جدول ۲- نتایج آنالیز تجزیه واریانس تعداد اسپور و میزان کلونیزاسیون ریشه قارچ‌های میکوریزا آربوسکولار

Table 2- The results of the analysis of variance (ANOVA) for spore count and root Colonization rate of arbuscular mycorrhizal fungi.

		Mean	Standard error		df	Sum of squares	Sig
Spore count	Control	2260.00	352.76	Between groups	3	9493768.42	0.04*
	<i>Onobrychis cornuta</i>	4038.64	544.90	Within groups	48	3273106.65	
	<i>Berberis integerrima</i>	3593.84	571.47	Total	51		
	<i>Juniperus sabina</i>	3952.69	566.01				
Colonization percentage (%)	Control	-		Between groups	2	4938.76	0.00**
	<i>Onobrychis cornuta</i>	46.79	2.83	Within groups	36	97.09	
	<i>Berberis integerrima</i>	41.30	1.98	Total	38		
	<i>Juniperus sabina</i>	53.46	3.22				

(**) اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۱، (*) اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵، (ns) عدم اختلاف معنی‌دار

بحث

همزیستی میکوریزا، با قدمتی ۴۰۰ میلیون ساله، نقش اساسی در سازگاری گیاهان با شرایط نامطلوب محیطی ایفا می‌کند. این تعامل، با تنظیم رشد و نمو، به گیاهان کمک کرده و بیش از ۸۰ درصد گونه‌های گیاهی زمینی از آن بهره‌مند هستند (Ogoma et al., 2021). در این پژوهش، مشاهده تنوع جامعه میکوریزا آربوسکولار، مشاهده ساختارهای میکوریزا (وزیکول، هیف) در ریشه‌های رنگ‌آمیزی شده و وجود اسپورهای این گروه قارچی در ناحیه ریزوسفری گیاهان مورد مطالعه، کلونیزاسیون میکوریزا را نشان داد. در این مطالعه، تکثیر مولکولی از تک‌اسپوره‌های (AMF) مرتبط با ریزوسفر گونه‌های بوته‌ای شامل *O. cornuta*، *B. integerrima* و *J. sabina* مورد بررسی قرار گرفته است. این مطالعه نشان داد *Acaulospora* sp. و *Glomus* sp. دارای فراوانی بیشتری در زیر اشکوب بیشتر گونه‌های بوته‌ای هستند. به‌طوری‌که در گونه بوته‌ای *B. integerrima* تنوع بیشتری از قارچ‌ها مشاهده شد. مطالعاتی نشان داد که تفاوت در فرایند توسعه ممکن است به دلیل تسلط گونه‌های *Acaulospora* و *Glomus* بر ریشه‌های بیشتر گیاهان خشکی‌زی باشد. زیرا این دو گونه نسبت به گونه

Gigaspora به زمان کمتری برای تولید اسپور نیاز دارند (Wang and Jiang., 2015). اعضای خانواده *Gigasporaceae* معمولاً شبکه‌های گسترده‌ای از هیف‌ها در خاک تشکیل می‌دهند و تعداد کمتری اسپور نسبت به اعضای خانواده‌های *Acaulosporaceae* و *Glomaceae* تولید می‌کنند (Wang and Jiang., 2015). همچنین مطالعاتی نشان داده‌اند که ویژگی‌های گیاهی، شرایط خاکی و اقلیمی بر تنوع و ترکیب جوامع AMF تأثیر می‌گذارند (Johnson, 2010). همان‌طور که توسط van de Voorde و همکاران (۲۰۱۰) گزارش شده است. علاوه بر این، مطالعات دیگر نشان داده‌اند که نوع گیاه، با تغییر شرایط اقلیمی خاص منطقه و تولید ترشحات ریشه، جامعه میکروبی خاک به‌ویژه AMF را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Velázquez et al., 2013; Öpik et al., 2009). مطالعات پیشین نیز نقش مهم گیاهان میزبان را در ساختار و ترکیب جمعیت قارچ‌های میکوریزا آربوسکولار (AMF) مورد تأیید قرار داده‌اند. به‌عنوان مثال، Smith و همکاران (۲۰۱۰) و Wei و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند که گیاهان میزبان می‌توانند به‌طور قابل‌توجهی بر تنوع و حضور گونه‌های آلوده‌کننده AMF تأثیرگذار باشند. با توجه به شرایط اقلیمی مدیترانه‌ای سرد و کوهستانی، به نظر می‌رسد

گزارش کردند که فراوانی ترشحات ریشه‌ای در جوامع گیاهی بالشتکی، موجب تحریک جوانه‌زنی اسپور و افزایش تولید هیف‌های آزاد می‌شود؛ پدیده‌ای که در نهایت می‌تواند منجر به افزایش میزان کلونیزاسیون قارچ‌های میکوریزا در گیاهان واقع در زیراشکوب این جوامع گردد. همچنین، در این پژوهش نشان داد که گونه‌های بوته‌ای تأثیر معنی‌داری بر کلونیزاسیون ریشه دارند. در این میان، بیشترین درصد کلونیزاسیون در میان گونه‌های مورد بررسی، به گونه بالشتکی *Onobrychis cornuta* (اسپرس خاردار) تعلق داشت. این برتری ممکن است به ویژگی‌های خاص این گونه ازجمله تعلق به خانواده *Fabaceae* که گیاهان آن تمایل بیشتری به برقراری همزیستی با باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن دارند، مرتبط باشد. علاوه بر این، *O. cornuta* دارای تاج متراکم و ریشه‌های عمیق است که می‌تواند شرایط بهتری برای زیست و فعالیت قارچ‌های میکوریزا فراهم کند ([Ghorbani Sini et al., 2011](#)). این نتایج با یافته‌های Casanova-Katny و همکاران (۲۰۱۱) که گزارش کردند بالاترین میزان کلونیزاسیون در ریشه گونه بالشتکی *Azorella madreporica* مشاهده شد، هم‌راستا است. همچنین، این یافته‌ها با مطالعه [Ahmadi](#) و همکاران (۲۰۱۶) بر گونه بوته‌ای *Astragalus gossypinus* که آن نیز از خانواده *Fabaceae* است، مطابقت دارد. افزون بر این، سیستم ریشه‌ای گسترده و عمیق گیاهان بالشتکی قادر است در حفظ میکروارگانیسم‌های مفید خاک، ازجمله قارچ‌های میکوریز آربوسکولار و نیز نگهداشت آب و مواد مغذی نقش مؤثری ایفا کند؛ ویژگی‌ای که موجب بهبود عملکرد این گیاهان در مقایسه با گونه‌های دارای تاج باز و پراکنده می‌شود ([Öpik et al., 2023](#)). به‌طورکلی، نتایج این پژوهش نشان داد که همزیستی موفق میان قارچ‌های میکوریزا آربوسکولار و گونه *O. cornuta* در منطقه مورد بررسی، برقرار شده است که بر اهمیت و کارایی این رابطه همزیستی در اکوسیستم‌های مرتعی تأکید دارد.

با توجه به نتایج این تحقیق، سه گونه بوته‌ای جزیره‌های حاصل‌خیز در مراتع زیرآلپی ایجاد کرده و منجر به تنوع بیشتر

گونه‌های مورد مطالعه از سازگاری بیشتری برای همزیستی با گیاهان این مناطق نسبت به سایر گونه‌های قارچ‌های میکوریز آربوسکولار برخوردارند. ترکیب گونه‌ای و تراکم جمعیتی قارچ‌های میکوریز آربوسکولار در خاک تحت تأثیر عوامل متعددی ازجمله میزان فعالیت میکروبی، دمای خاک، نوع و شدت عملیات خاک‌ورزی، شدت نور و سطح حاصلخیزی خاک قرار دارد. اگرچه به‌طورکلی بین قارچ‌های میکوریز آربوسکولار و گیاهان میزبان، اختصاصیت میزبانی وجود ندارد، اما مطالعات مختلف نشان داده‌اند که ترجیح میزبانی یا روابط همزیستی ترجیحی بین برخی گونه‌های قارچ و گیاهان خاص می‌تواند شکل گیرد ([Menge et al., 1978](#); [Ross, 1980](#)).

در این پژوهش، بیشترین تعداد اسپور در ۲۰۰ گرم خاک، ۴۰۳۸/۶۴ در زیر اشکوب بوته اسپرس خاردار و کمترین مقدار، ۲۲۶۰، در فضای بیرون از اشکوب بوته‌ها (شاهد) مشاهده شد. یافته‌ای که با نتایج ([Mosbah et al., 2018](#)) هم‌راستاست و نشان می‌دهد در مناطق مرطوب، تعداد اسپور بیشتری نسبت به مناطق نیمه‌مرطوب وجود دارد. همچنین، نتایج نشان داد که در میان گونه‌های مورد بررسی و فضای شاهد، بیشترین تعداد اسپور مربوط به گونه *O. cornuta* (اسپرس خاردار) بوده است. بنابراین، افزایش تراکم اسپور در زیراشکوب این گونه احتمالاً به ویژگی‌های خاص مورفولوژیکی آن بازمی‌گردد که امکان سازگاری بهتر با شرایط محیطی متنوع و ایجاد تعاملات مؤثرتر با عوامل زیستی خاک را فراهم می‌سازد. افزون بر این، *O. cornuta* از طریق همزیستی مؤثر با قارچ‌های میکوریزا، توانایی تثبیت نیتروژن و بهبود شرایط فیزیکی و شیمیایی خاک، محیط مناسبی برای رشد و افزایش اسپور این قارچ‌ها ایجاد می‌کند. همچنین، [Asanova-Katny](#) و همکاران (۲۰۱۱) در پژوهشی دریافتند که میزان کلونیزاسیون و تراکم جمعیت میکوریزا در زیراشکوب گونه‌های بالشتکی بیشتر از مناطق باز است که این موضوع را به عواملی مانند ترشحات ریشه‌ای، نوع گیاه، رطوبت بالاتر خاک و دوره رشد کوتاه‌تر در این نواحی نسبت دادند. در همین راستا، [Elfstrand](#) و همکاران (۲۰۰۵)

بالشتکی *O. cornuta* به‌عنوان گزینه‌ای برتر برای تقویت تراکم اسپور و همزیستی ریشه توسط قارچ‌های میکوریزا شناخته شده است. حفاظت و گسترش این گونه‌ها، به‌ویژه بوته‌های بالشتکی *O. cornuta*، می‌تواند نقش مهمی در رویشگاه‌های کوهستانی به‌ویژه مراتع تخریب‌شده و حفظ تنوع زیستی میکروبی ایفا کند.

قارچ‌های میکوریزا آربوسکولار می‌شوند. گونه‌های بوته‌ای تعداد اسپور و کلونیزاسیون ریشه قارچ‌های میکوریزا آربوسکولار (AMF) را افزایش داده‌اند. در پروژه‌های حفاظت از گیاهان مبتنی بر تنوع زیستی میکروارگانیزم‌ها، شناسایی و تقویت گونه‌هایی که توانایی حفظ و افزایش تنوع و تراکم میکروارگانیزم‌ها را دارند، اهمیت زیادی دارد. بوته

Reference

- Ahmadi, J., Farzam, M. & Lakzian, A., 2016. Investigation of the effect of plant growth forms in semi-steppe rangelands on the level of symbiosis with mycorrhizal fungi. The 3rd Scientific Research Congress on the Development and Promotion of Agricultural Sciences, Natural Resources, and the Environment of Iran.
- Aladdin Vand, A., 2021 Factors affecting rangeland degradation and identification of conservation strategies. Spatial Research Studies, 4(90): 71–90.
- Alguacil, M. M., Roldán, A. & Torres, M. P., 2009 Complexity of semiarid gypsophilous shrub communities mediates the AMF biodiversity at the plant species level. Microbial Ecology, 57, 718-727. <https://doi.org/10.1007/s00248-008-9438-z>
- Al-Maliki, S. & Al-Masoudi, M., 2018. Interactions between Mycorrhizal fungi, tea wastes, and algal biomass affecting the microbial community, soil structure, and alleviating of salinity stress in corn yield (*Zea mays* L.). Plants, 7(3): 63. <https://doi.org/10.3390/plants7030063>
- Arayne, M. S., Sultana, N. & Bahadur, S. S., 2007. The berberis story: *Berberis vulgaris* in therapeutics. Pakistan journal of pharmaceutical sciences, 20(1): 83-92.
- Asili, J., Emami, S. A., Rahimizadeh, M., Fazly-Bazzaz, B. S. & Hassanzadeh, M. K., 2010. Chemical and antimicrobial studies of *Juniperus sabina* L. and *Juniperus foetidissima* Willd. essential oils. Journal of Essential Oil-Bearing Plants, 13(1), 25-36. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2010.10643787>
- Averill, C., Bhatnagar, J. M., Dietze, M. C., Pearse, W. D. & Kivlin, S. N., 2019. Global imprint of mycorrhizal fungi on whole-plant nutrient economics. Proceedings of the National Academy of Sciences, 116(46): 23163-23168. <https://doi.org/10.1073/pnas.1906655116>
- Becchetti, T., George, M., McDougald, N., Dudley, D., Connor, M., Flavel, D. & Markegard, G., 2016. Rangeland Management Series: Annual Range Forage Production. <https://doi.org/10.3733/ucanr.8018>.
- Casanova-Katny, M. A., Torres-Mellado, G. A., Palfner, G. & Cavieres, L. A., 2011. The best for the guest: high Andean nurse cushions of *Azorella madreporica* enhance arbuscular mycorrhizal status in associated plant species. Mycorrhiza, 21, 613-622. <https://doi.org/10.1007/s00572-011-0367-1>.
- Elfstrand, M., Feddermann, N., Ineichen, K., Nagaraj, V. J., Wiemken, A., Boller, T. & Salzer, P., 2005. Ectopic expression of the mycorrhiza-specific chitinase gene Mtchit 3-3 in *Medicago truncatula* root-organ cultures stimulates spore germination of glomalean fungi. New phytologist, 167(2): 557-570. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01397.x>.
- Eom, A. H., Hartnett, D. C. & Wilson, G. W., 2000. Host plant species effects on arbuscular mycorrhizal fungal communities in tallgrass prairie. Oecologia, 122, 435-444.
- Erfanzadeh, R., Shayesteh Palaye, A. A. & Ghelichnia, H., 2020. Shrub effects on germinable soil seed bank in overgrazed rangelands. Plant Ecology & Diversity, 13(2): 199-208. <https://doi.org/10.1080/17550874.2020.1718233>
- Ficano, N., Porder, S. & McCulloch, L. A., 2021. Tripartite legume-rhizobia-mycorrhizae relationship is influenced by light and soil nitrogen in Neotropical canopy gaps. Ecology, 102(11), e03489. <https://doi.org/10.1002/ecy.3489>.
- Garbole, J. & Teklu, B., 2024. Woody species' carbon sequestration and soil seed bank conservation potentials of traditional rangeland management strategies in Western Guji, Southern Ethiopia. Environmental and Sustainability

- Indicators, 23, 100459.
<https://doi.org/10.1016/j.indic.2024.100459>.
- Gerdemann, J. W. & Nicolson, T. H., 1963. Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving & decanting. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(63\)80079-0](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(63)80079-0).
 - Gholamalizadeh Ahangar, A., Kermani Zadeh, B., Sabbagh, S. & Sirous Mehr, A., 2014. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi and organic fertilizers on the yield and yield components of two wheat cultivars. *Water and Soil*, 4, 795-803.
 - Ghorbani Sini, Z., Talebi, M., Bahar, M. & Zakieh Ghorbani Sini., 2011. Identification of rhizobial isolates containing specific genes effective in competition and symbiotic efficiency with legumes using specific primers. The 7th Biotechnology Congress of the Islamic Republic of Iran
 - Guisande-Collazo, A., González, L. & Souza-Alonso, P., 2016. Impact of an invasive nitrogen-fixing tree on arbuscular mycorrhizal fungi and the development of native species. *AoB Plants*, 8, plw018. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plw018>.
 - Hatami, N., Bazgiri, A., Sedaghaty, A. & Darvishnia, M., 2019. Morphological and phylogenetic study of arbuscular mycorrhizal fungi symbiotic with the roots of some medicinal plants. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 12(1). <https://doi.org/10.22108/BJM.2020.120148.1242>.
 - Jenkins, W. R. B., 1964. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil.
 - Johnson, J. M., Houngnandan, P., Kane, A., Chatagnier, O., Sanon, K. B., Neyra, M. & van Tuinen, D., 2016. Colonization and molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi associated with the rhizosphere of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) in Benin (West Africa): an exploratory study. *Annals of Microbiology*, 66, 207-221. <https://doi.org/10.1007/s13213-015-1097-y>.
 - Khaleghi, P., 1998. Characteristics of Hyrcanian forests. Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran.
 - Lee, D.H., Jeong, H.S., Lee, J.H., Kim, T.E., Lee, J., Kim, I.S., 2008. Real-time PCR for quantitative detection of bovine herpesvirus type 1. *Korean Journal of Microbiology*, 44(1), 14–21.
 - Lee, J., Park, S. H. & Eom, A. H., 2006. Molecular identification of arbuscular mycorrhizal fungal spores collected in Korea. *Mycobiology*, 34(1), 7-13. <https://doi.org/10.4489/MYCO.2006.34.1.007>
 - Mahdhi, M., Tounekti, T., Al-Turki, T. A. & Khemira, H., 2017. Composition of the root mycorrhizal community associated with *Coffea arabica* in Fiza Mountains (Jazan region, Saudi Arabia). *Journal of Basic Microbiology*, 57(8): 691-698. <https://doi.org/10.1002/jobm.201700075>
 - Majd, A., Mehrabian, S., Mostafai, H. & Rahmani, H., 2008. Antioxidant and anticancer effect of aqueous extract of *Berberis integerrima*. *Journal of Biological Sciences*, 1, 31-38.
 - Martínez-García, L. B. & Pugnaire, F. I., 2011. Arbuscular mycorrhizal fungi host preference and site effects in two plant species in a semiarid environment. *Applied Soil Ecology*, 48(3), 313-317. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.04.003>.
 - Martínez-García, L. B., Armas, C., de Dios Miranda, J., Padilla, F. M. & Pugnaire, F. I., 2011. Shrubs influence arbuscular mycorrhizal fungi communities in a semi-arid environment. *Soil Biology and Biochemistry*, 43(3): 682-689. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.12.006>
 - Menge, J. A., Steirle, D., Bagyaraj, D. J., Johnson, E. L. V., & Leonard, R. T., 1978. Phosphorus concentrations in plants responsible for inhibition of mycorrhizal infection. *New Phytologist*, 80(3): 575-578, <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1978.tb01589.x>.
 - Mosbah, M., Philippe, D. L. & Mohamed, M., 2018. Molecular identification of arbuscular mycorrhizal fungal spores associated to the rhizosphere of *Retama raetam* in Tunisia. *Soil Science and Plant Nutrition*, 64(3): 335-341. <https://doi.org/10.1080/00380768.2018.1431012>.
 - Ogoma, B. O., Omondi, S. F., Ngaira, J. & Kimani, J. W., 2021. Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) associated with *Carissa edulis*, an Endangered Plant Species along Lake Victoria Basin of Kenya. *International Journal of Forestry Research*, 2021(1): 7792282. <https://doi.org/10.1155/2021/7792282>.
 - Öpik, M., Metsis, M., Daniell, T. J., Zobel, M. & Moora, M. J. N. P., 2009. Large-scale parallel 454 sequencing reveals host ecological group specificity of arbuscular mycorrhizal fungi in a boreonemoral forest. *New Phytologist*, 184(2): 424-437. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02920.x>.
 - Pan, L., Zhou, T., Chen, C., Xu, H. & Wang, W., 2024. Phytochemistry, Pharmacology, and Traditional Medicine Applications of *Juniperus sabina* L.: A Comprehensive Overview. *Molecules*, 29(24): 5876. <https://doi.org/10.3390/molecules29245876>
 - Phillips, J. M. & Hayman, D. S., 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid

- assessment of infection. Transactions of the British Mycological Society, 55(1): 158-IN18.
- Pouryousef, H., Hemmat, J. & Vaezi, M., 2017. Comparison of molecular and morphological methods in studying the symbiosis of arbuscular mycorrhizal fungi in saffron (*Crocus sativus* L.). Scientific-Research Quarterly of Microorganism Biology, 7(26): 1-10. <https://doi.org/10.22108/bjm.2017.105754.1074>.
 - Rini, M.V., Yelli, F., Tambunan, D.L. and Damayanti, I., 2021. Morphological and molecular identifications of three native arbuscular mycorrhizal fungi isolated from the rhizosphere of *Elaeis guineensis* and *Jatropha curcas* in Indonesia. Biodiversitas Journal of Biological Diversity, 22(11). <https://doi.org/10.13057/biodiv/d221128>.
 - Rodriguez, A., Clapp, J. P., Robinson, L. & Dodd, J. C., 2005. Studies on the diversity of the distinct phylogenetic lineage encompassing *Glomus claroideum* and *Glomus etunicatum*. Mycorrhiza, 15, 33-46. <https://doi.org/10.1007/s00572-003-0291-0>
 - Ross, J. P., 1980. Effect of nontreated field soil on sporulation of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with soybean. Phytopathology, 70(12): 1200-1205.
 - Saia, S. & Jansa, J., 2022. Arbuscular mycorrhizal fungi: the bridge between plants, soils, and humans. Frontiers in Plant Science, 13, 875958. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.875958>
 - Shayesteh Palay, A. A., Erfanzadeh, R. & Gholichnia, H., 2017. The effect of *Berberis integerrima* shrub canopy on the diversity and density of the soil seed bank. The First National Conference on Conservation and Protection of Arasbaran Forests.
 - Sizonenko, T. A., Dubrovskiy, Y. A. & Novakovskiy, A. B., 2020. Changes in mycorrhizal status and type in plant communities along altitudinal and ecological gradients—a case study from the Northern Urals (Russia). Mycorrhiza, 30(4): 445-454. <https://doi.org/10.1007/s00572-020-00961-z>.
 - Smith, S. E. & Read, D. J., 2010. Mycorrhizal symbiosis. Academic Press.
 - Smith, S. E., Christophersen, H. M., Pope, S., & Smith, F. A., 2010. Arsenic uptake and toxicity in plants: integrating mycorrhizal influences. Plant and Soil, 327, 1-21. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0089-8>.
 - Tamartash, R., Yousefian, M., Tatian, M. R., & Ehsani, M., 2010. Vegetation analysis in rangelands of Lasem, Iran. Agriculture and Environment Science, 7, 397-401.
 - Torrecillas, E., Alguacil, M. M., & Roldán, A., 2012. Host preferences of arbuscular mycorrhizal fungi colonizing annual herbaceous plant species in semiarid Mediterranean prairies. Applied and Environmental Microbiology, 78(17): 6180-6186. <https://doi.org/10.1128/AEM.01287-12>.
 - van de Voorde, T. F., van der Putten, W. H., Gamper, H. A., Hol, W. G., & Bezemer, T. M., 2010. Comparing arbuscular mycorrhizal communities of individual plants in a grassland biodiversity experiment. New Phytologist, 746-754. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03216.x>
 - van Der Heijden, M. G., Martin, F. M., Selosse, M. A., & Sanders, I. R., 2015. Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. New Phytologist, 205(4), 1406-1423. <https://doi.org/10.1111/nph.13288>.
 - Velázquez, M. S., Cabello, M. N., & Barrera, M., 2013. Composition and structure of arbuscular-mycorrhizal communities in El Palmar National Park, Argentina. Mycologia, 105(3): 509-520. <https://doi.org/10.3852/11-353>.
 - Wang, M. & Jiang, P., 2015. Colonization and diversity of AM fungi by morphological analysis on medicinal plants in southeast China. The Scientific World Journal, 2015(1): 753842. <https://doi.org/10.1155/2015/753842>.
 - Wei, Y., Chen, Z., Wu, F., Hou, H., Li, J., Shangguan, Y. & Zeng, Q., 2015. Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi at a large-scale antimony mining area in southern China. Journal of Environmental Sciences, 29, 18-26. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2014.10.002>.
 - Wilkes, T. I., 2021. Arbuscular mycorrhizal fungi in agriculture. Encyclopedia, 1(4): 1132-1154. <https://doi.org/10.3390/encyclopedia1040085>
 - Zhou, J., Sun, T., Shi, L., Kurganova, I., de Gerenyu, V. L., Kalinina, O. & Kuzyakov, Y., 2023. Organic carbon accumulation and microbial activities in arable soils after abandonment: A chronosequence study. Geoderma, 435, 116496. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2023.116496>