مقاله مروری

فصلنامه انسان و محیط زیست، شماره ۶۱، تابستان ۱۴۰۱ صص ۱۹-۲۳

گلومالین تولیدی توسط قارچ‌های آربوسکولار مایکوریزا؛ مولکول کلیدی در تثبیت فلزهای سمی در خاک آلوده

الهام ملک زاده[۱]

malekzadeh.elham@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۱/۲۴ **تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۶/۰۳**

چکیده

زمینه و هدف: در دهه‌های اخیر، آلودگی محیط‌زیست، به‌ویژه خاک به فلزهای سمی در سطح جهانی افزایش چشمگیری داشته است. ورود فلزهای سمی به خاک از منابع مختلف، تهدیدی همیشگی و جدی برای سلامت گیاهان، جانوران و جوامع انسانی است. زیست‌پالایی با به‌کارگیری میکروارگانیسم‌های مفید خاکزی باعث افزایش راندمان پالایش مناطق آلوده به فلز می‌گردد و جایگزین مناسبی برای روش‌های پالایش فیزیکوشیمیایی شناخته‌شده می‌باشد.

روش بررسی: قارچ‌های آربوسکولار مایکوریزا (AM) در اکوسیستم‌های مختلف دنیا از جمله در خاک‌های آلوده به فلزهای سمی حضور دارند. این قارچ‌ها توسط مکانیسم‌های مختلفی فلزهای سمی را در اندام‌های قارچی درون و برون ریشه‌ای غیرپویا کرده و علاوه بر کاهش اثر سمی فلزها بر گیاه میزبان، از ورود آن به زنجیره‌های غذایی بالاتر ممانعت به‌عمل می‌آورند. مقاله حاضر، به نقش گلومالین به‌عنوان مولکول مهم دیواره سلولی اسپور و هیف‌های قارچ AM در خاک‌های آلوده به فلزات سمی پرداخته است.

یافته‌ها: نتایج نشان داد، گلومالین به‌عنوان محصول اختصاصی قارچ‌های AM، در نقش یک پروتئین شوک حرارتی و نیز ترکیب عمده و اصلی در دیواره هیف و اسپورها حضور دارد.

نتیجه‌گیری: گلومالین از طریق کاهش خطر سمیت و قابلیت دسترسی زیستی فلزها برای گیاهان و سایر موجودات، در حفظ و ارتقای سلامت خاک نقش مهم و کلیدی ایفا می‌کند.

کلیدواژه‌ها: سلامت خاک، زیست‌پالایی، کمپلکس گلومالین- فلز، همزیستی مایکوریزی

۱- استادیار گروه مهندسی علوم خاک، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

Human and Environment, No. 61, Summer 2022, pp.19-23

Glomalin Produced by Arbuscular Mycorrhizal Fungi; A Key Molecule in the Sequestration of Toxic Metals in the Contaminated Soil

Elham Malekzadeh[1]

malekzadeh.elham@gmail.com

Received: April 13, 2019 **Accepted: August 25, 2019**

Abstract

Aim and scope: In the last few decades, contamination of the environment especially the soil by toxic metals has been increased extremely at worldwide. Entrance of toxic metals into the soil from various sources is a constant and serious threat to the health of plants, animals and human societies. Bioremediation by using of the beneficial soil microorganisms improves the remediation efficiency of the metal contaminated areas and is a suitable alternative method for substitution of current physico-chemical strategies.

Methodology: Arbuscular mycorrhizal (AM) fungi are found in virtually all ecosystems worldwide, including in soil contaminated with toxic metals. AM fungi sequestrate toxic metals at fungal intra- and extracellular structures by different mechanisms, so in addition to reduce their toxic effects on host plant prevent from their entrance in the food chain. This study has been addressed the role of glomalin as an important molecule of the cell wall of AM fungi spores and hyphae in soils contaminated by toxic metals.

Finding: The results showed that glomalin as a specific product of AM fungi, is present in the role of a heat shock protein as well a critical and main component of spores and hyphal cell wall.

Conclusion: Glomalin plays an essential and key role in maintaining and improving the soil health by reducing toxicity and availability of metals for symbiotic partner of AM fungi and other organisms.

Keywords: Soil health, Bioremediation, Glomalin-metal complex, Mycorrhizal symbiosis

1- Assistant Professor, Department of Soil Science Engineering, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

مقدمه

آلودگی خاک به فلزهای سمی ناشی از فعالیت‌های صنعتی و معدن‌کاوی، توسعه تکنولوژی، کاربرد نامناسب کودهای شیمیایی و لجن‌های فاضلاب در زمین‌های کشاورزی و عدم تجزیه زیستی آن‌ها و تجمع‌پذیری در بدن موجودات زنده، تهدیدی جدی برای محیط‌زیست و سلامت عمومی ایجاد نموده است (۱). مواجه با فلزهای سمی سبب اختلال در عملکرد سیستم عصبی، نارسایی ریوی و کلیوی، سمیت کبدی و سرطان‌زایی می‌گردد. این فلزها از طریق کانال‌های انتقال فعال جذب سیستم بدن موجود زنده می‌شوند و در فعالیت‌های آنزیمی و تعادل بار مولکول‌های زیستی[1] نظیر پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک اختلال ایجاد می‌کنند (۲). بر این اساس فلزهای سمی سرب، کروم، آرسنیک، روی، کادمیوم، مس، جیوه و نیکل در فهرست فراوان‌ترین فلزهای سمی مناطق آلوده قرار دارند (۳). بنابراین، یافتن راه‌کارهایی برای پالایش، کنترل و کاهش اثرهای سمی این آلاینده‌های خطرناک ضرورتی انکار نشدنی است. از روش‌های کاهش اثرهای زیانبار فلزهای سمی و جلوگیری از ورود آن‌ها به چرخه تغذیه‌ای از محل خاک، غیرپویایی آن‌ها در خاک و ریشه گیاهان به کمک فناوری زیست‌پالایی گیاه-میکروارگانیسم می‌باشد. این روش، درجا، پایدار، کم‌هزینه و دوست‌دار محیط‌زیست بوده، همچنین ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی خاک در راستای باروری و حاصل‌دهی حفظ می‌گردد (۴). در پژوهش‌های متعددی، نقش قارچ‌های آربوسکولار مایکوریزا (AM[2]) در تثبیت فلزهای سمی داخل هیف‌های درون و برون ریشه‌ای و سمیت‌زدایی آن‌ها گزارش شده است (۵ و ۶). قارچ‌های AM از راه تامین آب و عناصر غذایی به‌ویژه فسفر و عناصر کم‌تحرکی مانند روی و مس به استقرار گیاه در خاک کمک کرده و با سازوکارهای گوناگون، شرکای زیستی خود را از انواع تنش‌های زیستی و غیرزیستی محافظت می‌کنند (۷). قارچ‌های AM با اندوزش فلزهای سمی در هیف‌های درون و برون ریشه‌ای می‌توانند سمیت آن‌ها را تعدیل کنند. این سازوکارها شامل تثبیت فلزهای سمی توسط تراوش‌های قارچی در رایزوسفر، رسوب در گرانول‌های پلی‌فسفات، واکوئل‌ها و وزیکول‌ها، جذب سطحی روی دیواره یاخته‌ای اندام‌های قارچی به‌واسطه حضور کیتین، ملانین، گلوکان و مانان و/یا کی‌لیت کردن در اندام‌های قارچی توسط حضور گلیکوپروتئین گلومالین می‌باشند (۷). تثبیت فلزی در ریشه‌های مایکوریزی و اندوزش ترجیحی بیشتر آن‌ها در ساختارهای قارچی هیف‌های درون ریشه‌ای نسبت به یاخته‌های ریشه در پژوهش‌های مکان‌یابی فلزها در ریشه‌های گیاهان مایکوریزی توسط روش‌های اسپکتروسکوپی تأیید شده است (۶). گلومالین، گلیکوپروتئین اختصاصی قارچ‌های AM می باشد (۸) که برخی پژوهش‌ها نقش آن را بعد از رهاسازی از اندام‌های قارچی در خاک، در غیرپویایی فلزهای سمی گزارش کرده‌اند (۹، ۱۰ و ۱۱). اما پژوهش‌های محدودی درباره نقش اصلی گلومالین در گیاه همزیست با قارچ‌های AM در مواجه با فلزهای سمی وجود دارد. با توجه به طول ده تا صد برابری هیف‌های برون ریشه‌ای در مقایسه با طول ریشه گیاه و قابلیت دسترسی به حجم وسیعی از خاک و نیز به‌واسطه حضور گلومالین در اسپور و هیف‌های قارچ AM، هدف این مطالعه بررسی نقش این گلیکوپروتئین در حفاظت از قارچ و گیاه میزبان از غلظت‌های سمی آلاینده‌های فلزی و قابلیت آن در تثبیت فلزهای سمی در میسلیوم‌های قارچی و نقش آن در فرآیند زیست پالایی می‌باشد.

روش‌ها

اندازه‌گیری گلومالین

گلومالین معمولا به‌وسیله دو روش پروتئین کل واکنش‌پذیر بردفورد (BRTP[3]) و الایزا (ELISA[4]) اندازه‌گیری می‌شود. در

1- Charge balancing of macromolecules
2- Arbuscular mycorrhizal (AM) fungi
3- Bradford reactive total protein
4- Enzyme-linked immunosorbent assay

این روش عصاره استخراجی حاوی گلومالین، با معرف رنگی کوماسی برلیانت بلو واکنش می‌دهد و معمولا پس از پنج دقیقه، جذب در طول موج ۵۹۵ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر قرائت می‌گردد. غلظت گلومالین با استفاده از منحنی استاندارد تهیه شده توسط سرم آلبومین گاوی تعیین می‌گردد. سنجش پروتئین کل واکنش‌پذیر بردفورد روش عمومی برای اندازه‌گیری کل پروتئین‌هاست. دقیق‌ترین و اختصاصی‌ترین روش تشخیص و شناسایی گلومالین تاکنون، استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال 32B11 تهیه شده بر علیه اسپورهای خرده شده قارچ *Glomus intraradices* FL208 (به نام جدید *Rhizophagus intraradices* FL208) بوده است (۸). زیرا علی‌رغم تلاش‌های پژوهشگران، ساختار بیوشیمیایی گلومالین هنوز کاملا شناخته نشده است و گلومالین خالص جهت تهیه مستقیم آنتی‌بادی بر علیه آن، خالص‌سازی نشده است.

جهت استخراج گلومالین کل، معمولا از بافر قلیایی سیترات سدیم ۵۰ میلی‌مولار (pH=۸) به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و طی چند سیکل اتوکلاو استفاده می‌گردد (۸ و ۱۲). برای اندازه‌گیری گلومالین در عصاره استخراجی، ۵۰ میکرولیتر از عصاره داخل میکروپلیت‌های U شکل از جنس پلی‌وینیل کلراید ریخته و به مدت یک شب در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری می‌شود. در مرحله دوم، از شیر خشک بدون چربی به مدت ۱۵ دقیقه برای بلوکه کردن نواحی فاقد پروتئین در چاهک میکروپلیت استفاده می‌شود. سپس نمونه‌ها با افزودن آنتی‌بادی مونوکلونال 32B11 به مدت یک ساعت گرماگذاری می‌شوند. بعد از اتمام زمان، چاهک‌ها سه بار با بافر شستشو (حاوی بافر PBS[1] و توئین ۲۰)، شسته می‌شوند. در مرحله بعد، برای آشکار کردن آنتی‌بادی مونوکلونال متصل به گلومالین از کونژوگه آنزیمی (آنتی‌بادی ثانویه) ضد آنتی‌بادی اولیه استفاده می‌شود. بعد از یک ساعت انکوباسیون، و چندین بار شستشو توسط بافر شستشو، از سوبسترای آنزیم متصل به کونژوگه جهت تولید رنگ استفاده می‌شود. شدت رنگ تولیدی (OD) در طول موج مشخص (بر حسب نانومتر) توسط دستگاه میکروپلیت ریدر[2] (الایزا ریدر) قرائت می‌گردد. جهت تعیین غلظت گلومالین از منحنی استاندارد در محدوده غلظت ۰/۰۰۵ تا ۰/۰۴ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره استفاده می شود (۲ و ۸)

اندازه‌گیری فلز سمی تثبیت شده توسط گلومالین

برای این منظور، گلومالین با کاهش pH عصاره استخراجی به محدود ۲-۲/۵ رسوب داده می‌شود. بعد از سانتریفوژ و هماوری گلومالین، بخش رسوبی در هیدروکسید سدیم ۰/۱ نرمال حل می‌گردد و پس از دیالیز در برابر آب دیونیزه، مجددا سانتریفوژ می‌گردد (۱۳). گلومالین رسوبی با اسید نیتریک غلیظ هضم می‌گردد و مقدار فلز سمی کمپلکس‌شده با آن با استفاده از دستگاه جذب اتمی قرائت می‌گردد (۹).

نتایج و بحث

نتایج پژوهش‌ها نشان داده است، تولید گلومالین تحت شرایط آلودگی به فلزهای سمی و سایر تنش‌ها افزایش پیدا می‌کند (۲ و ۱۴). ملک‌زاده و همکاران (۲۰۱۶) تاثیر غلظت‌های مختلف فلزهای سمی کادمیوم و سرب را در شرایط کشت گلخانه‌ای و درون شیشه‌ای بر مقدار گلومالین تولیدی توسط قارچ مایکوریزی *Rhizophagus irregularis* بررسی کردند. نتایج آن‌ها نشان داد، مقدار گلومالین تولید شده توسط قارچ AM با افزایش غلظت کادمیوم و سرب در هر دو آزمون گلخانه‌ای و درون شیشه‌ای افزایش یافت (۱۵ و ۱۶). ریلیگ و استینبرگ (۲۰۰۲) گزارش کردند، در شرایط نامساعد قارچ‌های AM ممکن است مقادیر قابل توجهی از کربن مورد نیاز برای رشد میسلیوم‌ها را به تولید گلومالین اختصاص دهند. افزایش تولید گلومالین در میسلیوم‌های قارچی با افزایش غلظت فلزهای سمی می‌تواند بیانگر نقش حفاظتی این پروتئین در برابر اثرهای سمیت فلزی باشد (۱۷). گاکار و ریلیک (۲۰۰۶) در مطالعات اولیه در سطح

1- Phosphate buffered saline

2- Micoplate-Reader

ژن، باند واکنش‌پذیر با آنتی‌بادی مونوکلونال 32B11 را در کشت درون شیشه‌ای قارچ مایکوریزی *Glomus intraradices* جداسازی و توالی‌یابی کردند، نتایج بیشترین شباهت توالی اسید آمینه‌ای را به پروتئین‌های شوک حرارتی ۶۰ نشان داد. بنابراین این فرضیه که گلومالین نوعی پروتئین القایی تنش می‌باشد و نقش اولیه و اصلی آن در حفاظت از قارچ و گیاه همزیست در شرایط تنش می‌باشد را تقویت کرد (۱۴). پس نقش گلومالین در پایداری خاکدانه‌ها و بهبود ساختمان خاک و جایگاه آن به‌عنوان منبع ذخیره کربن و نیتروژن دارای اهمیت ثانویه خواهد بود (۸ و ۱۸). پروتئین‌های شوک حرارتی به‌واسطه فعالیت چاپرونی از تغییر شکل پروتئین‌های ضروری و مهم مسیرهای متابولیکی حیاتی با افزایش بیان در تنش‌های بیوفیزیکوشیمیایی جلوگیری می کنند (۱۹). همچنین گاکار و ریلیگ (۲۰۰۶) گزارش کردند که محل اصلی بیان گلومالین در میسلیوم‌های قارچ مایکوریزی است (۱۴). پورین و ریلیگ (۲۰۰۸) نیز با استفاده از میکروسکوپی پراش الکترون، موقعیت سلولی گلومالین را در نمونه‌های تیمارشده با آنتی‌بادی مونوکلونال 32B11 مورد بررسی قرار دادند، آن‌ها واکنش‌پذیری با آنتی‌بادی را در دیواره هیف و اسپورها بیشتر از سیتوپلاسم مشاهده کردند. بنابراین، استدلال کردند که گلومالین تولیدی توسط قارچ‌های AM نقش حفاظتی داشته و نقش‌های کارکردی گلومالین در خاک به‌عنوان نقش ثانویه بوده و به‌طور ضمنی روی می‌دهد (۲۰). قابل تصور است که گلومالین سازوکار حفاظتی در افزایش بردباری و زنده‌مانی گیاهان مایکوریزی در شرایط تنش فلزی باشد، چون که قارچ AM بسیاری از منابع کربن و نیتروژنی خود را به تولید گلومالین اختصاص می دهد (۱۷). به نظر می‌رسد، با توجه به ماهیت پروتئینی گلومالین، در غیرپویایی فلزهای سمی موثر باشد (۲۱). اندوزش فلزهای سمی در دیواره سلولی هیف و اسپورهای قارچ AM با استفاده از طیف‌سنجی پراش انرژی پرتو ایکس (EDS) متصل به میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)[1] تاییده شده است (۲۲ و ۲۳). گونزالز-چاوز و همکاران (۲۰۰۴)، گلومالین تولیدی توسط قارچ *Gigaspora rosea* را پس از استخراج در شرایط درون‌شیشه‌ای با محلول حاوی مس تیمار کردند، نتایج نشان داد ۲۸ میلی‌گرم مس به ازای هر میلی‌گرم گلومالین تثبیت شده است (۹). نتایج پژوهش ملک زاده و همکاران (۲۰۱۶) نیز نشان داد، کادمیوم و سرب تثبیت شد توسط گلومالین استخراج شده از میسلیوم‌های برون ریشه‌ای و ریشه‌ها در کشت گلدانی و درون‌شیشه‌ای با افزایش غلظت فلزهای سمی افزایش معنی‌داری داشت (۱۵ و ۱۶). پژوهش‌های پیشین نیز گزارش کردند، گلومالین استخراجی از خاک می‌تواند فلزهای سمی نظیر مس، کادمیوم، سرب و روی را غیرپویا کند (۹، ۱۰ و ۱۱). بنابراین، گومالین به‌دلیل حضور در دیواره هیف و اسپور قارچ‌های AM، ریشه‌های کلنیزه شده و نیز خاک در تثبیت فلزهای سمی نقش ایفا می‌کند و می‌تواند به‌عنوان مولکول موثر در غیرپویایی و سمیت‌زدایی فلزهای سمی در ریشه گیاهان مایکوریزی باشد.

نتیجه‌گیری

به نظر می‌رسد در شرایط خاک آلوده به فلزهای سمی، میلسیوم‌های قارچ AM با جذب فلزها و سکوسترسازی آن‌ها در اندام‌های قارچی، به‌ویژه از طریق تشکیل کمپلکس با گلومالین می‌توانند از انتقال آن‌ها به ریشه و اندام‌هوایی بکاهند. همچنین افزایش تولید گلومالین در شرایط تنش فلزی می‌تواند در نقش پروتئین القایی تنش سازو کار محافظت‌کننده گیاه همزیست در برابر آسیب‌های ناشی از آلاینده‌های فلزی باشد. بنابراین، یکی از راه‌کارهای عملی و دوست‌دار محیط‌زیست برای افزایش تثبیت و غیرپویایی فلزهای سمی در خاک‌های آلوده به‌کارگیری روش‌هایی است که منجر به تقویت همزیستی AM در گیاهان شود.

1- Transmission electron microscope connected to an energy dispersive X-ray spectrometer

منابع

1- Guo, H., Luo, S., Chen, L., Xiao, X., Xi, Q., Wei, W,. et al. 2010. Bioremediation of heavy metals by growing hyperaccumulaor endophytic bacterium Bacillus sp. L14. Bioresource Technology, 101(22): 8599-605.

2- Hammer, E. C., and Rillig, M. C., 2011. The Influence of different stresses on glomalin levels in an arbuscular mycorrhizal fungus- salinity increases glomalin content. PLoS One, 6(12): 1-5, 2011.

3- USEPA, 1997. Report: recent Developments for In Situ Treatment of Metals contaminated Soils, U.S. Environmental Protection Agency, Office of Solid Waste and Emergency Response.

4- Soleimani, M., Akbar, S., Hajabbasi, M. A., 2011. Enhancing Phytoremediation Efficiency in Response to Environmetal Pollution Stress. In: Vasanthaiah, H. K. N., Kambiranda, D. M., (Eds.). Plants and Environment. In Tech-Open Access Publisher, pp. 1-14.

5- Sheikh-Assadi, M., Khandan-Mirkohi, A., Alemardan, A., and Moreno-Jiménez, E., 2015. Mycorrhizal *Limonium sinuatum* (L.) mill. Enhances accumulation of lead and cadmium. International Journal of Phytoremediation, 17 (6): 556–562.

6- Wu, S., Zhang, X., Chen, B., Wu, Z., Li, T., Hu, Y., Sun, Y., and Wang, Y., 2016. Chromium immobilization by extraradical mycelium of arbuscular mycorrhiza contributes to plant chromium tolerance. Environmental and Experimental Botany, 122: 10–18.

7- Ferrol, N., Tamayo, E., and Vargas, P. 2016. The heavy metal paradox in arbuscular mycorrhizas: from mechanisms to biotechnological applications. Journal of Experimental Botany. 67 (22): 6253-6265.

8- Wright, S. F., Franke-Snyder, M., Morton, J. B., and Upadhyaya, A., 1996. Time-course study and partial characterization of a protein on hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi during active colonization of roots. Plant and Soil, 181: 193-203.

9- Gonzalez-Chavez, M. C., Carrillo-Gonzalez, R., Wright, S. F., and Nichols, K. A., 2004. The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. Environmental Pollution, 130: 317-323.

10- Cornejo, P., Meier, S., Borie, G., Rillig, M. C., and Borie, F., 2008. Glomalin-related soil protein in a Mediterranean ecosystem affected by a copper smelter and its contribution to Cu and Zn sequestration. Science of the Total Environment, 406: 154-160.

11- Vodnik, D., Grčman, H., Maček, I., van Elteren, J. T., and Kovačevič, M., 2008. The contribution of glomalin-related soil protein to Pb and Zn sequestration in polluted soil. Science of the Total Environment, 392: 130-136, 2008.

12- Rosier, C. L., Hoye, A. T., and Rillig, M. C., 2006. Glomalin-related soil protein: Assessment of current detection and qualification tools. Soil Biology and Biochemistry, 38: 2205-2211.

13- Nichols, K.A., and Wright, S.F. 2005. Comparison of glomalin and humic acid

in eight native United State soils. Soil Science. 170 (12): 985-997.

14- Gadkar, V., and Rillig, M. C., 2006. The arbuscular mycorrhizal fungal protein glomalin is a putative homolog of heat shock protein 60. FEMS Microbiology Letters, 263: 93-101.

15- Malekzadeh, E., Aliasgharzad, N., Majidi, J., Abdolalizadeh, J., Aghebati-Maleki, L., 2016 a. Contribution of glomalin to Pb sequestration by arbuscular mycorrhizal fungus in a sand culture system with clover plant. European Journal of Soil Biology, 74: 45-51.

16- Malekzadeh, E., Aliasgharzad, N., Majidi, J., Aghebati-Maleki, L., Abdolalizadeh, J., 2016 b. Cd-induced production of glomalin by arbuscular mycorrhizal fungus (Rhizophagus irregularis) as estimated by monoclonal antibody assay. Environmental Science and Pollution Research, 23: 20711-20718.

17- Rillig, M. C., and Steinberg, P. D., 2002. Glomalin production by an arbuscular mycorrhizal fungus, a mechanism of habitat modification? Soil Biology and Biochemistry, 34 (9): 1371-1374.

18- Vaidya, G. S., Rillig, M. C., and Wallander, H., 2011. The role of glomalin in soil erosion. Scientific World, 9(9): 82-85.

19- Ferreira, A. S., Totola, M. R., Kasuya, M. C. M., Araujo, E. F., and Borges, A.C., 2005. Small heat shock proteins in the development of thermotolerance in *Pisolithu* ssp. Journal of Thermal Biology, 30 (8): 595–602.

20- Purin, S., and Rillig, M. C., 2008. Immuno-cytolocalization of glomalin in the mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus Glomus intraradices. Soil Biology and Biochemistry, 40 (4): 1000-1003.

21- Gil-Cardeza, M. L., Ferri, A., Cornejo, P., and Gomez, E., 2014. Distribution of chromium species in a Cr-polluted soil: presence of Cr(III) in glomalin related protein fraction. Science of the Total Environment, 493: 828–833.

22- González-Guerrero, M., Melville, L. H., Ferrol, N., Lott, J .N. A., Azcón-Aguilar, C., and Peterson, R. L., 2008. Ultrastructural localization of heavy metals in the extraradical mycelium and spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. Canadian Journal of Microbiology, 54 (2): 103–10.

23- Nayuki, K., Chen, B., Ohtomo, R., and Kuga, Y., 2014. Cellular imaging of cadmium in resin sections of arbuscular mycorrhizas using synchrotron micro X-ray fluorescence. Microbes and Environments, 29: 60–66.