

核糖体 rDNA 序列分析在丛枝菌根真菌研究中的应用

刘灵芝^{1,2} 李培军² 巩忠强² 张玉龙^{1*}

(1. 沈阳农业大学土地与环境学院 辽宁 沈阳 110161)

(2. 中国科学院 沈阳应用生态研究所 辽宁 沈阳 110016)

摘要: 丛枝菌根真菌(AMF)是一类古老、专性活体营养的共生菌物, 尚未获得纯培养, 在一定程度上限制了人们对 AMF 的深入研究。以 DNA 分析技术为基础的分子生物学技术增加了 AMF 检测的敏感性与特异性, rDNA 序列的同源性和变化性可更真实地反映物种之间的亲缘关系及进化地位, 因而被广泛应用于 AMF 分类、鉴定、遗传、生态及物种多样性等研究中。本文简要综述了 rDNA 序列分析技术在 AMF 系统发育、分子检测及群落结构特征研究中的应用现状。

关键词: rDNA, 丛枝菌根真菌, 系统发育, 鉴定, 种群多样性

Application of rDNA Sequence Analysis in the Study of Arbuscular Mycorrhizal Fungi

LIU Ling-Zhi^{1,2} LI Pei-Jun² GONG Zhong-Qiang² ZHANG Yu-Long^{1*}

(1. Department of Land Resources and Environment, Shenyang Agriculture University, Shenyang, Liaoning 110161, China)

(2. Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang, Liaoning 110016, China)

Abstract: Arbuscular mycorrhizal fungi(AMF) are ancient, asexual, and obligate symbiotic endophytes which have not been cultured *in vitro*. So there is some limitation in the study of mycorrhizology. While the molecular technology based on DNA analysis could increase the detection sensitivity and specificity of AMF. rDNA sequence homology and variability can reveal the relationship between species and their evolution. Thus rDNA sequence analysis are widely used in the classification, identification, genetic, ecology and biodiversity of AMF. This article summarizes the rDNA sequence analysis techniques and their application in phylogeny, molecular detection and community structure of AMF in different plant vegetation.

Keywords: rDNA, Arbuscular mycorrhizal fungi, Phylogeny, Identification, Biodiversity

丛枝菌根真菌(AMF)与寄主植物根系共生后才能完成其生活史, 至今尚不能在人工培养基上进行单独培养^[1,2], 长期以来一直依据传统的形态特征进

行分类学研究。由于形态学观察难以识别不同生长发育阶段的菌根真菌, 使得该类真菌的分类鉴定具有相当的局限性, 制约着人们对菌根生理效应和作

用机制等方面的深入了解。随着分子生物学技术的发展与应用,核糖体RNA基因(rDNA)序列分析已成为AMF核酸序列研究的核心内容。因rDNA存在着广泛的保守区域,可用做引物的结合位点,同时客观存在的不同区域进化水平不同,可用于不同分类等级的研究,目前它已成为研究生物系统进化和分类的可靠参照物^[3]。用于扩增AMF rDNA不同区域的保守引物已相继设计成功,并不断用于AMF分类鉴定及物种多样性等研究中^[4,5]。本文旨在评价rDNA序列分析技术在AMF系统发育、分类鉴定及种群多样性与植物群落变化等研究中应用的可能性和价值。

1 rDNA 序列分析在丛枝菌根真菌系统发育与分类研究中的应用

rDNA序列分析通常通过聚合酶链式反应(PCR)技术实现。AMF DNA 通过改进的CTAB 法可从湿筛获得的 AMF孢子中直接提取,亦可从AMF侵染的植物根段及根围土壤中提取基因组DNA^[6,7]。选择通用或特异性引物结合巢式PCR(Nested-PCR)、半巢式LP-PCR、实时 PCR(Real time-PCR, RT-PCR)、PCR-SSCP、PCR-DGGE、RFLP、RAPD等技术分析rDNA中的 18S rDNA、25-28S rDNA或ITS序列中存在的异同点,可用于AMF的分类、鉴定、系统发育、侵染及种群多样性等方面的研究。

AMF 的 18S rDNA 小亚基(SSU)可变区域被认为具有丰富的系统进化信息,自 Simon 等 1992 年首次对 AMF18S 核糖体基因进行分析,得到第一条 DNA 序列以来,作为靶位点已被设计出一系列特异性引物用于 AMF 的分类、鉴定及多样性等分析中^[8]。在 AMF 的系统分类中,18S rDNA 序列分析发挥了重要的作用。Redecker 等通过测定球囊霉属(*Glomus*)和无梗囊霉属(*Acaulospora*)中*A. gerdemanni*、*Gl. leptotichum*、*Gl. gedemanni*、*A. trappet*、*Gl. occultum*和*Gl. brasilianum*菌株的 18S rDNA基因序列,对其进行系统分析,发现它们在进化树中的位置比球囊霉科(Glomeraceae)和无梗囊霉科(Acaulosporaceae)更接近菌根菌的起源。因此,将这些菌株归入原囊霉科(Archaeowporaceae)和类球囊霉科(Paraglomeraceae)^[9]。而 SchüSler等人基于 18S rDNA 基因序列研究结果,更为大胆地把AMF的分类地位上升到门,在真菌界建立了一个新门——

球囊菌门(Glomeromycota),并进一步提出了AMF的最新分类系统^[10]。Thorunn等在验证该分类系统时,对*Acaulospora laevis*、*Glomus caledonium*、*Gigaspora margarita*和 *Scutellospora dipurpurescens*的单孢进行了 18S rDNA、肌动蛋白及 -延长因子的扩增、测序。结果表明AMF序列与其它真菌类群相比具有较高的相似性。系统发育分析指出接合菌目是AMF的姐妹类群^[11]。在球囊霉科(Glomeraceae)唯一分支球囊霉属(*Glomus*)的系统发育研究中,Schwarzott等将来源于 30 个菌株近全长的 18S rDNA序列构建了系统发育树,发现球囊霉属并非单系群。虽然球囊霉属(*Glomus*)已划分出类球囊霉属(*Paraglomus*)和原囊霉属(*Archaeospora*),该属亦可再形成两个分支。因而提出球囊霉目(Glomerale)中属的分类单元需重新修正,除形成新的科级单元外,至少还需建立 3 个属的分类类群^[12]。而 Winther和Friedman等在研究石松属AMF系统发育关系时,对其孢子及菌丝 18S rDNA序列分析结果亦提出A型球囊霉至少可分为 4 个不同的分支^[13]。

近年来 da Silva 等应用引物 28G1 和 28G2 扩增 AMF 中 *Gigaspora*、*Glomus* 和 *Scutellospora* 菌株的 28S rDNA,系统发育分析结果与 18S rDNA 分析结果相一致,从而提出在球囊霉菌目(Glomerale)系统发生与分类研究中,28S rDNA 亦可作为良好的分子标记^[14]。

尽管 18S 与 28S rDNA在AMF分类中发挥了重要作用,考虑到 18S rDNA与 28S rDNA保守性较高,可能会低估AMF的遗传多样性,因而ITS序列分析也成为研究者关注对象。ITS序列优点在于具有高拷贝数;同时包含保守和变异序列;能根据保守序列中的变异位点设计特殊引物进行特异性扩增比较。同时真菌DNA的碱基组成具有遗传稳定性,不易受环境影响,在生活史任何阶段均可获得^[15]。Redecker 等在分析大量的真菌 5.8S rDNA序列信息时,发现AMF *S. castanea*的部分序列很可能来源于子囊菌。其它曾经被证实为菌根菌起源的ITS和 5.8S rDNA序列在*S. castanea*菌株中差异很大。他们提出扩大能够检验ITS序列的 5.8S rDNA数据库,来质疑已形成的系统发生学^[16]。

rDNA 序列分析为确定 AMF 的系统发育和亲缘关系提供了依据,但该技术尚处于不够完善的探索阶段,研究结果仍存在着分歧与争论,通过进一步研究和改进,将现代生物技术同常规形态学分类方

法相结合, 将会促进 AMF 分类鉴定工作的科学化。

2 rDNA 序列分析在丛枝菌根真菌检测中的应用

rDNA 序列分析技术在一定程度上弥补了传统方法依据表观形态特征鉴定 AMF 的不足, 通过可变区的选择、特异性引物的设计及研究方法的改进等措施, 大大方便了 AMF 的鉴定与追踪检测。

De Souza 等对巨孢囊霉属(*Gigaspora*)各种的鉴定中, 通过 DGGE 图谱分析 43 个菌株, 发现 18S rDNA 的 V3-V4 区域扩增产物不适于该属各菌株的区分, 而 V9 区域扩增产物则能很好地识别出该属的不同菌株, 该方法虽能区别不同地理区域分离获得的 *Gi. albida*、*Gi. gigantea* 和 *Gi. margaatita*, 却不适于 *Gi. rosea* 的鉴定^[17]。随后在盾巨孢囊霉属(*Scutellospora*)属内菌株鉴定中, 从 16 个菌株中区别 *S. reticulata* 菌株, 针对其 18S rDNA 的 V9 区域进行扩增, 产物经 DGGE 图谱分析后, 能很好地识别出该菌株, 从而提出 18S rDNA 基因组内多态性可被用于盾巨孢囊霉属内相近种的识别^[18]。Cornejo 等在球囊霉属(*Glomus*)菌株鉴定中, 对 *G. clarum*、*G. constrictum*、*G. coronatum*、*G. intraradices*、*G. mosseae* 和 *G. viscosum* 18S rDNA 的 NS31-AM1 区域进行 PCR-TTGE, 结果发现该区域不能有效地区别各类菌株。将 NS31-AM1 扩增产物经 NS31-GLOL 巢式 PCR-TTGE, 各菌株在 TTGE 图谱上则可观察到特征性条带, 将巢式 PCR-TTGE 技术引入不同植物根系球囊霉属菌株的检测中^[19]。

在选择引物检测 AMF 中, Clapp 等从林地获得圆叶风铃草根段和根围土壤中分离出 AMF 盾巨孢囊霉属孢子。对根段和孢子 DNA 进行 18S rDNA 扩增, 扩增前引物为通用引物 SS38 和球囊霉目特异性引物 VANS1, 反向引物为巨孢囊霉科(*Gigasporaceae*)特异性引物 VAGIGA。扩增产物经克隆测序, 发现只有以 VANS1 为前引物时, 盾巨孢囊霉属各亚群序列才可被扩增^[20]。在引物设计中, Lee J 等针对 AMF 18S rDNA 序列设计的特异性引物 AML1 和 AML2, 可扩增除菌株 *Archaeospora trappei* 外的 AMF, 而植物、子囊菌及担子菌菌株则不被扩增。与引物 NS31 和 AM1 相比, 该引物在 AMF 检测中具有更好的通用性与特异性^[21]。Gamper H 等针对 28S rDNA VI 可变区侧翼设计的扩增引物可特异性检测

Acaulospora paulinae 和 *Diversisporaceae* 中的一些菌株^[22]。Van Tuinen 设计了 *G. mosseae*(BEG12)、*G. intraradices*(LPA8)、*Gi. rosea*(BEG9) 和 *S. castanea*(BEG1) 4 种 AMF 25S rDNA 5'端 D1 和 D2 可变区特异性引物, 以真菌通用引物进行第一轮扩增, 以 4 种 AMF 特异性引物进行第二轮扩增, 检测洋葱和韭菜根系 4 种 AMF 分布情况时, 发现 *S. castanea* 和 *Gi. rosea* 数量变化与两种球囊霉属菌株存在着协同作用, 为研究植物根系内各 AMF 联合协同效应提供了理论依据^[23]。

除 18S rDNA 与 28S rDNA 外, ITS 在真菌种间存在丰富的遗传变异, 该区域的 DNA 酶切图谱以及序列分析为真菌分类、鉴定提供了又一个强有力的工具^[24]。Landwehr 等通过扩增 AMF ITS 区域, 序列分析结果再次验证匈牙利盐碱地中 *G. geosporum* 是当地优势种群, 对提高植物抗盐性具有潜力^[25]。Redecker 等研究认为, 用极少的真菌的生物量就可通过 ITS 的 PCR-RFLP 区分球囊霉目(*Glomerale*)的不同种类, 且产生的带型具有高度重复性。他们应用通用引物 ITS1 和 ITS4 分别扩增盾巨孢囊霉属、巨孢囊霉属和球囊霉属各菌株的 ITS 区域, 结果发现: 盾巨孢囊霉属、巨孢囊霉属菌株扩增片段长度约为 500 bp, 球囊霉属长度范围在 580 bp~600 bp 之间。应用限制性内切酶 *Mbo* I、*Hinf* I 和 *Taq* I 酶切扩增片段鉴定各菌株时, 限制性酶切图谱不能区分球囊霉属中 *G. manihotis* 和 *G. clarum* 菌株, 盾巨孢囊霉属、巨孢囊霉属可从限制性酶切片段图谱反映出二者的系统发生关系, 但属内菌株几乎没有差异^[26]。表明, 通用引物与特异性引物的设计在 AMF 检测中具有实际意义。

rDNA 序列分析技术在 AMF 的检测中虽然表现出一定的灵敏性与特异性, 但许多研究亦指出, 扩增引物、扩增部位如孢子、菌丝及根系及检测方法的选择都将影响着 AMF 的检测结果。因此, 检测方法的改进以及分子手段与传统形态学研究的有机结合, 将会有利于更准确、更全面地检测不同生境中 AMF 的分布。

3 rDNA 序列分析在丛枝菌根真菌群落结构特征研究中的应用

rDNA 序列分析技术可同时检测根系中多种 AMF 的存在, 在研究 AMF 多样性与植物物种的相

互影响中发挥了重要的作用。

在植物群落结构和多样性调节过程中, AMF 的广泛分布可以减弱物种之间的竞争关系, 增加生态系统的物种多样性和稳定性^[27]。DeBellis 等应用限制性酶切 18S rDNA 序列分析了 Quebec 西北部杨树、白桦树、云杉和冷杉混合林中七筋菇根系 AMF 群落特征, 发现混合林中 AMF 群落丰度与多样性均高于耕作土壤, 但低于热带林与温带湿地。不同树种根系中 AMF 群落特征则差异不大^[28]。该研究从分子角度证实了 AMF 对寄主植物共生的非专一性, 使得受感染植物的根外菌丝可进一步侵染其它毫无亲缘关系植物的根系, 从而将营养物质进行转移与分配。尽管如此, 不同植物物种对菌根的依赖关系存在着较大的差异, 这种差异则进而影响着 AMF 对不同植物物种的侵染多样性^[29,30]。Douhan 等研究常见橡树林中不同植物根系 AMF 群落组成时, 应用引物 AM1-NS31 从植物根系 DNA 中扩增其 18S rDNA 部分区域, 发现不同寄主植物根系 AMF 表现出高度种群多样性^[31]。Geue 等应用 *A. longula* 和 *G. mosseae* 特异性引物, 通过巢式 PCR 扩增 28S rDNA 5' 端区域, 以研究两种类型草地和 3 种植物(车前草、三叶草和绒毛草)根系 AMF 的分布情况。认为两株菌根真菌与植物种类在共生关系上存在着一定的选择特异性^[32]。Pivato B 等通过对 28S rDNA 5' 端序列分析结合 qPCR 技术研究粘土中 4 种苜蓿对 AMF 遗传多样性及相对丰度的影响。观察到根系中 Glomeromycetes 菌株丰度明显高于土壤, 并且部分菌株出现频率因苜蓿品种不同表现出明显差异。因此提出, 尽管菌根没有寄主专一性, 但 AMF 与植物基因型存在着相互选择性^[33]。Sykorová Z 等在根系 18S rDNA 和 ITS 序列研究中亦证实了 AMF 群落组成强烈受到寄主植物种类的影响^[34]。

寄主植物种类可影响 AMF 的多样性, 环境因素可调控植物群落变化, 在植物响应外界条件变化的同时, 与植物共生的 AMF 也自然随其发生改变。Saito 等以日本草地两种主要植物种类为研究对象, 在落叶与根系 AMF 群落关系研究中指出落叶能够影响不同植物根系 AMF 的群落结构。18S rDNA 序列分析表明, 在 *Miscanthus* 根系, 落叶明显降低 A 型球囊霉属中两个类群 *Glomus-Ac* 和 *Glomus-Ad* 对根系的侵染率, 而 *Zoysia* 根系则几乎不受落叶影响^[35]。Schechter 等应用 AMF 特异性引物扩增植物

根系 18S rDNA, 在环境胁迫下研究了 AMF 对植物的定殖与生长影响。系统发育分析表明, 极端环境中 AMF 种群与植物抗逆性之间存在着明显的相关性^[36]。Vallino 等调查了意大利北部化学污染土壤 AMF 的生存状况。通过扩增植物根系 18S rDNA, 经 RFLP 分析, 确定球囊霉属是该地区 AMF 的主要属。该方法不仅可以检测到多种 AMF 的存在, 反映 AMF 较高的种群变化, 同时揭示了覆土修复技术对 AMF 群落多样性的影响^[37]。Alguacil 则采用相同方法研究耕作方式对玉米等作物根系 AMF 多样性影响。指出耕作方式可以影响 AMF 的群落组成^[38]。

另外, 结合不同检测技术分析 rDNA 序列亦表现出良好的应用前景。例如, Mummey 等以 FLR3 和 FLR4 为引物, 应用末端限制性片段长度多态性 (T-RFLP) 分析 AMF 的 DNA 序列, 指出 28S rDNA T-RFLP 技术用于 AMF 群落的分析是可行的^[39]。杨如意等通过特异引物 U1/U2 扩增 28S rDNA 部分序列, 并对其进行 DGGE 分析, 用以研究大气 CO₂ 倍增对植物根内 AMF 群落的影响^[40]。Renker 等以一对特异性引物选择性扩增 AMF 的 ITS 区域, 应用引物 ITS5/ITS4 和所设计的特异性引物进行巢式 PCR, 扩增产物用 *AluI* 限制性酶切处理, 用以评价 5 种不同生境球囊霉目种群结构差异; 该方法亦适用于田间巨孢囊霉属菌株的检测^[41]。

4 结语

AMF 是一类起源、演化相对独立的真菌, 其专性活体共生特征在一定程度上限制了该菌分类研究的发展。随着研究手段的不断改进与更新, 新的分类系统和方法正在不断建立和完善, 基于分子生物学技术所建立的相对快速、准确的分类鉴定手段, 已成为当前的一个发展方向。

rDNA 序列分析技术与分子标记技术结合应用, 对于不能在人工合成培养基上培养的 AMF 的遗传、鉴定、系统学及多样性等研究发挥了重要的作用。其快速、灵敏、准确、耗时短等特点大大简化了研究程序, 是 AMF 研究方法的发展和革新。对于 AMF 研究, 分子生物学技术多数限于引物的设计及其在分类与鉴定中应用, 对于土壤改良、矿区植被恢复、生态保护中 AMF 特异性与通用性引物的设计、种群多样性调查、基因表达的差异检测及 AMF 对植物抗

逆性影响的分子机制的研究等方面尚需进一步探索,如植物修复中,AMF 可提高植物耐受重金属能力,其分子机制目前尚不清楚,AMF 的侵染改变了植物体或菌根哪些相关基因的表达,AMF 是否参与调控这些基因的表达,还有待于从分子水平深入研究。此外,rDNA 序列分析可检测出环境中多种 AMF 的存在,而应用分子手段对污染土壤及根系优势 AMF 的检测结果能否直接用于 AMF 菌株的筛选,在实际应用中效果如何,均需进一步验证。我们相信,随着分子生物学技术的不断发展和完善,各类新兴技术的引入,必将促进 AMF 在分类、资源、生理、生态、及应用等方面的突破性进展。

参 考 文 献

- [1] 张 英, 刘润进, 郭良栋. AM 真菌培养特性研究现状. 微生物学通报, 2002, **4**(29): 86–90.
- [2] 刘润进, 陈应龙. 菌根学. 北京: 科学出版社, 2007, p.76.
- [3] Kuang ZG, Xu Y. Application of rDNA ITS sequence on the study of fungus. *Chemistry of Life*, 2004, **24**(2): 120–122.
- [4] Appoloni S, Lekberg Y, Tercek MT, *et al.* Molecular community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi in roots of geothermal soils in yellowstone national park (USA). *Microb Ecol*, 2008, **56**(4): 649–659.
- [5] Stukenbrock EH, Rosendahl S. Development and amplification of multiple co-dominant genetic markers from single spores of arbuscular mycorrhizal fungi by nested multiplex PCR. *Fungal Genet Biol*, 2005, **42**(1): 73–80.
- [6] Ishii S, Loynachan TE. Rapid and reliable DNA extraction techniques from trypan-blue-stained mycorrhizal roots: comparison of two methods. *Mycorrhiza*, 2004, **14**(4): 271–275.
- [7] Renker C, Weissshuhn K, Kellner H, *et al.* Rationalizing molecular analysis of field-collected roots for assessing diversity of arbuscular mycorrhizal fungi: to pool, or not to pool, that is the question. *Mycorrhiza*, 2006, **16**(8): 525–531.
- [8] Simon L. Specific PCR primers for the identification of endomycorrhizal fungi. In: Clap JP(eds). *Species Diagnostics Protocols. Series: Methods in Molecular Biology* (v.50): PCR and other nucleic acid methods. Totowa, New Jersey: Humana Press, 1992, pp.187–192.
- [9] Redecker D, Morton JB, Bruns TD. Ancestral lineages of arbuscular mycorrhizal fungi(Glomales). *Mol Phylogenet Evol*, 2000, **14**(2): 276–284.
- [10] Schüßler A, Schwarzott D, Walker C. A new fungal phylum, the Glomeromycota, phylogeny and evolution. *Mycol Res*, 2001, **105**: 1413–1421.
- [11] Thorunn H, Irene J. Phylogeny of the Glomerales and Diversisporales (Fungi: Glomeromycota) from actin and elongation factor 1-alpha sequences. *FEMS Microbiology Letters*, 2003, **229**(1): 127–132.
- [12] Schwarzott D, Walker C, Schüssler A. *Glomus*, the largest genus of the arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales), is nonmonophyletic. *Mol Phylogenet Evol*, 2001, **21**(2): 190–197.
- [13] Winther JL, Friedman WE. Arbuscular mycorrhizal associations in *Lycopodiaceae*. *New Phytol*, 2008, **177**(3): 790–801.
- [14] da Silva GA, Lumini E, Maia LC, *et al.* Phylogenetic analysis of Glomeromycota by partial LSU rDNA sequences. *Mycorrhiza*, 2006, **16**(3): 183–189.
- [15] Lin JW, Que YX, Chen TS, *et al.* Application of ribosomal DNA internal transcribed spacer in fungi taxonomy. *Letters in Biotechnology*, 2007, **18**(2): 292–294.
- [16] Redecker D, Hijri M, Dulieu H, *et al.* Phylogenetic analysis of a dataset of fungal 5.8S rDNA sequences shows that highly divergent copies of internal transcribed spacers reported from *Scutellospora castanea* are of ascomycete origin. *Fungal Genet Biol*, 1999, **28**(3): 238–244.
- [17] De Souza FA, Kowalchuk GA, Leeftang P, *et al.* PCR-denaturing gradient gel electrophoresis profiling of inter and intra species 18S rRNA gene sequence heterogeneity is an accurate and sensitive method to assess species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi of the genus *Gigaspora*. *Appl Environ Microbiol*, 2004, **70**(3): 1413–1424.
- [18] De Souza FA, Declerck S, Smit E, *et al.* Morphological ontogenetic and molecular characterization of *Scutellospora reticulata*(Glomeromycota). *Mycol Res*, 2005, **109**(6): 697–706.
- [19] Cornejo P, Azcón-Aguilar C, Barea JM, *et al.* Temporal temperature gradient gel electrophoresis(TTGE) as a tool for the characterization of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiol Lett*, 2004, **241**(2): 265–270.
- [20] Clapp JP, Fitter AH, Young JP. Ribosomal small subunit sequence variation within spores of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Scutellospora* sp.. *Mol Ecol*, 1999, **8**(6): 915–921.
- [21] Lee J, Lee S, Young JP. Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiol Ecol*, 2008, **65**(2): 339–349.
- [22] Gamper H, Leuchtmann A. Taxon-specific PCR primers to detect two inconspicuous arbuscular mycorrhizal fungi from temperate agricultural grassland. *Mycorrhiza*, 2007, **17**(2): 145–152.
- [23] Van Tuinen D, Jacquot E, Zhao B, *et al.* Characterization of root colonization profiles by a microcosm community of arbuscular mycorrhizal fungi using 25S rDNA-targeted nested PCR. *Mol Ecol*, 1998, **7**(7): 879–887.

- [24] Mervyn S, Linh N, Megan E, *et al.* A method for assessing arbuscular mycorrhizal fungi group distribution in tree roots by intergenic transcribed sequence variation. *Plant and Soil*, 2007, **290**: 259–268.
- [25] Landwehr M, Hildebrandt U, Wilde P, *et al.* The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus geosporum* in European saline, sodic and gypsum soils. *Mycorrhiza*, 2002, **12**(4): 199–211.
- [26] Redecker K. Specific PCR primers to identify arbuscular mycorrhizal fungi within colonized roots. *Mycorrhiza*, 2000, **10**: 73–80.
- [27] Yamato M, Ikeda S, Iwase K. Community of arbuscular mycorrhizal fungi in a coastal vegetation on Okinawa island and effect of the isolated fungi on growth of sorghum under salt-treated conditions. *Mycorrhiza*, 2008, **18**(5): 241–249.
- [28] DeBellis T, Vidden P. Diversity of the small subunit ribosomal RNA gene of the arbuscular mycorrhizal fungi colonizing *Clintonia borealis* from a mixed-wood boreal forest. *FEMS Microbiol Ecol*, 2006, **58**(2): 225–235.
- [29] Cesaro P, van Tuinen D, Copetta A, *et al.* Preferential colonization of *Solanum tuberosum* L. roots by the fungus *Glomus intraradices* in arable soil of a potato farming area. *Appl Environ Microbiol*, 2008, **74**(18): 5776–5783.
- [30] 龙良鲲, 姚青, 羊宋贞, 等. 扩繁条件对两种AMF菌剂接种势的影响. *微生物学通报*, 2007, **34**(2): 204–207.
- [31] Douhan GW, Petersen C, Bledsoe CS, *et al.* Contrasting root associated fungi of three common oak-woodland plant species based on molecular identification: host specificity or non-specific amplification. *Mycorrhiza*, 2005, **15**(5): 365–372.
- [32] Geue H, Hock B. Determination of *Acaulospora longula* and *Glomus subgroup Aa* in plant roots from grassland using new primers against the large subunit ribosomal DNA. *Mycol Res*, 2004, **108**: 76–83.
- [33] Pivato B, Mazurier S, Lemanceau P, *et al.* Medicago species affect the community composition of arbuscular mycorrhizal fungi associated with roots. *New Phytol*, 2007, **176**(1): 197–210.
- [34] Sykorová Z, Wiemken A, Redecker D. Cooccurring *Gentiana verna* and *Gentiana acaulis* and their neighboring plants in two Swiss upper montane meadows harbor distinct arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Appl Environ Microbiol*, 2007, **73**(17): 5426–5434.
- [35] Saito K, Suyama Y, Sato S. Defoliation effects on the community structure of arbuscular mycorrhizal fungi based on 18S rDNA sequences. *Mycorrhiza*, 2004, **14**(6): 363–373.
- [36] Schechter SP, Bruns TD. Serpentine and non-serpentine ecotypes of *Collinsia sparsiflora* associate with distinct arbuscular mycorrhizal fungal assemblages. *Mol Ecol*, 2008, **17**(13): 3198–3210.
- [37] Vallino M, Massa N, Lumini E, *et al.* Assessment of arbuscular mycorrhizal fungal diversity in roots of *Solidago gigantea* growing in a polluted soil in Northern Italy. *Environ Microbiol*, 2006, **8**(6): 971–983.
- [38] Alguacil MM, Lumini E, Roldán A, *et al.* The impact of tillage practices on arbuscular mycorrhizal fungal diversity in subtropical crops. *Ecol Appl*, 2008, **18**(2): 527–536.
- [39] Mummey DL, Rillig MC. Evaluation of LSU rRNA-gene PCR primers for analysis of arbuscular mycorrhizal fungal communities via terminal restriction fragment length polymorphism analysis. *J Microbiol Methods*, 2007, **70**(1): 200–204.
- [40] Yang RY, Tang JJ, Chen X, *et al.* The effects of elevated atmospheric CO₂ on AMF community colonized in roots of various plant species. *Acta ecologica sinica*, 2006, **26**(1): 54–60.
- [41] Renker C, Heinrichs J, Kaldorf M, *et al.* Combining nested PCR and restriction digest of the internal transcribed spacer region to characterize arbuscular mycorrhizal fungi on roots from the field. *Mycorrhiza*, 2003, **13**(4): 191–198.