

Agrovoc descriptors: vesicular arbuscular mycorrhizae, symbiosis, microbial ecology, rhizosphere, plant nutrition, fungi, taxonomy, phylogeny, methods, uses

Agris category code: F40, P34

Molekulski pristopi pri raziskavah arbuskularne mikorize

Irena MAČEK¹

Received September 5, 2008; accepted October 22, 2008.
Delo je prispelo 5. septembra 2008, sprejeto 22. oktobra 2008.

IZVLEČEK

Arbuskularna mikoriza se je razvila v koevoluciji s kopenskimi rastlinami. Čeprav predstavlja eno najbolj razširjenih simbioz na kopnem, še vedno obstajajo številna odprta vprašanja o biologiji arbuskularnih mikoriznih gliv ter njihovi ekološki vlogi v različnih ekosistemih. Z razvojem molekularskih tehnik so raziskave arbuskularne mikorize dobile nove razsežnosti, omogočen pa je bil tudi boljši vpogled v procese, ki se odvijajo v rizosferi oz. širše mikorizosferi, če poleg korenin upoštevamo tudi zunajkoreninski micelij mikoriznih gliv v tleh. V prvem delu članka je predstavljen pregled novejših objav s področja raziskav arbuskularne mikorize s poudarkom na ekološkem in funkcionalnem vidiku, v drugem delu pa tudi kratek pregled metod s poudarkom na tistih, ki se uporabljajo v mikrobni ekologiji.

Ključne besede: arbuskularna mikoriza, arbuskularne mikorizne glive, simbioza, mikrobna ekologija, molekulske metode, Glomeromycota, RFLP, t-RFLP, TGGE, DGGE, PLFA

MOLECULAR APPROACHES IN RESEARCH OF ARBUSCULAR MYCORRHIZA

ABSTRACT

Arbuscular mycorrhiza coevolved with terrestrial plants. Though it is one of the most wide spread symbioses in terrestrial ecosystems a lot of questions on biology of arbuscular mycorrhizal fungi and their ecological role in different ecosystems still remain to be answered. With development of new molecular techniques novel possibilities for research of arbuscular mycorrhiza have opened, enabling new insights into processes taking place in rhizosphere or broader mycorrhizosphere, if in addition to roots, extraradical mycelium of mycorrhizal fungi is taken into consideration. In the first part of the paper a review of recent publications in the field of arbuscular mycorrhiza research is presented, with the emphasis on functional and ecological role, in the second part, a short methodological review is given, with the emphasis on methods used in microbial ecology.

Key words: arbuscular mycorrhiza, arbuscular mycorrhizal fungi, symbiosis, microbial ecology, molecular methods, Glomeromycota, RFLP, t-RFLP, TGGE, DGGE, PLFA

1 UVOD

Velika večina rastlin (vključno z gametofiti številnih mahov in praprotnic ter sporofiti večine praprotnic) v naravnem okolju živi v povezavi z mikoriznimi glivami (Smith in Read, 2008). Različni tipi mikorize so prisotni pri približno 80 % vseh kopenskih rastlinskih vrst iz 92 % družin (pri kritosemenkah 84 % vrst iz 94 % družin) (Wang in Qiu, 2006). Med njimi je najbolj razširjena arbuskularna mikoriza, saj so arbuskularne mikorizne (AM) glive koreninski endosimbionti približno 2/3 vseh kopenskih rastlin (Fitter in Moyersoen, 1996). Odnos med rastlinami in AM glivami je starodaven, star več kot 400 milijonov let.

Dokaz temu so poleg rezultatov filogenetskih raziskav tudi fosilizirane, arbuskulom in veziklom podobne strukture v plazečih rizomih ene izmed zgodnjih kopenskih rastlin *Aglaophyton major*, ki izvirajo iz devona (Simon in sod., 1993, Redecker in sod., 2002). Arbuskularna mikoriza se je torej razvijala v koevoluciji s kopenskimi rastlinami (Wang in Qiu, 2006). Gliva je s svojim ekstenzivnim zunajkoreninskim micelijem verjetno že takrat primarno vršila vlogo izboljšanja preskrbe rastlin z mineralnimi hranili, predvsem fosforjem (Brundrett, 2002), saj prve kopenske rastline še niso imele razvitih korenin.

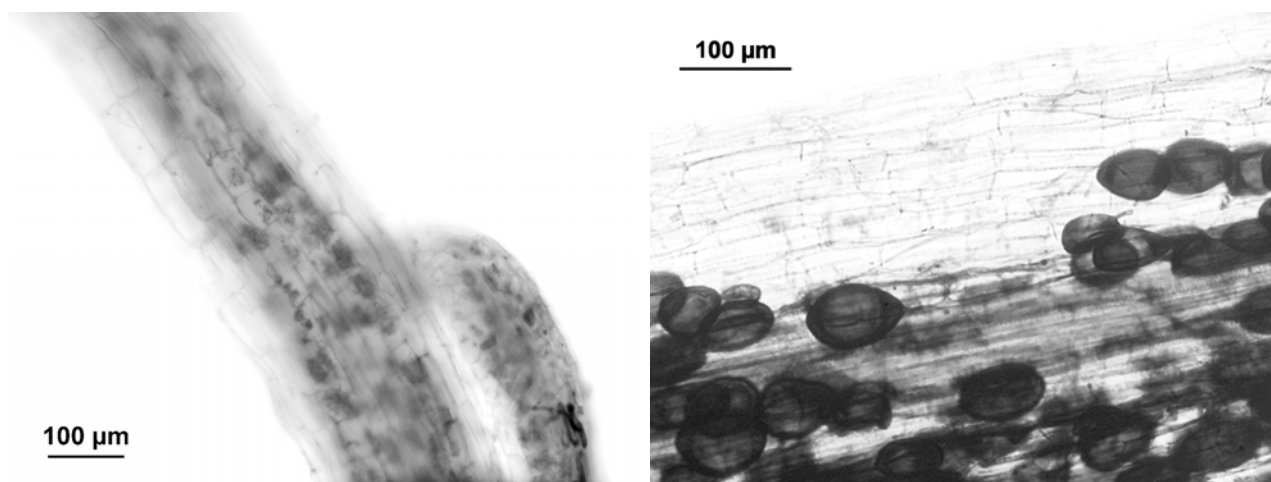
¹ Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Jamnikarjeva 101, SI-1001 Ljubljana, e-pošta: irena.macek@bf.uni-lj.si

2 EKOFIZIOLOŠKA VLOGA AM GLIV

AM glive so zelo pomembne pri kroženju hranil in ogljika v naravi, čeprav zaradi kompleksnosti in omejenega poznavanja njihova vloga v tem kontekstu pogosto ni zadosti upoštevana. Pri arbuskularni mikorizi se običajno pojavlja mutualističen tip simbioze, odnos, kjer je glivni partner energetsko povsem odvisen od gostiteljskih rastlin (biotrof), saj je preskrba glive z ogljikovimi hidrati popolnoma vezana na gostitelje. V zameno za rastlinske asimilate AM glive preskrbujejo rastline z mineralnimi hranili. Fosfatni ioni v tleh pogosto tvorijo netopne spojine z večino kationov (Al^{3+} , Fe^{3+} , Ca^{2+}) in tako postanejo za rastlinske korenine težko dostopni. Ker je fosfor v tleh zelo slabo mobilni element, pogosto predstavlja omejujoč dejavnik rasti rastlin. V nasprotju s prepričanjem izpred nekaj let, je v zadnjem času vedno več dokazov, da lahko poleg preskrbe s fosforjem AM glive vplivajo tudi na preskrbo rastlin z drugimi hranili, z mikroelementi (Cu, Zn) ter kot kaže tudi z dušikom. Z uporabo stabilnih izotopov dušika in ogljika ($^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$) so ugotovili, da lahko kolonizacija z AM glivo *Glomus hoi* obenem vpliva na

razgradnjo organske snovi v tleh ter poveča privzem dušika v rastlino iz organskega materiala (opad trav) (Hodge in sod., 2001), vendar pri teh procesih še ni poznana vloga drugih talnih mikroorganizmov pri razgradnji organskega materiala (Smith in Read, 2008). Podobno Govindarajulu in sod. (2005) poročajo o novo odkriti presnovni poti AM gliv, ki vključuje vgradnjo anorganskega dušika v aminokislino arginin znotraj zunajkoreninskega micelija in asimilacijo dušika v rastlino preko znotrajkoreninskega micelija ob razgradnji arginina. Izboljšana preskrba rastlin s hranili je najbolj izpostavljena vloga glive v mikorizi, poleg tega pa ima simbioza rastlin z AM glivami še druge pozitivne učinke (Smith in Read, 2008) kot so izboljšana preskrba rastlin z vodo, varovanje pred patogeni in boleznimi, varovanje pred škodljivimi snovmi (npr. težke kovine), dokazana pa je tudi vloga zunajkoreninskega micelija in kot kaže tudi nekaterih produktov AM gliv (npr. glomalina) pri stabilizaciji strukturnih agregatov tal (Wright in Upadhyaya, 1998) ter s tem pozitiven vpliv na strukturo in rodovitnost tal.

3 MORFOLOŠKE STRUKTURE IN NJIHOVA VLOGA PRI IZMENJAVI HRANIL



Slika 1: Kolonizacija korenin sivozelenega muhviča (*Setaria pumila*) z arbuskularnimi mikoriznimi glivami. Arbuskuli so vidni kot temnejše lise, povezane z znotrajkoreninskimi hifami (levo). Na desni sliki so predstavljeni vezikli AM gliv v koreninah travniškega mačjega repa (*Phleum pratense*). Glivne strukture so bile obarvane z barvilom tripan modro. Posneto z mikroskopom Olympus Provis AX70 in digitalno kamero Olympus DP70.

Figure 1: Arbuscular mycorrhizal colonization of *Setaria pumila* roots. Arbuscules can be seen as darker spots, connected with intraradical hyphae (left). Right, vesicles of AM fungi in roots of timothy grass (*Phleum pratense*). Fungal structures were stained with trypan blue. Photos taken by Olympus Provis AX70 microscope and digital camera Olympus DP70.

V mikoriziranih koreninah se znotraj koreninske skorje običajno izoblikujejo značilne morfološke strukture. Najbolj prepoznavni so arbuskuli (Slika 1), pri nekaterih

skupinah se namesto arbuskulov pojavljajo le zgostitve, nekakšni zvitki hif, včasih, pri okrog 80 % opisanih vrst AM gliv, pa lahko opazimo tudi vezikle (Slika 1), ki

verjetno služijo shranjevanju rezervnih snovi in v katerih pogosto opazimo oljne kapljice (zaradi občasne odsotnosti veziklov se danes ime »vezikularna arbuskularna mikoriza« opušča in vedno bolj uporablja krajši termin »arbuskularna mikoriza«). K nastanku arbuskula prispevata oba partnerja v simbiozi. Arbuskul predstavljajo fino razvejane nitke gliv (hife), ki so v neposrednem membranskem kontaktu s plazemsko membrano rastlinske celice (periarbuskularna membrana), ki se tesno prilaga oblikam razvejanih hif. S tem se ustvari zelo velika membranska površina, ki služi izmenjavi snovi med obema partnerjema. Ob nastanku arbuskula gliva penetrira celično steno rastlinske celice, ne pa tudi same plazmaleme (Hause in Fester, 2005). Gliva tako nikoli ni v neposrednem fizičnem stiku s citoplazmo rastlinske celice, čeprav se zaradi uvihanja plazemske membrane arbuskul navidezno razvije znotraj celice. Celična stena se na razvejitvah arbuskula progresivno tanjša, tako da je premer hif na končnih razvejitvah le še od 1 do 2 μm (cv. Smith in Read, 2008). Potrjeno je, da velika membranska površina arbuskula služi izmenjavi fosfatov med glivo in rastlino (Bucher, 2007), relativno malo pa je znanega o mehanizmih izmenjave drugih hranil med obema partnerjema. Obstaja več hipotez o mestih izmenjave ogljikovih hidratov med rastlinami in glivami, slednja

bi, kot poroča Fitter (2006), lahko potekala tudi v apoplastu, kjer hife rastejo med celicami koreninske skorje (intercelularno). Številne nove tehnike danes omogočajo hiter napredek in zelo ciljno raziskovanje samega simbiotskega odnosa in nove vpogleda v mehanizme izmenjave snovi na molekulskem nivoju ter potek ekspresije genov obeh partnerjev v simbiozi (Parniske, 2004, Hause in Fester, 2005, Bucher, 2007, cv. Smith in Read, 2008). Schüßler in sod. (2006) so v reviji *Nature* objavili opis prvega poznanege transporterja monosaharidov, ki deluje kot H^+ kotransporter z največjo afiniteto za glukozo, ki ji sledijo manoza, galaktoza in fruktoza. Transporter so opisali pri posebnem tipu simbioze med glivo iz debla Glomeromycota *Geosiphon pyriformis* in cianobakterijo *Nostoc punctiforme*, edino poznano tovrstno simbiozo s cianobakterijami, ki obenem tudi nakazuje na možnost še starejšega filogenetskega izvora arbuskularne simbioze (možnost obstoja simbioze s cianobakterijami še pred prehodom rastlin na kopno). V simbiotski fazi *Geosiphon* tvori posebne mehurjaste strukture, ki so funkcionalno primerljive z znotrajkoreninskimi strukturami pri arbuskularni mikorizi, vendar je v tem primeru situacija prostorsko obrnjena, saj glivno tkivo popolnoma obda celico cianobakterije (Wolf in Schüßler, 2005).

4 FILOGENIJA IN MOLEKULSKA EKOLOGIJA AM GLIV

V preteklosti so AM glive taksonomsko uvrščali v red Glomales debla Zygomycota, vendar jih danes na podlagi filogenetskih raziskav uvrščamo v povsem ločeno monofiletsko deblo Glomeromycota (Schüßler in sod., 2001), ki ga trenutno postavljajo ob bok glavnima debloma gliv Basydiomycota in Ascomycota (James in sod., 2006). Izguba arbuskularne mikorize pri rastlinah je sekundarna (Fitter in Moyersoen, 1996), vsi ostali tipi mikorize (ektomikoriza pri drevesih, orhidejska mikoriza, erikoidna mikoriza in drugi) so filogenetsko veliko mlajši, kaže pa tudi, da so se različni tipi ektomikorize in erikoidne mikorize (z izjemo orhidejske mikorize) razvili večkrat in neodvisno, v t.i. vzporedni evoluciji (Wang in Qiu, 2006, cv. Smith in Read, 2008). V primerjavi z arbuskularno mikorizo, ki je najpomembnejši tip mikorize na traviščih ter v gozdovih tropskega pasu, so drugi tipi mikorize konkurenčnejši v drugih habitatih, npr. gozdovi zmernih in hladnejših klimato, območja z večjo nadmorsko višino, rastišča, običajno revna z dušikom.

Trenutno je na podlagi morfoloških značilnosti, predvsem morfologije in barvanja spor (Slika 2), opisanih manj kot 200 vrst (morfortipov) AM gliv. AM glive tvorijo velike večjedrne spore (po ocenah, vrstno specifično vsebujejo med 800 do 35.000 jeder) premera od 40 do 500 μm , z debelo večplastno steno, ki je

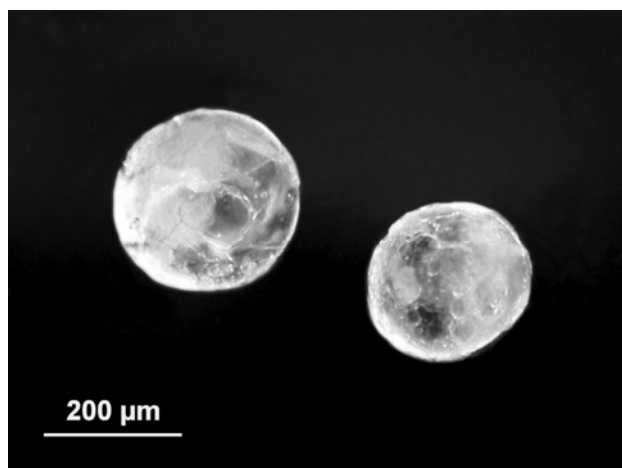
sestavljena iz hitina in v nekaterih primerih tudi $\beta(1-3)$ glukana (cv. Smith in Read, 2008). Kot kažejo novejša raziskave, so vsa jedra haploidna, kar je bilo dokazano pri vrstah *Glomus intraradices* in *G. etunicatum*, kot tudi pri vrsti *Scutelospora castanea* (cv. Smith in Read, 2008). Ni še dokazov o spolnem razmnoževanju AM gliv, genetske raziskave pa dodatno otežuje večjedrni micelij in dejstvo, da v življenjskem ciklu teh organizmov ni poznanege enojedrnega stadija. Prav tako ni znano ali so jedra znotraj posamezne spore oz. organizma genetsko identična (homokarion) ali ne (heterokarion) (Young, 2008, Rosendahl, 2008). Še več, med hifami iste vrste, predvsem istega izolata (Giovannetti in sod., 2006) se lahko tvorijo anastomoze (fizične povezave), s katerimi je vzpostavljena citoplazemska kontinuiteta, ki omogoča njihovo medsebojno povezanost in tudi migracijo dednega materiala. Biologija in evolucija AM gliv tako predstavljata vroči temi aktualnih znanstvenih polemik (Croll in sod., 2008, Rosendahl, 2008, Young, 2008).

Zaradi velike genetske raznolikosti in problematičnosti definicije taksonov v smislu biološke vrste (ni dokazov o rekombinaciji oz. spolnem razmnoževanju), se danes namesto prej morfološko določene vrste (morfortipa) vedno bolj uveljavlja termin sekvenčni tip oz. filotip, ki znotraj filogenetskega drevesa predstavlja monofiletski

grozd več sorodnih sekvenc (Rosendahl, 2008, cv. Smith in Read, 2008). Filogenija AM gliv v veliki meri temelji na 18S rDNK (SSU – mala podenota ribosoma), obstajajo pa tudi že poročila o uporabi mitohondrijske DNK (Croll in sod., 2008).

Glede na to, da so prisotnost arbuskularne mikorize potrdili pri veliki večini rastlin (80% oz. \approx 200.000 vrst, glej Uvod), bi pričakovali, da relativno majhno število (<200) opisanih vrst AM gliv kolonizira večino rastlin vrstno nespecifično. Tako se je izoblikovalo mnenje, da so AM glive taksonomsko revna skupina. V preteklosti so za taksonomsko določanje vrste AM gliv služili zgolj

morfološki znaki, ki pa se, kot kažejo novejša filogenetske raziskave, pri številnih filotipih prekrivajo. Klasični pristopi in številni lončni poskusi, ki so bili zasnovani s čistimi glivnimi inokulumi enega samega morfotipa, so domnevo o vrstno nespecifični kolonizaciji rastlin še dodatno okrepili, saj so pri raziskavah uporabljali zelo omejen nabor AM vrst, ki so kolonizirale večino gostiteljskih rastlin. Dejstvo je, da so bile raziskave omejene samo na tiste taksone gliv, ki jih je bilo sploh možno gojiti in razmnoževati v lončnih poskusih in so tam tudi sporulirale. Kot se je izkazalo kasneje, so bili to predvsem ekološki generalisti.



Slika 2: Spore AM glive vrste *Scutellospora dipurpureascens*. Celi spori, posneti v črnem polju s stereolupo Olympus SZH10 in kamero Olympus DP70 (levo). Desno, zdrobljena spora, vklopljena v PVLG. Vidna dvoplastna stena je karakteristična za ta rod. Spore vsebujejo rezervne snovi v obliki lipidov (oljne kapljice). Posneto z mikroskopom Olympus Provis AX70 in digitalno kamero.

Figure 2: Spores of AM fungus *Scutellospora dipurpureascens*. Entire spores (left). Photo was taken in dark field using Olympus SZH10 stereomicroscope and digital camera Olympus DP70. Crushed spore, mounted in PVLG (right). Genus characteristic double-layered spore wall can be seen. Spores contain lipid reserves (oil droplets). Photos taken by Olympus Provis AX70 microscope and digital camera.

Razvoj molekularnih tehnik je omogočil prehod v raziskovanje arbuskularne mikorize v naravnih ekosistemih. Z uvedbo molekularnih metod v raziskave ekologije AM gliv v okoljskih vzorcih se je kmalu potrdilo, da je dejanska slika v okolju povsem drugačna od tiste, ki je izhajala iz konvencionalnih pristopov. Že kmalu po razvoju prvih za AM glive specifičnih začetnih oligonukleotidov (primerjev) (Simon in sod., 1992, Helgason in sod., 1998, Redecker, 2007), ki so omogočili specifično namnoževanje DNK AM gliv se je namreč izkazalo, da lahko v enem samem centimetru korenine sočasno sobiva tudi do 20 različnih filotipov AM gliv in da je biološka pestrost skupine veliko večja kot lahko sklepamo zgolj na podlagi morfoloških znakov. Danes praktično z vsako raziskavo v nove habitate raziskovalci odkrivajo nove, še neregistrirane taksone AM gliv. Nekateri se pojavljajo samo v

koreninah določenih rastlinskih vrst, združba gliv pa je lahko v koreninah različnih rastlin, ki sobivajo v istem habitatu, popolnoma različna (npr. Helgason in sod., 2002, Vandenkoornhuysen in sod., 2003, Johnson in sod., 2005). Zelo malo je znanega o biogeografski razširjenosti AM gliv (Rosendahl, 2008) in o tem, kateri biotski in abiotski dejavniki okolja najbolj vplivajo na sestavo AM združb in kakšna je njihova medsebojna povezava. Rastlinska vrsta in združba lahko prestavlja biotski dejavnik okolja, ki določa katere glive se pojavljajo v katerem okolju, obstajajo pa tudi dokazi v nasprotno smer. Tudi prisotnost ali odsotnost določenih filotipov gliv lahko vpliva na sestavo rastlinske združbe (van der Heijden in sod., 1998), kar pravzaprav, glede na skupno evolucijo kopenskih rastlin in AM gliv ter njihovo tesno povezanost, sploh ni presenetljivo. Nekateri študije že kažejo, da se v agrarnih okoljih

pojavlja več generalistov (Helgason in sod., 1998), najbolj pogostih filotipov, ki so tudi na splošno med AM taksoni najbolj raziskani, saj jih je mogoče gojiti v čistih kulturah in je bilo v preteklosti z njimi izvedenih največ raziskav (npr. *Glomus intraradices*, *Glomus mossae*). Na drugi strani, v bolj specifičnih okoljih (npr. v ekstremnih habitatih – območja naravnih izvirov CO₂ v SV Sloveniji), kjer se pojavljajo močni abiotski selekcijski pritiski, dominirajo novi, prej še neregistrirani in kot kaže bolj specializirani filotipi AM gliv (Maček in sod., 2008). Genetska raznolikost AM gliv bi lahko bila pogojena tudi z njihovo funkcionalno kompleksnostjo (Fitter, 2005). Glede na to, da lahko v

zelo majhnem delu korenine sobiva več različnih filotipov gliv, je možno, da različni tipi zavzemajo različne funkcionalne niše in so funkcionalno in morfološko specializirani. Za varovanje rastline pred patogeni je tako verjetno bolj smiseln razvoj obsežnega znotrajkoreninskega micelija, medtem ko je za preskrbo rastline s hranili zelo pomemben ekstenziven zunajkoreninski micelij, ki lahko črpa hranila iz večjega volumna tal. Prav tako se preskrba rastline z vodo lahko izboljša, če je omogočen čim boljši stik korenine s strukturnimi agregati v tleh v neposredni bližini korenine, torej je pomembna stabilizacija talnih agregatov in razvoj micelija ob korenini.

5 UPORABA AM GLIV

Z novimi vpogledi v ekologijo AM gliv in njihovo kompleksnost se razvijajo tudi različne možnosti aplikacije AM gliv v kmetijsko prakso (akcija COST 870, Gosling in sod., 2006, Piotrowski in Rillig, 2008). Potencial za uporabo AM gliv je največji na območjih s sonaravnim kmetijstvom, kjer bi, ob omejeni uporabi gnojil in fitofarmaceutskih sredstev, AM glive lahko služile kot biognojilo v obliki glivnega inokuluma, inokulacija z AM glivami pa lahko izboljša tudi preživetje rastlin v stresnih razmerah (suša, onesnažena tla, obdobje po presajanju, okužbe s patogeni). Pri

konkretni izvedbi tovrstnih aplikacij predstavlja največjo težavo dejstvo, da rezultati številnih poskusov, ki so bili izvajani v kontroliranih razmerah, niso neposredno prenosljivi v okolje. Obenem je zelo malo znanega o sezonski dinamiki naravnih populacij AM gliv (Santos-Gonzalez in sod. 2007) ter njihovi sukcesiji v določenem okolju v odvisnosti od okoljskih dejavnikov (Piotrowski in Rillig, 2008), kar kaže na nujnost nadaljnjih raziskav teh tematik in ekologije arbuskularne mikorize v prihodnosti.

6 METODOLOGIJA RAZISKAV AM GLIV

6.1 Konvencionalni pristopi

Poleg novih, molekulskih tehnik se v raziskavah AM gliv še vedno ohranjajo tudi konvencionalni pristopi. Med njimi so najbolj pogosto uporabljane metode za ocenjevanje kolonizacije korenin z AM glivami (Slika 1). Pri teh metodah je korenine potrebno presvetliti z vročim KOH, čemur sledi specifično barvanje glivnih struktur znotraj korenine z barvili (npr. tripan modro, kisli fuksin, tudi navadno črnilo). Za oceno kolonizacije se največ uporabljata dve metodi: pri (1) intersekcijski metodi po Giovanetti and Mosse (1980) preštejemo vsa presečišča koloniziranih in nekoloniziranih korenin s horizontalnimi in vertikalnimi linijami centimetrske mreže na dnu petrijevke, v kateri je vzorec korenin. Za delo uporabljamo stereolupo. Na podlagi tako dobljenih podatkov izračunamo odstotek korenin, ki so kolonizirane z AM-glivami (kvantitativna ocena). Druga metoda je (2) ocenjevanje kolonizacije po Trouvelot in sod. (1986), ki zahteva podrobnejši pregled mikroskopskih preparatov pobarvanih korenin. V vzorcu ocenjujemo mikorizno kolonizacijo ter gostoto arbuskulov v različnih razredih. Na podlagi tako dobljenih ocen lahko kolonizacijo ovrednotimo tako kvantitativno kot kvalitativno (predvsem prisotnost

arbuskulov kaže na funkcionalno izmenjavo hranil med simbiontoma).

Spore AM gliv (Slika 2) lahko izoliramo iz substrata s centrifugiranjem v raztopini saharoze in z mokrim sejanjem skozi sito z odprtini premera 32 µm na katerem ostanejo posamezne spore. Identifikacija spor je zelo kompleksna, vključuje pa njihovo barvanje z Melzerjevim reagentom in ocenjevanje vrstno specifičnih morfoloških struktur v polivinil alkohol-lakto-glicerol (PVLG) vklopljenih spor (spletna stran INVAM – International Culture Collection of (Vesicular) Arbuscular Mycorrhizal Fungi).

Obstaja tudi več različnih metod za oceno količine zunajkoreninskega micelija AM gliv v substratu. V ta namen vzorce tal suspendiramo v vodi, suspenzijo filtriramo skozi membranski filter in hife gliv pobarvamo z barvilom. Dolžino hif izmerimo pod stereolupo z linijsko intersekcijsko metodo.

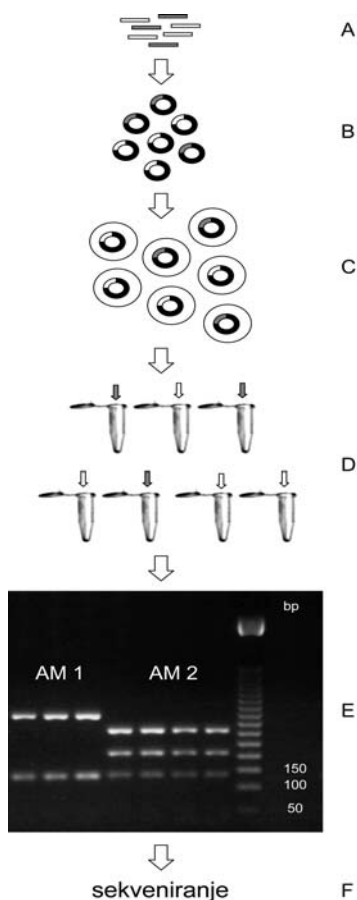
6.2 Molekulski pristopi v ekologiji AM gliv

Število novih molekulskih tehnik, ki se uporabljajo za raziskave ekologije AM gliv zelo hitro narašča. V

ekoloških raziskavah uporabljajo številne tehnike, ki bazirajo na tehniki PCR (verižna reakcija s polimerazo). Pri tem je bil ključnega pomena razvoj za AM glive specifičnih začetnih oligonukleotidov (primerjev), saj ob ekstrakciji DNK iz koreninskega materiala dobimo mešanico DNK različnih organizmov. Največ razpoložljivih začetnih oligonukleotidov se nanaša na različne regije znotraj rDNK male podenote ribosoma (SSU) (Redecker in sod., 2003, Redecker, 2007).

V dosedanjih raziskavah je bil najpogosteje uporabljen pristop (Helgason in sod., 1998), ki je prikazan na spodnji shemi (Slika 3). Po izolaciji celokupne DNK iz suhega koreninskega vzorca s primernim izolacijskim

kitom (npr. Power Plant DNA Isolation Kit, MoBio – običajno za izolacijo zadošča zelo malo, okrog 50 mg posušenega koreninskega tkiva) sledi (A) amplifikacija približno 550 bp dolgega rDNK fragmenta majhne ribosomske podenote (SSU-rDNK) AM gliv iz izolata (ekstrakta) celokupne DNK s parom začetnih oligonukleotidov AM1 (specifični primer za AM glive, Helgason in sod., 1998) in NS31 (splošni evkariontski primer). Dobimo mešanico produktov PCR vseh namnoženih AM gliv, ki kolonizirajo segment korenine, iz katerega smo izolirali DNK. (B) Po čiščenju produkt PCR kloniramo v vektor (plazmid) in na ta način ločimo posamezne tipe AM gliv. (C) Sledi transformacija vektorja v kompetentne celice *Escherichia coli*.



Slika 3: Pristop k analizi združbe AM gliv. (A) Amplifikacija DNK AM gliv iz ekstrakta celokupne DNK – gliva AM 1 (temna) in AM 2 (svetla črta), razmerje AM 1:AM 2 = 3:4, (B) kloniranje produktov PCR v vektor, (C) transformacija vektorja v *E. coli*, (D) drugi PCR, (E) RFLP – 2% agarozni gel, restrikcijska profila dveh AM gliv (AM 1 in AM 2 v začetnem razmerju 3:4), restrikcijski encim *Hsp 92II* (Promega), (F) sekveniranje in obdelava podatkov.

Figure 3: Approach to AM community analysis. (A) Amplification of AMF DNA from the total DNA extract – fungus AM 1 (dark) and AM 2 (light line), ratio AM 1:AM 2 = 3:4, (B) cloning of the PCR products into vector, (C) transformation of vector into *E. coli*, (D) second PCR, (E) RFLP – 2% agarose gel, restriction profiles of two AM fungi (AM 1 and AM 2 in the initial ratio 3:4), digestion with enzyme *Hsp 92II* (Promega), (F) sequencing and data analysis.

Posamezna celica lahko sprejme le po en plazmid. Po inkubaciji čez noč pri 37°C na agarnih ploščah iz posameznih celic *E. coli* dobimo ločene kolonije transformiranih celic. (D) Sledi druga amplifikacija, pri čemer kot matrico uporabimo DNK iz posameznih kolonij ločeno, torej tudi ločeno za vsak posamezen tip AM gliv. (E) Temu sledi še restrikcija z najmanj dvema encimoma in dolžinski polimorfizem restrikcijskih fragmentov (RFLP), kjer število ponovitev posameznega profila RFLP uporabimo kot merilo abundance posameznega tipa AM gliv v začetnem celokupnem vzorcu DNK (glej fazo A) (F) Zadnja faza je sekveniranje produktov PCR izbranih profilov RFLP, čemur sledi obdelava sekvenc, izračuni ter grafični prikaz filogenetskega drevesa. S takšnim pristopom istočasno, poleg kvalitativne analize prisotnosti posameznih filotipov v vzorcu, dobimo tudi podatek o abundanci posameznega restrikcijskega profila, na podlagi katerega je poleg kvalitativne možna tudi kvantitativna analiza mikorizne združbe.

Ekološke raziskave na okoljskih vzorcih ponavadi zahtevajo obsežno vzorčenje, veliko število vzorcev pa pomeni velik časovni in finančni vložek, kar je tudi glavna pomanjkljivost na zgornji shemi predstavljenega pristopa. Poleg omenjene tehnike se v zadnjem času vedno več uporabljajo tudi druge metode, ki omogočajo istočasno obdelavo večjega števila vzorcev. Številne med njimi že dlje časa uporabljajo v različnih vejah raziskav mikrobiologije in mikrobne ekologije tal. Večino tehnik se uporabljajo v kombinaciji s knjižnicami klonov, kar omogoča začetno kalibracijo metode in hitrejšo obdelavo večjega števila vzorcev v kasnejših fazah. Med najbolj pogosto uporabljenimi molekulskimi tehnikami so:

- (1) T-RFLP – dolžinski polimorfizem terminalnih restrikcijskih fragmentov (Dickie in FitzJohn, 2007, Mumey in Rillig, 2007). Tehniko so uporabili v številnih študijah o vplivu biotske raznolikosti AM gliv na rastlinsko združbo in obratno (npr. Johnson in sod., 2005, Vandenkoornhuyse in sod., 2003, Helgason in sod., 2002), vključno z vplivom invazivnih rastlinskih vrst na AM združbo (Mummey in Rillig, 2007), pri čemer kot izhodiščni material za izolacijo glivne DNK največkrat uporabljajo rastlinske korenine.
- (2) DGGE (denaturacijska gradientna gelska elektroforeza) in
- (3) TGGE (temperaturna gradientna gelska elektroforeza) sta v študijah AM gliv redkeje uporabljeni metodi, pri katerih je za karakterizacijo AM združbe možna tudi uporaba DNK, izolirane iz talnih vzorcev (Liang in sod., 2008). Za karakterizacijo mikrobnih združb v okoljskih vzorcih pogosto uporabljajo tudi (4) analizo maščobnih kislin (npr. analiza fosfolipidnih maščobnih kislin – PLFA), ki predstavljajo esencialno komponento vseh živih celic ter obenem zelo uporabne biomarkerje za posamezne skupine v času vzorčenja aktivnih mikroorganizmov, vključno z glivami (Ramsey in sod., 2006, Grigera in sod., 2007). Analiza maščobnih kislin v tleh lahko predstavlja dober način za kvantifikacijo aktivne mase AM gliv (zunajkoreninskega micelija) v talnih vzorcih, pri čemer je uporaba molekulskih metod, npr. (5) kvantitativni PCR v realnem času (quantitative real-time PCR) (Gamper in sod., 2008, Jansa in sod., 2008) ali (6) LAMP (loop-mediated isothermal amplification) (Gadkar in Rillig, 2008) še v fazi razvoja.

7 ZAKLJUČEK

Čeprav arbuskularna mikoriza sodi med najpomembnejše simbioze v naravi, nanjo pogosto pozabljamo, verjetno tudi zato, ker je, če je ne iščemo ciljno, praktično nevidna. Razvoj molekulskih tehnik je omogočil hiter napredek in vedno večje zavedanje ekološkega pomena AM gliv in njihove tesne povezanosti s kopenskimi rastlinami. Pomen arbuskularne mikorize je v ekstenzivnih agroekosistemi še bistveno večji kot na območjih z intenzivnim kmetijstvom, zato lahko pričakujemo, da bo z vedno večjim poznavanjem biologije in ekologije AM gliv

lažji tudi prenos uporabe glivnih inokulumov v kmetijsko prakso (biognojilo, biotsko varstvo rastlin, kot kontrola pojava invazivnih vrst, izboljšanje preživetja rastlin v stresnih razmerah idr.). Številne nove metode, s poudarkom na molekulskih in izotopskih tehnikah, danes omogočajo vpogled v do sedaj nevidno, zato lahko v prihodnosti upamo na vedno boljše poznavanje teh povsod navzočih in starodavnih organizmov in razvoj novih možnosti njihove uporabe ter uspešnega sobivanja z njimi.

8 ZAHVALA

Izr. prof. dr. Dominiku Vodniku se zahvaljujem za koristne pripombe na osnutek članka, prav tako hvala

mag. Borisu Turku za pomoč pri fotografiranju spor AM gliv. Dr. Thorunn Helgason, prof. Alistairju H.

Fitterju in dr. Alexu J. Dumbrellu iz Univerze v Yorku, VB se zahvaljujem za vso pomoč ter kreativno raziskovalno vzdušje, v katerem sem preživela zimo 2007/08 in ki me še vedno polni z entuziazmom za nadaljevanje raziskav arbuskularne mikorize. Obisk na

Univerzi v Yorku je bil financiran s strani britanskega Kraljevega društva in British Council-a. Raziskave potekajo v okviru podoktorskega projekta št. Z4-9295, financiranega s strani ARRS.

9 VIRI

- Akcija COST 870, "From production to application of arbuscular mycorrhizal fungi in agricultural systems: a multidisciplinary approach", spletna stran (1. 9. 2008): <http://www.cost870.eu/>.
- Brundrett, M.C. 2002. Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist* 154 (2): 275-304.
- Bucher, M. 2007. Functional biology of plant phosphate uptake at root and mycorrhiza interfaces. *New Phytologist* 173 (1): 11-26.
- Croll, D., Wille, L., Gamper, H.A., Mathimaran, N., Lammers, P.J., Corradi, N., Sanders, I.R. 2008. Genetic diversity and host plant preferences revealed by simple sequence repeat and mitochondrial markers in a population of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *New Phytologist*, 178 (3): 672-687.
- Dickie, I.A., FitzJohn, R.G. 2007. Using terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) to identify mycorrhizal fungi: a methods review. *Mycorrhiza* 17 (4): 259-270.
- Fitter, A.H. 2005. Darkness visible: reflections on underground ecology. *Journal of Ecology* 93 (2): 231-243.
- Fitter, A.H. 2006. What is the link between carbon and phosphorus fluxes in arbuscular mycorrhizas? A null hypothesis for symbiotic function. *New Phytologist* 172 (1): 3-6.
- Fitter, A.H., Moyersoen, B. 1996. Evolutionary trends in root-microbe symbioses. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 351 (1345): 1367-1375.
- Gadkar, V. in Rillig, M.C. 2008. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) to rapidly detect arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biology & Biochemistry* 40 (2): 540-543.
- Gamper, H.A., Young, J.P.W., Jones, D.L., Hodge, A., 2008. Real-time PCR and microscopy: Are the two methods measuring the same unit of arbuscular mycorrhizal fungal abundance? *Fungal genetics and biology* 45 (5): 581-596.
- Giovannetti, M., Avio, L., Fortuna, P., Pellegrino, E., Sbrana, C., Strani, P. 2006. At the root of the wood wide web. Self recognition and nonself incompatibility in mycorrhizal networks. *Plant Signaling and Behavior*, 1, 1-5.
- Giovanetti, M. in Mosse, B. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist* 84: 489-500.
- Govindarajulu, M., Pfeffer, P.E., Jin, H.R., Abubakerm, J., Douds, D.D., Allen, J.W., Bucking, H., Lammers, P.J., Shachar-Hill, Y. 2005. Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Nature* 435 (7043): 819-823.
- Gosling, P., Hodge, A., Goodlass, G., Bending, G.D. 2006. Arbuscular mycorrhizal fungi and organic farming. *Agriculture Ecosystems & Environment* 113 (1-4): 17-35.
- Grigera, M.S., Drijber, R.A., Shores-Morrow, R.H., Wienhold, B.J. 2007. Distribution of the arbuscular mycorrhizal biomarker C16:1cis11 among neutral, glyco and phospholipids extracted from soil during the reproductive growth of corn. *Soil Biology & Biochemistry* 39 (7): 1589-1596.
- Hause, B. in Fester, T. 2005. Molecular and cell biology of arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Planta* 221 (2): 184-196.
- Helgason, T., Daniell, T.J, Husband, R., Fitter, A.H., Young, J.P.W. 1998. Ploughing up the wood-wide web? *Nature* 394 (6692): 431-431.
- Helgason, T., Merryweather, J.W., Denison, J., Wilson, P., Young, J.P.W., Fitter, A.H. 2002. Selectivity and functional diversity in arbuscular mycorrhizas of co-occurring fungi and plants from a temperate deciduous woodland. *Journal of Ecology* 90 (2): 371-384.
- Hodge, A., Campbell, C.D., Fitter, A.H., 2001. An arbuscular mycorrhizal fungus accelerates decomposition and acquires nitrogen directly from organic material. *Nature* 413 (6853): 297-299.
- INVAM, spletna stran (4. 9. 2008): <http://invam.caf.wvu.edu/>.
- Jansa, J., Smith, F.A., Smith, S.E., 2008. Are there benefits of simultaneous root colonization by different arbuscular mycorrhizal fungi? *New Phytologist* 177 (3): 779-789.
- James, T.Y., Kauff, F., Schoch, C.L., Matheny, P.B., Hofstetter, V., Cox, C.J., Celio, G., Gueidan, C., Fraker, E., Miadlikowska, J., Lumbsch, H.T., Rauhut, A., Reeb, V., Arnold, A.E., Amtoft, A., Stajich, J.E., Hosaka, K., Sung, G.H., Johnson, D., O'Rourke, B., Crockett, M., Binder, M., Curtis, J.M., Slot, J.C., Wang, Z., Wilson, A.W., Schuëbler, A., Longcore, J.E., O'Donnell, K., Mozley-Standridge, S., Porter, D., Letcher, P.M., Powell, M.J., Taylor, J.W., White, M.M., Griffith, G.W., Davies, D.R., Humber, R.A., Morton, J.B., Sugiyama, J., Rossman, A.Y., Rogers, J.D., Pfister, D.H., Hewitt, D., Hansen, K., Hambleton, S., Shoemaker, R.A., Kohlmeyer, J., Volkmann-Kohlmeyer, B., Spotts, R.A., Serdani, M., Crous, P.W., Hughes, K.W., Matsuura, K., Langer, E., Langer, G., Untereiner, W.A., Lücking, R., Budel, B., Geiser, D.M., Aptroot, A., Diederich, P.,

- Schmitt, I., Schultz, M., Yahr, R., Hibbett, D.S., Lutzoni, F., McLaughlin, D.J., Spatafora, J.W., Vilgalys, R. 2006. Reconstructing the early evolution of fungi using a six-gene phylogeny, *Nature* 443 (7113): 818-822.
- Johnson, D., Ijdo, M., Genney, D.R., Anderson, I.C., Alexander, I.J. 2005. How do plants regulate the function, community structure, and diversity of mycorrhizal fungi? *Journal of Experimental Botany* 56 (417): 1751-1760.
- Liang, Z.B., Drijber, R.A., Lee, D.J., Dwiekat, I.M., Harris, S.D., Wedin, D.A. 2008. A DGGE-cloning method to characterize arbuscular mycorrhizal community structure in soil. *Soil Biology & Biochemistry* 40 (4): 956-966.
- Maček, I., Dumbrell, A.J., Helgason, T., Nelson, M., Fitter, A.H., Vodnik, D. 2008.
- Extreme abiotic environmental factors are determining arbuscular mycorrhizal fungal community structure at natural CO₂ springs. V: COST Action 870 – From production to application of arbuscular mycorrhizal fungi in agricultural systems: a multidisciplinary approach: Working groups 2 and 4 meeting. Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki, Greece, 17-19 September 2008, s. 71-72.
- Mummey, D.L. in Rillig, M.C. 2007. Evaluation of LSU rRNA-gene PCR primers for analysis of arbuscular mycorrhizal fungal communities via terminal restriction fragment length polymorphism analysis. *Journal of Microbiological Methods* 70 (1): 200-204.
- Parniske, M., 2004. Molecular genetics of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology* 7 (4): 414-421.
- Piotrowski, J.S. in Rillig, M.C. 2008. Succession of arbuscular mycorrhizal fungi: Patterns, causes, and considerations for organic agriculture. *Advances in Agronomy* 97: 111-130.
- Redecker, D. 2007. Molecular ecology of arbuscular mycorrhizal fungi: a review of PCR-based techniques. V: Cooper J.E. in Rao, J.R. (ed.). *Molecular approaches to soil, rhizosphere and plant microorganism analysis*. CAB International: 198-212.
- Redecker, D., Hijri, I., Wiemken, A. 2003. Molecular identification of arbuscular mycorrhizal fungi in roots: Perspectives and problems. *Folia Geobotanica* 38 (2): 113-124.
- Redecker, D., Kodner, R., Graham, L.E. 2002. *Palaeogloniopsis grayi* from the Ordovician. *Mycotaxon* 84: 33-37.
- Ramsey, P.W., Rillig, M.C., Feris, K.P., Holben, W.E., Gannon, J.E. 2006. Choice of methods for soil microbial community analysis: PLFA maximizes power compared to CLPP and PCR-based approaches. *Pedobiologia* 50 (3): 275-280.
- Rosendahl, S. 2008. Communities, populations and individuals of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 178 (2): 253-266.
- Santos-Gonzalez, J.C., Finlay, R.D., Tehler, A. 2007. Seasonal dynamics of arbuscular mycorrhizal fungal communities in roots in a seminatural grassland. *Applied and environmental microbiology* 73 (17): 5613-5623.
- Schüßler, A., Martin, H., Cohen, D., Fitz, M., Wipf, D. 2006. Characterization of a carbohydrate transporter from symbiotic glomeromycotan fungi. *Nature* 444 (7121): 933-936.
- Schüßler, A., Schwarzott, D., Walker, C. 2001. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research* 105: 1413-1421.
- Simon, L., Lalonde, M., Bruns, T.D. 1992. Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. *Applied and environmental microbiology* 58 (1): 291-295.
- Simon, L., Bousquet, J., Levesque, R.C., Lalonde, M. 1993. Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature* 363 (6424): 67-69.
- Smith S.E. in Read D.J. 2008. *Mycorrhizal symbiosis*, Third Edition, London, Academic Press: 787 str..
- Trouvelot, A., Kough, J.L., Gianinazzi-Pearson, V. 1986. Mesure du taux de mycorrhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. V: *Physiological and genetical aspects of mycorrhizae*, Gianinazzi-Pearson, V., Gianinazzi, S. (ur.). Pariz, INRA press: 217-221.
- Vandenkoornhuyse, P., Ridgway, K.P., Watson, I.J., Fitter, A.H., Young, J.P.W. 2003. Co-existing grass species have distinctive arbuscular mycorrhizal communities. *Molecular Ecology* 12 (11): 3085-3095.
- van der Heijden, M.G.A., Klironomos, J.N., Ursic, M., Moutoglis, P., Streitwolf-Engel, R., Boller T., Wiemken, A., Sanders, I.R. 1998. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* 396 (6706): 69-72.
- Wolf, E. in Schüßler, A. 2005. Phycobiliprotein fluorescence of *Nostoc punctiforme* changes during the life cycle and chromatic adaptation: characterization by spectral confocal laser scanning microscopy and spectral unmixing. *Plant Cell and Environment* 28 (4): 480-491.
- Wang, B., Qiu, Y.L. 2006. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza* 16 (5): 299-363.
- Wright, S.F., Upadhyaya, A. 1998. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and soil* 198 (1): 97-107.
- Young, J.P.W. 2008. The genetic diversity of intraterrestrial aliens. *New Phytologist* 178 (3): 465-468.