



ARBEITSGRUPPE «VOLLZUG BODENBIOLOGIE»
GROUPE DE TRAVAIL «BIOLOGIE DU SOL - APPLICATION»

Molekulargenetische Verfahren zur Bestimmung der Vielfalt von arbuskulären Mykorrhizapilzen in Wurzeln und Böden

Jan Jansa¹ und Hannes A. Gamper²

¹ ETH Zürich, Institut für Agrarwissenschaften,
Eschikon 33, CH-8315 Lindau, Tel. 052 354 92 16, jjansa@ethz.ch

² Universität Basel, Botanisches Institut, Hebelstrasse 1, CH-4056 Basel,
Tel. 061 267 23 34, hannes.gamper@unibas.ch

IMPRESSUM

Herausgeber Arbeitsgruppe „Vollzug Bodenbiologie“ VBB

Zitiervorschlag Jansa, J., Gamper, H.A. 2011: Molekulargenetische Verfahren zur Bestimmung der Vielfalt von arbuskulären Mykorrhizapilzen in Wurzeln und Böden. VBB-Bulletin 13, Beilage, pp13

Bezugsquelle Sekretariat VBB, Dr. Paul Mäder, Forschungsinstitut für biologischen Landbau FiBL, Postfach, CH – 5070 Frick

Arbeitsgruppe Vollzug Bodenbiologie VBB, 2011

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	4
2	Übersicht mittels molekulargenetischer Methoden gewonnener Erkenntnisse auf dem Hintergrund von Befunden aus mikroskopischen Studien.....	6
3	Molekulargenetische und traditionelle mikroskopische Methoden im Vergleich.....	7
4	Notwendige praktische Arbeitsschritte zur mikroskopischen & molekulargenetischen Untersuchung von arbuskulären Mykorrhizapilzen im Feld.....	8
5	Allgemeine Gegenüberstellung von gängigen molekulargenetischen Untersuchungsmethoden.....	8
6	Zukunftsprojekte und Herausforderungen	11
7	Zusammenfassung und Schlussfolgerungen.....	12
8	Verdankungen	12
9	Literaturverzeichnis.....	12

Wichtige Begriffe im Zusammenhang ökologischer Forschung mittels molekulargenetischer Methoden

rDNS	<i>Ribosomale DNS Abschnitte, bestehend aus mehrfach vorkommenden Blöcken von Genen, die für die drei strukturellen RNS Bestandteile der Ribosomen kodieren und durch nicht-kodierende, aber abgelesene / transkribierte variable Platzhaltersequenzen voneinander getrennt sind. Da die Genblöcke immer zusammen abgelesen werden, werden diese auch Operons genannt. Den in vielen Kopien auftretenden rDNS Sequenzabschnitten stehen Eiweiss-kodierende Gene gegenüber, die z.T. nur einmal im Genom vorkommen und in ihrer Sequenz meistens weniger variable sind, da ihre Funktion während der Evolution erhalten werden muss.</i>
OTU	<i>engl. <u>O</u>perational <u>T</u>axonomic <u>U</u>nit: Aufgrund molekulargenetischer Daten unterschiedene biologische Einheiten, die z.B. Individuen, Arten, Gattungen, oder Familien von zumeist Mikroorganismen entsprechen. OTU werden je nach Organismengruppe, der verwendeten Methode und des Untersuchungstyps unterschiedlich festgelegt. Sequenzinformation-basierte OTU können leicht aufgrund der Ähnlichkeit, sollten aber besser nach der relativen stammesgeschichtlichen Verwandtschaft, definiert werden.</i>
PCR	<i>engl. <u>P</u>olymerase <u>C</u>hain <u>R</u>eaction: Ein grundlegendes molekulargenetisches Hilfsmittel zur Enzym-vermittelten exponentiellen Vermehrung eines bestimmten DNA Abschnitts. Durch zyklische Verlängerung von sog. PCR Primern (= Oligonukleotiden) können kleinste Mengen an DNA nachweisbar gemacht werden.</i>
PCR Drift	<i>Zufällige, bevorzugte Vermehrung von einzelnen DNS Abschnitten in der PCR. Dieser vermutlich bedeutende methodologische Fehler beeinflusst alle Ergebnisse aus auf PCR-beruhenden Verfahren zur Analyse von Gemischen aus verschiedenen DNA Molekülen. Je nach Empfindlichkeit der Verfahren mit denen die PCR Produkte schlussendlich analysiert werden, kann das Signal von seltenen durch das von häufigen Organismen überdeckt werden.</i>
PCR-Selektion	<i>Bevorzugte Vermehrung gewisser DNS Abschnitte, sei es wegen nicht vollständiger Übereinstimmung der Primer- mit denen der Gensequenzen, unterschiedlichem Schmelzverhalten der DNS Vorlagen oder weil häufigere PCR Produkte an seltene DNA Vorlagemoleküle binden und diese somit von der künstlichen Vermehrung ausschließen. PCR-Selektion ist ein anderer vermutlich immer auftretender methodologischer Fehler, der in PCR von Gemischen von DNA Vorlagemolekülen unterschiedlicher Sequenz, d.h. z.B. verschiedener Arten auftritt. Auf PCR beruhende molekulargenetische Schätzungen über die relative Häufigkeit verschiedener Arten sollten wegen PCR Drift und Selektion nur als Annäherungen verstanden werden.</i>
Pyrosequencing	<i>Massives gleichzeitiges Echtzeitsequenzieren, das es erlaubt Sequenzinformation von Gemischen von DNS Molekülen aus Proben von mehreren Organismen, sowie Populationen und Gemeinschaften zu erhalten ohne dass ein separater Klonierungsschritt nötig ist. Damit ist dieses Verfahren geeignet, um mikrobielle Feldproben zu analysieren. Im Falle, dass sehr viele Proben untersucht werden sollen, besteht zudem die Möglichkeit während der anfänglichen PCR-vermittelten künstlichen Vermehrung des DNS Markers kurze Proben-spezifische Wiedererkennungssequenzen einzuführen. Alle neuen Sequenzierverfahren ziehen Nutzen aus der Nanotechnologie und verwenden optimal aufeinander abgestimmte biochemisch-physikalische Verfahren, wie nanoklonale künstliche Vermehrung in Wasser-Öl Emulsion, fluoreszenzmarkierte, exakt positionierte Biomoleküle und effiziente Computer-gestützte Datenanalyse.</i>

1 Einleitung

Arbuskuläre Mykorrhizen, die symbiotische Vergesellschaftung von Bodenpilzen des Stammes der Glomeromycota (= 'Knäuelpilze') und Pflanzenwurzeln, wurden erst Ende des 19. Jahrhunderts entdeckt und seither intensiv untersucht. Weltweit verbreitet und häufig, unterstützen diese wurzelkolonisierenden Pilze ihre Wirtspflanzen v.a. in der Aufnahme von schlecht verfügbaren Mineralstoffen, wie Phosphat und Zink. Sie erreichen dies, indem sie mit ihren Pilzfadengeflechten den Wirtspflanzen zusätzlichen Bodenraum erschließen. Mykorrhizapilze verbinden Pflanzenwurzeln mit der Bodenmatrix und Pflanzenindividuen derselben und unterschiedlicher Arten miteinander. Vermutlich können die pflanzenverbindenden Pilzfäden Konkurrenzverhältnisse in Pflanzengemeinschaften und das Aufkommen von Pflanzenkeimlingen beeinflussen. Wiederholt wurde gezeigt, dass Pflanzen und Gemeinschaften von arbuskulären Mykorrhizapilzen sich gegenseitig beeinflussen, wobei die Richtung der Beeinflussung von den gegebenen Umweltbedingungen abhängt.

Aufgrund ihrer weiten geographischen und ökologischen Verbreitung und zentralen Funktion in der Aufnahme von Nährsalzen aus nährstoffarmen Böden hat das Studium der arbuskulären Mykorrhizapilze schon immer das Interesse der Grundlagenforschung wie der angewandten Wissenschaften, Praktikerinnen und Praktiker der Agronomie, des Gartenbaus und der Restaurationsökologie geweckt. Obwohl anfänglich als 'Biodünger' propagiert, muss anerkannt werden, dass arbuskuläre Mykorrhizapilze das Wachstum ihrer Wirtspflanzen nur in einem begrenzten Fenster von Umweltbedingungen verbessern, wobei das Verhältnis von pflanzenverfügbarem Phosphat zu Stickstoff (P:N) wichtig ist (Hoeksema et al. 2010; Johnson 2010). Insbesondere ist zu beachten, dass arbuskuläre Mykorrhizapilze keine neuen Nährstoffe in Anbau- oder Ökosysteme einbringen, sondern ausschließlich helfen, die Nährstoffversorgung der Pflanzen zu verbessern, falls einerseits genügend, andererseits aber auch nicht übermassig viele Nährstoffe vorhanden sind. Nur wenn sich die Hilfe durch den Pilz bei der Nährstoffaufnahme gegenüber den Kosten für die abgetretenen Fotosyntheseprodukte für die Wirtspflanzen auszahlt, sind Mykorrhizapilze für die Pflanzen förderlich. Dies trifft zu, falls eine Wirtspflanze durch die Verfügbarkeit von Bodennährstoffen in ihrem Wachstum eingeschränkt ist, aber einen Überschuss an Fotosyntheseprodukten zur Verfügung hat. Stehen der Wirtspflanze jedoch mineralische Nährstoffe in ausreichendem Masse zur Verfügung, die auch selber aufgenommen werden können, nützen arbuskuläre Mykorrhizapilze den Wirtspflanzen wenig, oder fallen diesen sogar zur Last (Johnson 1993; Gamper et al. 2004; Jansa et al. 2006).

Obwohl der pflanzliche Nutzen aus Mykorrhizen stark von den vorherrschenden Umweltbedingungen abhängt, bestehen seit längerem Bestrebungen, Inokula von effektiven arbuskulären Mykorrhizapilzen heranzuzüchten und ins Feld auszubringen. Während ein solcher Ansatz in teilweise sterilisiertem Boden oder Böden mit einer geringen natürlichen Vielfalt von arbuskulären Mykorrhizapilzen vielversprechend sein kann, ist die Situation ganz anders - und übrigens weitestgehend ungeklärt - falls bereits eine Gemeinschaft von aneinander und an die lokalen Bedingungen angepassten Pilzen besteht.

Ökologische Studien, beruhend auf Untersuchungen des Wirtspflanzenwachstums und der Wurzelkolonisation, leiden gemeinhin unter einem Erklärungsnotstand für beobachtete Einflüsse der Versuchsvorgänge. Dies trifft besonders in den Fällen zu, wo keine Korrelationen zwischen pflanzlichen und pilzlichen Messgrößen bestehen. Solch ein Fall trat z.B. in einer durch die Gruppe Vollzug Bodenbiologie (VBB) veranlassten Vorstudie zum Einfluss von Standortfaktoren auf die Mykorrhizierung von Testpflanzen ein (Jansa et al. 2009). Molekulargenetische Untersuchungen zur Zusammensetzung der Pilzgemeinschaften- und -populationen sind hingegen auch dann aufschlussreich, wenn sich Mykorrhizierungsgrade von Pflanzenwurzeln nicht unterscheiden. Molekulargenetische Analyseverfahren erlauben es herauszufinden, ob unterschiedliche Wurzelkolonisationsgrade durch Unterschiede in der pilzlichen Gemeinschafts- oder Populationsstruktur erklärt werden können.

Im Nachfolgenden werden molekulargenetische Untersuchungsansätze zur Erfassung von Unterschieden zwischen Pilzgemeinschaften und -populationen beschrieben, die inzwischen in der ökologischen Feldforschung die schlecht auflösenden mikroskopischen Analysen ersetzt haben. In der Tat sind molekulargenetische Methoden die besten Werkzeuge, um groß- und kleinräumige Einflüsse von Bodenparametern, biogeographischer Isolation und Wirtspflanzen zu untersuchen. Studien letzterer Art werden zukünftige Forschungsschwerpunkte darstellen.

Bei der Wahl eines molekulargenetischen Analyseverfahrens zur Beantwortung ökologischer Fragestellungen ist es äußerst wichtig, dass Stärken und Schwächen verschiedener Methoden sorgfältig gegeneinander abgewogen werden. In diesem Beitrag konzentrieren wir uns ausschließlich auf eine Darstellung von Methoden in der Erforschung von arbuskulären Pilzgemeinschaften und -populationen. Zum Verständnis vieler dieser Methoden ist es wichtig zu wissen, dass arbuskuläre Mykorrhizapilze einer einzigen stammesgeschichtlichen Verwandtschaftsline angehören, deren Mitglieder alle untereinander näher verwandt sind, als zu solchen anderer Pilzgruppen. Im Weiteren ist es wichtig zu wissen, dass in den Pilzfadengeflechten der Vertreter der Glomeromycota Zwischenzellwände weitestgehend fehlen, und dass diese Pilze relativ große, bodenbürtige und damit wenig mobile vielkernige Dauersporen ausbilden. Eine Aufteilung der genetischen Information der Kerne in ungleiche, aber nebeneinander existierende Teile, ist vermutlich ein spezielles Merkmal der Glomeromycota (Sanders 2004, Young 2009). Ein Nebeneinander von unterschiedlichen Gensequenzen im selben Organismus hat jedoch zur Konsequenz, dass gewisse molekulargenetische Untersuchungen für diese Pilzgruppe nicht so einfach durchführbar sind, wie in anderen Lebewesen, und, dass Vertreter der Glomeromycota vermutlich auch anders als andere Organismen auf ihre Umwelt reagieren. Befunde aus der früheren molekulargenetischen Forschung haben gezeigt, dass das Kerngenom einiger arbuskulärer Mykorrhizapilze sowohl bezüglich ribosomaler, als auch Eiweiss-kodierender Gene äußerst vielfältig ist (Kuhn et al. 2001; Jansa et al. 2002a). Im Moment wird davon ausgegangen, dass das Pilzfadengeflecht oder eine Spore eines einzigen arbuskulären Mykorrhizapilzindividuums genetisch einer ganzen Population von Individuen anderer Organismen entspricht (Hijri & Sanders 2005).

2 Übersicht mittels molekulargenetischer Methoden gewonnener Erkenntnisse auf dem Hintergrund von Befunden aus mikroskopischen Studien

Bereits die ersten molekulargenetischen Studien zur Zusammensetzung der arbuskulären Mykorrhizapilzgemeinschaften in Agrar- und natürlichen Ökosystemen haben klare Unterschiede aufgezeigt. Unterschiede im Auftreten von Pilzarten sind in der Zwischenzeit nun bereits in weiteren Studien bestätigt worden. Im Gegensatz zu den Befunden von Sporengemeinschaftsanalysen deuten Resultate von molekulargenetischen Untersuchungen nicht unbedingt auf eine Reduktion der Artenzahlen in intensiv genutzten Agrarökosystemen hin. Sowohl mikroskopische, wie auch molekulargenetische Studien zeigten aber wiederholt, dass die Intensität der agronomischen Nutzung Verschiebungen in den Artenzusammensetzung der arbuskulären Mykorrhizapilze verursacht (Hijri et al. 2006). Nur dank molekulargenetischer Analysen wurden im Feld Präferenzen zwischen Pilz- und Pflanzenpartnern der arbuskulären Mykorrhiza aufgedeckt (Helgason et al. 2002; Vandenkoornhuysen et al. 2003). Dies bedeutet, dass sich die Zusammensetzung der Pilzgemeinschaften verschiedener Pflanzenarten im Feld oft klar unterscheiden, obwohl unter konkurrenzfreien Bedingungen praktisch jeder Mykorrhizapilz jede Mykorrhizawirtspflanze kolonisieren kann. Dank molekulargenetischer Methoden wurden saisonale Veränderungen in der pilzlichen Gemeinschaftszusammensetzung von mykorrhizierten Wurzeln festgestellt (Husband et al. 2002). Relative Unterschiede in der quantitativen Häufigkeit, in den sog. Dominanzmustern, verschiedener Mykorrhizapilzarten wurden bisher in Proben mykorrhizierter Wurzeln gefunden (s. Abbildung 1), werden aber bald auch für Bodenproben vorliegen (siehe Abschnitt Zukunftsprojekte).

Trotz Problemen beim Definieren und Erfassen von Arten der arbuskulären Mykorrhizapilze (Gamper et al. 2008, 2009), können grobe Schätzungen zum Artenreichtum gemacht werden. Einmalige und ohne langzeitige Erfahrung im Mikroskopieren durchgeführte Sporengemeinschaftsanalysen ergaben Artenzahlen, die je nach Ökosystem zwischen vier und etwa einem Dutzend schwanken. Detailliert und über eine längere Zeitperiode durchgeführte mikroskopische Sporengemeinschaftsuntersuchungen ergaben Inventare mit bis zu etwa 40 Arten arbuskulärer Mykorrhizapilze pro Ökosystem (Oehl et al. 2005, 2010). Möchte man jedoch eine Art eines arbuskulären Mykorrhizapilzes eindeutig nachweisen, müssen oftmals zumindest sog. Fangkulturen angelegt werden, d.h. Topfkulturen mit pilzfremdem Wachstumssubstrat, einer Wirtspflanze und einer kleinen Feldprobe aus Wurzeln oder Boden als Inokulum. Solche Fangkulturen dienen dazu, neue Dauersporen in allen Entwicklungsstadien und somit mit allen mikroskopischen Merkmalen zu erhalten. Besser ist es jedoch auf alle Fälle, den Aufwand nicht zu scheuen und mehrere Einzelsporen- oder zumindest Reinkulturen der kultivierbaren Pilzarten herzustellen. Eindeutig definiertes und qualitativ gutes Pilzmaterial von Reinkulturen ist zum Vergleich für molekulargenetische Analysen von größtem Nutzen (Jansa et al. 2002b, Gamper et al. 2007,

2009). Möchte man eine bestehende Methode anwenden, ist es außerdem hilfreich, deren Eignung zuerst anhand von Nukleotidsequenzsammlungen der im Untersuchungsgebiet vorkommenden Pilze abzuklären, weil immer noch Wissenslücken bezüglich des globalen Artenreichtums der arbuskulären Mykorrhizapilze in landwirtschaftlichen und natürlichen Ökosystemen bestehen (Öpik et al. 2006, 2009, 2010, Gamper et al. 2007). Mangel an Sequenzinformation ist der Grund, dass sich eine größere Zahl von Pilzen mit gängigen molekulargenetischen Methoden noch nicht erfassen lässt.

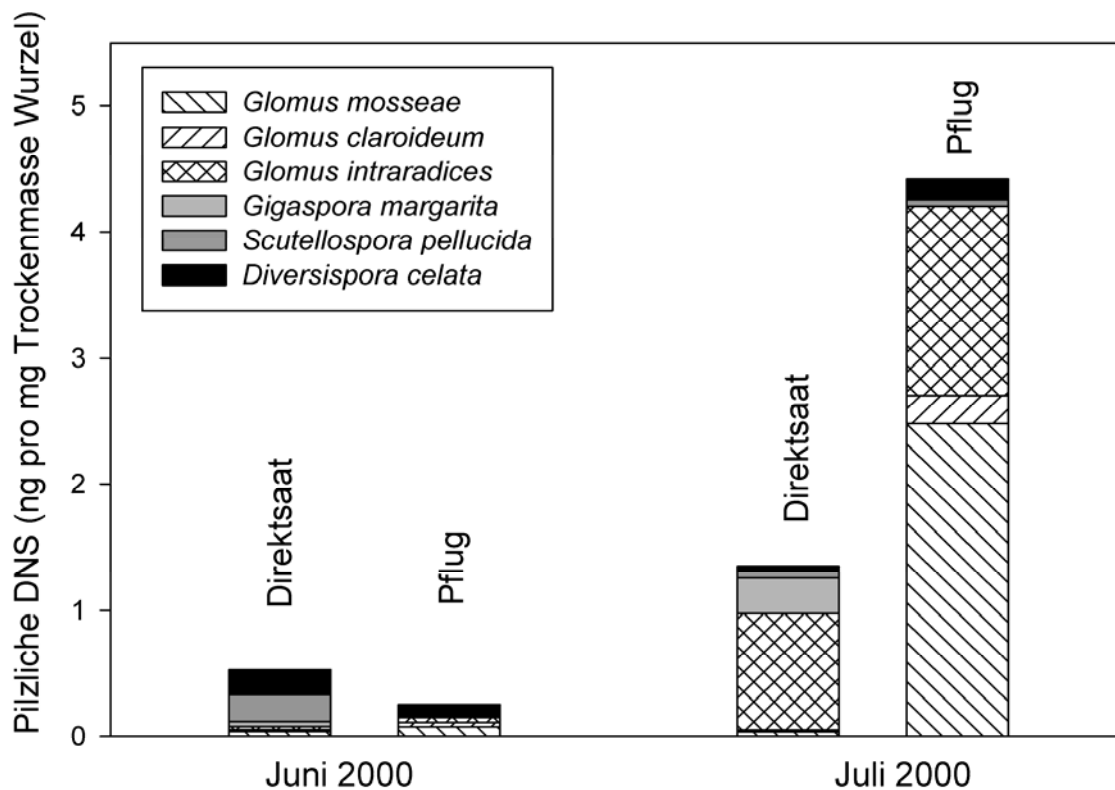


Abbildung 1: Quantitative Häufigkeit von sechs arbuskulären Mykorrhizapilzen in Maiswurzeln eines Bodenbearbeitungsversuchs in Tänikon (TG) mit einem Direktsaat- und Pflugverfahren. Die Wurzeln wurden in einem Zeitabstand von einem Monat im Sommer 2000 gesammelt und mittels quantitativer Echtzeit-PCR (qPCR) und spezifischen Markern (Primern und Hydrolysesonden) analysiert. Die Marker binden an spezifische Sequenzmotive des Gens der großen ribosomalen Untereinheit des Kerngenoms und wurden kürzlich anhand von Nukleotidsequenzen von Arten des untersuchten und eines nahe gelegenen Standorts konstruiert. Gezeigt sind die Mittelwerte von Wurzelproben aus vier Feldwiederholungen.

3 Molekulargenetische und traditionelle mikroskopische Methoden im Vergleich

Heutzutage werden in der ökologischen und systematischen Forschung gleichzeitig molekulargenetische und mikroskopische Untersuchungen eingesetzt, da sich beide methodischen Ansätze gegenseitig ergänzen und absichern.

Traditionell wird die Artbestimmung von arbuskulären Mykorrhizapilzen aufgrund des äußeren Erscheinungsbilds und der individuellen Entwicklung der Dauersporen vorgenommen. Weil aber mikroskopische Feinmerkmale alles andere als einfach zu erkennen sind, muss beträchtlich Zeit investiert werden, um Arten mikroskopisch zuverlässig zu unterscheiden. Außerdem müssen für Sporengemeinschaftsanalysen gute Mikroskope und Dokumentationssysteme zur Verfügung stehen. Die Beschreibung von arbuskulären Mykorrhizapilzen aufgrund ihres äußeren Erscheinungsbilds führte durch die Begrenztheit an sich unterscheidenden Merkmalen zur Auffassung, dass nur etwa 200 formal beschriebene Pilzarten etwa tausendmal mehr potenziellen Wirtspflanzenarten gegenüber stehen. Aber seit dem ersten Einsatz molekulargenetischer Methoden und v.a. seit massives gleichzeitiges Sequenzieren (engl. Pyrosequencing, Hudson 2008) von Feldproben möglich wurde, ist es jedoch offensichtlich, dass die formal beschriebenen, kultivierbaren und ausgiebig und häufig sporulierenden arbuskulären Mykorrhizapilzarten nur einen Bruchteil des ganzen Artenspektrums eines bestimmten

Ökosystems ausmachen. Es wurde außerdem klar, dass Wirtspflanzen- und Habitatspezialisten viel zahlreicher sind als ursprünglich angenommen (Öpik et al. 2009). Die Bestimmung vieler arbuskulärer Mykorrhizapilze wird dadurch erschwert, dass Merkmale von Dauersporen im Feld meist unvollständig erhalten bleiben und wichtige Bestimmungsgrößen fehlen. Zudem sporuliert eine beträchtliche Zahl von Pilzen selten oder möglicherweise auch nie. Die Artzugehörigkeit der ökophysiologisch wichtigen Pilzfadengeflechte in Wurzeln und Böden lässt sich mikroskopisch nicht bestimmen. Eine Ausnahme ist jedoch das Unterscheiden von Großgruppen von Mykorrhizapilzen und deren Abgrenzung von anderen Nicht-Mykorrhizapilzgruppen (Abbott & Robson 1978). Während molekulargenetische Methoden früher vornehmlich zur Pilzidentifikation verwendet worden sind, zielen heute molekulargenetische Feldstudien und Experimente vermehrt darauf ab, ein tieferes Verständnis der Biologie und Ökologie arbuskulärer Mykorrhizapilze zu erlangen.

Es ist aber nicht abzustreiten, dass bei Vertretern der Glomeromycota nicht nur die Artdefinition und -unterscheidung nach dem äußeren Erscheinungsbild, sondern auch die biologische und molekulargenetische Artenumschreibung und -unterscheidung an Grenzen stößt (Gamper et al. 2009). Diese Pilze scheinen sich fast ausschließlich klonal zu vermehren und bilden eine biologische Ausnahme, was die Organisation ihres Genoms anbelangt. Das Kerngenom der am besten untersuchten arbuskulären Mykorrhizapilzarten scheint sich, wie erwähnt, aus genetisch verschiedenen Kernen zusammen zu setzen, die in der gleichen pilzlichen Zelle neben einander vorkommen (Hijri & Sanders 2005).

Aufgrund der obenerwähnten Unklarheiten und praktischen Schwierigkeiten eine Art zu definieren gehen Molekularökologen den Weg, sog. Operationelle Taxonomische Einheiten (engl. Units), abgekürzt OTU, zu definieren. Diese OTU werden meist der Einfachheit halber rein aufgrund der Ähnlichkeit von Nukleotidsequenzen definiert, sollten zukünftig aber besser aufgrund der relativen stammesgeschichtlichen Verwandtschaft der Sequenzen berechnet werden, da nicht alles was ähnlich ist auch verwandt ist. Relative stammesgeschichtliche Verwandtschaft ist auch ein universell anwendbares Ordnungsprinzip und im Gegensatz zu reiner Sequenzähnlichkeit informativer, da es oft auch mit zwischen verwandten Organismen geteilten Eigenschaften übereinstimmt.

Molekulargenetische Methoden können systematische Einheiten feiner auflösen, als dies Mikroskopie ermöglicht, und zudem können diese Methoden auf Material von allen pilzlichen Entwicklungsstadien angewendet werden. Außerdem ist kein spezifisches mikroskopisches Training zur Arterkennung nötig. Trotzdem erübrigen sich mikroskopische Untersuchungen nicht ganz, da diese oft eine erste grobe Übersicht und womöglich Grobklassifikation bezüglich systematischer Artzugehörigkeit und Häufigkeit erlauben.

4 Notwendige praktische Arbeitsschritte zur mikroskopischen & molekulargenetischen Untersuchung von arbuskulären Mykorrhizapilzen im Feld

Am Anfang jeder ökologischen Studie zu Mykorrhizen stehen Arbeitsschritte, die viel Zeit und Fachkenntnis in praktischen Verfahren erfordern, sei es im Falle von mikroskopischen Analysen, sorgfältigem Waschen von Wurzelproben, Isolieren von Dauersporen und/oder Pilzfäden, Anfärben von Pilzfadengeflechten oder dem Herstellen und Analysieren von Präparaten. Bei der Anwendung molekulargenetischer Verfahren sind Extrahieren, weiter Bearbeiten (z.B. PCR-basierte Vermehrung) und Aufbereiten (z.B. enzymatischer Verdau und Aufreinigung oder Klonieren) von Nukleinsäuren zeitaufwändige Schritte bevor die eigentliche Datenerfassung beginnen kann. Wegen beträchtlicher zeitlicher und finanzieller Aufwendungen müssen Analysemethoden dringend unter Berücksichtigung aller ihrer Vor- und Nachteile sorgfältig gewählt werden. Die mikroskopischen und molekulargenetischen Analysen erfordern beide eine gute Laborausstattung und spezialisierte Personalausbildung.

5 Allgemeine Gegenüberstellung von gängigen molekulargenetischen Untersuchungsmethoden

Die zurzeit zur Verfügung stehenden molekulargenetischen Analyseverfahren unterscheiden sich zum Teil beträchtlich in ihrer Auflösung und folglich Anwendbarkeit zur Bearbeitung ökologischer Fragestellungen. Umso wichtiger ist es, die richtigen molekulargenetischen Methoden zu wählen oder aber Methoden und Fragestellungen aneinander anzupassen.

Tabelle 1: Übersicht zu den gängigen molekulargenetischen Untersuchungsmethoden für Studien über die Zusammensetzung und Struktur von Gemeinschaften und Populationen von arbuskulären Mykorrhizapilzen, sowie für den Nachweis und die Abschätzung relativer Häufigkeiten (Dominanz) einzelner Taxa.

Molekulargenetischer Ansatz	Forschungsfragen	Für	Wider	Beteiligte Schweizer Forscher
Nachweis von Pilzarten/-gruppen mittels spezifischer PCR Primer	Ist eine bestimmte Art vorhanden oder nicht?	Hohe Empfindlichkeit	Für jede Art ist ein separater Ansatz erforderlich. Begrenzte Vergleichbarkeit von Daten verschiedener Arten	Mathimaran Natarajan, Jan Jansa, Hannes A. Gamper, Dirk Redecker
Identifikation von Pilzarten mittels PCR, Klonieren & Sequenzieren	Wer sind die Gemeinschafts- & Populationsmitglieder und welches sind ihre nächsten Verwandten?	Genaue Information zur Identität der Organismen; bewährte Methode	Relativ teuer, arbeitsintensiv & oft wenig empfindlich für seltene Pilze; suboptimales Binden der PCR Primer kann zu PCR Drift führen und Klonieren kann gewisse Fragmente bevorzugen	Dirk Redecker, Hannes A. Gamper, Mathimaran Natarajan, Jan Jansa und andere
Quantifikation von Pilzarten/-gruppen via qPCR von DNS oder cDNS aus pilzlichen Reinkulturen & Feldproben	Wie vorherrschend / aktiv ist eine Art?	Einzigste molekulargenetische Methode zur genauen und fehlerfreien Bestimmung der Häufigkeit einer einzelnen Art oder Artengruppe oder der Ablesungshäufigkeit eines einzelnen Gens	Relativ teuer, muss für verschiedene Arten separat durchgeführt werden, kann nicht zwischen Pilzfäden und -sporen unterscheiden. Spezifität muss mittels Proben von Nicht-Zielorganismen getestet werden	Jan Jansa, Hannes A. Gamper, Mathimaran Natarajan, Ian R. Sanders
Gemeinschaftsprofilmethoden: DGGE, PCR-RFLP, T-RFLP, SSCP Analysen	Wie ist die Gemeinschafts- und Populationsstruktur? Welche Arten zeigen ein korreliertes Vorkommen?	Relativ günstig, schnell und geeignet, um viele Proben zu analysieren	Die Identität der nachgewiesenen Organismen steht nicht direkt fest; PCR Drift und Selektion können die Schätzung der relativen Häufigkeit von Organismen beeinflussen	Mathimaran Natarajan, Hannes A. Gamper, Jan Jansa
Populationsprofilmethoden: SSR / Mikrosatelliten, SNP, RFLP von mitochondrialen und Kern-DNS Abschnitten	Kreuzen sich Pilzstämme? Welche Pilzstämme kommen vor & in welcher relativen Häufigkeit?	Hohe Auflösung, da die Marker sehr variabel sind	Relativ großer Zeit- und Kostenaufwand für die Entwicklung	Mathimaran Natarajan, Dirk Redecker, Daniel Croll, Ian R. Sanders
Massives gleichzeitiges / Pyrosequenzieren von referenzmarkierten Gemeinschafts-PCR Produkten	Wie viele und welche Gemeinschafts- und Populationsmitglieder sind vorhanden? Wie nahe verwandt und häufig sind diese?	Nahezu vollständige Beprobung mit hoher Empfindlichkeit und Auflösung für einzelne Pilzstämme möglich	Beträchtlicher Bioinformatik- und Statistikaufwand, Unsicherheiten betreffend der Robustheit relativer Quantifikation, wegen PCR Drift und Selektion, falls dem Sequenzieren eine PCR Vermehrung vorausgeht	Hannes A. Gamper

Abkürzungen: cDNA: komplementäre Desoxyribonukleinsäure, DGGE / DTGE (engl. Denaturing Gradient / Temperature Gel Electrophoresis): dt. Denaturierungs- / Temperaturdenaturierungsgradientenanalyse; qPCR (engl. quantitative Polymerase Chain Reaction): dt. Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion, PCR-RFLP (engl. PCR Restriction Fragment Length Polymorphism): dt. PCR-Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus Analyse; T-RFLP (engl. Terminal RFLP): dt. Endstücklängenvielfaltanalyse von Verdauungsprodukten, SNP (engl. Single Nucleotide Polymorphism): dt. Analyse einzelner Nukleotidunterschiede; SSCP (engl. Single-Strand Conformational Polymorphism): dt. Einzelstrangkonformationsvielfaltanalyse; SSR (engl. Simple Sequences Repeat): dt. einfache Wiederholungseinheit- oder Mikrosatellitenanalyse.

Molekulargenetische Analyseverfahren können nach verschiedenen Kriterien klassifiziert werden. Einerseits bestehen Verfahren, die nur eine einzelne systematische Einheit (= Taxon) erfassen, wie

z.B. eine Art, eine Gattung, eine Familie, eine Ordnung, oder den ganzen Stamm der Glomeromycota. Solche methodischen Ansätze sind darauf beschränkt die Anwesenheit, das Fehlen, die quantitative Häufigkeit von einzelnen Organismen oder -gruppen zu erfassen. Sie erlauben es aber nicht tiefere systematische Einheiten, wie z.B. Populations- oder Gemeinschaftsmitglieder (d.h. Individuen oder Arten) aufzuschlüsseln. Beispiele solcher Methoden sind die Polymerasekettenreaktion (PCR)-vermittelte Vermehrung von DNS Abschnitten mittels spezifischer Oligonukleotidprimer oder quantitative Echtzeit PCR (vgl. Tabelle 1 und Kästchen; Gamper et al. 2007, 2008). Andererseits gibt es molekulargenetische Verfahren, um Mischproben von Organismen auf ihre Zusammensetzung hin zu untersuchen und sog. Gemeinschafts- oder Populationsprofile zu erstellen. Profilanalysen erlauben einen hohen Probendurchsatz und sind deshalb besonders für ökologische Untersuchungen geeignet. Der Nachteil der Methoden die das Vorkommen erfassenden ist jedoch, dass die Identitäten der einzelnen Populations- oder Gemeinschaftsmitglieder nicht sofort feststehen und, dass nur die häufigsten Organismen unter relativ großem Zusatzaufwand identifiziert werden können. Die mittels PCR vermehrten DNS Fragmente müssen vor dem Sequenzieren für die stammesgeschichtliche Identifikation über Klonieren voneinander getrennt werden. Klonieren, Sequenzieren und stammesgeschichtliche Verwandtschaftsanalyse erlauben es also, Elementen eines Populations- oder Gemeinschaftsprofils Identitäten zuzuordnen.

Profilanalysen können danach klassifiziert werden, ob sie einerseits unterschiedliche Längen, oder aber, andererseits, Sequenzunterschiede von Nukleinsäureabschnitten zur Unterscheidung nutzen. Sequenzunterschiede führen meistens dazu, dass sich Nukleinsäuren unterschiedlich falten, können aber auch unter Zuhilfenahme von DNS-schneidenden Enzymen zum Erzeugen von Fragmenten unterschiedlicher Länge genutzt werden. Beispiele von molekulargenetischen Gemeinschafts- und Populationsprofilanalyseverfahren sind DGGE und SSCP, die auf Faltungsunterschieden von DNS Fragmenten beruhen, oder z.B. RFLP und SSR / Mikrosatelliten Analysen, die DNS Fragmentlängenunterschiede nutzen (vgl. Tabelle und zugehörige Fußnote für die Englischen Abkürzungen der einzelnen Methoden).

Neuste technologische Entwicklungen auf dem Gebiet des Sequenzierens, welche es auch erlauben, aus Probengemischen oder Mischproben Nukleotidsequenzen zu erhalten, sprengen nun diese Dichotomie zwischen den Gemeinschafts- oder Populationsprofilmethoden und den Verfahren der Ein-Organismusanalysen. Es ist vorauszusehen, dass Pyrosequencing unseren Informationsstand massiv verbessern und es ermöglichen wird die derzeitigen molekulargenetischen Markersysteme so anzupassen, dass sie im Idealfall generell einsetzbar werden. Vermutlich werden sich auch bald einige der Profilanalysemethoden durch das Sammeln von Sequenzen erübrigen (s. Abbildung der Zusammenfassung). Im Moment besteht das Problem, dass viele molekulargenetische Werkzeuge nur für örtlich begrenzte Studien einsetzbar sind. Es ist zu hoffen, dass dieser methodische Flaschenhals durch Fortschritte in der Entwicklung neuer Sequenzieretechnologien überwunden wird, damit in Zukunft der Fokus endlich weg von Markersystemen und methodologischen Belangen auf ökologische Fragestellungen gelenkt werden kann. Ein vollständigeres Erfassen der Pilzgemeinschaften und –populationen sollte es in Zukunft ermöglichen, ein kohärenteres ökologisches Gesamtbild zu erhalten.

Die gesamte Artenvielfalt wird jedoch sowohl mittels molekulargenetischer, wie auch mikroskopischer Methoden unterschätzt und verzerrt wahrgenommen. Unterschiedliche DNA Extraktionseffizienz, Anzahl von Genkopien zwischen Pilzstämmen und –arten und Vermehrungsraten in der Polymerasekettenreaktion (sog. PCR Drift und Selektion – siehe Kästchen) sind einige der Gründe für eine fehlerhafte Wahrnehmung mittels molekulargenetischer Methoden. Molekulargenetische Analyseverfahren haben im Gegensatz zu mikroskopischen Methoden aber immer noch den großen Vorteil, dass sie sich auch zur Untersuchung von Pilzfadengeflechten in Wurzeln und Böden eignen.

Es ist wichtig, die aus molekulargenetischen Untersuchungen errechnete Vielfalt (Diversität) der arbuskulären Mykorrhizapilze nur als genäherte Schätzung zu betrachten. Gerade ribosomale, aber auch andere Gensequenzen des Kerns, scheinen v.a. innerhalb von Individuen der Glomeromycota äußerst vielfältig und in vielen Kopien vorhanden zu sein (Jansa et al. 2002a).

Zu kurze Sequenzmarker und damit verbunden zu wenig Information zur stammesgeschichtlichen Verwandtschaftsanalyse verunmöglichten es bisher im Feld zwischen Populationen und Gemeinschaften der arbuskulären Mykorrhizapilze zu unterscheiden. Durch immer mehr und längere Nukleotidsequenzen scheint es nun aber möglich zu werden, zwischen den verschiedenen systematischen Ein-

heiten pragmatisch Grenzen ziehen zu können (Stockinger et al. 2010). Ein methodologisch einfacher Weg zur Erkennung von arbuskulären Mykorrhizapilzstämmen ist es zurzeit, mitochondrielle Sequenzmarker zu verwenden (Börstler et al. 2010). Die Entwicklung mitochondrieller Markersysteme ist aber noch in den ersten Anfängen, weshalb das abgedeckte Artenspektrum noch sehr begrenzt ist (Odile Thiéry, mündl. Kommunikation).

Es fehlen immer noch getestete und auf alle arbuskuläre Mykorrhizapilze anwendbare Populationsmarker, die sich auch zur Untersuchung von Wurzel- und Bodenproben aus dem Feld eignen.

6 Zukunftsprojekte und Herausforderungen

Derzeit ist eine große vergleichende Studie zu den arbuskulären Mykorrhizapilzgemeinschaften in dutzenden von Schweizer Landwirtschaftsböden am Laufen. Es handelt sich hier um eine weiterführende Studie nach Evaluationsarbeiten (Jansa et al. 2009) zu einer aus Aktivitäten der Gruppe VBB hervorgegangenen bodenbiologischen Referenzmethode der Eidgenössischen Forschungsanstalten (FAL, 1996) zur Bestimmung der Bodenqualität anhand von arbuskulären Mykorrhizen. In dieser durch das Bundesamt für Umwelt (BAFU) finanzierten Studie werden die Struktur und Zusammensetzung von arbuskulären Mykorrhizapilzgemeinschaften und die pflanzenwachstumsphysiologischen Effekte in Acker- und Grünlandflächen im Flachland, der Hügelstufe, in alkalischen, sauren, ton-, lehmhaltigen, mit organischem Material angereicherten und sandigen Böden verglichen. Das Ziel dieser Studie ist es, den Einfluss verschiedener Umweltfaktoren auf arbuskuläre Mykorrhizapilze abschätzen zu können.

Im Rahmen eines SNF-finanzierten Projekts (Nr. 127522) zur Gemeinschaftsbildung bei arbuskulären Mykorrhizapilzen wird massives gleichzeitiges Sequenzieren (Pyrosequencing) verwendet, um den Gemeinschaftsbildungsprozess im Feld zu untersuchen. Um die Hypothese zu testen, ob nur weiterverwandte und deshalb sich funktionell stärker unterscheidende Arten zusammen am selben Ort vorkommen können, wurden acht natürliche Pilzgemeinschaften mit einem Teil ihres Oberbodens kreuzweise an die sieben anderen Schweizer Standorte gebracht und dort mit den einheimischen Gemeinschaften vermischt. Erkenntnisse aus dieser Studie sollen dazu dienen, allgemein vorhersagen zu können, welche Pilzinokula sich möglicherweise erfolgreich gegen natürliche Gemeinschaftsmitglieder durchsetzen und sich in Zukunft invasiv ausbreiten könnten.

Wie in der übrigen molekularen Ökologie bestehen auch in der Erforschung von arbuskulären Mykorrhizapilzen Tendenzen, vermehrt Eiweiss-kodierende molekulargenetische Marker anzuwenden (Gamper et al. 2010, Thomson et al. 2010). Diese haben den Vorteil, dass Aminosäuresequenzen stammesgeschichtlich hoch konserviert sind, was es ermöglicht, auch sehr unterschiedliche Arten vergleichen zu können. Außerdem erlauben Gen-basierte Marker Expressionsstudien auf der Ebene der Ribonukleinsäuren (RNS). RNA-basierte Studien ergeben einen unmittelbareren Einblick in die spezifischen metabolischen Aktivitäten von Organismen. In der Tat kann mit einem solchen Ansatz der Einfluss von Umweltfaktoren auf einzelne molekulare Prozesse oder funktionelle Merkmalsausprägungen im Detail studiert werden. Im Weiteren erlauben es Eiweiss-kodierende molekulargenetische Marker oft auch tiefere systematische Einheiten, wie Arten zu unterscheiden, da Pilze in vielen ihrer Gensequenzen variable ‚Introns‘, kurze nicht-kodierende Sequenzeinschübe, aufweisen. Um diese Variation in den Intronsequenzen nutzen zu können, werden PCR Primer entworfen, die beidseitig an die stammesgeschichtlich konservierten kodierenden Gensequenzen binden (vgl. Thomson et al. 2010 für eine allgemeine Übersicht zu molekulargenetischen Methoden).

Somit ist es eine Herausforderung für die Zukunft, von der reinen Beobachtung wegzukommen und biologische Wechselwirkungen direkt in Feldproben zu erfassen, sei es nur zwischen arbuskulären Mykorrhizapilzen, Mykorrhizapilzen und Pflanzen, oder Mykorrhizapilzen und anderen Bodenmikroorganismen oder auch nicht-biologischen Umweltfaktoren. Gerade die neu eingeführten Methoden des Pyrosequencing dürften unser immer noch begrenztes Wissen zur Ökologie und Populationsbiologie einzelner Mykorrhizapilzarten enorm erweitern.

7 Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Heutzutage stützen sich die meisten Untersuchungen zur Bestimmung der Vielfalt der arbuskulären Mykorrhizapilze in Wurzeln und Böden auf molekulargenetische Analyseverfahren, im Gegensatz zu früher, als sich Gemeinschaftsstudien nur auf die Analyse von Sporengemeinschaften abstützten konnten. Nur dank molekulargenetischer Methoden ist es möglich, Gemeinschaften von Pilzfadengeflechten auf ihre Artzusammensetzung und das quantitative Vorkommen der einzelnen Arten hin zu untersuchen.

Während die ökologische Forschung der letzten beiden Jahrzehnte durch einen Mangel geeigneter molekulargenetischer Methoden und hohe arbeitszeitliche und finanzielle Aufwendungen Einschränkungen erfahren hat, stehen wir heute an einem Wendepunkt zu einer Forschungsperiode, während der vermutlich eher angemessene statistische Analyseverfahren und Köpfe für die Dateninterpretation fehlen werden. Es ist vorauszusehen, dass bewährte traditionelle molekulargenetische gemeinschafts- und populationsanalytische Methoden durch erleichterte und günstigere moderne Sequenzierverfahren ersetzt werden. Die Bedeutung gut durchdachter Studiendesigns, effizienter Probenahme, -aufbereitung und Datenanalyse wird zunehmen. Ganz offensichtlich stehen wir im Moment an einem interessanten technologischen Wendepunkt, weil wir nun die Möglichkeit haben nie dagewesene Informationsmengen zu sammeln und zu interpretieren und damit ganz neue Forschungsfragen angehen können.

8 Verdankungen

Angela Erb hat die qPCR Analysen durchgeführt, und Thomas Anken hat das Feldexperiment in Tänikon beaufsichtigt. Prof. Dr. Thomas Boller gab konstruktive Kommentare zu einer früheren Fassung dieses Artikels und MSc Silvia Calabrese half dabei das Deutsch zu verbessern. H. A. Gamper bedankt sich bei den Professoren T. Boller und A. Wiemken für die Anstellung als Forschungs- & Lehrassistent am Botanischen Institut der Universität Basel.

9 Literaturverzeichnis

- Abbott LK, Robson AD. 1978. Growth of subterranean clover in relation to the formation of endomycorrhizas by introduced and indigenous fungi in a field soil. *New Phytologist* 81: 575-585.
- Börstler B, Thiéry O, Sykorová Z, Berner A, Redecker D. 2010. Diversity of mitochondrial large subunit rDNA haplotypes of *Glomus intraradices* in two agricultural field experiments and two semi-natural grasslands. *Molecular Ecology* 19: 1497-1511.
- FAL. 1996. Schweizerische Referenzmethoden der Eidg. landwirtschaftlichen Forschungsanstalten. Band 2: Bodenuntersuchungen zur Standort-Charakterisierung. Forschungsanstalten ART und ACW.
- Gamper H, Leuchtmann A. 2007. Taxon-specific PCR primers to detect two inconspicuous arbuscular mycorrhizal fungi from temperate agricultural grassland. *Mycorrhiza* 17: 145-152.
- Gamper H, Peter M, Jansa J, Lüscher A, Hartwig UA, Leuchtmann A. 2004. Arbuscular mycorrhizal fungi benefit from 7 years of free air CO₂ enrichment in well-fertilized grass and legume monocultures. *Global Change Biology* 10: 189-199.
- Gamper HA, van der Heijden MGA, Kowalchuk GA. 2010. Molecular trait indicators: moving beyond phylogeny in arbuscular mycorrhizal ecology. *New Phytologist* 185: 67-82.
- Gamper HA, Walker C, Schüßler A. 2009. *Diversispora celata* sp. nov.: molecular ecology and phylo-taxonomy of an inconspicuous arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytologist* 182: 495-506.
- Gamper HA, Young JPW, Jones DL, 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: 581-596.
- Helgason T, Merryweather JW, Denison J, Wilson P, Young JPW, Fitter AH. 2002. Selectivity and functional diversity in arbuscular mycorrhizas of co-occurring fungi and plants from a temperate deciduous woodland. *Journal of Ecology* 90: 371-384.

- Hijri I, Sýkorová Z, Oehl F, Ineichen K, Mäder P, Wiemken A, Redecker D. 2006. Communities of arbuscular mycorrhizal fungi in arable soils are not necessarily low in diversity. *Molecular Ecology* 15: 2277-2289.
- Hijri M, Sanders IR. 2005. Low gene copy number shows that arbuscular mycorrhizal fungi inherit genetically different nuclei. *Nature* 433: 160-163.
- Hoeksema JD, Chaudhary VB, Gehring CA, Johnson NC, Karst J, Koide RT, Pringle A, Zabinski C, Bever JD, Moore JC, Wilson GWT, Klironomos JN, Umbanhowar J. 2010. A meta-analysis of context-dependency in plant response to inoculation with mycorrhizal fungi. *Ecology Letters* 13: 394-407.
- Hudson ME. 2008. Sequencing breakthroughs for genomic ecology and evolutionary biology. *Molecular Ecology Resources* 8: 3-17.
- Husband R, Herre EA, Young JPW. 2002. Temporal variation in the arbuscular mycorrhizal communities colonising seedlings in a tropical forest. *FEMS Microbiology Ecology* 42: 131-136.
- Jansa J, Mozafar A, Banke S, McDonald BA, Frossard E. 2002a. Intra- and intersporal diversity of ITS rDNA sequences in *Glomus* intraradices assessed by cloning and sequencing, and by SSCP analysis. *Mycological Research* 106: 670-681.
- Jansa J, Mozafar A, Anken T, Ruh R, Sanders I, Frossard E. 2002b. Diversity and structure of AMF communities as affected by tillage in a temperate soil. *Mycorrhiza* 12: 225-234.
- Jansa J, Oberholzer HR, Egli S. 2009. Environmental determinants of the arbuscular mycorrhizal fungal infectivity of Swiss agricultural soils. *European Journal of Soil Biology* 45: 400-408.
- Jansa J, Wiemken A, Frossard E. 2006. The effects of agricultural practices on arbuscular mycorrhizal fungi. In: Frossard E, Blum WEH, Warkentin BP (eds) *Function of soils for human societies and the environment*. Geological Society, London, Special publications 266: 89-115.
- Johnson NC. 1993. Can fertilization of soil select less mutualistic mycorrhizae? *Ecological Applications* 3: 749-757.
- Johnson NC. 2010. Resource stoichiometry elucidates the structure and function of arbuscular mycorrhizas across scales. *New Phytologist* 185: 631-647.
- Kuhn G, Hijri M, Sanders IR. 2001. Evidence for the evolution of multiple genomes in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 414: 745-748.
- Oehl F, Laczko E, Bogenrieder A, Stahr K, Bösch R, Heijden Mvd, Sieverding E. 2010. Soil type and land use intensity determine the composition of arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Soil Biology and Biochemistry* 42: 724-738.
- Oehl F, Sieverding E, Ineichen K, Ris EA, Boller T, Wiemken A. 2005. Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi at different soil depths in extensively and intensively managed agroecosystems. *New Phytologist* 165: 273-283.
- Öpik M, Vanatoa A, Vanatoa E, Moora M, Davison J, Kalwij JM, Reier, Zobel M. 2010. The online database MaarjAM reveals global and ecosystemic distribution patterns in arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *New Phytologist* doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03334.x.
- Öpik M, Metsis M, Daniell TJ, Zobel M, Moora M. 2009. Large-scale parallel 454 sequencing reveals host ecological group specificity of arbuscular mycorrhizal fungi in a boreonemoral forest. *New Phytologist* 184: 424 - 437.
- Öpik M, Moora M, Liira J, Zobel M. 2006. Composition of root-colonizing arbuscular mycorrhizal fungal communities in different ecosystems around the globe. *Journal of Ecology* 94: 778-790.
- Sanders IR. 2004. Intraspecific genetic variation in arbuscular mycorrhizal fungi and its consequences for molecular biology, ecology, and development of inoculum. *Canadian Journal of Botany* 82: 1057-1062.
- Stockinger H, Krüger M, Schüßler A. 2010. DNA barcoding of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 187: 461-474.
- Thomson RC, Wang IJ, Johnson JR. 2010. Genome-enabled development of DNA markers for ecology, evolution and conservation. *Molecular Ecology* 19: 2184-2195.
- Vandenkoornhuysen P, Ridgway KP, Watson IJ, Fitter AH, Young JPW. 2003. Co-existing grass species have distinctive arbuscular mycorrhizal communities. *Molecular Ecology* 12: 3085-3095.
- Young JPW. 2008. The genetic diversity of intraterrestrial aliens. *New Phytologist* 178, 465-468.