

Razvoj raziskovalnih metod za karakterizacijo združb arbuskularnih mikoriznih gliv in potencialni vpliv biodiverzitete glivnih endofitov na vegetacijo

Irena MAČEK^{1,2}

Received November 12, 2021; accepted July 13, 2022.
Delo je prispelo 12. novembra 2021, sprejeto 13. julija 2022

Development of research methods to characterise arbuscular mycorrhizal fungal communities and potential effects of fungal endophyte biodiversity on vegetation

Abstract: Characterization and quantification of the functional and taxonomic diversity of microbial communities is essential for understanding all aspects of microbial ecology and is closely related to ecosystem function. Arbuscular mycorrhiza is the most widespread symbiosis on Earth, with arbuscular mycorrhizal (AM) fungi present in more than 2/3 of all plant species. Just over a decade after the publication of the first review article on molecular approaches to study the ecology of AM fungi in *Acta Agriculturae Slovenica* (Maček, 2009), the rapid development of molecular tools, especially next generation sequencing (NGS) technology, has accelerated the study of the research field of plant root endophytes. In this paper, the current approach to study the ecology and taxonomy of AM fungi is presented, which also provides some insights into the study of other plant root endophytes. In addition, a widely used system for classifying AM fungi with so-called virtual taxa (VT) is presented, which is used for ecological studies and comparison between different studies. Finally, a brief overview of the importance of climate and soil properties for AM fungal community composition and taxa distribution in global ecosystems is presented.

Key words: arbuscular mycorrhiza; biodiversity; ecology; endophytes; rhizosphere; sequencing; soil

Razvoj raziskovalnih metod za karakterizacijo združb arbuskularnih mikoriznih gliv in potencialni vpliv biodiverzitete glivnih endofitov na vegetacijo

Izvleček: Karakterizacija in kvantifikacija funkcionalne in taksonomske raznolikosti mikrobnih združb je ključnega pomena za razumevanje vseh vidikov mikrobne ekologije in je povezana tudi širše z razumevanjem delovanja ekosistemov. Arbuskularna mikoriza predstavlja najbolj razširjeno in starodavno simbiozo na Zemlji, saj so arbuskularne mikorizne (AM) glive prisotne v koreninah več kot dveh tretjin vseh rastlinskih vrst. V dobrem desetletju od objave preglednega članka o uporabi molekularskih pristopov pri raziskavah arbuskularne mikorize v reviji *Acta Agriculturae Slovenica* (Maček, 2009) je razvoj metodologije, predvsem tehnologije določanja nukleotidnega zaporedja (sekvenciranja) naslednjih generacij (NGS), močno pospešil raziskave raznolikosti in ekologije združb AM gliv in drugih koreninskih endofitov. V tem članku so predstavljene novosti na področju raziskav endofitskih gliv v koreninah rastlin, s poudarkom na aktualnem pristopu k raziskavam v ekologiji in taksonomiji AM gliv, ter sistem njihove klasifikacije s tako imenovanimi virtualnimi taksoni (VT). Slednji je zelo uporaben za namen ekoloških raziskav in širše primerjave različnih študij med sabo. Na kratko je predstavljen tudi vpliv klimatskih in talnih lastnosti okolja na sestavo združb in pojavljanje posameznih taksonov AM gliv v različnih ekosistemih.

Ključne besede: arbuskularna mikoriza; biodiverzitet; ekologija; endofiti; rizosfera; sekvenciranje; tla

¹ Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

² Korespondenčni avtor, e-naslov: irena.macek@bf.uni-lj.si

1 UVOD V RAZISKAVE DIVERZITETE AM IN DRUGIH SKUPIN ENDOFITSKIH GLIV V KORENINAH RASTLIN

Arbuskularne mikorizne (AM) glive (skupina Glomeromycotina ali tudi Glomeromycota) (Spatofora in sod., 2016, Tedersoo in sod., 2018) predstavljajo ključno skupino talnih mikroorganizmov v številnih kopenskih ekosistemih in najbolj široko razširjeno simbiozo na planetu (Brachmann in sod., 2006). Povezava med AM glivami in rastlinami je starodavna, saj so bile AM glive prisotne že ob prehodu rastlin iz morja na kopno v paleozoiku pred več kot 450 milijoni let. Poleg AM gliv (Glomeromycotina) pa so bile ob prehodu rastlin na kopno prisotne tudi endofitske glive iz starodavne in delno saprotrofne skupine Endogonales (Mucoromycotina, Mucoromycota), katerih predstavnike so dolgo uvrščali med AM glive zaradi podobnih morfoloških struktur (drobne hife in njihov razrastki podobni arbuskulom), ki jih te glive tvorijo v koreninah rastlin. Na podlagi molekularnih označevalcev (markerjev) je bilo ugotovljeno, da predstavljajo t.i. drobni koreninski endofiti iz skupine Mucoromycotina (ang. 'fine root endophytes' ali MFRE) filogenetsko ločeno skupino globalno razširjenih rastlinskih endosimbiontov (Orchard in sod. 2017). Slednji tudi danes še vedno tvorijo endosimbiozo z večino skupin kopenskih rastlin, pogosto tudi istočasno in funkcionalno komplementarno z AM glivami (Field in sod., 2015; Orchard in sod., 2017, Hoysted in sod., 2019, Besiana et al., 2021; Sinanaj in sod., 2021). Ker so ugotovitve o pomenu simbioze rastlin z glivami iz skupine Mucoromycotina še relativno nove, je podatkov o njihovi povezavi z rastlinami manj kot za arbuskularno mikorizo, tako da obstaja še kar nekaj odprtih vprašanj za boljše razumevanje te skupine gliv in njihove funkcije v ekosistemih (Sinanaj in sod., 2021). V tem preglednem članku se osredotočam predvsem na arbuskularno mikorizo, torej AM glive iz skupine Glomeromycotina, vsekakor pa bo v prihodnosti potrebno spremljati tudi razvoj raziskav drugih skupin rastlinskih endofitov, tako že dlje časa poznanih temnih septiranih endofitov (DSE) (Rodriguez in sod., 2009, Knapp in sod., 2018, Tonjer in sod., 2021), kot tudi drobnih koreninskih endofitov iz skupine Mucoromycotina (MFRE). Razvoj novih molekularnih metod v zadnjem desetletju vsekakor omogoča lažje odkrivanje in razumevanje celotnega spektra raznolikosti organizmov, ki živijo v območju rastlinskih korenin oz. rizosferi. V bližnji prihodnosti zato lahko pričakujemo veliko novih informacij o starodavnih simbiozah med glivami in rastlinami, njihovi biodiverziteti in pomenu za ekosisteme, vključno z agroekosistemi.

Že dolgo je znano, da arbuskularna mikoriza rastlinam prinaša številne koristi, od izboljšane mineralne

prehrane in preskrbe z vodo ter obrambe pred patogeni, do posrednih koristi npr. izboljšane strukture tal in manjše erozije tal. AM glive so obvezni biotrofi, od rastlin dobivajo fotoasimilate, ki predstavljajo njihov edini vir organskega ogljika (Smith & Read, 2008). Simbioza vpliva tudi na sestavo združb kopenskih rastlin, s tem pa tudi na funkcioniranje ekosistemov in njihovo produktivnost (Fitter, 2005, Schnitzer & Klironomos, 2011, Wurzbürger in sod., 2017). Taksonomsko lahko AM glive klasificiramo na več načinov, od tradicionalnih klasifikacij, ki temeljijo na morfologiji celične stene njihovih spor (npr. Oehl in sod., 2011, Blszkowski, 2012), kar je naslovljeno v prvem delu članka, do molekularnih pristopov, pri katerih uporabljamo različne molekularne označevalce, kar je obravnavano v drugem delu članka. Definicija vrste je pri mikroorganizmih, vključno z mikroglivami, na splošno zelo težavna in podvržena konsenzu na podlagi trenutnega poznavanja posamezne skupine organizmov. Prav zato lahko na tem področju v prihodnosti pričakujemo tudi nadaljnje spremembe klasifikacije, ki bodo temeljile na novo pridobljenih podatkih o AM glivah. V zadnjem delu članka so na kratko povzete tudi glavne omejitve različnih pristopov k raziskovanju raznolikosti AM gliv, s poudarki, kje je na mestu previdnost, z namenom čim bolj kvalitetne interpretacije rezultatov in pridobivanja novega znanja o tej zanimivi in pomembni skupini organizmov.

1.1 GOJENJE AM GLIV V ČISTIH KULTURAH IN KLASIČNA IDENTIFIKACIJA VRST AM GLIV

Veliko težavo pri morfološkem določanju vrst AM gliv predstavlja njihovo gojenje v čistih kulturah, saj AM glive brez primerne gostiteljske rastline ne uspevajo. V sklopu raziskav AM gliv čisto, enovrstno (monospecifično) kulturo predstavlja kultura, kjer je prisotna samo ena vrsta glive, ki je bila vzgojena iz ene same spore. Postopek vzpostavitve take kulture je zapleten in dolgotrajen, zahteva veliko ekspertnega znanja ter rastne razmere, ki preprečujejo navzkrižno kontaminacijo lončnih kultur rastlin z drugimi glivami iz okolja (npr. ob zalivanju rastlin, zaradi prenosa z živalskimi vektorji, kot so insekti itd.).

Spore nekaterih vrst AM gliv lahko izoliramo iz njihovega okolja (običajno iz talnih vzorcev ali pri nekaterih vrstah tudi iz korenin) s postopkom redčenja in koncentriranja v vodi in/ali raztopini saharoze ter iskanjem in prepoznavanjem spor s stereo mikroskopom. Novo, enovrstno lončno kulturo AM gliv vzpostavimo s prenosom posamezne spore v bližino korenin izbranih vrst rastlin. Rastline so običajno za namen tega postopka vzgojene iz semen, ki so bila predhodno površinsko sterilizirana. Da povečamo možnost neposrednega stika



Slika 1: Vzpostavitev enovrstnih (monospecifičnih) kultur AM gliv, vzgojenih iz ene same spore, v nastavkih za pipete (levo) in kasneje v lončnih kulturah (sredina, desno). Namen tega postopka je, da omogočimo čim boljši stik korenine rastline s posamezno izolirano sporo AM gliv in kasneje pomnoževanje AM gliv v kulturi. Rastline so vzgojene iz semena, ki je bilo predhodno površinsko sterilizirano (foto: I. Maček)

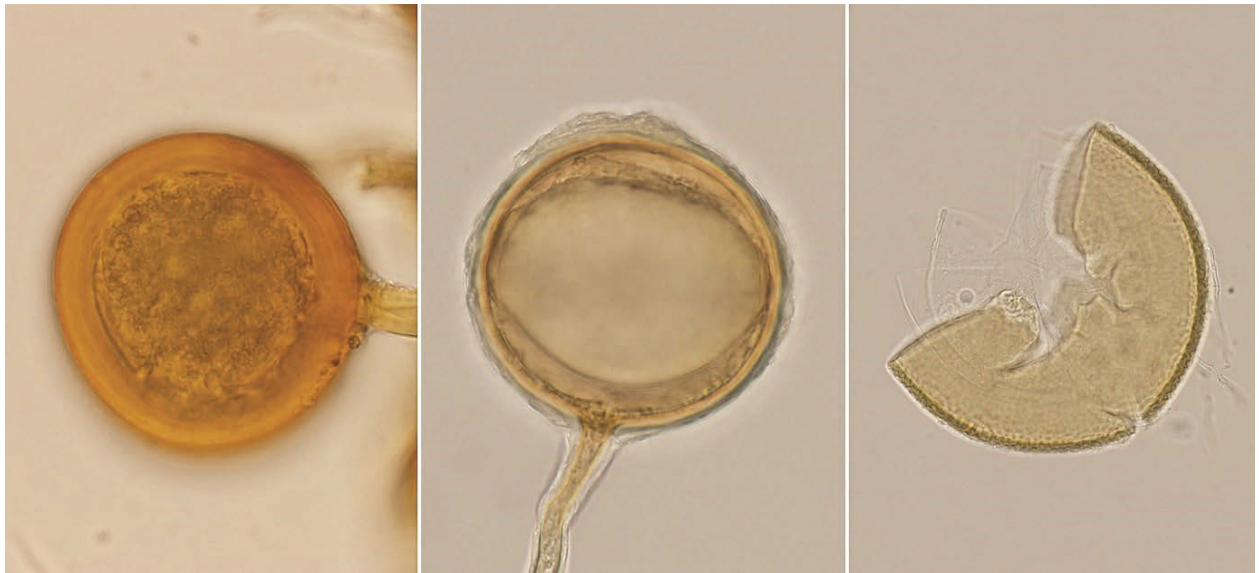
Figure 1: Monospecific cultures of AM fungi grown from a single AM fungal spore in pipette tips (left) and later in pot cultures (centre, right). The method allows good spatial contact between plant roots grown from a single surface-sterilised seed and a single AM fungal spore and further fungal development (photo: I. Maček)

med korenino rastline in viabilno sporo AM glive, vzpostavimo začetno interakcijo med obema organizmoma v omejenem prostoru. Za ta namen se je izkazala primerena uporaba nastavkov za pipete, napolnjenih z vlažnim, sterilnim substratom (Slika 1). Kasneje rastline skupaj z nastavkom prenesemo v večje lonce, napolnjene s sterilnim substratom (Slika 1). Da zagotovimo bolj raznolik življenjski prostor za glive (koreninska biomasa) lahko v kasnejši fazi rasti dosejemo še več gostiteljskih rastlin. Koristno je, če uporabimo več rastlinskih vrst, kar omogoči večji nabor potencialnih gostiteljev za AM glive, večjo raznolikost in biomaso korenin in s tem večjo možnost, da se simbioza (mikoriza) v rizosferi dejansko vzpostavi. Pomembno je, da tudi kasneje, tekom rasti rastlin, maksimalno zmanjšamo možnost navzkrižne kontaminacije s sporami ali delci infektivnih hif med posameznimi lončnimi kulturami. Taki preventivni postopki zajemajo gojenje rastlin v zaprtih prostorih, kontrolo škodljivcev, kontrolirano odtekanje vode iz loncev z mikorizo, ustrezno zalivanje, ki je lahko urejeno z avtomatiziranim kapljičnim sistemom, in omejeno ventilacijo zraka znotraj prostora. Rastline lahko gojimo tudi v posebnih vrečkah z vgrajenim filtrom, kjer se ustvari mikroklima in so izolirane od ostalih rastlin, obenem pa je poseganje v tak sistem (npr. zalivanje) omejeno na minimum.

Vzpostavitev enovrstne kulture AM gliv je dolgotrajni postopek, ki je lahko odvisen od številnih de-

javnikov, med drugimi vrste oz. genotipa glive, rastne sezone, gostiteljskih rastlin in rastnih razmer. Tudi sporulacija (tvorba spor) je pri AM glivah zelo nepredvidljiva in odvisna od vrste glive. Namen vseh teh postopkov je zagotovitev zadostne količine materiala (nepoškodovanih, živih spor) za njihovo izolacijo in identifikacijo, saj za opis morfološke vrste AM gliv ne zadostuje ena sama spora, ampak jih potrebujemo vsaj nekaj deset za pripravo preparatov in še več za kasnejše shranjevanje glivnega materiala v banko gliv (Oehl in sod., 2011), kar je pogoj za opis nove vrste (Slika 2). Običajno se shranjuje posušen substrat s sporami v suhem, temnem in hladnem prostoru oz. se vzdržuje aktivno kulturo AM gliv, skupaj z živimi rastlinskimi simbionti v rastlinjaku, kar pa je časovno in finančno zelo zahtevno.

Taksonomske in ekološke raziskave AM gliv na podlagi morfoloških znakov so torej zelo težavne iz več razlogov. Če povzamemo, so glavne omejitve: (1) veliko taksonov AM gliv ne moremo gojiti v čistih (lončnih) kulturah, obenem je glive nemogoče identificirati na podlagi kolonizacije v koreninah (Slika 3), (2) zahteve za rast in sporulacijo različnih taksonov AM gliv so zelo raznolike in kompleksne, (3) pri številnih taksonih (še) nismo uspeli izolirati njihovih spor in tako morfološko določene vrste povezati s podatki, ki izvirajo iz molekularskih raziskav na osnovi DNA, (4) taksonomsko določanje AM gliv je zelo zapleteno in zahteva kompleksno ekspertno znanje, ki je



Slika 2: Spore dveh različnih vrst AM gliv iz rodu *Rhizophagus* (levo, sredina). Spora AM glive s strto celično steno iz rodu *Acaulospora* (desno). Vidna je večplastna, strukturirana celična stena. Morfološke značilnosti celične stene, njenih plasti ter pritrjenih hif služijo kot taksonomski znaki v taksonomiji AM gliv (foto: I. Maček)

Figure 2: Spores of two different AM fungal species from the genus *Rhizophagus* (left, centre). Crushed AM fungal spore of the genus *Acaulospora* with visible multi-layered structured cell wall (right). The morphological structures of the cell wall, its layers and attached hyphae serve as taxonomic features in the taxonomy of AM fungi (photo: I. Maček)

kljub temu, da na to temo obstaja kar nekaj strokovne literature (Oehl in sod., 2011, Blaszkowski, 2012), omejeno na samo nekaj strokovnjakov (Slika 2), (5) taksonomski znaki različnih skupin AM gliv se lahko tudi prekrivajo, oz. ni znano, če lahko npr. ista gliva v različnih okoljih tvori tudi več različnih morfoloških tipov spor.

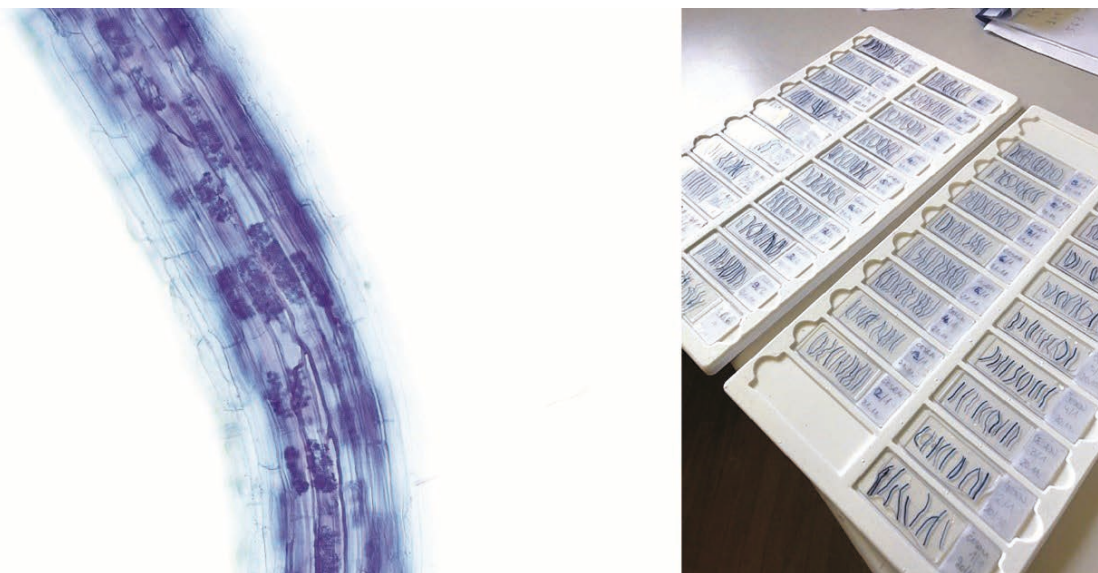
Prav zato je razvoj molekularnih metod zelo pomemben za razumevanje ekologije in diverzitete AM in drugih endofitskih gliv. Ena izmed prednosti tega pristopa je tudi ta, da lahko DNA izoliramo direktno iz korenin (Slika 3), s tem pa dobimo podatke o združbi gliv, ki je fiziološko aktivna in v času vzorčenja v dejanski interakciji z rastlinami. Molekularne metode in njihov hitri razvoj tako predstavljajo pravo revolucijo v razumevanju teh organizmov in so še vedno med najbolj obetavnimi orodji za raziskave združb endofitskih gliv (Clapp in sod., 2003, Dickie & FitzJohn, 2007, Dumbrell in sod., 2017, Sinanaj in sod., 2021).

2 MOLEKULSKA IDENTIFIKACIJA AM GLIV V OKOLJSKIH VZORCIH IN GENSKI MARKERJI

Dejstvo je, da obstaja relativno malo vrst oz. taksonov AM gliv, ki jih lahko gojimo v lončnih kulturah. Pri številnih genotipih AM gliv, ki jih poznamo samo na osnovi molekularnih označevalcev izolirane DNA iz

okoljskih študij, raziskovalci še nismo uspeli izolirati spor ali celo ugotoviti, če ti taksoni sploh sporulirajo v njihovem naravnem okolju. Taki genotipi so poznani samo na osnovi nukleotidnih zaporedij oz. sekvenc določenih genskih označevalcev. V okoljskih študijah se kot ustrezni označevalec za raziskave raznolikosti in ekologije združb AM gliv največkrat uporablja gen *18S rRNA* za malo podenoto ribosoma (SSU) (Simon in sod., 1992, Helgason in sod., 1998; Maček in sod., 2019), v zadnjem času pa v manjšem obsegu tudi regija notranjega prepisanega vmesnika – ITS (nuclear ribosomal internal transcribed spacer region) (npr. Alzarhani in sod., 2019) (Slika 4). Slednja se največkrat uporablja v primeru, da so v raziskavo vključene tudi druge skupine gliv (ne samo AM glive), za katere je regija ITS bolj primeren označevalec kot *18S rRNA*, obenem pa uporaba ene same regije za vse zmanjša stroške raziskave (uporaba enega označevalca, namesto dveh, čeprav regija ITS ni optimalno za identifikacijo AM gliv) (Alzarhani in sod., 2019).

Molekularsko določanje omogoča številčno ovrednotenje (kvantifikacijo) taksonov AM gliv v tleh ali v koreninah rastlin. Geni, ki kodirajo to *18S rRNA* (ali *18S SSU*) genomsko regijo, so dostopni v velikem številu kopij in vsebujejo veliko ohranjenih kot tudi variabilnih regij, kar omogoča ločevanje taksonov na različnih ravneh. Sekvence male podenote ribosoma (*18S SSU*) se v ekologiji AM gliv uporabljajo nekje od začetka devetdesetih let prejšnjega stoletja (Simon in sod., 1992). Do



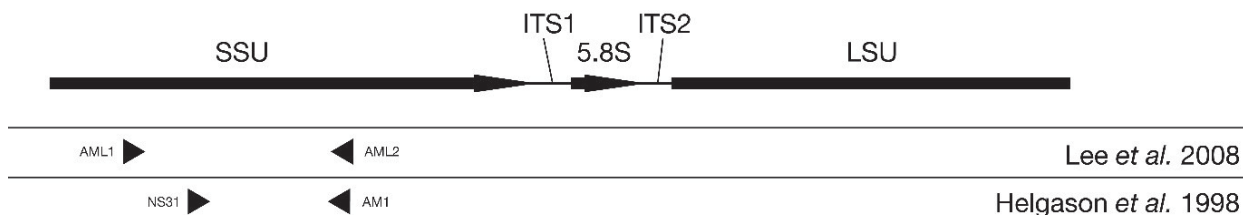
Slika 3: Kolonizacija korenin koruze (*Zea mays* L.) z AM glivami (levo) in mikroskopski preparati za oceno stopnje kolonizacije korenin z AM glivami (desno). Na sliki levo so vidne znotraj-koreninske hife AM gliv in arbuskuli (drevescom-podobne strukture), ki so pomembne za izmenjavo hranil med rastlinami in glivami (foto: I. Maček)

Figure 3: Arbuscular mycorrhizal fungi colonising maize (*Zea mays* L.) roots (left), with visible intraradical hyphae and arbuscules (tree-like structures) important for nutrient exchange between plants and fungi. Slides for microscopy and estimation of AM fungal colonisation in plant roots (right) (photo: I. Maček)

danes je bilo objavljenih kar nekaj različnih začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje odsekov sekvenc, specifičnih za različne skupine AM gliv, v postopku verižne reakcije s polimerazo (PCR). Najpogosteje uporabljen par začetnih oligonukleotidov male podenote ribosoma v okoljskih raziskavah je AM1 (Helgason in sod., 1998) in NS31 (Simon in sod., 1992), kjer je dolžina pomnoženega fragmenta DNA približno 550 baznih parov. Za ta par začetnih oligonukleotidov je značilno tudi za AM glive nespecifično pomnoževanje drugih fragmentov, sploh, kadar je glivne DNA v okolju oz. ekstraktu malo. To je bil tudi povod za izdelavo novih začetnih oligonukleoti-

dov, kot je par AML1-AML2 (Lee in sod., 2008; dolžina pomnoženega fragmenta DNA je okrog 800 baznih parov) (Slika 4). Regija vsebuje tudi začetno regijo pomnoževanja oligonukleotidov AM1-NS31, in pomnožuje širok nabor taksonomskih skupin AM gliv, ne pa vseh – izključujeta na primer skupino Paraglomeraceae (Lee in sod., 2008).

Ribosomska DNA je v posamezni spori AM gliv zelo polimorfna, kar pomeni, da so sekvence rRNA gena med posameznimi taksoni AM gliv močno variabilne (Tisserant in sod., 2013). Dokazano je tudi, da hife in spore AM gliv vsebujejo na stotine jeder (Tisserant in



Slika 4: Shematski pregled najpogosteje uporabljenih parov začetnih oligonukleotidov, ki se uporabljajo v ekoloških raziskavah AM gliv (NS31-AM1 in AML1-AML2). Na vrhu slike so prikazani molekularni označevalci jedrne ribosomske RNA – mala podenota ribosoma (18S SSU), velika podenota ribosoma (28S LSU), 5.8S medgenski vmesnik (IGS) in notranji prepisani vmesnik (ITS). Trikotne puščice prikazujejo smer in mesto za prijemanje začetnih oligonukleotidov

Figure 4: Schematic of the most common primer pairs and DNA regions used in the community ecology of AM fungi (NS31-AM1 and AML1-AML2). At the top of the figure are shown molecular markers of nuclear ribosomal RNA (rRNA) – small ribosomal subunit (18S SSU), large ribosomal subunit (28S LSU), 5.8S intergenic spacer (IGS) and the internal transcribed spacer (ITS). The arrows indicate the direction and alignment range of the primers

sod., 2013). Zaradi polimorfizma trenutno razpoložljivih genskih označevalcev je težko določiti vrsto AM gliv z molekulskimi metodami. V večini študij združb AM gliv različne taksone identificiramo kot skupine sorodnih sekvenc (npr. operativne taksonomske enote – OTU), ki pa verjetno bolj kot nivoju posamezne vrste AM gliv ustrezajo posameznim rodovom (npr. Krüger in sod., 2009). Največ okoljskih raziskav raznolikosti AM gliv je bilo izvedenih s pomnoževanjem regije 18S rRNA (npr. Schwarzott & Schußler, 2001; Helgason in sod., 2002; Vandenkoornhuysen in sod., 2002; Öpik in sod., 2006), najprej z uporabo pirosekvenciranja s platformo Roche 454 GS-FLX (npr. Öpik in sod., 2009, Dumbrell in sod., 2011), kasneje pa tudi s z določanjem nukleotidnega zaporedja (sekvenciranjem) s platformo Illumina (npr. Alzarhani in sod. 2019; Maček in sod., 2019, Davison in sod., 2021). Trenutno poznamo več kot 300 morfotipov AM gliv, določenih na podlagi morfologije spor (<http://www.amf-phylogeny.com/>). Na podlagi molekulskih analiz lahko ocenimo, da je število različnih taksonov AM gliv v okolju bistveno večje, kot kažejo taksonomske študije na podlagi morfoloških znakov. Virtualna taksonomija (virtualni taksoni – VT) AM gliv, ki je bila vzpostavljena v specializirani bazi podatkov s področja raziskav AM gliv, ki se imenuje MaarjAM (Öpik in sod., 2010), tudi bazira na uporabi genskega markerja 18S rRNA. Enote, definirane znotraj tega sistema, so t.i. virtualni taksoni (VT), ki po navedbah avtorjev baze MaarjAM verjetno predstavljajo monofiletske skupine AM gliv, pri katerih podobnost sekvenc znotraj skupine presega dogovorno določeno mejo 97 %. Resolucija VT naj bi približno ustrezala tisti, ki definira vrste AM gliv, določene na podlagi morfoloških znakov (Öpik & Davison, 2016). Baza MaarjAM (<http://maarjam.botany.ut.ee>) vsebuje več kot 450 virtualnih taksonov, identificiranih na podlagi sekvenc za malo podenoto ribosoma (18S rRNA) (Öpik in sod., 2014), vendar se številke spreminjajo oz. so večje, odvisno, katere genske označevalce uporabimo za identifikacijo taksonov. Klasifikacija sekvenc genov 18S rRNA z uporabo virtualnih taksonov (VT), ki so določeni na podlagi baze MaarjAM (Öpik in sod., 2009, 2010), nam omogoča poenoten sistem poimenovanja genotipov, ki jih lahko v ekoloških študijah uporabimo za najboljši približek identifikaciji do nivoja vrst oz. rodov (Öpik in sod., 2014).

Pogosta kritika uporabe molekulskih metod za številčno ovrednotenje mikrobnih združb so tudi napake posamezne metode, ki lahko vplivajo na končni rezultat analize. Ena izmed najpogosteje omenjenih napak je povezana z metodo PCR in neenakomernim pomnoževanjem DNA različnih taksonov znotraj združbe (t.i. PCR bias ali PCR pristranskost). PCR je ključni del praktično vseh molekulskih pristopov za analizo mikrobnih

združb, vključno z združbami AM gliv. Znotraj izolata DNA iz vzorca korenin namreč glivna DNA predstavlja le majhen del celokupne ekstrahirane DNA, zato je potrebno specifično pomnoževanje (amplifikacija) regij DNA, ki so informativne za ločevanje različnih taksonov AM gliv. Odvisno od ciljev in namena raziskave se za to lahko uporablja različne genske označevalce, najpogosteje pa je v ekoloških raziskavah AM gliv uporabljena že omenjena regija 18S rRNA. Potencialne napake oz. pristranskost metode PCR za pomnoževanje specifičnih taksonov (genotipov) AM gliv ter primernost uporabe presejalne metode polimorfizma dolžine terminalnih restrikcijskih fragmentov (TRFLP) za kvantitativne raziskave je bila za regijo 18S rRNA AM gliv testirana v študiji Cotton in sod. (2014). V raziskavi so potrdili, da pri uporabi metod PCR za gene 18S rRNA ne prihaja do bistvenih razlik v pomnoževanju DNA med različnimi genotipi AM gliv in se zato te metode lahko uporabljata tudi za kvantitativne analize združb AM gliv, zavedati pa se moramo določenih omejitev. Napake v pomnoževanju regij DNA z metodo PCR se lahko zgodijo, če se različni genotipi pomnožujejo različno hitro zaradi razlik v njihovih nukleotidnih zaporedjih ali zaradi same kinetike reakcije pomnoževanja (Kanagawa, 2003). Argument, da se to ne pojavlja pri AM glivah ob uporabi najpogosteje uporabljenih začetnih oligonukleotidov AM1 in NS31 je ta, da so regije DNA, na katere se ti oligonukleotidi vežejo zelo konzervativne (ohranjene med sorodstveno oddaljenimi taksoni) in imajo obenem zelo majhno variabilnost v vsebnosti baz gvanina (G) in citozina (C) v amplikonih (Dumbrell in sod., 2010). Odsotnost tovrstnih napak (pristranskosti pri pomnoževanju med različnimi genotipi) pri reakciji PCR, je eden izmed osnovnih pogojev, da je neka analiza lahko kvantitativna in obenem omogoča oceno različnih indeksov pestrosti oz. diverzitetnih indeksov (Cotton in sod., 2014).

V nadaljnjih testih so uporabili tudi analizo TRFLP za karakterizacijo umetno ustvarjene združbe z znanimi razmerji količin vhodne DNA različnih genotipov AM gliv. Podatki študije kažejo, da je protokol TRFLP v kombinaciji s PCR močno in konsistentno orodje za analizo združb AM gliv, medtem, ko na nivoju analiz populacij posameznih taksonov (genotipov) avtorji študije priporočajo več previdnosti (Cotton in sod., 2014). Ta eksperiment je torej potrdil hipotezo, da je možno z uporabo PCR in metodo TRFLP ustrezno ugotoviti relativne razlike med različnimi združbami AM gliv, v smislu njihove diverzitetne in sestave. Študija je tudi pokazala, da pri pomnoževanju različnih genotipov AM gliv za gene 18S rRNA metoda PCR posameznih genotipov ne pomnožuje bolj, kot drugih, kar pomeni, da se ta metoda lahko uporablja tudi v sklopu drugih kvantitativnih analiz združb AM gliv, kjer predstavlja metoda PCR pomemb-

no komponento. Mednje vsekakor sodijo tudi vse metode sekvenciranja naslednjih generacij (NGS), ki so danes za raziskave ekologije združb AM gliv največ v uporabi in katerih sestavni del je tudi pomnoževanje sekvenc s PCR (npr. platforma Illumina).

2.1 UPORABA KLONIRANJA IN DOLOČANJA NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA PO SANGERJU TER PRESEJALNIH METOD

V času nastanka prvega preglednega članka o uporabi molekularskih pristopov pri raziskavi AM gliv (Maček, 2009) se je za raziskave sestave mikrobnih združb, vključno z združbami rizosfernih AM gliv iz okoljskih vzorcev (tal ali korenin), v veliki meri uporabljalo molekularske pristope, ki so temeljili na postopkih kloniranja in določanja nukleotidnega zaporedja po Sangerju. Če povzamemo na kratko, tak pristop običajno vsebuje naslednje korake: (1) pomnoževanju glivne DNA z reakcijo PCR, (2) *in vivo* ločevanje pomnoženih fragmentov DNA s kloniranjem pomnožkov (amplikonov) v plazmide in uporabo kolonij bakterij vrste *Escherichia coli* za ločevanje sekvenc, (3) ponovna/sekundarna reakcija PCR za namen ločevanja sekvenc, potrebnega za uporabo (4) sekvenciranj prve generacije (sekvenciranje po Sangerju) (glej opis postopka v Maček, 2009). Vsi naštetih koraki, predvsem pa kloniranje in uporaba celičnih kultur, so predstavljali velik časovni in finančni zalogaj, zato je bilo število vzorcev (biološke ponovitve), kot tudi število sekvenc, ki so bile sekvencirane za posamezni vzorec (globina sekvenciranja), zelo omejeno. Za posamezno okoljsko študijo sestave združbe AM gliv smo na tak način tipično lahko pregledali nekje med 500 in 1000 sekvenc za posamezni genski marker (npr. fragment 18S rRNA). Posledica tega je bila, da so bile združbe opisane zelo pomanjkljivo. Lahko se namreč zgodi, da na ta način nevede izpustimo tiste taksone, ki so znotraj združbe manj pogosti (redki), združbo pa zaradi metodoloških omejitev opisujemo zgolj na podlagi bolj dominantnih in bolj številčnih predstavnikov skupine.

Vmesna faza med zgoraj opisanim postopkom in novimi postopki sekvenciranja naslednjih generacij (NGS) je bila uporaba različnih presejalnih metod, ki temeljijo na primerjavah t.i. prstnih odtisov združbe oz. ločevanju produktov PCR z dvojno vijačnico podobne dolžine, vendar z različno sekvenco. Te metode so omogočile zajem nekoliko večjega števila vzorcev in tudi večjo globino vzorčenja (število obravnavanih sekvenc). Mednje sodijo metode, kot so denaturacijska gradientna gelska elektroforeza (DGGE), temperaturna gradientna gelska elektroforeza (TGGE) in že omenjeni polimorfizem dolžine terminalnih restriktivskih fragmentov (TR-

FLP). Med naštetimi metodami ima TRFLP največjo zmogljivost v smislu možnosti obdelave večjega števila bioloških vzorcev, medtem, ko so tehnike gelske elektroforeze (DGGE, TGGE) zamudne in omogočajo obdelavo le manjšega števila vzorcev. To pomeni, da so manj uporabne za ekološke študije, kjer je med vzorci običajno velika variabilnost in je zato potrebno v študijo vključiti veliko število vzorcev. Slaba stran vseh teh metod je tudi ta, da so primarno presejalne narave, zato v končni fazi običajno nimamo vpogleda v sekvence posameznega markerskega gena raziskovanih organizmov. Tako metodo lahko zato uporabljamo samo za relativne primerjave sestave združb in biodiverzitete med primerjanimi vzorci znotraj ene študije, ne omogočajo pa primerjave različnih študij med sabo. Tako je bila pred razvojem in širšo uporabo metod NGS relativno pogosto uporabljena analiza za relativne primerjave sestave združb organizmov iz okoljskih vzorcev preučevanje polimorfizma dolžine terminalnih restriktivskih fragmentov (TRFLP) tarčnih genov (prokariotskih 16S ali evkariotskih 18S rRNA), ki v nekaterih primerih omogoča tudi kvantitativne študije. Metoda je bila pogosto uporabljena tudi na področju mikrobne ekologije in okoljske mikrobiologije, predvsem zaradi cenovne dostopnosti, filogenetske ločljivosti in enostavne analize večjega števila vzorcev.

Analiza TRFLP ima torej dovolj veliko zmogljivost (omogoča obdelavo zadostnega števila vzorcev), da lahko z njo preučimo tudi vplive različnih okoljskih dejavnikov na strukturo in dinamiko mikrobnih združb. Na tak način dobimo t.i. 'prstni odtis' (finger-print) združbe raziskovane skupine organizmov za analizirane vzorce, zato tehniko TRFLP imenujemo tudi tehnika prstnih odtisov. Take podatke lahko uporabimo za analizo diverzitete (izračun različnih indeksov raznolikosti) in sestave združbe, pri čemer lahko izvajamo primerjave med vzorci, zajetimi znotraj ene študije, ne pa tudi med različnimi študijami, kar je pomanjkljivost tehnik, ki uporabljajo t. i. tehniko prstnih odtisov. Poznati moramo tudi specifične posamezne preučevane skupine organizmov in omejitve uporabe posamezne metode za to skupino. Primernost metode TRFLP so testirali tudi za kvantitativne analize združb AM gliv, pri tem pa avtorji študije opozarjajo, da tehnika TRFLP v vseh testiranih vzorcih precenjuje vrstno pestrost AM gliv znotraj raziskovane združbe, zato je pri kvantitativnem vrednotenju indeksov raznolikosti potrebna pozornost pri interpretaciji s to tehniko pridobljenih rezultatov (Cotton in sod., 2014). Sama metoda TRFLP ne producira celotnih sekvenc posameznih organizmov znotraj združbe, se pa lahko s TRFLP pridobljeni podatki primerjajo z obstoječo bazo sekvenc, če želimo pridobiti podatke o identiteti posameznega vzorca (Dickie & FitzJohn, 2007, Roberts in sod., 2012). Danes so tehniko TRFLP v raziskavah ekologije združb mik-

roorganizmov v veliki meri nadomestile tehnike NGS, katerih velika prednost je, da končne izhodne podatke predstavljajo celotne sekvence posameznih amplikonov, kar omogoča lažjo in neposredno identifikacijo organizmov, ki pa je odvisna od informativnosti regije, ki jo sekvenciramo za posamezno skupino organizmov. Kot že rečeno, naj bi regija 18S rRNA pri AM glivah približno ustrezala nivoju morfološke vrste, se pa to področje še zelo intenzivno raziskuje in lahko v prihodnosti pričakujemo novosti.

2.2 DOLOČANJE NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA (SEKVENCIANJE NASLEDNJIH GENERACIJ – NGS)

Metode NGS so najprej uporabljali v medicini in pri poskusih sekvenciranja človeka in drugih primatov (Wheeler in sod., 2008). Relativno hitro so se te metode razširile tudi na področje ekoloških raziskav in raziskav mikrobnih združb (mikrobiomov) v različnih okoljih, saj so omogočale vključevanje bistveno večjega števila vzorcev v raziskavo in obenem bistveno večjo globino sekvenciranja znotraj posameznega vzorca (najprej od več sto tisoč pa vse do več sto milijonov sekvenc pri danes uporabljenih pristopih). Ti novi principi so močno vplivali na številna področja v mikrobni ekologiji, okoljski mikrobiologiji, ekologiji tal in raziskavah rizosfere, kot tudi pri raziskavah različnih interakcij med organizmi, vključno z interakcijami rastlin z drugimi organizmi (npr. mikoriza).

Danes je tudi v okoljskih raziskavah pogosta praksa pomnoževanja tarčnih filogenetskih in/ali funkcionalnih genskih označevalcev in obenem uporaba pristopov NGS za karakterizacijo njihove raznolikosti. Nova tehnologija omogoča vse številnejše sete vzorcev, kar je bistvenega pomena za ekološke raziskave, ki se lahko izvajajo v različnih dimenzijah, tako prostora, kot tudi časa (vzorčenja v več prostorskih in časovnih točkah, raziskave dinamike procesov in sukcesije). Zavedati pa se moramo, da so prav vsi pristopi NGS podvrženi metodološkim napakam oz. so lahko pristranski, pri čemer gre na eni strani za produkcijo visoko kvalitetnih podatkov, ki jih zahtevajo raziskave, in na drugi napačnih sekvenc ter metodološkega šuma. Vsi pristopi z uporabo NGS zato zahtevajo natančno bioinformacijsko analizo in procesiranje podatkov, kar omogoča kvalitativno filtriranje in procesiranje sekvenc z namenom izogibanja zavajajočih interferenc iz metodoloških napak. Podobna previdnost je potrebna tudi pri vseh nadaljnjih statističnih analizah pridobljenih podatkov, saj lahko nepravilen izbor statističnega pristopa rezultira v napačnih zaključkih raziskave.

Prav s tem namenom je nastalo tudi kar nekaj preglednih objav oz. pregleda metodoloških pristopov, ki sistematično podajajo navodila za lažje spopadanje z izzivom obdelave podatkov, ki izhajajo iz NGS (npr. za osnovno analizo podatkov, ki izhajajo iz sekvenciranja amplikonov z namenom raziskav raznolikosti in ekologije združb AM gliv (Dumbrell in sod., 2017). Tipično bioinformacijski pristopi vključujejo metode za preverjanje kakovosti sekvenc in odstranjevanja šuma, formiranje operacijskih taksonomskih enot (Operational Taxonomic Unit – OTU), taksonomsko določanje posameznih sklopov sekvenc ter osnovne statistične analize za testiranje hipotez. Prikaz teh metod za dva pogosto uporabljena pristopa (QIIME in mothur), skupaj s samostojnimi orodji (vključno z odprtokodnim programskim okoljem ter jezikom R), so predstavljene v objavi Dumbrell in sod. (2017), kjer so predstavljeni pristopi za obdelavo podatkov sekvenciranja amplikonov, ki izhajajo iz dveh pogosto uporabljenih tehnologij NGS, v preteklosti več uporabljane tehnologije 454-pirosekvenciranja ter danes široko uporabljane platforme Illumina.

Zaradi hitrega napredka tehnologije in z njo povezane bioinformatike pa je nujno redno spremljanje tekočih objav in drugih virov na to temo. Zaradi obsežnosti in kompleksnosti podatkov, ki izhajajo iz tehnik sekvenciranja amplikonov z NGS je pogost izziv tudi njihova ustreznost predstavitev. Izziv, ki se skriva v novih tehnologijah je predvsem ta, da nas lahko zaslepi analitična moč novih metod, obenem pa je naše zavedanje o tem, da zaradi hitrega razvoja teh pristopov lahko pridemo tudi do napačnih zaključkov, pomanjkljivo. Napačni zaključki so lahko rezultat napak v sami tehnologiji, pomanjkljivega testiranja metod in/ali pomanjkanja izkušenj. Nujno je, da nek problem oz. študijo že v začetni fazi načrtovanja naslovimo z jasnimi vprašanji, posledica katerih so tudi jasno zastavljene raziskovalne hipoteze in ciljni metodološki pristopi, ki izhajajo iz teh hipotez. Vsekakor pa predstavljajo metode NGS ob pravilni uporabi močno analitično orodje, ki odpira povsem nove možnosti v raziskavah ekologije tako bolj vidnih in karizmatičnih nadzemnih organizmov, kot tudi bolj skritih, a pomembnih akterjev v podzemnem delu kopenskih ekosistemov.

3 VPLIV OKOLJSKIH IN GEOGRAFSKIH DEJAVNIKOV NA SESTAVO ZDRUŽB AM GLIV IN NJIHOVO RAZŠIRJENOST

Znano je, da sestavo združb AM gliv določajo različni dejavniki okolja, vključno s klimatskimi in talnimi specifikami, ki delujejo tako na lokalni, kot tudi na globalni ravni (npr. Dumbrell in sod., 2010, Kivlin in sod.,

2011, Lekberg in sod., 2011, Maček in sod., 2011, Hazard in sod., 2013, Davison in sod., 2015, Maček in sod., 2019, Vetrovsky in sod., 2019, Davison in sod., 2021). Na splošno je pri pojavljanju različnih taksonov AM gliv še vedno relativno malo dostopnih informacij na ravni odnosa posameznega organizma in okolja (Davison in sod., 2020). Po podatkih iz številnih študij, ki so zbrane v bazi MaarjAM (Öpik in sod., 2010) lahko vidimo, da so mnogi virtualni taksoni (VT) AM gliv široko geografsko razširjeni in se pojavljajo v številnih habitatnih tipih (Davison in sod., 2015, Savary in sod., 2018). Taka opažanja pa so nastala večinoma na podatkih o prisotnosti taksonov v določenem habitatu, ni pa podatkov v kolikšni meri številčnost (abundanca) posameznih VT variira vzdolž gradienta določenega abiotičnega dejavnika. Taksone AM gliv so v preteklosti klasificirali v različne ekotipe (Alzarhani in sod., 2019) ter v ekološke skupine, kot so generalisti in specialisti na osnovi različnih rangov, ki vključujejo geografske dejavnike (Moora in sod., 2011, Bouffaud in sod., 2016), habitat (Sykorova in sod., 2007, Oehl in sod., 2010, Vályi in sod., 2015) ali rastlinske gostiteljske vrste (Helgason in sod., 2007). Poudariti pa je treba, da je tovrstno klasificiranje taksonov v posamezne ekološke niše omejeno na obseg okoljskih dejavnikov, ki jih pokriva posamezna študija in posplošenje tega pojava ni mogoče. V nekaterih novejših objavah poročajo, da so si določene funkcionalne lastnosti med sorodnimi morfološkimi vrstami AM gliv podobne (Powell in sod., 2009, Hoeksema in sod., 2018). Dejstvo pa je, da predstavljajo morfološko opisane vrste AM gliv, identificirane na podlagi morfologije celične stene njihovih spor, le majhen del raznolikosti AM gliv, ki so bile določene na osnovi molekularnih označevalcev (markerskih genov) (Öpik in sod., 2014). V zelo obsežni nedavni študiji, ki je vključevala več kot 300 talnih vzorcev iz različnih naravnih ekosistemov iz celega sveta so ugotovili, da so porazdelitev VT v različnih ekosistemih skupaj pojasnile tako okoljske, kot tudi prostorske (geografske) variable. Med njimi sta bili temperatura okolja in vrednost pH tal najpomembnejša okoljska določevalnika porazdelitve in lokalne relativne abundance (številčnosti) različnih taksonov AM gliv (Davison in sod., 2021). V študiji so ugotovili tudi različne vzorce ekoloških niš, ki so bili najbolj opazni na ravni družin AM gliv, kar kaže, da sorodni taksoni oz. VT zavzemajo podobne ekološke niše. Za predstavnike družine AM gliv Acaulosporaceae je tako značilen optimum pri manjši vrednosti pH tal, in nižji temperaturi, medtem, ko so predstavniki družine Gigasporaceae bolj številčni v bolj vlažnih območjih z več dežja (Davison in sod., 2021). Na to temo pa bo v prihodnjem desetletju sigurno še veliko novih podatkov, tudi v luči vpliva klimatskih sprememb na AM glive in njihovo simbiozo z rastlinami (Maček in sod., 2019).

4 ZAKLJUČEK

Razumevanje vpliva globalnih sprememb na terestrične ekosisteme zahteva povezovalen pristop med različnimi disciplinami, ki raziskuje odzive skozi vse ravni biološke organizacije in skozi različne prostorsko-časovne skale. Obenem mora ta pristop vključevati tako nadzemno, kot tudi podzemno raznolikost znotraj ekosistemov, saj sta obe neločljivo povezani in prepleteni. V večini primerov še vedno ni celostnega razumevanja odziva interakcij komponent nadzemne in podzemne raznolikosti na akutne kratkoročne (npr. suša, toplotni valovi) ter kronične dolgoročne globalne in klimatske spremembe (npr. segrevanje, povečana koncentracija CO₂, onesnaženje). Prav zato so nujno potrebni eksperimenti, ki naslavlajo te vrzeli v razumevanju delovanja ekosistemov. Nove metode sekvenciranja omogočajo veliko ponovljivost in s tem dokaj robusten pristop k raziskavam v ekologiji, predvsem v smislu velikega števila bioloških ponovitev (zadosti ponovitev za ustrezno analizo podatkov), obravnavo vseh ravni ekoloških združb (nadzemnega in podzemnega – rizosfernega), in v smislu primerne trajanja eksperimenta (zaželeno so dolgoročne študije, ki zajemajo vzorčenje preko več sezon ali celo let). Slednje je nujno za razumevanje in ločevanje dolgoročnih in kratkoročnih odzivov na vseh ravneh biodiverzitete.

Najnovejša molekulska orodja za raziskave v ekologiji združb, kot so metode NGS, ki omogočajo pridobivanje podatkov o sekvencah organizmov iz različnih okolij, postavljajo vse cenejše in široko dostopne. Pri tem pa je nujno zavedanje, da kljub široki dostopnosti, kvalitetna biološka interpretacija molekulske karakterizacije združb posameznih skupin organizmov zahteva veliko specialističnega znanja o specifični skupini organizmov. Zavedati se moramo na primer, da tako tehnika TRFLP, kot tudi NGS, predstavljata analize relativne številčnosti (abundance) taksonov znotraj vzorcev, zato ju ne smemo uporabljati za ugotavljanje razlik v absolutni številčnosti med posameznimi vzorci. Na koncu se moramo zavedati tudi dejstva, da lahko podajajo ocene sestave združb, ki temeljijo na ekstraktih DNA, le podatke o genski raznolikosti in genski sestavi združb. Nemogoča je namreč ocena biomase posameznih vrst teh organizmov v nekem okolju na osnovi takih podatkov zaradi medvrstne in časovne variabilnosti števila kopij posameznih genov na enoto rasti, kar posebej velja za nitaste organizme, kot so AM glive (Corradi in sod., 2007, Jansa in sod., 2008). Bistveno je torej, da se obenem zavedamo tako moči tehnologije, da v kratkem času producira ogromno količino podatkov, kot tudi vseh omejitev in novosti, vključno s hitro spreminjajočimi se postopki bioinformatike, ki je neločljivo povezana z vsakim postopkom NGS. Tak pris-

top v kar največji možni meri zmanjša možnost napačne interpretacije podatkov, ki jih pridobimo z NGS, in obenem poveča trajno znanstveno vrednost in odmevnost našega dela.

5 ZAHVALA

Raziskovalno delo, povezano z vsebino tega članka, poteka v okviru programske skupine P4-0085, ARRS.

6 REFERENCE

- Alzarhani, A.K., Clark, D.R., Underwood, G.J., Ford, H., Cotton, T.A., and Dumbrell, A.J. (2019). Are drivers of root-associated fungal community structure context specific? *ISME Journal*, 13, 1330–1344. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0350-y>
- Besiana, S., Hoysted, G.A., Pressel, S., Bidartondo, M.I., and Field, K.J. (2021). Critical research challenges facing Mucoromycotina 'fine root endophytes. *New Phytologist, Forum*, 1–7. <https://doi.org/10.1111/nph.17684>
- Bouffaud, M.L., Creamer, R.E., Stone, D., Plassart, P., van Tuinen, D., Lemanceau, P., Wipf, D., and Redecker, D. (2016). Indicator species and co-occurrence in communities of arbuscular mycorrhizal fungi at the European scale. *Soil Biology and Biochemistry*, 103, 464–470. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.09.022>
- Błaszczkowski J. (2012). *Glomeromycota*. W. Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Sciences, Kraków., 300 pp.
- Brachmann, A. and Parniske, M. (2006). The most widespread symbiosis on earth. *PLoS Biol* 4, e239. DOI: 10.1371/journal.pbio.0040239. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040239>
- Clapp, J.P., Helgason, T., Daniell, T.J., and Young, J.P.W. (2003). Chapter 8: Genetic studies of the structure and diversity of arbuscular mycorrhizal fungal communities. In: van der Heijden, M.G.A. and Sanders, I.R. (eds.). *Mycorrhizal Ecology (Ecological Studies 157)*. Germany: Springer., pp. 201–221. https://doi.org/10.1007/978-3-540-38364-2_8
- Corradi, N., Croll, D., Colard, A., Kuhn, G., Ehinger, M., and Sanders, I.R. (2007). Gene copy number polymorphisms in an arbuscular mycorrhizal fungal population. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(1), 366–369. <https://doi.org/10.1128/AEM.01574-06>
- Cotton, T.E., Dumbrell, A.J., Helgason, T. (2014). What goes in must come out: testing for biases in molecular analysis of arbuscular mycorrhizal fungal communities. *PLoS One*, 9(10), e109234, doi: 10.1371/journal.pone.0109234. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109234>
- Davison, J., García de León, D., Zobel, M., Moora, M., Bueno, C.G., Barceló, M., Gerzm M., León, D., Meng, Y., Pillar, V.D., Sepp, S., Soudzilovskaia, N.A., Tedersoo, L., Vaessen, S., Vahter, T., Winck, B., and Öpik, M. (2020). Plant functional groups associate with distinct arbuscular mycorrhizal fungal communities. *New Phytologist*, 226, 1117–1128. <https://doi.org/10.1111/nph.16423>
- Davison, J., Moora, M., Öpik, M., Adholeya, A., Ainsaar, L., Bâ, A., Burla, S., Diedhiou, A.G., Hiiesalu, I., Jairus, T., Johnson, N.C., Kane, A., Koorem, K., Kochar, M., Ndiaye, C., Pärtel, M., Reier, Ü., Saks, Ü., Singh, R., Vasar, M., and Zobel, M. (2015). Global assessment of arbuscular mycorrhizal fungus diversity reveals very low endemism. *Science*, 349, 970–973. <https://doi.org/10.1126/science.aab1161>
- Davison, J. Moora, M., Semchenko, M., Adenan, S.B., Ahmed, T., Akhmetzhanova, A.A., Alatalo, J.M., Al-Quraishy, S., Andriyanova, E., Anslan, S., Bahram, M., Batbaatar, A., Brown, C., Bueno, C.G., Cahill, J., Cantero, J.J., Casper, B.B., Cherosov, M., Chideh, S., Coelho, A.P., Coghill, M., Decocq, G., Dudov, S., Fabiano, E.C., Fedosov, V.E., Fraser, L., Glassman, S.I., Helm, A., Henry, H.A.L., Hérault, B., Hiiesalu, I., Hiiesalu, I., Hozzein, W.N., Kohout, P., Kõljalg, U., Koorem, K., Laanisto, L., Mander, U., Mucina, L., Munyampundu, J., Neuenkamp, L., Niinemets, U., Nyamukondiwa, C., Oja, J., Onipchenko, V., Pärtel, M., Phosri, C., Pölme, S., Püssa, K., Ronk, A., Saitta, A., Semboli, O., Sepp, S., Seregin, A., Sudheer, S., Peña-Venegas, C.P., Paz, C., Vahter, T., Vasar, M., Veraart, A.J., Tedersoo, L., Zobel, M., and Öpik, M. (2021). Temperature and pH define the realised niche space of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 231, 763–776. <https://doi.org/10.1111/nph.17240>
- Dickie, I.A. and FitzJohn, R.G. (2007). Using terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) to identify mycorrhizal fungi: a methods review. *Mycorrhiza*, 17, 259–270. <https://doi.org/10.1007/s00572-007-0129-2>
- Dumbrell, A.J., Ashton, P.D., Aziz, N., Feng, G., Nelson, M., Dytham, C., Fitter, A.H., and Helgason, T. (2011). Distinct seasonal assemblages of arbuscular mycorrhizal fungi revealed by massively parallel pyrosequencing. *New Phytologist*, 190, 794–804. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03636.x>
- Dumbrell, A.J., Ferguson, R.M.W., and Clark, D.R. (2017). Microbial Community Analysis by Single-Amplicon High-Throughput Next Generation Sequencing: Data Analysis - From Raw Output to Ecology. In: McGenity, T.J., Timmis, K.N., and Nogales, B. (eds) *Hydrocarbon and lipid microbiology protocols. Springer protocols handbooks*. Springer, Heidelberg, pp. 155–206. https://doi.org/10.1007/8623_2016_228
- Dumbrell, A.J., Nelson, M., Helgason, T., Dytham, C., and Fitter, A.H. (2010). Relative roles of niche and neutral processes in structuring a soil microbial community. *ISME Journal*, 4, 337–345. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.122>
- Field, K.J., Rimington, W.R., Bidartondo, M.I., Allinson, K.E., Beerling, D.J., Cameron, D.D., Duckett, J.G., Leake, J.R., and Pressel, S. (2015). First evidence of mutualism between ancient plant lineages (Haplomitriopsida liverworts) and Mucoromycotina fungi and its response to simulated Palaeozoic changes in atmospheric CO₂. *New Phytologist*, 205, 743–756. <https://doi.org/10.1111/nph.13024>
- Fitter, A.H. (2005). Darkness visible: reflections on underground ecology. *Journal of Ecology*, 93, 231–243. <https://doi.org/10.1111/j.0022-0477.2005.00990.x>

- Hazard, C., Gosling, P., Van Der Gast, C.J., Mitchell, D.T., Doohan, F.M., and Bending, G.D. (2013). The role of local environment and geographical distance in determining community composition of arbuscular mycorrhizal fungi at the landscape scale. *ISME Journal*, 7, 498–508. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.127>
- Helgason T., Daniell T. J., Husband R., Fitter A. H., and Young J. P. W. (1998). Ploughing up the wood-wide web? *Nature*, 394, 431. <https://doi.org/10.1038/28764>
- Helgason T., Merryweather J. W., Denison J., Wilson P., Young J. P. W., and 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, 371–384. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2745.2001.00674.x>
- Helgason, T., Merryweather, J.W., Youngm J.P.W., and Fitter A.H. (2007). Specificity and resilience in the arbuscular mycorrhizal fungi of a natural woodland community. *Journal of Ecology*, 95, 623–630. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2007.01239.x>
- Hoeksema, J.D., Bever, J.D., Chakraborty, S., Chaudhary, V.B., Gardes, M., Gehring, C.A., Hart, M.M., Housworth, E.A., Kaonongbua, W., Klironomos, J.N., Lajeunesse, M.J., Meadow, J., Milligan, B.G., Piculell, B.J., Pringle, A., Rúa, M.A., Umbanhowar, J., Viechtbauer, W., Wang, Y., Wilson, G.W.T., and Zee, P.C. (2018). Evolutionary history of plant hosts and fungal symbionts predicts the strength of mycorrhizal mutualism. *Communications Biology*, 1, 116. <https://doi.org/10.1038/s42003-018-0120-9>
- Hoysted, G.A., Jacob, A.S., Kowal, J., Giesemann, P., Bidartondo, M.L., Duckett, J.G., Gebauer, G., Rimington, W.R., Schornack, S., Pressel, S., and Field, K.J. (2019). Mucoromycotina fine root endophyte fungi form nutritional mutualisms with vascular plants. *Plant Physiology*, 181, 565–577. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00729>
- Jansa, J., Smith, F.A., and Smith, S.E. (2008). Are there benefits of simultaneous root colonization by different arbuscular mycorrhizal fungi? *New Phytologist*, 177, 779–789. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02294.x>
- Lee, J., Lee, S., and Young, J.P. (2008). Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiology Ecology*, 65, 339–349. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00531.x>
- Lekberg, Y., Meadow, J., Rohr, J.R., Redecker, D., and Zabinski, C.A. (2011). Importance of dispersal and thermal environment for mycorrhizal communities: lessons from Yellowstone National Park. *Ecology*, 92, 1292–1302. <https://doi.org/10.1890/10-1516.1>
- Kanagawa, T. (2003). Bias and artifacts in multitemplate polymerase chain reactions (PCR). *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96, 317–323. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(03\)90130-7](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(03)90130-7)
- Kivlin, S.N., Hawkes, C.V., and Treseder, K.K. (2011). Global diversity and distribution of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biology & Biochemistry*, 43, 2294–2303. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.07.012>
- Knapp, D.G., Nemeth, J.B., Barry, K., Hainaut, M., Henrissat, B., Johnson, J., Kuo, A., Lim, J.H.P., Lipzen, A., Nolan, M., Ohm, R.A., Tamas, L., Grigoriev, I.V., Spatafora, J.W., Nagy, L.G., and Kovacs, G.M. (2018). Comparative genomics provides insights into the lifestyle and reveals functional heterogeneity of dark septate endophytic fungi. *Scientific Reports*, 8, 6321. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24686-4>
- Krüger, M., Stockinger, H., Krüger, C., and Schüssler, A. (2009). DNA-based species level detection of Glomeromycota: one PCR primer set for all arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 183, 212–223. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02835.x>
- Maček, I. (2009). Molekulski pristopi pri raziskavah arbuskularnih mikorize. *Acta Agriculturae Slovenica*, 93(1), 77–85.
- Maček, I., Clark, D.R., Šibanc, N., Moser, G., Vodnik, D., Müller, C., and Dumbrell, A.J. (2019). Impacts of long-term elevated atmospheric CO₂ concentrations on communities of arbuscular mycorrhizal fungi. *Molecular Ecology*, 28(14), 3445–3458. <https://doi.org/10.1111/mec.15160>
- Maček, I., Dumbrell, A.J., Nelson, M., Fitter, A.H., Vodnik, D., and Helgason, T. (2011). Local adaptation to soil hypoxia determines the structure of an arbuscular mycorrhizal fungal community in roots from natural CO₂ springs. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(14), 4770–4777. <https://doi.org/10.1128/AEM.00139-11>
- Moora, M., Berger, S., Davison, J., Öpik, M., Bommarco, R., Bruehlheide, H., Kühn I, Kunin WE, Metsis M, Rortais A., Vanatoa, A., Vanatoa, E., Stout, J.C., Truusa, M., Westphal, C., Zobel, M., and Walther G. (2011). Alien plants associate with widespread generalist arbuscular mycorrhizal fungal taxa: evidence from a continental-scale study using massively parallel 454 sequencing. *Journal of Biogeography*, 38, 1305–1317. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2011.02478.x>
- Oehl, F., Laczko, E., Bogenrieder, A., Stahr, K., Bösch, R., van der Heijden, M., and Sieverding, E. (2010). Soil type and land use intensity determine the composition of arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Soil Biology & Biochemistry*, 42, 724–738. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.01.006>
- Oehl, F., Sieverding, E., Palenzuela, J., Ineichen, K., and da Silva, G.A. (2011). Advances in Glomeromycota taxonomy and classification. *IMA Fungus*, 2, 191–199. <https://doi.org/10.5598/imafungus.2011.02.02.10>
- Orchard, S., Standish, R.J., Dickie, I.A., Renton, M., Walker, C., Moot, D., and Ryan, M.H. (2017). Fine root endophytes under scrutiny: A review of the literature on arbuscule-producing fungi recently suggested to belong to the Mucoromycotina. *Mycorrhiza*, 27, 619–528. <https://doi.org/10.1007/s00572-017-0782-z>
- Öpik, M. and Davison, J. (2016). Uniting species- and community-oriented approaches to understand arbuscular mycorrhizal fungal diversity. *Fungal Ecology*, 24, 106–113. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2016.07.005>
- Öpik, M., Davison, J., Moora, M., and Zobel, M. (2014). DNA-based detection and identification of Glomeromycota: the virtual taxonomy of environmental sequences. *Botany-Botanique*, 92, 135–147. <https://doi.org/10.1139/cjb-2013-0110>
- Öpik, M., Metsis, M., Daniell, T.J., Zobel, M., and Moora, M. (2009). Large-scale parallel 454 sequencing reveals eco-

- logical group specificity of arbuscular mycorrhizal fungi in a boreonemoral forest. *New Phytologist*, 184, 424–437. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02920.x>
- Öpik, M., Moora, M., Liira, J., and Zobel, M. (2006). Composition of root-colonizing arbuscular mycorrhizal fungal communities in different ecosystems around the globe. *Journal of Ecology*, 94, 778–790. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2006.01136.x>
- Öpik, M., Vanatoa, A., Vanatoa, E., Moora, M., Davison, J., Kalwij, J.M., Reier, U., and Zobel, M. (2010). The online database MaarjAM reveals global and ecosystem distribution patterns in arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *New Phytologist*, 188, 223–241. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03334.x>
- Öpik, M., Zobel, M., Cantero, J.J., Davison, J., Facelli, J.M., Hiiesalu, I., Jairus, T., Kalwij, J.M., Koorem, K., Leal, M.E., Liira, J., Metsis, M., Neshataeva, V., Paal, J., Phosri, C., Pölme, S., Reier, Ü., Saks, Ü., Orchard, S., Standish, R.J., Dickie, I.A., Renton, M., Walker, C., Moot, D., and Ryan, M.H. (2017). Fine root endophytes under scrutiny: a review of the literature on arbuscule-producing fungi recently suggested to belong to the Mucoromycotina. *Mycorrhiza*, 27, 619–638. <https://doi.org/10.1007/s00572-017-0782-z>
- Powell, J.R., Parrent, J.L., Hart, M.M., Klironomos, J.N., Rillig, M.C., and Maherali, H. (2009). Phylogenetic trait conservatism and the evolution of functional trade-offs in arbuscular mycorrhizal fungi. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 276, 4237–4245. <https://doi.org/10.1098/rspb.2009.1015>
- Roberts, D.M., Schofield, P.G., Don, S., and Daniell, T.J. (2012). Directed terminal restriction analysis tool (DRAT): an aid to enzyme selection for directed terminal-restriction fragment length polymorphisms. *Methods in Ecology and Evolution*, 3(1), 24–28. <https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2011.00139.x>
- Rodriguez, R.J., White, J.F., Arnold, A.E., and Redman, R.S. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*, 182, 314–330. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x>
- Savary, R., Masclaux, F.G., Wyss, T., Droh, G., Corella, J.C., Machado, A.P., Morton, J.B., and Sanders, I.R. (2018). A population genomics approach shows widespread geographical distribution of cryptic genomic forms of the symbiotic fungus *Rhizophagus irregularis*. *ISME Journal*, 12, 17–30. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.153>
- Schnitzer, S.A. and Klironomos, J. (2011). Soil microbes regulate ecosystem productivity and maintain species diversity. *Plant Signaling & Behavior*, 6-8, 1240–1243. <https://doi.org/10.4161/psb.6.8.16455>
- Schwarzott, D. and Schüßler A. (2001). A simple and reliable method for SSU rRNA gene DNA extraction, amplification, and cloning from single AM fungal spores. *Mycorrhiza*, 10, 203–207. <https://doi.org/10.1007/PL00009996>
- Simon, L., Lalonde, M., and Bruns, T.D. (1992). Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular arbuscular endomycorrhizal fungi colonising roots. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 291–295. <https://doi.org/10.1128/aem.58.1.291-295.1992>
- Sinanaj, B., Hoysted, G.A., Pressel, S., Bidartondo, M.I., and Field, K.J. (2021). Critical research challenges facing Mucoromycotina ‘fine root endophytes’. *New Phytologist*. <https://doi.org/10.1111/nph.17684>
- Smith, S.E and Read, D.J. (2008). *Mycorrhizal Symbiosis*, 3rd Edition. Academic Press, 800 pg.
- Spatafora, J.W., Chang, Y., Benny, G.L., Lazarus, K., Smith, M.E., Berbee, M.L., Bonito, G., Corradi, N., Grigoriev, I., Gryganskyi, A., James, T.Y., O'Donnell, K., Roberson, R.W., Taylor, T.N., Uehling, J., Vilgalys, R., White, M.M., and Stajich, J.E. (2016). A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia*, 108, 1028–1046. <https://doi.org/10.3852/16-042>
- Sýkorová, Z., Ineichen, K., Wiemken, A., and Redecker, D. (2007). The cultivation bias: different communities of arbuscular mycorrhizal fungi detected in roots from the field, from bait plants transplanted to the field, and from a greenhouse trap experiment. *Mycorrhiza*, 18, 1–14. <https://doi.org/10.1007/s00572-007-0147-0>
- Tedersoo, L., Sánchez-Ramírez, S., Kõljalg, U., Bahram, M., Döring, M., Schigel, D., May, T., Ryberg, M., and Abarenkov, K. (2018). High-level classification of the Fungi and a tool for evolutionary ecological analyses. *Fungal Diversity*, 90, 135–159. <https://doi.org/10.1007/s13225-018-0401-0>
- Tisserant, E., Malbreil, M., Kuo, A., Kohler, A., Symeonidi, A., Balestrini, R., Charron, P., Duensing, N., Frei Dit Frey, N., Gianinazzi-Pearson, V., Gilbert, L.B., Handa, Y., Herr, J.R., Hijri, M., Koul, R., Kawaguchi, M., Krajinski, F., Lammers, P.J., Masclaux, F.G., Murat, C., Morin, E., Ndikumana, S., Pagni, M., Petitpierre, D., Requena, N., Rosikiewicz, P., Riley, R., Saito, K., San Clemente, H., Shapiro, H., van Tuinen, D., Bécard, G., Bonfante, P., Paszkowski, U., Shachar-Hill, Y.Y., Tuskan, G.A., Young, P.W., Sanders, I.R., Hennissat, B., Rensing, S.A., Grigoriev, I.V., Corradi, N., Roux, C., and Martin, F. (2013). Genome of an arbuscular mycorrhizal fungus provides insight into the oldest plant symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, 20117–20122. <https://doi.org/10.1073/pnas.1313452110>
- Tonjer, L.R., Thoen, E., Morgado, L., Botnen, S., Mundra, S., Nybakken, L., Bryn, A., and Kauserud, H. (2021). Fungal community dynamics across a forest-alpine ecotone. *Molecular Ecology*, 30, 4926–4938. <https://doi.org/10.1111/mec.16095>
- Vandenkoornhuysse, P., Husband, R., Daniell, T.J., Watson, I.J., Duck, J.M., Fitter, A.H., and Young, Y.P. (2002). Arbuscular mycorrhizal community composition associated with two plant species in a grassland ecosystem. *Molecular Ecology*, 11, 1555–1564. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2002.01538.x>
- Větrovský, T., Kohout, P., Kopecký, M., Machac, A., Man, M., Bahnmann, B.D., Brabcová, V., Choi, J., Meszárosová, L., Human, Z.R., Lepinay, C., Lladó, S., López-Mondéjar, R., Martinović, T., Mašínová, T., Morais, D., Navrátilová, D., Odriozola, I., Štursová, M., Švec, K., Tláskal, V., Urbanová, M., Wan, J., Žifčáková, L., Howe, A., Ladau, J., Peay, K.G., Storch, D., Wild, J., and Baldrian, P. (2019). A meta-analysis of global fungal distribution reveals climate-driven patterns. *Nature Communications*, 10, 5142. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13164-8>

Wurzburger, N., Brookshire, E.N.J., McCormack, M.L. and Lankau, R. (2017). Mycorrhizal fungi as drivers and modulators of terrestrial ecosystem processes. *New Phytologist*, 213(3), 996–999. <https://doi.org/10.1111/nph.14409>

Wheeler, D.A., Srinivasan, M., Egholm, M., Shen, Y., Chen, L., McGuire, A., He, W., Chen, Y., Makhijani, V., Roth, G.T., Gomes, X., Tartaro, K., Niazi, F., Turcotte, C.L., Irzyk, G.P.,

Lupski, J.R., Chinault, Xing-zhi Song, Yue Liu, Ye Yuan, Lynne Nazareth, Xiang Qin, Donna M. Muzny, Marcel Margulies, C., Weinstock, G.M., Gibbs, R.A., and Rothberg, J.M. (2008). The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing. *Nature*, 452, 872–876. <https://doi.org/10.1038/nature06884>