

APLIKASI PCR-RAPD DALAM IDENTIFIKASI FMA

Cecep Hidayat

Cephidayat62@uinsgd.ac.id

Abstrak

Identifikasi FMA berdasarkan karakteristik morfologi memiliki kelemahan, yaitu tidak dapat mengungkap keragaman pada tingkat strain dalam suatu spesies, sehingga perlu memanfaatkan karakter molekular dan genetik berdasarkan DNA ribosom. Teknologi yang digunakan adalah *Random Ampified Polymorphic DNA* (RAPD) yang didasarkan pada metode *Polimerase Chain Reaction* (PCR) dengan menggunakan primer rantai pendek yang dapat diterapkan pada mikroba yang tidak dapat dikulturkan seperti FMA, melalui amplifikasi genom dari spora tunggal, akar terinfeksi, atau sampel tanah langsung dari lapangan. Teknik PCR bisa berupa *Nested PCR* yang untuk memonitor spesies FMA dan kelimpahannya atau *Competitive PCR* untuk mendeteksi sekuen yang muncul dalam FMA pada akar yang dikumpulkan dari lapangan. Dengan teknik PCR genom DNA tersedia dalam jumlah memadai untuk keperluan identifikasi.

Kata kunci : FMA, RAPD, PCR, DNA ribosom, identifikasi.

Pendahuluan

Filum Glomeromycota merupakan kelompok biologis menarik karena semua anggotanya dikelompokkan menjadi satu dari dua tipe asosiasi simbiotik. Satu diantaranya adalah famili Geosiphonaceae yang mempunyai satu-satunya anggota *Geosiphon pyriformis* yang dapat membentuk simbiosis khusus yang dinamakan endocytobiosis dengan Cyanobacteria yang termasuk ke dalam genus *Nostoc* (Gehring *et al.*, 1996). Tipe simbiosis lain adalah mikoriza arbuskula yang

dibentuk dari sisa spesies fungi. Mikoriza arbuskula merupakan kelompok mikroorganisme rhizosfir yang mampu membentuk simbiosis dengan lebih dari 80% spesies tumbuhan yang hidup di darat, yang mengindikasikan kompleksitas asal, evolusi dan diversifikasi dari kelompok ini. Dengan fakta tersebut dapat disimpulkan jenis fungi ini berperan penting dalam mempertahankan kestabilan ekosistem tumbuhan darat dan kemungkinan terlibat dalam menentukan struktur komunitas tumbuhan. Sebagai

konsekuensinya bila terjadi perubahan keanekaragaman FMA akan merubah potensi rhizosfir dan kesuburan tanah.

Sayang keanekaragaman FMA dalam tanah hanya sedikit diketahui, khususnya yang berkaitan dengan keanekaragaman genetik dan struktur khususnya. Kelemahan ini disebabkan oleh *biotropy* FMA yang tegas sampai kesulitan memperoleh materi fungi yang cukup, kurangnya pengetahuan sistem reproduksi, dan kecepatan mutasi FMA. Selanjutnya, spora FMA mengandung banyak nucleus dan terdapat varasi intra spora seperti pada *Gigaspora margarita* yang diakibatkan oleh hifa *anastomosis* yang tidak menimbulkan *caryogamy* atau meiosis.

Secara tradisional identifikasi FMA dilakukan berdasarkan sifat morfologi spora. Struktur spora memiliki informasi taksonomi penting dan pendekatan morfologi dalam indentifikasi spesies bermanfaat untuk menduga biodiversitas, namun memiliki keterbatasan dan menyisakan kontroversi. Spora merupakan struktur yang muncul pada kondisi lingkungan kurang menguntungkan, dimana pemunculannya merupakan *resultante* dari kejadian masa lalu dan tidak mencerminkan keadaan sebenarnya pada

saat sampel diambil. Demikian juga halnya dengan kenyataan bahwa spora dihasilkan di luar akar yang dapat menyebabkan pendugaan lebih rendah pada sampel lapangan. Menurut Redecker et al. (2003) produksi spora sangat bergantung pada kondisi fisiologis FMA dan lingkungan. Pada kondisi tertentu FMA memproduksi banyak spora dan hal tersebut tampak mendominasi kolonisasi akar. Sementara pada kondisi lain, tidak menghasilkan spora sama sekali. Selanjutnya, dinamakan produksi spora terhadap kolonisasi akar berbeda diantara spesies. Kelemahan lain identifikasi berdasarkan morfologi adalah spora yang dikoleksi dari lapangan sering terkena parasit atau mengalami kerusakan sehingga tidak dapat diidentifikasi. Untuk mengatasi masalah tersebut, banyak penelitian akhir-akhir ini memfokuskan pada seleksi dan implementasi alat yang mampu mengidentifikasi FMA secara akurat.

Penanda molekuler telah dikembangkan untuk keperluan deteksi dan identifikasi patogen dengan keakuratan mengagumkan. Cara ini juga telah berhasil digunakan untuk mendeteksi fungi. Selanjutnya sekuens yang digunakan ditargetkan pada gen

ribosom sehingga menjadi universal dan pada beberapa kasus tidak spesifik spesies, tetapi berlaku pada kisaran genera atau taksonomi lebih tinggi (Süchbler et al, 2001a).

Teknik molekuler berbasis DNA menawarkan banyak keuntungan, yaitu akan merevolusi ekologi FMA karena memungkinkan mengidentifikasi FMA dari sampel akar tanpa memerlukan spora. Pemahaman fungsi mikoriza pada level molekuler dapat dipergunakan untuk perbaikan tanaman secara berkelanjutan. Diluar kegunaan praktis, studi FMA molekuler perlu dan penting, dimana fenomena evolusi dan komunikasi molekuler antara pasangan simbiosis mendasari adanya penelitian dasar masa mendatang.

Salah satu teknik identifikasi FMA berbasis DNA adalah Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) yang didasarkan pada metode Polymerase Chain Reaction (PCR), dimana dalam metode ini digunakan primer pendek (biasanya 10 nukleotida) pada tiap-tiap sekuens. Adanya beragam teknologi PCR membuka peluang deteksi dan seleksi mikroorganisme yang tidak dapat dikulturkan. Amplifikasi primer untuk PCR umumnya homologous, untuk

mempertahankan sekuens yang sering digunakan pada gen rRNA (rDNA). Hal ini diorganisasikan pada daerah yang dilindungi (18S, 5.8S, dan 28S) dan daerah lainnya. Primer universal yang umum digunakan untuk amplifikasi rDNA dapat memperbanyak sekuens dari daerah ini (Zeze et al., 1996). Untuk mengatasi masalah spora yang terkontaminasi mikroorganisme lain, penggunaan primer dilakukan dengan hati-hati dan Simon et al. (1992) mengambil rDNA yang berasal dari spora yang dihasilkan secara axenic. Lanfranco et al. (1998) membuat primer spesifik *Glomus mosseae* dari fragmen RAPD untuk deteksi dan identifikasi fungi dalam jaringan akar.

Karakteristik FMA

Fungi mikoriza arbuskula (FMA) merupakan jenis fungi yang fenomenal karena kemampuannya membentuk asosiasi dengan 80 persen spesies tumbuhan dan kebanyakan family tanaman kecuali Cruciferae. Disamping berasosiasi luas dengan tumbuhan, asosiasi secara geografis juga menunjukkan hal sama, dimana jenis fungi ini ditemukan pada tumbuhan yang hidup di daerah kutub utara sampai tropis. Asosiasi juga terjadi dalam kisaran ekologis yang luas dari

lingkungan akuatik sampai gurun. Mayoritas tanaman pertanian, hortikultura, dan kehutanan yang termasuk kedalam beragam family bermikoriza. Pengaruh positif FMA terhadap pertumbuhan tanaman banyak dilaporkan, diantaranya adalah meningkatkan serapan fosfor pada tanah-tanah yang defisien unsur P dan peningkatan serapan unsur-unsur imobil lain, meningkatkan daya tahan terhadap kekeringan, resistensi terhadap patogen tular tanah, stimulasi hormon pertumbuhan, membantu nodulasi tanaman legume, membantu mengatasi aklimatisasi, dan membantu pertumbuhan tanaman pada tanah-tanah rusak seperti lahan pasca tambang.

Penelitian tentang FMA dirintis oleh Mosse yang dibantu oleh Gardeman dan Nocolson pada decade tahun 60-an. Ribuan makalah, ratusan artikel review, dan proseding telah dipublikasikan sejak saat itu. Kebanyakan dari semua tulisan tersebut terfokus pada manfaat atau pengaruh ekofisiologi FMA terhadap tanaman dan hanya sedikit yang membahas masalah kemampuan kultur, filogeni, aspek taksonomi dan karakteristik simbiotik mikroba ini. Kondisi ini disebabkan oleh *pertama*, FMA merupakan simbion obligat,

dimana mikroba ini tidak dapat ditumbuhkan secara murni di labolatorium tanpa kehadiran tanaman inang dan masih terdapat kendala dalam perbanyakannya sekala besar. Beberapa peneliti telah mencoba mengkulturkan pada medium auxenic, namun hasilnya belum menggembirakan. *Kedua*, ketidaksediaan karakter yang dapat diandalkan untuk keperluan filogeni dan taksonomi karena jenis fungi ini tidak memproduksi organ seksusal dan hanya muncul dalam keadaan tidak sempurna. Studi filogenik, identifikasi dan taksonomi didasarkan pada sifat morfologi dari organ aseksual (spora). Apabila tidak ada spora, struktur intradikal dapat dipergunakan untuk level famili. *Ketiga*, identifikasi mycosimbion dalam tanaman inang menghadapi *kendala* adanya beragam spora FMA yang mengkolonisasi akar tanaman secara berkesinambungan.

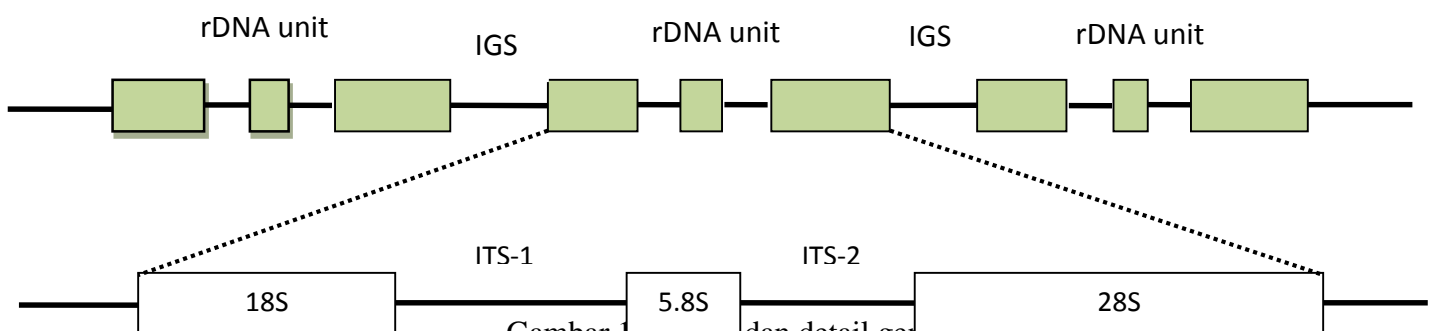
Pendekatan molekular dilakukan berdasarkan prinsip mengeksploitasi variasi genetik. Studi tentang genom FMA telah menjadi tren, karena disadari bahwa fungi ini memiliki banyak genom dibandingkan dengan zygomycetes lain, yaitu berkisar 0.13 sampai 1.0 pg DNA per nucleus (Hosni *et al.*, 1998). Analisis terhadap komposisi basa DNA sembilan

spesies *glomelian* memperlihatkan kandungan GC rendah dengan level tinggi *methylcytosine* (Hosni *et al.*, 1997) dan genom memiliki sekuens DNA ulangan yang banyak.

Metode molekular telah berhasil dilakukan untuk mempelajari sekuens rDNA dari FMA. Beberapa peneliti melaporkan spora individu FMA yang multinukleus, menunjukkan tingkat keragaman genetik tinggi dalam *internal transcribed spacer* (ITS) dari gen mRNA inti. Analisis sekuense DNA berbasis ribosom memperlihatkan variasi genetik baik di dalam maupun diantara spesies FMA (Clapp *et al.*, 1999). Lebih jauh, gen dari daerah ini tersedia dalam *copy* yang banyak dan memiliki keawetan tinggi, yang akan memfasilitasi perbedaan taxa dalam berbagai tingkatan. Sekuens rDNA SSU

(16S) berbuah relative lambat dan berguna untuk mempelajari jarak dari organisme berdekatan, sedangkan gen rDNA mitokondria berubah lebih cepat dan dapat dipergunakan pada tingkat family.

ITS adalah sekuens yang berlokasi pada gen rRNA eukariotik antara daerah pengkodean 18S dan 5,8S rRNA (ITS 2, gambar 1). Studi tentang variasi site restriksi DNA ribosomal (rDNA) dari suatu populasi memperlihatkan bahwa daerah pengkodean terlindungi, sedangkan daerah *spacer* berlainan. Sekuens *spacer* ini berubah dengan kecepatan tinggi dan hadir dalam gen rRNA eukariotik. Semua faktor tersebut berguna dalam analisis filogenik diantara spesies dan atau diantara populasi dalam satu spesies.



Gambar 1. Lokasi dan detail gen rDNA

Keterangan : IGS : Intergenic space, ITS : Internal transcribed spacer

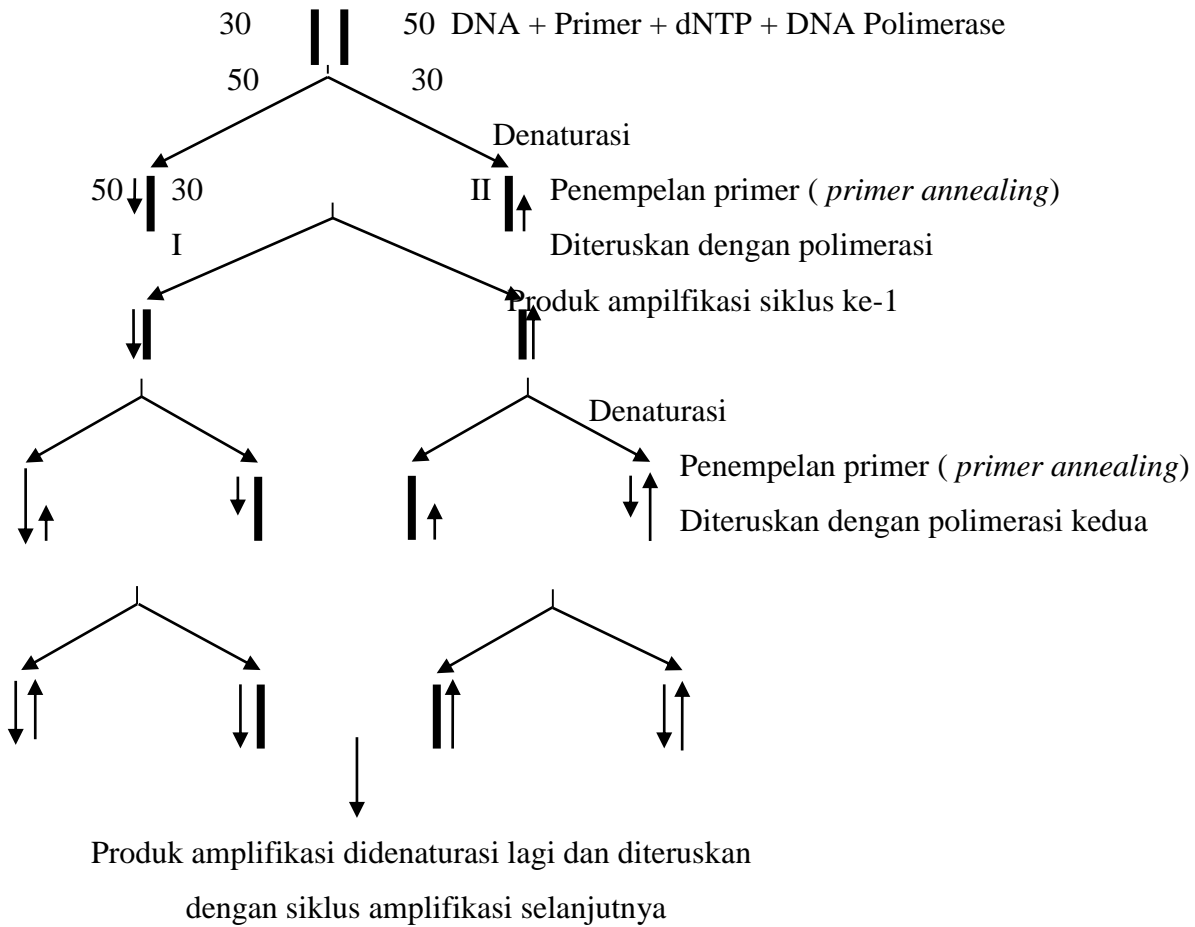
Sumber : Redecker *et al.* (2000)

DNA, PCR, dan RAPD

Deoxyribonucleic Acid (DNA), merupakan salah satu makro molekul yang mempunyai peranan yang sangat penting pada jasad hidup. DNA adalah polimer asam nukleat yang tersusun secara sistematis dan merupakan pembawa informasi genetik yang diturunkan kepada jasad keturunannya. Informasi genetik disusun dalam bentuk kodon yang berupa tiga pasang basa nukleotida dan menentukan bentuk, struktur, maupun fisiologis suatu jasad. Molekul DNA berbentuk *double helix* (untai ganda) yang terpilin, pada masing-masing untai terdapat asam fosfat dan deokxyribose, satu dari empat basa terikat secara kovalen, yaitu : adenin, atau guanine (purin), cytosine atau thymin (pirimidin). Basa-basa yang terletak bersebrangan dalam dua untai dihubungkan oleh ikatan hydrogen. Konfigurasi basa tersusun sedemikian rupa sehingga adenin hanya berpasangan dengan thymin dan guanin dengan cytosine. Daerah molekul DNA biasanya mengandung 500 sampai 1500 pasang basa, tetapi kadang-kadang lebih atau kurang bergantung pada gennya (Yuwono, 2005).

Reaksi berantai polymerase (Polymerase Chain Reaction, PCR) adalah suatu metode enzimatik untuk

melipatgandakan secara eksponensial suatu sekuen nukleotida tertentu dengan cara *in vitro*. Metode ini pertama kali dikembangkan pada tahun 1985 oleh Kary B. Mullis, seorang peneliti diperusahaan *CETUS Corporation*. Metode ini sekarang telah banyak digunakan untuk berbagai macam manipulasi dan analisis genetik. Dengan menggunakan analisis PCR, dapat diperoleh pelipatgandaan suatu fragmen DNA (110 bp, 5×10^{-19} mol) sebesar 200.000 kali setelah dilakukan 20 siklus reaksi selama 220 menit (Mullis dan Faloan, 1989 dalam Yuwono, 2006). Empat komponen utama pada proses PCR adalah : (1) DNA *cetakan*, yaitu fragmen DNA yang akan dilipatgandakan, (2) oligonukleotida *primer*, yaitu suatu sekuen oligonukleotida pendek (15-25 basa nukleotida) yang digunakan untuk mengawali sintesis rantai DNA, (3) deoxyribonukleotida trifosfat (dNTP), terdiri atas dATP, dCTP, dGTP, dTTP, dan (4) enzim DNA polymerase, yaitu enzim yang melakukan katalisis reaksi sintesis rantai DNA. Komponen lain yang juga penting adalah senyawa buffer (Yuwono, 2006). Prinsip dasar PCR dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Skema raksi amplifikasi DNA dengan teknik PCR

- I dan II : DNA DNA target yang diamplifikasi
- Oligonukleotida primer
- DNA baru hasil amplifikasi

PCR-RAPD merupakan salah satu teknik molekuler berupa penggunaan penanda tertentu untuk mempelajari keanekaragaman genetika. Dasar analisis RAPD adalah menggunakan mesin PCR yang mampu mengamplifikasi sekuen DNA secara *in vitro*. Teknik ini melibatkan penempelan primer tertentu yang dirancang sesuai

dengan kebutuhan. Tiap primer boleh jadi berbeda untuk menelaah keanekaragaman genetik kelompok yang berbeda. Penggunaan teknik RAPD memang memungkinkan untuk mendeteksi polimorfisme fragmen DNA yang diseleksi dengan menggunakan satu primer arbitrase, terutama karena amplifikasi DNA secara *in vitro* dapat

dilakukan dengan baik dan cepat dengan adanya PCR. Penggunaan penanda RAPD relatif sederhana dan mudah dalam hal perparasi. Teknik RAPD memberikan hasil yang lebih cepat dibandingkan dengan teknik molekuler lainnya. Teknik ini juga mampu menghasilkan jumlah karakter yang relative tidak terbatas, sehingga sangat membantu untuk keperluan analisis keanekaragaman organisme yang tidak diketahui latar belakang genomnya. Teknik RAPD sering digunakan untuk membedakan organisme tingkat tinggi (*eucaryote*). Namun demikian beberapa peneliti menggunakan teknik ini untuk membedakan organisme tingkat rendah (*procaryote*) atau melihat perbedaan organisme tingkat rendah melalui piranti organel sel seperti mitokondria.

Penelitian molekuler untuk mengidentifikasi keragaman genetik memerlukan jumlah genom DNA yang memadai. Disini muncul masalah ketidakmampuan mengkulturkan FMA karena sifat simbiosis obligat dari fungi ini, sehingga perlu upaya lain untuk memperoleh jumlah DNA guna keperluan teknik identifikasi molekuler berbasis DNA, yaitu dengan memanfaatkan PCR. Amplifikasi dari bagian DNA telah menjadi langkah yang

harus ditempuh dalam teknik molekuler (Tabel 1.). Dengan PCR memungkinkan mengamplifikasi genom atau bagian darinya yang berasal dari spora tunggal, akar terkolonisasi, atau dari sampel tanah secara langsung.

Terdapat tiga katagori dalam penelitian FMA, yaitu gen dan ekspresinya, genomik, dan variasi genetik. Meskipun kloning gen dari spesies FMA telah berhasil, namun belum menjelaskan ukuran dan struktur gen. Kloning arbuskula dilaporkan oleh Burleigh (2000). Zeze et al (1996) mengklon EcoRI dari hancuran DNA *Scutellospora casanea* kedalam pUC 18 dan didapatkan sekitar 1000 rekombinan klon DNA. Zeze et al (1999) mengembangkan pustaka genomik *Glomus versiforme* dan *Gigaspora margarita*.

Penelitian molekuler tentang eksplorasi variasi genetik FMA bervariasi dari sistematik dan taksonomi sampai ke pengembangan alat untuk kepentingan identifikasi sampel lapangan. Semua area penelitian yang luas tersebut tetap memerlukan amplifikasi sekuens rDNA menggunakan PCR, dengan pengkodean unit kecil (17S/18S). Dalam analisis tersebut memerlukan metode yang

mampu meneliti kisaran luas loci dari genom dibandingkan locus gen tunggal dari rDNA (Redecker *et al.*, 1997).

Tabel 1. Rincian Studi FMA Berbasis Molekuler-PCR

Daerah amplifikasi	Maraka molekular	Primer	Organisme target
SSU rDNA	PCR	VANS1	Glomales
Genomic DNA	PCR-RADP	OPA-02 and OPA-04 OPA-18 and P124 OPA-18 and P124	<i>Glomus versiforme</i> , <i>Gl. mosseae</i> <i>Gl. caledonium</i> , <i>Acaulospora leavis</i> <i>Gigaspora margarita</i> , <i>Scutellospora gregaria</i>
SSU rDNA	PCR	VAS1 and NS21	<i>G. intraradices</i>
Genomic DNA	Competitive PCR	PO and M3	<i>G. mosseae</i>
ITS	PCR-RFLP	ITS1 and ITS4	<i>Glomus</i> sp., <i>Scutellospora</i> sp., <i>Gigaspora</i> sp.,
SSU 1492	PCR	NS71 and SSU1492	<i>Gigaspora</i> sp.
Partial rDNA	PCR-partial	SS38 and VANS1 VANS1	Roots and spores <i>Sctellospora</i> and <i>Glomus</i>
ITS1 and ITS2	PCR	VAGIGA ITS1 and ITS2	Gigasporaceae <i>G. margarita</i>
ITS	PCR	ITS1 and ITS4	<i>G. mosseae</i> and <i>Gigaspora margarita</i>
SSU rDNA	PCR-RFLP PCR-nested	LR1 amd FLR2 FLR2-5.23andFLR2-8.23 LR1-23.46	Subgroups of Glomales <i>G. mosseae</i> , <i>G. intraradices</i>

			<i>G. roseae</i>
28S rDNA	PCR-SSCPs	LSU-Primers	<i>Glomus sp.</i>
SSU rDNA	PCR	NS31 and AM1	<i>Glomus sp.</i>
SSU rDNA	PCR-SSCP	VANS1	Subgroups of Glomales
	Nested – PCR	ITS, AM1	
ITS	PCR-RFLP	ITS1 and ITS4	<i>G. mosseae</i>
ITS	NestedPCR-SSCP	Eucaryotic universal primer	<i>Glomus sp.</i>
	Glomus-specific ITS primer		
ITS	Nested-PCR	ITS5 and ITS4	Glomeromycota (except)
ITS	Archaeosporaceae- PCR	SSU-Glom/LSU-Glom1	Major groups within Glomeromycota
		ITS5 and ITS4	

Terdapat beberapa versi pengembangan dari teknik dasar PCR. *Nested-PCR*, prosedur sangat sensitif yang menggunakan dua set primer untuk memonitor spesies FMA dan untuk menentukan kelimpahannya pada tanaman dan tanah. *Competitive PCR*, yang mengko-amplifikasi target *cetakan* dengan standar internal juga dikembangkan untuk mengkuantifikasi teknik PCR dengan tujuan mendeteksi perbedaan sekuens yang muncul diantara FMA pada akar yang dikumpulkan dari lapangan.

Filogeni

Dari catatan fosil dan data molekular menunjukkan sejarah evolusi

FMA (Glomales) berasal dari Ordovician, yaitu bersamaan dengan kolonisasi lingkungan daratan oleh tanaman darat. Bukti awal fosil arbuskul ditemukan pada specimen Algaophyton dari Devonian Rhynie Chert (Remy et al., 1994). Fosil spora dan hifa dari fungi glomen yang dijumpai sekarang telah ditemukan pada materi tanaman dari lapangan ini. Setelah diobservasi ternyata spora dan hifa Ordovician sama dengan jenis *Glomus* saat ini. Penemuan ini membuktikan bahwa fungi glomalean menjadi pendukung utama dalam suksesi pada awal okupasi daratan oleh tumbuhan

Tabel 2. Primer untuk aplikasi gen RNA ribosom inti

rRNA	Primer Gen	Product size (bp)*
Nuclear small		
NS1	5 GTAGTCATATGCTTGTCTC	555
NS2	5 GGCTGCTGGCACCAGACTTGC	
NS3	5 GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC	597
NS4	5 GTTCCGTCAATTCCTTTAAG	
NS5	5 AACTTAAAGGAATTGAGGGAAG	310
NS6	5 GCATCACAGACCTGTTATTGCCCTC	
NS7	5 GAGGCAATAACAGTCCTGTGATGC	377
NS8	5 TCCGCAGGTTACCTACGGA	
Nuclear		
ITS1	5 TCCGTAGGTGAACCTGCGG	290
ITS5	5 GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	315
ITS2	5 GCTGCGTTCTTCTCGATGC	290
ITS3	5 GCATCGATGAAGAACGCAGC	330
ITSs4	5 TCCTCCGCTTCTTGTCTGC	580
ITS1F	5 CTTGGTCATTTTCGACCAACTAA	700
ITS4B	5 CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG	
TW13	5 GGTCCGCTGTTCAAGACG	1200

Sumber : Reddy et al. (2005)

Keterangan : * Ukran produk berdasarkan gen rRNA genes of *Saccharomyces cerevisiae*

Perhatian khusus dalam kajian filogeni FMA adalah *Geosiphon pyriformis*, suatu fungi yang hidup bersimbiosis dengan *cyanobacterium*, yaitu *Nostoc pinctiforme*. Mollenhauer (1992) adalah orang pertama yang berspekulasi bahwa *Geosiphon*

berkerabat dengan *Glomus* dan karenanya dimasukkan sebagai FMA.

Suatu studi yang membandingkan morfologis dan ultrastruktural rinci spora *Geosiphon* dengan spesies-spesies FMA memperlihatkan kesamaan diantara keduanya (SchÜßler, 1997). Analisis

sekuense SSU rRNA juga mendukung kekerabatan tersebut. Pohon filogeni memperlihatkan bahwa dalam FMA termasuk *Geosiphon* sebagai cabang dasar dan membentuk bagian yang tidak satu kelompok dengan Zygomycetes lainnya. Berdasarkan penambahan hubungan keturunan dengan FMA. SchÜßler et al. (2001) memiliki argumen kuat untuk membuktikan pembentukan filum baru., Glomeromycota untuk mengakomodasi *monophyletic* FMA dan fungi seperti *Geosiphon*. Dengan adanya data pada tingkat DNA, tampaknya perlu ada redefinisi Glomales untuk mengakomodasi fungi non-mikoriza. Menurut Redecker et al (2000), menggunakan data sekuense baru dan yang telah ada dari 18S rRNA, didapatkan sedikitnya lima spesies fungi glomelian berada di luar definisi family yang berlaku selama ini dan telah menyimpang sejak awal evolusi. Juga disarankan lebih lanjut bahwa spora dimorfik memiliki hubungan keturunan dan satu atau morfologi lain hilang dalam berbagai garis umur. Data 5.8S rDNA menunjukan *Scutelospora castaena* berasal dari Ascomycetes. Jadi, data molekular dari berbagai taxa FMA

memungkinkan dilakukan redefinisi taxa dan membentuk hubungan filogenik baru.

Taksonomi

Sampai saat ini terdapat sekitar 150 spesies FMA yang terbagi dalam enam genera termasuk ke dalam kelas Zygomycota dan ordo tunggal Glomales (Tabel 3). Ordo ini terdiri dari subordo Glominae, dengan dua family Glomaceae (*Glomus* dan *Sclerocystis*) dan Acaulosporaceae (*Acaulospora* dan *Entrophospora*), dan subordo Gigasporaneae, dengan family Gigasporaceae (*Gigaspora* dan *Scutelospora*)(70,ma). Sebagai bagian dari dua family baru, yaitu Archaeosporaceae dan Paraglomaceae, sebuah family baru Diversisporaceae dapat dibentuk berdasarkan sekuens gen SSU rRNA panjang-penuh. Identifikasi Glomales sendiri telah lama didasarkan pada karakteristik morfologi spora. Namun terdapat kelemahan penggunaan karakteristik morfologi, yakni menyembunyikan keragaman yang terjadi pada strain dalam satu spesies. Sehingga karakter molekular dan genetik baru perlu dicari untuk kepentingan sistematik mulai dari spesies, genus, sampai ke family.

Tabel 3. Klasifikasi Ordo Glomales

Order : Glomales Morton & Benny

Suborder : Glominae Morton & Benny

Family : Glomaceae Pirozynski & Dalpe

Genus : *Glomus* Tulasna & Tulsane

Genus : *Scleorocystis* (Barjekey & Broome) Almeida & Schenck

Family : Acaulosporaceae Morton & Benny

Genus : *Acaulospora* (Gardemann & Trappe) Berch

Genus : *Entrophospora* Ames & Schneider

Suborder : Gigasporineae Morton & Benny

Family : Gigasporaceae Marton & Benny

Genus : *Gigaspora* (Gerdemann & Trappe) Walker & Sanders

Genus : *Scutellospora* Walker & Sanders

Sebagai bukti adanya kontroversi yang muncul dari observasi berdasarkan morfologi, dapat dikemukakan contoh spora *Acaulospora gerdemaniae* dan *Glomus leptotrichum* diamati pembentukannya pada hifa yang sama, sehingga muncul dua tipe spora yang disebut *Synanomorphs*. Namun dari sekuens 18S rDNA membuktikan bahwa organisme dimorfik ini tidak termasuk ke dalam *Glomus* maupun *Acaulospora*, juga tidak ke dalam family yang ada. Sebagai gantinya, masuk kedalam satu dari beberapa turunan yang menyimpang dari ordo *Glomales*. Genus *Glomales* telah dibatasi kurang memadai dan

mencerminkan konglomerasi fungi yang secara morfologi sukar untuk dipisahkan dan mempunyai jarak genetik sebesar family FMA Gigasporaceae dan Acaulosporaceae. Berdasarkan analisis sekuens SSU rDNA ringan, pengajuan klasifikasi FMA baru perlu mendapatkan pemikiran serius.

Keragaman intraspektif *G. mosseae* yang diungkapkan oleh uji inkompatibilitas vegetatif telah dikonfirmasi oleh gambaran total protein TS-RFLP. Studi menggunakan sekuens rDNA ITS menunjukkan tingginya variasi yang muncul pada populasi alami *G. mosseae*, yang memerlukan pemisahan

spesies ini. Pengelompokan *Gigaspora* berdasarkan penanda molekular enam nukleotida-panjang telah dibuktikan oleh analisis SSU dan isozim. Analisis cetak jari AFLP dari isolate tiga genera *Glomus*, *Gigaspora*, dan *Scutellospora* mendukung penempatan *Gigaspora* dan *Scutellospora* kedalam family yang sama.

Metode Identifikasi Molekular

Hampir semua cara identifikasi FMA didasarkan pada DNA ribosom. Gen dari daerah genom ini tersedia dalam jumlah copy banyak dan memiliki keawetan tinggi, yang membuka jalan untuk menunjukkan perbedaan taxa pada berbagai tingkatan. Analisis filogenetik berdasarkan sekuens DNA memungkinkan menyimpulkan secara langsung sejarah evolusi dan hubungan dalam taxa. Masalah adanya penghambat dalam mengembangkan identifikasi molekular berbasis DNA dapat diatasi dengan PCR. Dengan kehadiran teknik ini, analisis terhadap jumlah kecil DNA dari organisme yang tidak dapat dikulturkan secara axenic seperti halnya FMA, menjadi hal mudah.

Bagian dari gen ribosom menjadi target dalam identifikasi molekular. Tiga sekuens unit kecil 18S (SSU) dari DNA ribosom ditemukan oleh Simon et al.

(1993). Primer VANS 1 sering digunakan pada beberapa penelitian (Clapp et al., 1995 ; Di Bonito et al., 1995), namun bila tersedia banyak sekuens SSU, primer VANS 1 tidak dapat diawetkan dengan baik pada semua kelompok FMA. Dengan subunit ribosom besar 28S (LSU), Van Tuinen et al. (1998) merancang beberapa primer spesifik dengan target daerah D2 berbeda dari LSU, masing-masing untuk setiap spesies.

Untuk mengidentifikasi FMA secara molekular dari FMA yang mengkolonisasi akar tanaman yang tumbuh pada berbagai ekosistem pertanian berbeda seperti pertanian intensif, pertanian organik, dan padang rumput semi alami dapat menggunakan *trap culture*.

Isolasi FMA

Spora spesies FMA diperoleh melalui penyaringan basah dari kulturpot, dikumpulkan per individu dan permukaannya diseterilisasi. DNA diekstaksi, hasilnya sekitar 1-2 ng DNA per spora. DNA kemudian diperbanyak dalam gel atau dengan metode mini fluriometric.

Skrening Sekuens Ulangan DNA

Pustaka genom EcoR dari *S. Castanea* dalam pUC18 diskrening

untuk sekuens ulangan DNA menggunakan metode gun cloning. Sampel secara random 23 klon dari pustaka gen dipilih sebagai materi awal. Plasmid diekstraksi menggunakan prosedur perebusan dan setelah mengalami penghancuran, sisipan dipisahkan dari Puc18 dalam gel agarose 0,8% dan ditransfer ke membran Broprobe Biophylon Z⁺. Hibridisasi berlangsung seperti halnya Southern blot pada suhu 68⁰C dengan total DNA dari spora spesies-spesies yang diuji.

Hibridisasi Southern

DNA dari spora serta akar tanaman bermikoriza dan tidak bermikoriza masing-masing sebanyak 3,5 mg dihidrolisasi dengan perestriksi endonucleases dan electrophoresed dalam gel agarosa 0.8%. hibridisasi berlangsung pada suhu 68⁰C dalam 5 X SSC (1x SSC adalah 1,5M NaCl + 0.015 M Sodium Citrate) -reagen blocking- 2% sodium dodecyl sulphate (SDS) – 0,1% laury sarcocinate. Membran dicuci dua kali pada temperatur kamar dalam 2 x SSC – 0.1% SDS dan dua kali dalam 0.1% SSC – 0.1% SDS selama 20 menit. Signal hibridisasi dideteksi dengan system Chemiluminescence.

Seleksi Probe Spesifik Scutrllospora

Total DNA (60 ng) dari spora empat spesies yang mewakili genera FMA berbeda (*Acaulospora laevis*, *Gigaspora rosea*, *Glomus caledonium*, *S. Castanea*) diencerkan dengan seri 1:3 dan ditotolkan pada membran Bioprobe Biohylon Z⁺. Sisipkan SCI menggunakan prosedur squeeze-freeze dan dilabel oleh primer acak dan kemudian digunakan sebagai probe. Setelah hibridisasi pada 68⁰C semalaman, filter dicuci dua kali selama 2 menit pada temperatur ruangan dalam 2X SSC -0.1% SDS dan dua kali selama 15 menit dalam 0,1 % SSC – 0,1% SDS. DNA (1,5µg) dari spora empat spesies yang digunakan dalam percobaan blot dot dihidrolisis dengan endonuclease EcoR1, dipisahkan dalam 0.8% gel agarosa, ditransfer ke membran Bioprobe Biohylon Z⁺ dan dihibridisasi dengan *Scutellospora* fragmen DNA berlabel digoxigenin specific selama semalam pada suhu 68⁰C.

Karakteristik Sekuens

Sekuensing fragmen DNA spesifik-*Scutellospora* menggunakan Promega fmol Sequencing Kit dengan primer label akhir ³²P. Setelah persiapan kecil dengan prosedur perebusan, klon yang telah disisipkan ke EcoRI dari pUC18 digunakan sebagai cetakan untuk

reaksi sekuensing pada setiap arah dengan primer universal pUC18. Sekuens sempurna didapatkan dengan menggunakan autosequencer 373A.

Aplikasi PCR

Reaksi campuran 50 μ L yang berisi tiap primer 0.05 μ M 1 U *Taq* polymease, 250 μ M deoxynucleotide triphosphate, dan 1,5 mM $MgCl_2$. Satu nanogram plasmid spesifik *Scutellodpora* atau 5-10ng total DNA dari spora atau akar digunakan sebagai cetakan. Tiga pasang primer pCU 18, SC1-1 dan SC1-2, primer universal 18 S rDNA, yakni NS 3 dan NS6. Untuk reaksi amplifikasi parameter siklus ternal 95⁰C selama dua menit untuk denaturasi, penguatan selama 55 detik, dan pemanjangan pada 72⁰C selama 1,5 menit diikuti dengan 30 siklus berbeda dengan temperatur denaturasi 93⁰C.

Determinasi Jumlah Copy Sekuens

Untuk menentukan jumlah copy SCI dari *S. Castanea*, kandungan DNA per nucleus diukur dengan flow cytometry. Caranya nucleus diambil dari spora dengan menghancurkan spora dalam buffer berisi DAP (4',6-diamidino-2-phenylindole)

berkonsentrasi jenuh. Nukleus

selanjutnya dianalisis pada Partec CA II flow cytometer dan jumlah DNA diduga dengan DAPI fluorescence nucleus relatif terhadap *Gigaspora margarita* (0.77 pg) sebagai standar internal. Cytometer dikalibrasi dengan erythrocytes ayam mengandung 2.33 pg DNA inti. Histogram pengukuran DAPI-DNA pada skala linier fluorescence intensity (FL) digunakan untuk menghitung jumlah DNA inti menurut persamaan kandungan DNA (picogram) = rata-rata sampel FL/rata-rata FL standar x kandungan standar DNA (pictogram). Dari persamaan tersebut dapat diartikan bahwa fluorencence kompleks DNA-DAPI secara stoichiometric berkaitan dengan jumlah DNA.

Permasalahan dalam Identifikasi Molekuler FMA

Untuk memahami permasalahan yang muncul dalam identifikasi FMA secara molekular alangkah baiknya membandingkan dengan studi molekular fungi ektomikoriza yang telah terlebih dahulu berkembang. Kedua sistem menunjukkan perbedaan dalam hal-hal kunci seperti yang terlihat pada tabel 4.

Tabel 4. Perbedaan Sistem Biologis Identifikasi Molekuler Fungi Ektomikoriza dan FMA

	Ektomikoriza	Mikoriza Arbuskula
Jaringan Fungi	Di luar dalam akar	Dalam akar
Rasio fungi/jaringan tanaman	Tinggi	Rendah
Jumlah kolonisasi	Satu fungi perujung akar	Multi kolonisasi, tidak dapat dipisah
Primer	Primer spesifik spesies	Primer spesifik FMA
rDNA	Monomorfik dalam spesies	Sangat polimorfik dalam spora tunggal
Kuantifikasi	Jumlah atau berat kering ujung akar	Jumlah klon dari PCR campuran, multiple PCRs, kuantifikasi PCR

Sumber : Redacker et al. (2003)

Ujung akar yang dikolonisasi ektomikoriza biasanya hanya ditempati oleh satu jenis fungi saja dan bagian tersebut dapat dengan mudah dipisahkan. Pada daerah ini, jenis fungi lain biasanya ditemukan tidak dalam jumlah yang sama dengan fungi ektomikoriza, sehingga primer spesifik fungi untuk mengeluarkan DNA mencukupi. Jumlah ujung akar yang diduduki oleh satu spesies fungi atau berat keringnya merupakan ukuran kelimpahan relatif setiap spesies fungi terhadap spesies ektomikoriza dalam akar. Beberapa fungi ektomikoriza mampu hidup secara axenic dan karenanya lebih mudah untuk diakses menggunakan metode molekular (Redacker *et al*, 2003).

Jaringan fungi tertanaman dalam pada akar tanaman bermikoriza yang

menyebabkan ekstraksi DNA lebih bermasalah (Reddy *et al.*, 2005). Primer spesifik FMA diperlukan karena kalau tidak, sejumlah fungi pathogen dan saprofit akan ikut terdeteksi. Untuk merancang primer bagi semua fungi glomelean dan fungi lain sulit, sehingga perlu diganti oleh primer spesifik grup. Sepotong akar dapat dikolonisasi oleh beberapa FMA dan banyak komponen pengkolonisasi lain dipisahkan menggunakan cloning produk PCR (Clapp *et al*, 1995 ; Van Tuinen *et al*, 1988). rDNA FMA sangat polimorfik dalam spora tunggal dan bila dibandingkan dengan banyak fungi lain sekuens rDNA (mis, ITS) sering menunjukkan kesamaan dalam satu spesies.

DNA ribosom (rDNA) sangat polimorfik pada spora tunggal FMA. Hal

ini berbeda dengan jenis fungi lain, dimana setiap sekuens rDNA berbeda sering identik dalam satu spesies. Locus tunggal rDNA berbeda sering identik dalam satu spesies. Locus tunggal (rDNA) tidak memberikan potongan gambaran jelas tentang keragaman genetik intra spesies dan diantara spesies. Masalah ini muncul berkaitan dengan konsep spesies yang didasarkan pada genealogy gen. Dalam konsep spesies secara biologis, spesies adalah suatu unit individu interbreeding. Metode genetik molekular memungkinkan mendapatkan marka genetik untuk banyak fungi, termasuk jenis yang tidak dapat dikultivikasi. Karenanya, konsep yang disebut genealogical concordance phylogenetic, spesies recognition (GCPSR) ditemukan untuk mendeteksi aliran gen yang disebabkan oleh interbreeding. Menurut konsep ini perbedaan spesies dicirikan oleh isolasi genetik (Taylor et al., 2002). Namun konsep spesies berdasarkan filogenetik masih dipertanyakan apakah dapat diterapkan pada FMA. Dilaporkan oleh Kuhn et al (2001) nucleus pada miselium coenocytic dan FMA berbeda secara aseksual (klonal). GCPASR tidak dapat diaplikasikan pada alur klonal, sebab setiap jenis secara genetik diisolasi

dari alur lain dan karenanya mencerminkan atau mewakili spesies berbeda.

Penelitian pada *Glomus coronatum*, Clepp et al (2001) menyimpulkan spora FMA kemungkinan memiliki gen ribosom dari morphospesies berbeda. Dalam banyak kasus isolat multi spora sering digunakan dan analisis genetik dilaksanakan dengan mengekstrak DNA dari banyak spora. Perlu juga dipahami dalam studi molekular komunitas FMA utamanya bertujuan mengidentifikasi grup sekuens dan bukan spesies. Grup inilah yang kemudian memiliki keterkaitan morphospesies atau grupnya.

Masalah utama dalam penelitian FMA adalah fungi tidak dengan mudah dapat diidentifikasi dalam akar. Secara tradisional, spora dipergunakan untuk menentukan spesies yang terdapat dan aktif dalam akar, padahal pembentukan spora sangat tergantung pada parameter fisiologis dan sering tidak berkorelasi dengan kolonisasi akar. Jumlah spora tidak mencerminkan spesies fungi yang mengkolonisasi akar secara fungsional menjadi penting.

Struktur fungi dapat terdeteksi dalam akar, tetapi morfologinya memiliki kesamaan secara umum dan

tidak memadai untuk keperluan identifikasi pada tingkat spesies. Untuk dapat memahami hubungan antara populasi fungi dalam tanah dan akar, perlu mengidentifikasi spesies atau isolat dalam kompartemen berbeda dari ekologi *niche*. Disinilah urgensi mengembangkan alat molekular untuk mengidentifikasi FMA *in situ* terbebas dari pembentukan spora. Dalam hal ini PCR sangat diperlukan. Primer yang digunakan ada yang memanfaatkan sekuens random, tetapi umumnya menggunakan pendekatan sistematik dengan membandingkan sekuens yang telah diketahui fungsinya sebagaimana yang dapat dilihat pada Tabel 5. Rendom fragmen amplifikasi dari *G. mosseae* digunakan untuk spesifik primer spesies ini dan untuk mengembangkan PCR kuantitatif untuk mengukur kolonisasi akar. Clapp et al (1995) menampilkan hasil peneltian pertama tentang populasi lapangan FMA. Hasil PCR untuk spesies *Acaulospora* dan *Scutellospora* dengan pengukuran jumlah spora, namun terdapat ketidaksesuaian antara kolonisasi akar kuat oleh *Glomus* dan ketiadaan sporulasi.

Tabel 5. Primer yang Digunakan untuk Sekuens rDNA LSU Akar Bermikoriza

LSU 006 ¹	5'AGCATATCAATAAGCGGA GGA
²	5'AGTTGTTTGGGATTGCAG
LSU 3f ¹	C 5'GGGAGGTAAATTTCTCCT TAAGGC
4f ¹	5'AAATTGTTGAAAGGGAAA
LSU 6f ¹	CG 5'ATTCGTTAAGGATGTTGA
LSU 9f ¹	CG 5'CCCTTTCAACAATTTAC
LSU 5r ¹	G

Jacquot et al (2000) menyarankan penggunaan nested-PCR dengan spesifik primer untuk memonitor pengaruh faktor biotik dan abiotik dalam kompertemen berbeda dari akar. Menggunakan kombinasi primer NS31-AMI yang mengamplifikasi sekuens gen SSU rDNA dari tiga family Glomales, Daniel et al (2001) memperbanyak dan mengembangkan cetak jari spesies *Glomus* yang mengkolonisasi tanaman. Dengan demikian keragaman FMA dalam tanah dapat dimonitor. Metode sederhana untuk mendeteksi dan mengkuantifikasi *G.intraradices* dalam akar spesies tanaman berlainan

LSU 7r ³	5'ATCGAAGCTACATTCCTC C
LSU 8r ¹	5'GGGTATCCGTTGCAATCC TC
LSU 0599	5'TGGTCCGTGTTTCAAGAC G
²	5'CATAGTTCACCATCTTTC
LSU 0805	GG
^{1,2}	

Sumber : Redecker et al (2003)

- 1Primers yang digunakan untuk squencing
- 2Primers yang digunakan untuk amplifikasi PCR utama
- 3Primers yang digunakan untuk amplifikasi nested-PCR

menggunakan primer takson spesifik VANSI berpasangan dengan primer universal primer NS21. Competitive PCR dapat digunakan untuk mengkuantifikasi kolonisasi *G. Mosseae* dalam akar dengan akurasi dan sensitifitas tinggi. Competitive PGR juga memberikan informasi kelimpahan dan distribusi spasial populasi campuran FMA dalam akar, yang membuka jalan kearah penelitian interaksi spesifik.

KESIMPULAN

1. FMA merupakan jenis fungi yang mampu berasosiasi dengan 80%

- spesies tumbuhan, berkembang biak dengan spora yang memiliki multinukleus, dan memperlihatkan variasi genetik di dalam maupun diantara spesies berdasarkan analisis sekuens DNA ribosom.
2. Identifikasi FMA berdasarkan morfologi spora memberikan informasi taksonomi dan bermanfaat untuk menduga keanekaragaman, namun memiliki kelemahan karena produksi spora berbeda untuk tiap spesies dan kondisi lingkungan, serta ada kemungkinan tidak dapat diidentifikasi akibat terkena parasit dan rusak.
 3. Deteksi dan identifikasi FMA dapat dilakukan dengan metode yang memberikan hasil lebih akurat, yaitu teknik molekuler berbasis DNA, menggunakan prinsip eksploitasi keragaman genetik, berdasarkan pada DNA ribosom yang memiliki copy gen banyak
 4. Pemanfaatan PCR dalam identifikasi FMA diperlukan untuk mengatasi persoalan simbiosis obligat yang menyebabkan FMA tidak dapat dikulturkan tanpa kehadiran tanaman inang. Dengan teknik PCR, genom DNA tersedia dalam jumlah memadai untuk kepentingan identifikasi.
 5. Penggunaan RAPD memungkinkan mendeteksi polimorfisme fragmen rDNA FMA, dengan penanda relatif lebih sederhana dan mudah dalam preparasi, serta memberikan hasil lebih cepat dan menghasilkan jumlah karakter tidak terbatas.

DAFTAR PUSTAKA

- Clapp, J.P., Fitter, A.H. and Young, J.P.W., Ribosomal small subunit sequence variation within spores of an arbuscular mycorrhizal fungus *Scutellospora* sp. *Mol. Ecol.*, 1999, 8, 915-921.
- Clapp, J.P., Young, J.P.W., Merryweather, J. W. and Fitter, A.H., Diversity of fungal symbionts in arbuscular mycorrhizae from a natural community. *New Phytol.*, 1995, 130, 259-265.
- Clapp, J.P., Odriguez, R.A. and Odd, D. J. C., inter and intraspecific RNA large subunit variation in *Glomus coronatum* spores. *New Phytol.*, 2001, 149, 539-554.
- Daniell, T. J., Husband, R., Fitter, A. H., and Young, J. P. W., Molecular diversity of arbuscular

- mycorrhizal fungi colonising arable crops. *FEMS Microbiol Ecol.*, 2001, 36, 203-209.
- Di Bonito, R., Elliot, M. L. and Des Jardin, E. A., Detection of an arbuscular mycorrhizal fungus in roots of different plant species with the PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995, 61, 2809-2810.
- Gehring, H., SchÜßler, A. And Kluge, M., Geosiphon pyriforme, a fungus forming endocytobiosis with Nostoc (cyanobacteria) is an ancestral member of the Glomales: Evidence of SSU rRNA analysis. *J. Mol. Ecol.*, 1996,43, 71-81.
- Hosny, M., Gianinazzi-Pearson, V. And Duhieu, H., Nuclear DNA contents of 11 fungal species in glomales. *Genome*, 1998,41, 422-429.
- Hosny, M., Paris de Barros, J. Gianinazzi-Pearson, V. and Duhieu, H., Base comparison of DNA from Glomalean fungi : high amounts of methylated cytosine. *Fungal Genet. Biol.*, 1997, 22, 103-111.
- Jasquot, E., Van Tuinen, D., Gianinazzi, S., and Gianinazzi-Pearson, V., Monitoring species of arbuscular mycorrhizal fungi in planta and in soil by nested PCR : Amplification to the study of the impact of sewage sludge. *Plant Soil*, 2000, 226, 179-188.
- Lanfranco, L., Delperio, M. and Bonfante, P., Intrasporal variability of ribosomal sequences in the endomycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. *Mol. Ecol.*, 1999, 8, 37-45.
- Mollenhauer, D., *Geosiphon pyriformis*. In *Algae and Symbiosis : Plants, Animals, Fungi, Viruses, Interaction Explored* (ed. Reisser, W.), Biopress, Bristol. 1992, pp. 339-351.
- Redecker, D., Hijri, I., and Wiekman, A., Molecular identification of arbuscular mycorrhizal fungi in root : Perspectives and problems. *Folia Geobot.*, 2003, 38, 113-124.
- Redecker, D., Kodner, R., and Graham, L. E., Glomalean fungi from the Ordovician. *Science*, 2000, 289,1920-1921.
- Reddy, S. R., Pavan, K., Pindi, and S. M. Reddy. Molecular methods for research on arbuscular mycorrhizal fungi in India : problem and prospect. *Current Science*, 2005, 89,1669-1706.
- SchÜßler, A., Mollenhauer, D., Schnepf, E., and Kluge, M., *Geosiphon pyriforme*, and endosymbiotic association of fungus and

- cyanobacteria: The spore structure resembles that of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi. *Bot. Acta*, 1994, 107, 36-45.
- SchÜßler, A., Schwarzott, D., and Walker, C., A new fungal phylum, the Glomeromycota : Phylogeny and evolution. *Mycol. Res.*, 2001, 105, 1413-1421.
- Simon, L., Phylogeni of the Glomales : Deciphering the past to understand the present. *New Phytol.*, 1996, 133, 95-101.
- Taylor, J. W., Jacobson, D. J., Kroken, S., Kasuga, T., Geiser, D.M., Hibbet, D. S., and Fisher, C. A., Phylogenetic species recognitioned species concepts in fungi. *Fungal Genet. Biol.*, 2000, 31, 21-32.
- Van Tuinen, D., jacquot, E., Zhao, B., Gollote, A., and Gianinazzi-Perason, V., Characterization of root colonization profiles by amicroscosm community of arbuscular mycorrhizal fungi using 25rDNA-targeted nested PCR. *Mol Ecol.*, 1998, 7, 879-887.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., and Tylor, J., In *PCR Protocols* : Redecker, D., Thierfelder, H., Walker, C., and Warner, D., Restriction analysis of PCR amplified internal transcribed spacer of ribosomal DNA as tool for species identification in different genera of the order Glomales. *App. Environ. Microbial.*, 1997, 63, 1756-1761.
- Zeze, A., Hosny, M., Tuinen D van, Gianinazzi-Perason, V., and Dulieu, H., MYCDIRE a dispersed repetitive DNA element in arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycol. Res*, 1999, 103, 572-576