

梅根系丛枝菌根真菌 AFLP 分析

蔡邦平¹ 陈俊愉² 张启翔² 郭良栋³ 黄耀坚⁴ 王增福⁴

(1 厦门市园林植物园 2 北京林业大学园林学院 3 中国科学院微生物研究所 4 厦门大学生命科学学院)

摘要: 为了解决梅根系共生的丛枝菌根(AM)真菌难以应用形态学鉴定的问题,以巢式 PCR 的 AFLP 方法研究梅根系 AM 真菌 DNA 多态性。试验采集梅花期的根系样品,应用改良 CTAB 法提取总 DNA,经纯化处理后,应用巢式 PCR 扩增根系 AM 真菌基因片段,进行 AFLP 分析。结果表明,18 个梅品种的 30 个根系样品中,仅有 8 个样品经巢式 PCR 后获得纯化的 DNA 片段,占试验样品数的 26.7%;8 个样品共得到指纹图谱带 24 条,各样品平均多态性位点数为 3.0 个,Nei's 基因多样性为 0.4097 ± 0.0848 , Shannon 信息指数为 0.5968 ± 0.0955 ;利用 Nei's 遗传相似性系数聚类,梅品种根系内 AMF 基因组 DNA 的聚类类别与梅“品种群”这一分类级别无相关性。该试验为植物根系共生 AM 真菌 DNA 多态性研究提供了一种简便的技术。

关键词: 丛枝菌根真菌; 巢式 PCR; 扩增片段长度多态性; 梅

中图分类号: S685.17; S718.46 文献标志码: A 文章编号: 1000-1522(2012)增刊1-0082-06

CAI Bang-ping¹; CHEN Jun-yu²; ZHANG Qi-xiang²; GUO Liang-dong³; HUANG Yao-jian⁴; WANG Zeng-fu⁴. **AFLP analysis of arbuscular mycorrhizal fungi in roots of *Prunus mume*.** *Journal of Beijing Forestry University* (2012) **34** (Suppl. 1) 82-87 [Ch, 17 ref.]

1 Xiamen Botanical Garden, Xiamen, Fujian, 361003, P. R. China;

2 College of Landscape Architecture, Beijing Forestry University, 100083, P. R. China;

3 Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100101, P. R. China;

4 School of Life Sciences, Xiamen University, 361005, P. R. China.

DNA polymorphism of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) was analyzed through the method of DNA amplification by nested PCR based on AFLP marker, in order to solve the difficulty of identifying the species of AMF associated with mei flowers (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.). A total of 30 root samples from 18 mei cultivars were collected in the flowering phase from Wuhan Mei Garden as experimental materials. The results show that the purified DNA can be extracted only from eight root samples that account for 26.7% of total root samples. Totally 24 polymorphic loci were obtained from eight sample roots, averaging 3.0 loci for each sample. The average genetic identity was 0.4097 ± 0.0848 , and the Shannon information index was 0.5968 ± 0.0955 . The clustered groups of AMF DNA by AFLP marker from different cultivars were not identical with cultivar groups of *P. mume*. The results indicate that the AFLP marker technology is a brief and effective method to study the DNA polymorphism for the AMF in the roots of a plant.

Key words arbuscular mycorrhizal fungi; nested PCR; amplified restriction fragment polymorphism (AFLP); *Prunus mume*

丛枝菌根(arbuscular mycorrhiza,简称AM)是植物与球囊霉门(Glomeromycota)真菌形成的共生体,在自然界中普遍存在。梅(*Prunus mume* Sieb. et

Zucc.)能与AM真菌形成丛枝菌根^[1-3]。由于AM真菌是以活植物为专门宿主的菌类,目前为止尚无法离开活植物进行纯培养^[4,5],因此在植物根系内

收稿日期: 2011-10-20

基金项目: 教育部科学技术研究重点项目(104034)、国家自然科学基金项目(30670047)、厦门市科技计划项目(3502Z20072010、3502Z20112004)。

第一作者: 蔡邦平,博士,副研究员。主要研究方向: 园林植物与观赏园艺、植物菌根。电话: 0592-2039576 Email: cbangping@163.com
地址: 361003 福建省厦门市思明区虎园路25号厦门市园林植物园。

本刊网址: <http://journal.bjfu.edu.cn>

共生的 AM 真菌难以判断具体是哪些种类。

分子标记技术利用生物 DNA 多态性进行遗传标记,在种质多态性研究、分子遗传图谱构建、品种鉴定、系统发育与进化等方面有着广泛的应用^[6]。Simon 等^[7]于 1993 年首次利用 PCR 扩增技术测定了 AM 真菌的 DNA 序列,开始了分子标记技术在 AM 真菌的遗传多样性、种质鉴定、菌群多样性等方面的研究。国内郑世学等^[8]利用巢式 PCR 技术对田间玉米根样中 AM 真菌的特异性进行检测;龙良鲲等^[9]利用 PCR-DGGE 技术分析 AM 真菌 DNA 多态性;接伟光等^[10]研究了黄檗 AM 真菌 PCR-DGGE 的条件;蔡柏岩等^[11]利用巢式 PCR 技术对黄檗根围 AM 真菌进行分子鉴定;李涛等^[12]通过克隆 AM 真菌 RNA LSU 基因片段研究了我国西南地区干热河谷 2 种优势旱生植物的 AM 真菌分子多样性。

扩增片段长度多态性(AFLP)是 1992 年由荷兰科学家 Zabeau 和 Vos 发明的检测 DNA 多态性分子

标记技术^[13]。该技术既继承了 RFLP 的稳定性,又具有 PCR 反应快速、灵敏的特点,同时克服了 RFLP 和 RAPD 的缺点,且扩增的带纹多(50~100 条),可以提供较为丰富的多态性位点,具有重复性高、可操作性强、快速、简便、有效的特点^[6]。

本研究通过巢式 PCR 技术扩增梅根系的 AM 真菌基因片段,利用 AFLP 标记检测 AM 真菌 DNA 多态性,研究梅根系 AM 真菌的群落和遗传多样性,为进一步研究梅共生 AM 真菌的种类组成、功能菌种、作用机理提供可能,同时也为其他植物共生 AM 真菌 DNA 多态性研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

梅品种根系样品(表 1)采自武汉东湖梅园,于 2008 年 2 月梅开花期采集,样品清洗干净后置于 -70 °C 冰箱保存备用。

表 1 梅品种的根系样品

Tab. 1 Root samples of different cultivars of *P. mume*

| 序号 | 梅品种 | 品种群* | 样品数 | 序号 | 梅品种 | 品种群* | 样品数 |
|----|------|-------|-----|----|-------|-------|-----|
| 1 | 小绿萼 | 绿萼品种群 | 2 | 10 | 昆明小跳枝 | 跳枝品种群 | 1 |
| 2 | 宫春 | 宫粉品种群 | 1 | 11 | 晚碗宫粉 | 宫粉品种群 | 1 |
| 3 | 洪岭二红 | 宫粉品种群 | 1 | 12 | 粉妆台阁 | 宫粉品种群 | 1 |
| 4 | 徽州骨红 | 朱砂品种群 | 2 | 13 | 江南朱砂 | 朱砂品种群 | 1 |
| 5 | 三轮玉蝶 | 玉蝶品种群 | 2 | 14 | 多萼朱砂 | 朱砂品种群 | 1 |
| 6 | 江梅 | 单瓣品种群 | 1 | 15 | 龙游 | 龙游品种群 | 3 |
| 7 | 米单绿 | 绿萼品种群 | 2 | 16 | 垂直梅 | 垂直品种群 | 1 |
| 8 | 米单跳枝 | 跳枝品种群 | 3 | 17 | 杏梅 | 杏梅品种群 | 1 |
| 9 | 复瓣跳枝 | 跳枝品种群 | 2 | 18 | 美人梅 | 美人品种群 | 3 |

注: * 品种群划分依据文献[14]。

基因组提取试剂盒购自上海赛百盛基因技术有限公司,PCR 产物纯化试剂盒 Cycle Pure Kit 和 Gel Pure Kit 购自 OMEGA 公司(美国),*Mse* I、*T4* DNA Ligase、*Taq* 酶均购自大连宝生物工程有限公司。

1.2 基因组总 DNA 提取、纯化与检测

采用改良 CTAB 法提取根系内基因组总 DNA。每一样本选取适量(约 1~2 g)新鲜细嫩根样放于无菌试管中,加入适量无菌水在离心机以 2 000 r/min 的速度振荡 2 min,重复洗涤 3 次,去除杂质,置于 70% 的乙醇溶液中表面消毒 4~5 min,再用去离子水清洗 3 次。将洗涤后的根样转移到无菌研钵中,加入液氮充分研磨呈粉末状,迅速转入 5 mL 的离心管中。向离心管中加入事先于 65 °C 水浴预热的 2 mL 2% CTAB 抽提液(100 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 20 mmol/L EDTA, pH 5.0; 1.4 mol/L NaCl),充

分混匀,于 65 °C 水浴 1 h,同时每隔 15 min 缓慢摇动 1 次离心管。温浴结束后,采用基因组提取试剂盒继续处理样品,收集到基因组 DNA 粗提物。

将 DNA 粗提物采用 Cycle Pure Kit 进一步纯化,去除样品中残留蛋白质,获得的 DNA 纯化样品直接进行 PCR 扩增或置于 -20 °C 下保存备用。

采用 1% 琼脂糖凝胶电泳,以 Marker DNA-*Hind* III 做为分子标记,120 V 电压下电泳 20 min,溴化乙锭染色,在 Tannon GIS-2009 紫外凝胶成像仪分析系统下观察、拍照,进行 DNA 检测。

1.3 基因片段的巢式 PCR 扩增

1.3.1 巢式 PCR 引物

巢式 PCR 即进行 2 次 PCR 扩增。首先采用真核生物大亚基(LSU)通用引物 LR1 和 FLR2 作为外侧引物进行第 1 次 PCR 扩增,再用第 1 次 PCR 的产

物作为模板,用 AMF 特异性引物 28G1 和 28G2 作为内侧引物进行第 2 次 PCR 扩增,以 Gel Pure Kit

对 PCR 产物进行割胶纯化,去除样品中残留蛋白质和非目标条带。

表 2 巢式 PCR 引物的碱基序列及来源

Tab.2 Primers of nested PCR

| 引物 | 碱基序列 | 温度/℃ | 专一性情况 | 来源 |
|------|-------------------------------|------|------------|--------|
| LR1 | 5'-GCATATCAATAAGCCGAGGA-3' | 53 | Fungi | 文献[15] |
| FLR2 | 5'-GTCGTTTAAAGCCATTACGTA-3' | 54 | Fungi | 文献[16] |
| 28G1 | 5'-CATGGAGGCTGAGAATCCCG-3' | 61 | (AM) fungi | 文献[17] |
| 28G2 | 5'-CCATTACGTCAACATCCTTAACG-3' | 59 | (AM) fungi | 文献[17] |

1.3.2 PCR 反应体系及条件

PCR 扩增条件为:起始温度 94 ℃ 3 min;变性温度 94 ℃ 1 min,退火温度第 1 次 54 ℃、第 2 次 59 ℃ 各 1 min,延伸温度 72 ℃ 1 min,共 35 次循环;最后延伸温度 72 ℃ 10 min。

第 1 次 PCR 反应产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,若无条带,则直接作为第 2 次 PCR 反应的模板;若有条带,将其稀释 40 倍作为第 2 次 PCR 反应的模板。

采用 Cycle Pure Kit 试剂盒对 PCR 产物进行纯化,利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

1.4 AFLP 分析

1.4.1 酶切

利用内切酶 *Mse* I 对扩增的 DNA 进行酶切。反应体系中 DNA 模板 100 ng,加入内切酶 *Mse* I 0.625 μL、10 × NEB 缓冲液 2.5 μL、100 × BSA (100 g/mL) 0.25 μL,再加入灭菌双蒸水至 25 μL,混匀后置于 PCR 仪内 37 ℃ 反应 3.5 h。酶切序列为: *Mse* I: 3'-TTAAAATT-5'。

1.4.2 人工接头的连接

将酶切产物置于 70 ℃ 水浴 15 min,使 *Mse* I 内切酶变性、失活。接头连接反应体系中,酶切产物模板 12.5 μL,加入 10 × T4 DNA 连接缓冲液 2.5 μL、T4 接头 (10 μmol/L) 5 μL、T4 连接酶 (350 U/μL) 1 μL,再加灭菌双蒸水至 25 μL,混匀后置于 PCR 仪内 18 ℃ 反应 7 h。接头序列为: T4 接头: (M 接头) 5'-GACGATGAGTCCTGAGTACTCAGGACTCAT-3'。

1.4.3 预扩增

取连接产物 10 μL 为模板 DNA,加入 1 μL 扩增引物、2.5 μL 10 × PCR 缓冲液、0.5 μL dNTPs (2.5 mmol/L)、0.25 μL *Taq* 酶 (5 U/μL),再加入灭菌双蒸水至 25 μL。扩增程序为:94 ℃ 预变性 3 min;94 ℃ 变性 30 s,58 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 45 s,扩增 31 个循环;72 ℃ 终延伸 5 min,最后 4 ℃ 10 min。扩增后样品中加入 5 μL 上样缓冲液 (6 ×) 混合,95 ℃ 变性 5 min 后立刻转移到冰上冷却,取 10

μL 迅速在已制备好并经过预电泳的聚丙烯酰胺变性凝胶的点样孔中点样。扩增引物序列: 5'-GATGAGTCCTGAGTAAC-3'。

1.4.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳

选择性扩增产物用 6% 变性聚丙烯酰胺胶和 1 × TBE 缓冲液,80 W 恒功率预电泳 30 min。上样品 10 μL,80 W 恒功率电泳约 2 h,至第 1 条上样缓冲液条带泳到胶板的另一前沿停止电泳。

1.4.5 银染

将胶板放入 2 L 新配制的 10% 冰醋酸中,轻轻摇动 20 min 至胶全部脱色;用蒸馏水冲洗胶板 3 次,每次 2 min;再放入染色液 (1.5 g AgNO₃ + 2.25 mL 37% 甲醛 + 1.5 L 水) 中,摇动 30 min,染色;在蒸馏水中冲洗约 5 s,立即放在冷却的显影液 (30 g 无水碳酸钠,400 μL 10 mg/mL 的硫代硫酸钠,融入 1 L 水中,置于 4 ℃ 预冷) 中,摇动至 DNA 条带出现;将胶板放入 10% 冰醋酸固定液中,轻摇 5 min,定影;蒸馏水冲洗胶板约 5 min 后,室温下自然干燥。

1.5 数据分析

根据电泳图谱,将图谱上某一位置出现条带的记为“1”,缺乏的记为“0”。强带和弱带都记为“1”,仅那些重复性好的带才被记录。最后对“1”和“0”组成的原始矩阵,用 NTSYSpc-2.0 软件进行数据分析。用 POPGENE 32 软件,计算得出多态性位点数、多态性条带百分率、Nei's 基因多样性指数、Shannon 信息指数、Nei's 基因遗传距离 (GD) 等指数。其中遗传相似系数 $GS = 2N_{ij} / (N_i + N_j)$, N_{ij} 为两品种共有的条带数, N_i 和 N_j 分别表示两品种各自扩增出的条带数; Nei's 基因遗传距离 $GD = 1 - GS$ 。利用得到的 GD 矩阵进行类间平均链锁法聚类分析,建立样品间的亲缘关系树图。

2 结果与分析

2.1 根系总 DNA 的提取、PCR 扩增产物纯化的结果

18 个梅品种的 30 个根系样品,利用改良的 CTAB 法提取 DNA,得到 16 个样品 DNA 粗提物,获

得 DNA 粗提物的样品数占试验总样品的 53.3%。经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, DNA 片段弥散、条带模糊(图 1)。DNA 粗提物经 Cycle Pure Kit 试剂盒纯化处理后, 再经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, DNA 片段较纯化前, 条带清晰, 蛋白质污染减轻, 条带拖尾现象明显减弱(图 2), 但仅有 8 个纯化 DNA 片段, 获得纯化 DNA 片段的样品数占试验总样品的 26.7%。

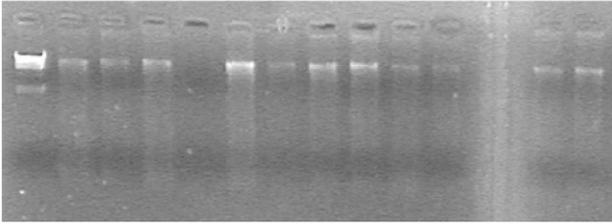


图 1 未纯化的根系 DNA 电泳图谱
Fig.1 Unpurified root DNA spectrum

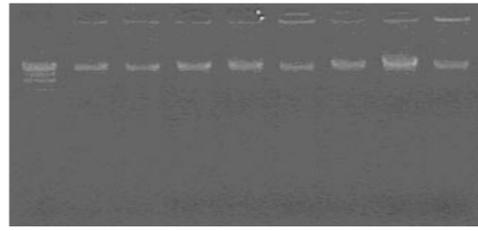


图 2 纯化的根系 DNA 电泳图谱
Fig.2 Purified root DNA spectrum

将 DNA 粗提物稀释 100 倍作为模板进行巢式 PCR 处理。第 1 次 PCR 反应产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 若在 750 bp 处无条带, 则直接作为第 2 次 PCR 反应的模板; 若 750 bp 处有条带, 将其稀释 40 倍作为第 2 次 PCR 反应的模板。巢式 PCR 后, 共获得 8 个纯化的 DNA 片段, 小于 720 bp(图 3), 表明梅根系存在 AMF 基因组。

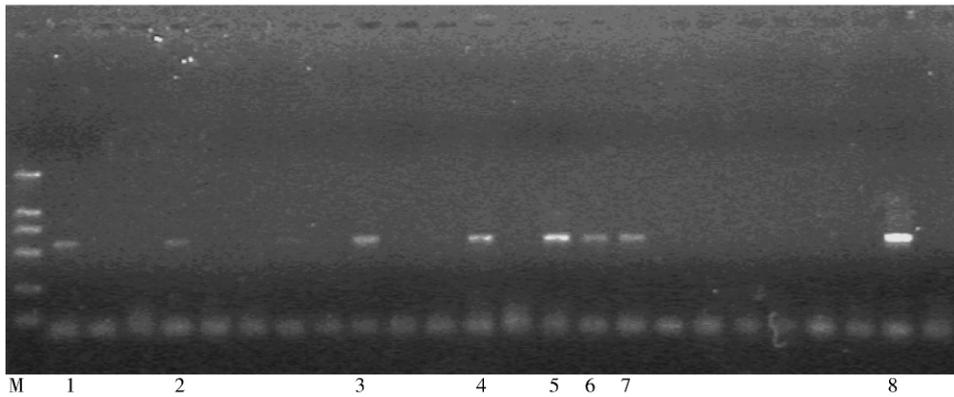


图 3 根系 DNA 巢式 PCR 扩增产物

Fig.3 Amplification by nested PCR of root DNA

注: 1. 三轮玉蝶 a; 2. 小绿萼 a; 3. 小绿萼 b; 4. 洪岭二红; 5. 三轮玉蝶 b; 6. 宫春; 7. 徽州骨红; 8. 江梅。

2.2 根系 AMF 基因组 DNA 的 AFLP 指纹图谱分析

根系 AMF 基因组 DNA 经过巢式 PCR 扩增后, 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳和银染, 紫外灯下扫描。结果发现 8 个样品共得到指纹图谱带 24 条(图 4), 其中多态性带 24 条, 多态性比率为 100%, 多态性位点数 9 个, 平均多态性位点数 3.0 个, Nei's 基因多样性为 0.4097 ± 0.0848 , Shannon 信息指数为 0.5968 ± 0.0955 。其中, 梅品种 '宫春' 根系 AMF 基因组 DNA 的多态位条带最多, 为 6 条, '洪岭二红' 的多态位条带最少, 为 1 条。具有多态性位点 1 号(DNA 片段约 1372 bp) 的梅品种数量最多, 8 个样品中有 5 个样品具有; 具有多态性位点 14 号(DNA 片段约 194 bp) 的梅品种数量最少, 仅 '三轮玉蝶' a 1 个样品具有。

2.3 根系 AMF 基因组 DNA 遗传相似性与聚类图谱

根系 AMF 基因组 DNA 在梅各品种间的 Nei's 遗传相似性和遗传距离也有差异, 反映了其丰富的

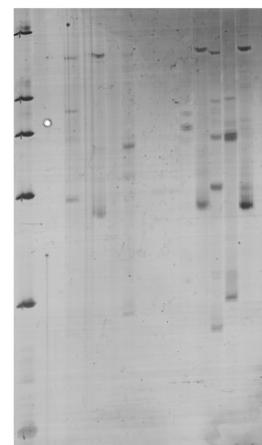


图 4 AMF 基因组 DNA 的 AFLP 电泳图谱
Fig.4 Gel electrophoresis AFLP of AMF DNA

遗传多样性。Nei's 遗传相似系数变异范围是 0.22 ~ 1.00, '三轮玉蝶' b 和 '小绿萼' a 的相似性最高, 相似性系数为 1.00; 而 '宫春' 和 '洪岭二红'、'徽州

骨红’和‘江梅’的相似性最低,相似性系数均为 0.22(表3)。

表3 梅品种根系内 AMF 基因组 DNA 基于 AFLP 标记的遗传相似系数和遗传距离

Tab.3 Genetic similarity coefficients and genetic distances of the root of *P. mume* cultivars based on AFLP marker

| | 三轮玉蝶 a | 小绿萼 a | 小绿萼 b | 洪岭二红 | 三轮玉蝶 b | 宫春 | 徽州骨红 | 江梅 |
|--------|--------|-------|-------|------|--------|------|------|------|
| 三轮玉蝶 a | * | 0.33 | 0.67 | 0.44 | 0.33 | 0.33 | 0.56 | 0.22 |
| 小绿萼 a | 0.67 | * | 0.56 | 0.33 | 0.00 | 0.67 | 0.67 | 0.11 |
| 小绿萼 b | 0.33 | 0.44 | * | 0.44 | 0.56 | 0.56 | 0.33 | 0.67 |
| 洪岭二红 | 0.56 | 0.67 | 0.56 | * | 0.33 | 0.78 | 0.33 | 0.44 |
| 三轮玉蝶 b | 0.67 | 1.00 | 0.44 | 0.67 | * | 0.67 | 0.67 | 0.11 |
| 宫春 | 0.67 | 0.33 | 0.44 | 0.22 | 0.33 | * | 0.67 | 0.56 |
| 徽州骨红 | 0.44 | 0.33 | 0.67 | 0.67 | 0.33 | 0.33 | * | 0.78 |
| 江梅 | 0.78 | 0.89 | 0.33 | 0.56 | 0.89 | 0.44 | 0.22 | * |

注:下三角为相似性系数,上三角为遗传距离。

聚类结果表明(图5)梅品种根系内 AMF 基因组 DNA 的聚类类别与梅品种本身的“品种群”这一分类级别无相关关系,也就是梅的不同品种群与其定居根内的 AMF 种群无必然的联系。例如在梅品种分类中,‘小绿萼’和‘三轮玉蝶’分别属于绿萼型

和玉蝶型,但其根系内 AMF 基因组 DNA 的遗传距离最近,可聚为一类型;相反,即使是同一个梅花品种(如小绿萼 a 和 b)其不同植株的根系内 AMF 基因组 DNA 的遗传距离也有较大差距,可聚为不同的类型(图5)。

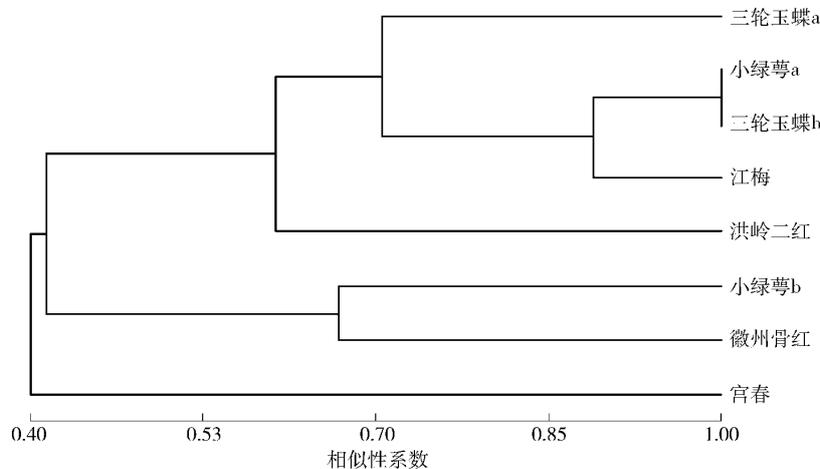


图5 梅品种根系 AMF 基因组 DNA 基于 AFLP 标记的聚类结果

Fig.5 Clustered result of AMF DNA from the roots of different cultivars of *P. mume* based on AFLP marker

3 结论与讨论

3.1 根系 AMF DNA 的提取方法

采用分子生物学技术对 AM 真菌进行研究,具有快速、准确、涉及范围广等优点,是传统技术不可比拟的。但在操作中,仍有试验条件、材料、技术水平等多方面影响结果。本试验中,取样为 18 个梅品种的 30 个根系样品,利用改良的 CTAB 法提取 DNA,只得到 16 个样品的 DNA 粗提物。经纯化处理,仅有 8 个样品的 DNA 片段条带清晰、无污染、无拖尾,符合 AFLP 分析的要求。因此,对于植物根系内提取 AMF DNA 的试验条件还需要进一步优化。

本研究应用巢式 PCR 对 AMF DNA 进行特异性扩增,具有很好的灵敏性,可有效地从微量 DNA 中扩增出目标带,对其根系内的 AMF 基因组 DNA 研究十分有利。但是,植物根系被 AM 真菌侵染的能力、侵染率不同,绝大多数的根系不可能达到 AM 侵染率为 100%。梅根系 AM 侵染率在 8.39% ~ 32.22%^[1],这就可能导致提取基因组总 DNA 所利用的根系样品,本身就不存在 AM 真菌。因此,对于梅根系 AM 真菌的 DNA 多态性研究仍需进行材料与方法的改进。

3.2 梅根系共生的 AM 真菌鉴定

对于自然生态系统中的 AM 真菌多样性研究多

数还是依据土壤孢子形态以及根内侵染结构。根据植物根内的侵染结构,可以初步判断是哪些类群的 AM 真菌侵染,而无法判断是哪些具体的 AMF 种类以及数量^[5]。分子标记技术为植物根内定居的 AM 真菌种类和遗传多样性研究提供一种可行性方法。本研究表明梅根系共生的 AM 真菌遗传多样性丰富,平均多态性位点数为 3.0 个,说明其根内的 AM 真菌种类多样。但对根系内的 AM 真菌种类鉴定,还有赖于大量的 AM 真菌分子测序工作。

3.3 梅品种与其共生 AMF 菌群关系

研究表明,梅根系内的 AMF 基因组 DNA 的平均多态性位点数 3.0 个,明显少于梅根际土壤的 AMF 基因组 DNA 的 6.5 个(将另文发表相关结果)。说明在梅根围土壤的 AMF 孢子种类明显多于根系内的种类,宿主植物对 AMF 的定居着生是有选择性的,或者说明梅根围土壤的 AMF 种类并不是能够全部定居于宿主植物中的。

根据聚类结果表明,梅各品种根系内 AMF 基因组 DNA 的聚类类别与梅的“品种群”这一分类级别无相关关系。但是由于本试验中从根系中能够抽取 AMF DNA 的梅品种群的品种样本相对较少,尚缺乏各品种群的大量样品进一步核实。

参 考 文 献

- [1] 蔡邦平, 陈俊愉, 张启翔, 等. 中国梅丛枝菌根侵染的调查研究[J]. 园艺学报, 2008, 35(4): 599-602.
- [2] 蔡邦平, 陈俊愉, 张启翔, 等. 重庆地区梅根际丛枝菌根真菌多样性研究[C]//张启翔. 中国观赏园艺研究进展 2011. 北京: 中国林业出版社, 2011: 547-550.
- [3] 蔡邦平, 陈俊愉, 张启翔, 等. 武汉春、秋季的梅根际丛枝菌根真菌群落变化的研究[C]//张佐双. 中国植物园(第 13 期). 北京: 中国林业出版社, 2010: 13-19.
- [4] SMITH S E. Discoveries, discussions and directions in mycorrhizal research [C]//VARMA A, HOCK B. *Mycorrhiza: Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology*. Heidelberg, Germany: Springer-Verlag, 1995: 521-560.
- [5] HART M M, READER R J. Taxonomic basis for variation in colonization strategies of arbuscular mycorrhizal fungi [J]. *New Phytologist*, 2002, 153(2): 335-344.
- [6] 邹喻苹, 葛颂, 王晓东. 系统与进化植物学中的分子标记[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [7] SIMON L, BOUSQUET J, LEVESQUE R C, et al. Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants[J]. *Nature*, 1993, 363: 67-69.
- [8] 郑世学, 董秀丽, 喻子牛, 等. 四种 AM 真菌接种剂的田间效应及其分子检测研究[J]. 土壤学报, 2004, 41(5): 742-749.
- [9] 龙良鲲, 羊宋贞, 姚青, 等. AM 真菌 DNA 的提取与 PCR-DGGE 分析[J]. 菌物学报, 2005, 24(4): 564-569.
- [10] 接伟光, 蔡柏岩, 葛菁萍, 等. 黄檗丛枝菌根(AM)真菌 PCR-DGGE 条件研究[J]. 黑龙江大学自然科学学报, 2008, 25(4): 534-538.
- [11] 蔡柏岩, 接伟光, 葛菁萍, 等. 黄檗根围丛枝菌根(AM)真菌的分离与分子鉴定[J]. 菌物学报, 2008, 27(6): 884-893.
- [12] LI T, LI L F, SHA T, et al. Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi associated with two dominant xerophytes in a valley-type savanna, southwest China [J]. *Applied Soil Ecology*, 2010, 44(1): 61-66.
- [13] ZABEAU M, VOS P. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting: Europe, 0534858 [P]. 2005-04-27.
- [14] 陈俊愉. 中国梅花品种图志[M]. 北京: 中国林业出版社, 2010.
- [15] TROUVELOT S, VAN TUINEN D, HIGRI M, et al. Visualization of ribosomal DNA loci in spore interphasic nuclei of glomalean fungi by fluorescence in situ hybridization [J]. *Mycorrhiza*, 1999, 8(4): 203-206.
- [16] VAN TUINEN D, JACQUOT E, ZHAO B, et al. Characterization of root colonization profiles by a microcosm community of arbuscular mycorrhizal fungi using 25S rDNA-targeted nested PCR [J]. *Molecular Ecology*, 1998, 7(7): 879-887.
- [17] DA SILVA G A, LUMINI E, MAIA L C, et al. Phylogenetic analysis of Glomeromycota by partial LSU rDNA sequences [J]. *Mycorrhiza*, 2006, 16(3): 183-189.

(责任编辑 李 慧)