

丛枝菌根真菌 *Gigaspora margarita* 孢子 伴生菌群效应分析*

龙良鲲^{1,3} 姚青² 艾云灿³ 朱红惠^{1**}

(¹广东省微生物研究所, 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广东省微生物应用新技术公共实验室 广州 510070)

(²华南农业大学园艺学院 广州 510642; ³中山大学生命科学院 广州 510275)

摘要 丛枝菌根真菌的孢子表面存在与之伴生的微生物类群, 其中以细菌为主. 本文以不同处理方式的珍珠巨孢囊霉(*Gigaspora margarita*)孢子与白三叶草(*Trifolium repens* L.)进行共培养试验. 试验分为4组: A, 孢子经表面消毒; B, 孢子表面消毒后并回接伴生菌; C, 孢子未经表面消毒; D, 孢子存在于土壤接种物中. 以灭菌的蛭石为基质, 修改的Hoagland营养液作为补充营养, 在相对无杂菌的环境中培养3 mo, 并取样观察. 结果表明, 处理A的植株茎叶鲜(干)重显著低于其它处理, 根系鲜重无显著差异. 菌根侵染率以D处理最高, A与B、C之间存在不显著的差异. 产孢数量以A最少, 并与B、C之间存在显著性差异. 以PCR-DGGE技术分析各处理之间孢子伴生细菌的种群差异. 结果显示, A处理与其它处理间存在较大的差异, 其它处理间差异较小. 分析认为, 伴生菌群对*G. margarita*及其宿主植物的生命活动起着直接或间接的影响. 图1 表3 参26

关键词 珍珠巨孢囊霉; 孢子; 伴生细菌; 效应; 丛枝菌根真菌

CLC Q948.122.3

Community Effects of Microbes Associated with Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Gigaspora margarita* Spores*

LONG Liangkun^{1,3}, YAO Qing², AI Yuncan³ & ZHU Honghui^{1**}

(¹Guangdong Institute of Microbiology, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Provincial Open Laboratory of Microbial New Application Technique, Guangzhou 510070, China)

(²College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

(³College of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract Many microbes, especially bacteria, colonize on the surface of arbuscular mycorrhizal fungi spores. In this study, four kinds of different pre-treated spores of *Gigaspora margarita* were co-cultured with *Trifolium repens* L. in sterilized vermiculite bottle, including sterilized spores (A), sterilized spores inoculated with spore-associated microbes (B), unsterilized spores (C), and spores contained in soil (D). The cultivation was conducted in an axenic environment and watering modified Hoagland solution for three months. The analysis and results indicated that the values of fresh or dry weights of stem and leaf of treatment A were significantly lower than those of other treatments, and the value of fresh weight of root was not obviously different. The highest percent of mycorrhizal infection existed in treatment D, and no significant differences were found among treatments A, B and C. In addition, the number of newly formed spores of treatment A was lower than that of treatments B and C. The bacterial communities associated with the newly formed spores of the four treatments were analyzed by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) techniques. The result revealed that the bacterial community in treatment A was obviously different from the other treatments. This study indicated that the AMF-associated microbes might directly or indirectly affect the life activities of *G. margarita* and its host plants. Fig 1, Tab 3, Ref 26

Keywords *Gigaspora margarita*; spore; associated bacteria; community effect; arbuscular mycorrhizal fungus

CLC Q948.122.3

丛枝菌根真菌(Arbuscular mycorrhizal fungi, AMF)是一类与植物形成互惠共生关系的土壤微生物, 其分布广泛, 能

够侵染80%以上的陆生植物^[1]. AMF具有重要的科学研究和应用价值, 促使人们不断对其生物学、生态学、生理学和遗传学等方面进行深入的研究^[2-4]. 目前, 已知在菌根生态系统中, 除植物、菌根真菌之外, 存在第3类参与者——细菌等微生物^[4]. 这些微生物可称之为AMF伴生菌^[5], 存在于AMF的孢子、孢子果或菌丝的表面或内部^[6-10]. 伴生菌对AMF具有

收稿日期: 2007-10-17 修订日期: 2008-03-05

*广东省自然科学基金项目(Nos. 07000509, E05202480) Supported the Natural Science Foundation of Guangdong, China (Nos. 07000509, E05202480)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: zhuhonghui66@yahoo.com.cn)

的生态学意义为人们所关注. 有人将分离到的伴生细菌与AMF共培养或共同接种宿主植物, 发现这些细菌能够促进AMF的孢子萌发^[11]、菌丝生长^[12]、定殖宿主^[13], 甚至形成新的孢子^[14], 并能促进宿主植物的生长^[15]. 由于自然环境中的微生物具有群体效应, 关于伴生菌群对AMF具有的效应, 国外研究较少, 国内还未见相关报道. 本文以珍珠巨孢囊霉(*Gigaspora margarita*)为研究材料, 分析了孢子伴生菌群对其真菌宿主和植物的生态效应.

1 材料与方法

1.1 AMF菌株

Gigaspora margarita Becker & Hall MAFF 520054 (源自日本农林渔业部遗传资源库), 由本实验室以等体积比的沙土混合物为基质、白三叶草(*Trifolium repens* L.)为宿主植物进行纯系扩繁、保存.

1.2 伴生菌悬液的准备与孢子表面消毒

湿筛法^[16]挑取*G. margarita*孢子. 取50粒健康孢子盛入无菌1.5 mL离心管中, 并用无菌水轻轻漂洗3次(1 mL/次), 弃漂洗液. 管中再次加入1 mL无菌水, 用枪头反复吹打50次, 20 kHz超声处理10 s, 处理中避免孢子破碎. 吸取漂洗液入新的离心管中, 作为伴生菌悬液备用. 孢子的表面消毒以“差别灭菌法”^[17]进行, 并以TSA (1.5%胰蛋白胨, 0.5%大豆蛋白胨, 0.93% K₂HPO₃, 0.37% KH₂PO₃, 1.5%琼脂粉, pH 7.3)平板培养检测, 污染率小于5%时备用.

1.3 试验处理

设A、B、C、D四种处理, 见表1. 取24 g蛭石装入100 mL三角瓶中, 并加40 mL蒸馏水和5 mL修改的Hoagland营养液(即大量元素为原配方的1/10强度), 封口灭菌. 白三叶草种子用70%的酒精浸5 s后, 5%的次氯酸钠消毒10 min, 无菌水漂洗3次. 在无菌条件下, 每培养瓶中接入2粒植物种子和外观一致的健康*G. margarita*孢子5粒. 伴生菌的接种方式: 将真菌孢子浸入伴生菌悬液中10 min, 每粒孢子连同50 μL伴生菌悬液接入培养瓶. 所接土壤为1 g/瓶, 未灭菌, 其中约含*G. margarita*孢子5粒. 各处理3次重复. 培养条件: 16 h光照、昼夜26 ℃/20 ℃. 3 mo后取样观察.

1.5 伴生细菌种群的DGGE分析

1.5.1 DNA模板的制备 分别取各处理的*G. margarita*孢子20粒为一组装入1.5 mL离心管中, 并用无菌ddH₂O漂洗3次(1 mL/次). 漂洗好的孢子移入0.2 mL PCR管中, 并加入30 μL无菌ddH₂O. 用无菌枪头反复吹打50次, 20 kHz超声处理10 s, 42 ℃温浴30 min. 操作中孢子破碎, 则弃之. 吸取上清入新的PCR管中, 加入3 mg Chelex-100. 56 ℃温浴30 min, 99 ℃8 min, 冰浴2 min. 10 000 g, 10 min离心, 取上清作为PCR模板. 孢子总数量不足20粒的取所有孢子, 最终悬浮体积相应减少.

1.5.2 细菌16S rDNA V3区扩增 两步法PCR进行. 先以27f (5′ AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3′)、518r (5′ ATT ACC GCG GCT GCT GG 3′)为引物进行首次 PCR (目标片段约500 bp), 20 μL体系, ddH₂O 14.9 μL; 10×Buffer 2 μL; MgCl₂ (20 mmol/L)1.6 μL; dNTP (10 mmol/L) 0.4 μL; 27f (10 μmol/L) 0.4 μL; 518r (10 μmol/L) 0.4 μL; Taq (5U/μL) 0.1 μL; DNA 0.2 μL. 反应程序: 94 ℃, 4 min预变性; 94 ℃, 0.5 min; 52 ℃, 1 min; 72 ℃, 0.5 min; 30个循环, 72 ℃, 7 min. 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测.

以上产物的50倍稀释液为模板(电泳检测无条带则不稀释), 以GC-357f (5′ CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG 3′)和518r为引物进行二次PCR, 获得约230 bp的V3区片段. 反应50 μL体系, 除引物不同外, 其它参数同上. 反应程序同上. 1.2%琼脂糖凝胶电泳检测.

1.5.3 DGGE 以基因突变检测系统(BIO-RAD公司)进行DGGE分析. 灌制8%的丙稀酰胺(丙稀酰胺: 双丙稀酰胺=37.5: 1)及30%~60% (100%的变性剂为40%甲酰胺, 7M尿素)变性剂范围的DGGE凝胶. 各样品取约500 ng的16S rDNA V3区PCR产物进行电泳. 以荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescence*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、发根农杆菌(*Agraracterium rhizogens*)、青枯菌(*Ralstonia solanacearum*)纯系的16S rDNA V3区产物, 混合点样作为参照条带. 电泳参数: 50 V、15 min进胶, 之后160 V, 5 h. 0.05%的Goldview (北京赛百盛公司)染色20 min, 紫外成像仪下观察、拍照保存.

表1 试验设计
Table 1 Test design

处理 Treatment	种子消毒 Sterilized seed	孢子消毒 Sterilized spore	接种伴生菌群 Inoculation of the associated microbes	土壤 Soil
A	+	+	—	—
B	+	+	+	—
C	+	—	—	—
D	+	—	—	+

每个处理3次重复 Three repeats per treatment

1.4 生物量和菌根感染率的测定

将培养瓶中的三叶草整株取出, 分别测量茎叶和根系鲜重, 另将茎叶烘干后测量干重. 根系用曲苯利蓝法^[16]染色后, 网格交叉法^[18]测定菌根感染率. 培养瓶中的蛭石全部取出, 并用湿筛法分离、计算其中的产孢数量. 数据的差异显著性用SPSS 11.0软件进行LSD检验分析.

1.5.4 统计分析 DGGE图谱中每一条带作为独立的分类操作单元(OUT). 用Gelpro32软件进行DGGE条带标准化和数字化处理. 用Biodiversity Test软件计算Shannon–Wiener指数. 按照同一水平位置条带的有无, 分别记为1, 0, 并转换成数字矩阵. 用NTSYSpc 2.1软件以UPMAG法进行聚类分析(Dice系数).

表2 处理间各生物指标的比较
Table 2 Comparison of biological values among different treatments

处理 Treatment	重复 Repeat	茎叶鲜重 Fresh weight of stem/leaf	茎叶干重 Dry weight of stem/leaf	根系鲜重 Fresh weight of root	菌根率 Percent of infection (P/%)	产孢数 Number of spores	其它 Other
A	1	0.1800	0.0270	0.1600	33.10	18	—
	2	0.0700	0.0150	0.1900	27.50	14	—
	3	0.0900	0.0190	0.2800	11.70	10	—
	Mean	0.1133a	0.0203a	0.2100ab	24.10a	14a	—
B	1	0.1800	0.0270	0.2000	54.90	47	—
	2	0.1500	0.0310	0.1500	48.80	38	—
	3	0.2200	0.0370	0.2000	31.40	27	—
	Mean	0.1833b	0.0317b	0.1833a	45.03ab	37b	—
C	1	0.3000	0.0260	0.3100	48.90	41	—
	2	0.2800	0.0390	0.2500	46.20	38	—
	3	0.2800	0.0360	0.2300	31.00	39	—
	Mean	0.2867c	0.0337b	0.2633ab	42.03ab	39b	—
D	1	0.1600	0.0400	0.2400	68.40	26	Root nodule
	2	0.2100	0.0340	0.2600	31.00	22	Root nodule
	3	0.1800	0.0410	0.3300	50.00	25	Root nodule
	Mean	0.1833b	0.0383b	0.2766b	49.80b	24a	—

同一列数字后标有不同字母表示达到5%显著水平,下同 Different letters in the same column mean 5% significant difference. The same below

2 结果与分析

2.1 伴生菌群对AMF及植物的影响

由表2可知,各处理之间AMF及宿主植物生物指标存在一定的规律性变化. A处理的茎叶鲜重和干重均明显低于B、C、D处理. 各处理之间的根系鲜重比较, A、B、C处理之间无显著性差异, B处理显著低于D处理. 菌根率比较,数值上A处理最低,仅为24.10%, D处理最高,达49.80%,其他处理也在40%以上. 显著性检验, A显著低于D,但与B和C差异不显著. 产孢数量以A、D最低,分别为14粒和24粒, B和C产孢量明显多,均接近40粒. 缺少伴生菌的A处理在茎叶鲜重和干

重、及产孢数量上与其它存在伴生菌的处理有一定的差异,但在根系鲜重和菌根率的指标上差异不明显. 经孢子表面消毒,但回接伴生菌的B处理,与未经孢子表面消毒的C处理没有大的差异(茎叶鲜重除外). 另外, D处理的3个重复均发现有大量的根瘤形成,而其它处理未发现.

2.2 伴生细菌的种群分析

通过DGGE技术,分析了各处理新形成孢子的伴生细菌种群差异. 从图1-I中的电泳图谱可知, A处理的孢子伴生细菌的种群与其它处理之间的差异最为明显. Shannon-wiener指数分析发现A处理的指数显著低于其它处理,见表3. 优势

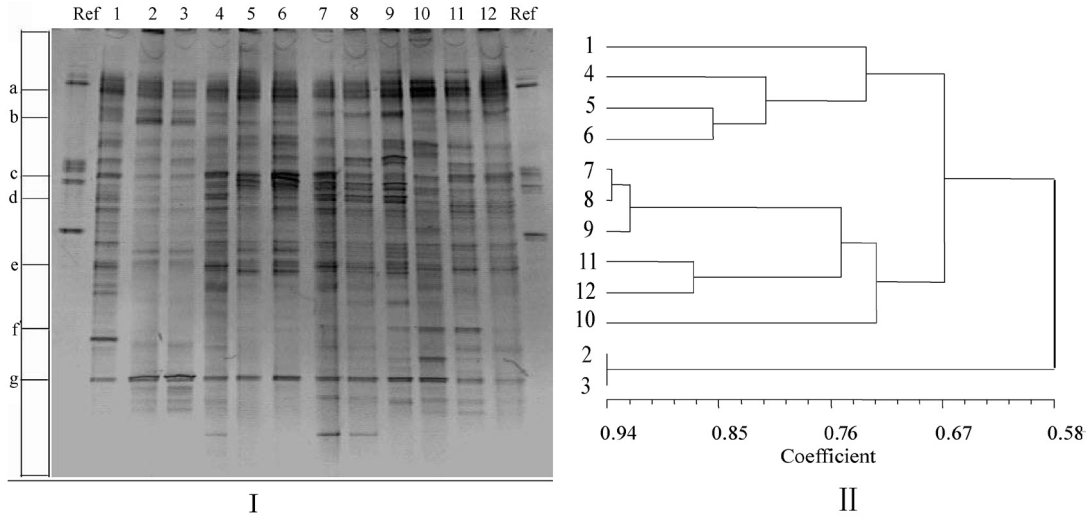


图1 不同处理条件下*G. margarita* 孢子伴生细菌种群的DGGE分析(I)与聚类分析(II)

Fig. 1 DGGE profile (I) and clustering analysis (II) of *G. margarita* spores-associated bacteria population under different treatments
1~3, a. 孢子经表面消毒; 4~6, b. 表面消毒的孢子接种伴生菌; 7~9, c. 孢子未经表面消毒; 10~12, d. 接种含孢子的土壤. Ref, 至上而下的条带分别为*P. fluorescence*、*E. coli*、*B. subtilis*、*R. solanacearum*和*A. rhizogens*
1~3, a, Surface sterilization; 4~6, b, Inoculated surface sterilized spores with the associated microbe; 7~9, c, No surface sterilization; 10~12, d, Inoculated soil containing spores; Ref, The bands up to down were *P. fluorescence*, *E. coli*, *B. subtilis*, *R. solanacearum* and *A. rhizogens*, respectively

菌群(主条带)分布也存在明显的差异。A处理(1~3泳道)的主条带集中于a、b及g水平线附近,其中1泳道有所不同,可能是孢子消毒的差异所致。B处理(4~6泳道)和C处理(7~9泳道)的主条带分布最为相似,主要处于a、c、d、e及g水平线附近。而D处理(10~12泳道)的主带处于a、c、e、f及g水平线附近。其次,对各泳道图谱进行UPMAG的聚类分析(图1-II),发现A处理(2、3泳道)与其它处理处于不同的分枝,但其1泳道与B处理具有更好相似性。其他处理之间的差异则相对较小。同时,各处理之间有一定的共性,如在a和g水平线附近都有明显的主带,在b、c及e水平线附近都分布有明显的条带。

表3 Shannon-wiener指数
Table 3 Shannon-wiener index of diversity

Treatment	Shannon-wiener index
A	2.5290±0.0558a
B	2.7799±0.1373b
C	2.8240±0.0791b
D	2.7492±0.0212b

3 讨论

AMF孢子、菌丝的周围存在复杂的伴生菌群,这些菌群对其真菌宿主具有的效应已引起研究者们的关注^[19, 20]。以往,人们多以单个伴生细菌菌株为对象,研究其对AMF或植物的效应^[21, 22]。AMF对其伴生菌群具有的依赖性还并不清楚。本文以表面消毒的方法去除*G. margarita*孢子的表面伴生菌,对比研究了*G. margarita*孢子在缺少伴生菌的情况下,其自身的生命活动及宿主植物的生长变化。结果表明,缺少伴生菌的A处理,孢子萌发后对宿主的侵染率有所降低,新形成孢子的数量显著减少;另外,新形成的孢子个体偏小,孢子壁的外观形态也发生了一定的变化(数据未发表);植物的生长情况也发生变化,主要表现为茎叶生长量上明显降低。经过同样的孢子表面消毒,但回接了伴生菌群的B处理,其各项生物指标与未经孢子表面消毒的C处理十分接近。显然,伴生菌群对其真菌宿主和植物的生命活动起到积极的影响,AMF与伴生菌群存在紧密的互作。另外,试验中接种土壤的D处理,其产孢数量较低,这可能与形成大量的根瘤有关。已有文献报道AMF与根瘤菌之间存在相互作用^[23]。

由于AMF孢子伴生菌的主要类群为细菌类群(包括放线菌)^[6]。本文以细菌通用引物扩增获得伴生细菌的16S rDNA V3区,并成功进行了DGGE分析。由于*G. margarita*孢子含的胞质内生细菌“*Candidatus Glomeribacter gigasporarum*”数量巨大(10^5 CFU/孢子)^[24, 25],以致会严重影响到伴生细菌菌群的DGGE分析图谱(数据未发表)。本文以孢子表面细菌群为研究对象,因此,在DNA模板的制备过程中,严格控制各操作步骤对孢子样品的损伤,避免孢子破裂。试验结果显示,排除伴生菌群的A处理的DGGE图谱与其它处理之间存在明显的差别。主要表现为,多样性指数显著降低,优势菌群也发生明显变化。A处理仍然存在一定的条带丰富度,且其条带存在的位置与其它处理之间有一定的共性,如DGGE图谱中g水平线上,各处理均存在明显的亮带。分析认为,试验中的消毒处理过程并不能彻底去除*G. margarita*孢子伴生细菌。

有些微生物对消毒剂具有高的抗性,难以去除。而且,有一些细菌或类似物包埋于孢子壁中或存在于细胞质中,消毒剂难以对其作用^[26]。同时也存在培养过程中某些相似的细菌类群重新定殖到孢子上的可能性。因此,本研究所涉及仅是部分伴生菌群,对于更全面的菌群分析,需要借助新的技术途径。

在无杂菌的条件下,不同的AMF的生命活力表现出不同变化。例如,发根共培养试验中,*Glomus intraradice*容易与胡萝卜发根形成共生关系,并产生新的孢子;有些菌种如*G. margarita*、*Gigaspora rosea*虽也能侵染发根材料,但产孢困难、数量少;有的如*Glomus leptotichum*则萌发困难。伴生菌群是否是其中一个关键的影响因素,值得研究。近年来,AMF伴生菌的研究倍受关注,人们已对一些AMF菌株的伴生菌群有了分类学上的认识,且针对部分伴生菌株的生态功能开展了有益的研究,但相关的基础信息积累仍显不够。从种群生态学方面认识*G. margarita*伴生菌群,明确其组成特征和规律,成为下一步的研究方向。

References

1 Schüßler A, Schwarzott D, Walker C. A new fungal phylum, the Glomeromycota: Phylogeny and evolution. *Mycol Res*, 2001, **105**: 1413~1421

2 Liao JP (廖继佩), Lin XG (林先贵), Cao ZH (曹志洪), Luo YM (骆永明), Wu LH (吴龙华). Effect of interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and heavy metals on microbial populations and phosphatase activities in the maize rhizosphere. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2002, **8**: 408~413

3 Koide RT, Mosse B. A history of research on arbuscular mycorrhiza. *Mycorrhiza*, 2004, **14**: 145~163

4 Artursson V, Finlay RD, Jansson JK. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. *Environ Microbiol*, 2006, **8**: 1~10

5 Long LK (龙良鲲), Yao Q (姚青), Ai YC (艾云灿), Zhu HH (朱红惠). Advance in researches on bacteria associated with arbuscular mycorrhizal fung. *Acta Ecol Sin* (生态学报), 2007, **27**: 5345~5351

6 Ames RN, Mihara KL, Bayne HG. Chitin-decomposing actinomycetes associated with a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus from a calcareous soil. *New Phytol*, 1989, **111**: 67~71

7 Hijiri M, Redecker D, Petetot J-C, Voigt K, Wöstemyer J, Sanders IR. Identification and isolation of two ascomycete fungi from spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Scutellospora castanea*. *Appl Environ Microb*, 2002, **68**: 4567~4573

8 Lee PJ, Koske RE. *Gigaspora gigantea*-parasitism of spores by fungi and actinomycetes. *Mycol Res*, 1994, **98**: 458~466

9 Maia LC, Kimbrough JW. Ultrastructural studies of spores and hypha of a *Glomus* species. *Int J Plant Sci*, 1998, **159**: 581~589

10 Filippi C, Bagnoli G, Citernesi AS, Giovannetti M. Ultrastructural spatial distribution of bacteria associated with sporocarps of *Glomus mosseae*. *Symbiosis*, 1998, **24**: 1~12

11 Mayo K, Davis RE, Motta J. Stimulation of germination of spores of *Glomus versiforme* by spore-associated bacteria. *Mycologia*, 1986, **78**: 426~431

- 12 Hildebrandt U, Janetta K, Bethe H. Towards growth of arbuscular mycorrhizal fungi independent of a plant host. *Appl Environ Microb*, 2002, **68**: 1919~1924
- 13 Barea JM, Andrade G, Bianciotto VV, Dowling D, Lohrke S, Bonfante P, O'Gara F, Azcon-Aguilar C. Impact on arbuscular mycorrhiza formation of pseudomonas strains used as inoculants for biocontrol of soil-borne fungal plant pathogens. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64**: 2304~2307
- 14 Hildebrandt U, Ouziad F, Marner FJ, Bothe H. The bacterium *Paenibacillus validus* stimulates growth of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* up to the formation of fertile spores. *FEMS Microbiol lett*, 2006, **254**: 258~267
- 15 Mamatha G, Bagyaraj DJ, Jaganath S. Inoculation of field-established mulberry and papaya with arbuscular mycorrhizal fungi and a mycorrhiza helper bacterium. *Mycorrhiza*, 2002, **12**: 313~316
- 16 刘润进, 李晓林. 丛枝菌根及其应用. 北京: 科学出版社, 2000. 1~198
- 17 Dong CJ (董昌金), Zhen SX (郑世学), Zhao B (赵斌). The study for surface-sterilization and germination of *Glomus* spores. *Mycosystema* (菌物系统), 2003, **22**: 410~416
- 18 Giovannetti M, Mosse B. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol*, 1980, **84**: 489~500
- 19 Bianciotto V, Bonfante P. Arbuscular mycorrhizal fungi: A specialized niche for rhizospheric and endocellular bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2002, **81**: 365~371
- 20 Johansson JF, Paul LR, Finlay RD. Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. *FEMS Microbiol Ecol*, 2004, **48**: 1~13
- 21 Budi SW, Tuinen DV, Marlinotti G, Gianinazzi S. Isolation from the *Sorghum bicolor* mycorrhizosphere of a bacterium compatible with arbuscular mycorrhiza development and antagonistic towards soilborne fungal pathogens. *Appl Environ Microb*, 1999, **65**: 5148~5150
- 22 Xavier LJC, Germida JJ. Bacteria associated with *Glomus clarum* spores influence mycorrhizal activity. *Soil Biol Biochem*, 2003, **35**: 471~478
- 23 Amora-Lazcano E, Vázquez MM, Azcón R. Response of nitrogen-transforming microorganisms to arbuscular mycorrhizal fungi. *Biol Fertil Soils*, 1998, **27**: 65~70
- 24 Bianciotto V, Bandi C, Minerdi D, Sironi M, Tichy HV, Bonfante P. An obligately endosymbiotic mycorrhizal fungus itself harbors obligately intracellular bacteria. *Appl Environ Microb*, 1996, **62**: 3005~3010
- 25 Bianciotto V, Lumini E, Bonfante P, Vandamme P. '*Candidatus Glomeribacter gigasporarum*' gen. nov., sp. nov., an endosymbiont of arbuscular mycorrhizal fungi. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2003, **53**: 121~124
- 26 Walley FL, Germida JJ. Failure to decontaminate *Glomus clarum* NT4 spores is due to spore wall-associated bacteria. *Mycorrhiza*, 1996, **6**: 43~49