

POLEDENODOBNE MIGRACIJE MIKORIZNIH RASTLIN IN GLIVNIH PARTNERJEV v SIMBIOZI: PRIMER RODU *TUBER*

post-glacial migrations of mycorrhizal plants and ectomycorrhizal partners: an example of the genus *Tuber*

Povzetek: Rod *Tuber* je ektomikorizni rod gliv, razširjen v večjem delu J in JV Evrope. V raziskavi smo s filogeografskim pristopom ugotavljali, ali izbrane vrste iz rodu izkazujejo geografsko diferenciranost na nivoju genov rRNK. Iz razpoložljivih nukleotidnih zaporedij, ki izvirajo iz večjega dela areala vrst rodu *Tuber*, smo za več vrst ugotovili razporejanje in ločevanje genotipov glede na položaj ledeniških zatočišč v zadnji ledeni dobi in glede na znane poledenodobne migracijske poti haplotipov drevesnih partnerjev (hrastov). Območje Slovenije se je izkazalo za območje mešanja več genotipov variabilnih vrst. Prisotnost več genotipov ene vrste gliv nakazuje možnost križanja oziroma mešanja dveh poledenodobnih migracijskih poti, kar daje območju dodatno vrednost s stališča biotske raznovrstnosti. Poznavanje genetske pestrosti in funkcionalne povezave glivnih in rastlinskih genotipov lahko nudi usmeritve pri gospodarjenju z gozdovi, pridobivanju gozdnih proizvodov in morebitnem načrtnem gojenju drevesnih in glivnih partnerjev v simbiozi z namenom pridelave gliv.

Ključne besede: biotska raznovrstnost, ektomikoriza, filogeografija gliv, hipogeje glive, južna in jugovzhodna Evropa, molekularna filogenija

Abstract: The genus *Tuber* is an important ectomycorrhizal genus in Europe, forming symbiosis with a wide range of woody plants. In our research we aimed to apply phylogeography approach to analyse the geographical differentiation of *Tuber* species based on rDNA analysis. Available nucleotide sequences originating from S and SE Europe showed genetic differentiation and distribution in several *Tuber* species. The observed phylogenetic clades corresponded to the last glacial refugia pools and post-glacial migration paths of symbiotic plants (oaks). Based on the high number of the analysed *Tuber* ribotypes found in Slovenia, this area appears to be the encountering zone of two postglacial migration routes and an important biodiversity hot-spot. The knowledge on genetic diversity and geographic distribution of genotypes can contribute to the biodiversity and functional correlations of plant and fungal partners in ectomycorrhiza and subsequently to the forest management planning and potential cultivation of fungi.

Keywords: Biodiversity, Ectomycorrhiza, Phylogeography of fungi, Hypogeous fungi, South and Southeast Europe, Molecular phylogeny

UVOD

V kvartarju so se v času med in po poledenitvah številne drevesne vrste odzivale na spremembe v okolju z migracijami (Wilkinson, 1998). V hladnejših obdobjih, predvsem v zadnjem dlje trajajočem hladnem obdobju pred približno

11-10 tisoč leti je bil precejšnji del Evrope pokrit z ledom, preostale dele so preraščale polpuščavske stepe (Adams in Faure, 1997). Gozdna vegetacija, vključno z ektomikoriznimi partnerji, je bila omejena le na posamezne gorske verige polotokov južne in jugovzhodne Evrope (Adams in Faure, 1997; Randi, 2007). Z ogrevanjem ozračja in umikanjem ledenega pokrova se je do pred ca. 5000 leti oblikovala klima, razporeditev vegetacije (tudi gozdov) in raz-

Gozdarski inštitut Slovenije, Večna pot 2, SI-1000 Ljubljana,
e-pošta: tine.grebenc@gozdis.si

poreditev genotipov znotraj vrst, kot jo poznamo danes (Grove in Rackham, 2001).

Rod *Tuber* predstavlja 86 različnih vrst gliv iz skupine askomicet (Tuberaceae, Ascomycotina, Fungi). Rod je splošno razširjen in številčen predvsem v zmernem in mediteranskem pasu vseh kontinentov (Kirk in sod., 2008). Posamezne vrste so v glavnem omejene na en kontinent, oziroma se morfološko podobne vrste med kontinenti na molekularni ravni jasno ločijo na vrstnem nivoju (Wang in sod., 2006, Grebenc in sod., v pripravi). Znotraj družine Tuberaceae je rod *Tuber* najboljšežnejši ektomikorizni rod (Agerer, 1987-2006), ki tvori izključno podzemne (hipogeje) trosnjake (Paolocci in sod., 2004; Læssøe in Hansen, 2007). Podzemna rast razmnoževalnih struktur je povezana s specifičnim načinom razširjanja, saj vse vrste iz rodu *Tuber* ob zorenju trosnjakov proizvajajo značilne hlapne (volatilne) substance, ki privlačijo raznašalce spor. Spore prenašajo v večji meri insekti ter mali sesalci, ostali načini prenosa (na primer z vodo, prenašanjem zemlje ipd.) so redkejši (Frank in sod., 2006). Način prenosa spor tako poteka na relativno kratkih razdaljah, podobno kot pri arbuskularno mikoriznih glivah (Wilkinson, 1998), in s tem v tesnejši povezavi z migracijami drevesnih partnerjev v ektomikorizi.

Filogeografija je veda, ki razlaga geografsko razporeditev osebkov glede na filogenetsko raznolikost populacij znotraj vrste na osnovi genealogije izbranih genov (Avice, 2000). V literaturi ni znanih veliko primerov filogeografije gliv. Eden od pomembnih razlogov je ta, da zaradi velikega pomena razširjanja na velike razdalje glive (predvsem spore gliv) kažejo široko razširjenost. To velja predvsem za nekatere saprobne vrste (Moncalvo in Buchanan, 2008). Značilne geografske vzorce razporejanja posameznih filogenetskih skupin višjih gliv so do sedaj ugotavljali za ektomikorizne gobane (Boletales) na področju Pacifika (Halling in sod., 2008) in za skupino nemikoriznih (saprobnih) podzemnih bazidiomicet Hysterangiales (Hosaka in sod., 2008). Podatkov o filogeografiji ektomikoriznih vrst, ki tvorijo izključno podzemne trosnjake (npr. rod *Tuber*), kljub velikemu pomenu v gozdnih ekosistemih, še ni.

Namen naše študije je prikazati načine ugotavljanja znotraj vrstne pestrosti na ravni DNK in razložiti opaženo pestrost s filogeografskim pristopom. Za potrditev hipoteze o somigracijah partnerjev v simbiozi kot modela izbora in somigracij najprimernejših genotipov obeh partnerjev glede dogajanja v preteklosti in glede na današnje ekološke razmere, smo analizirali izbrana nukleotidna zaporedja za rod *Tuber* in predhodno objavljene migracijske poti potencialnih drevesnih partnerjev v ektomikorizi.

METODOLOGIJA

IZBOR PODATKOV IN ANALIZE

Za filogeografske analize lahko uporabljamo katerokoli informativno regijo genoma vzorca, ki je jasno določen do vrste in zanj obstajajo zadostni podatki o nahajališču. Za glive iz rodu *Tuber* je v javno dostopnih bazah nukleotidnih zaporedij deponirano zadovoljivo število nukleotidnih zaporedij, pretežno regije rDNK, ki pa so v večji meri brez podatkov o izvoru, predvsem zaradi komercialnih interesov. Za zagotovitev zadostne pokritosti celotnega areala analiziranih vrst s kvalitetnimi in informativnimi spremljajočimi podatki za območje J in JV Evrope, smo poleg zaporedij, deponiranih v javno dostopnih bazah podatkov NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/) in UNITE (<http://unite.ut.ee/>), v analize vključili tudi nukleotidna zaporedja lastnih predhodnih študij (Marjanović in sod., 2009; Grebenc in sod., v pripravi).

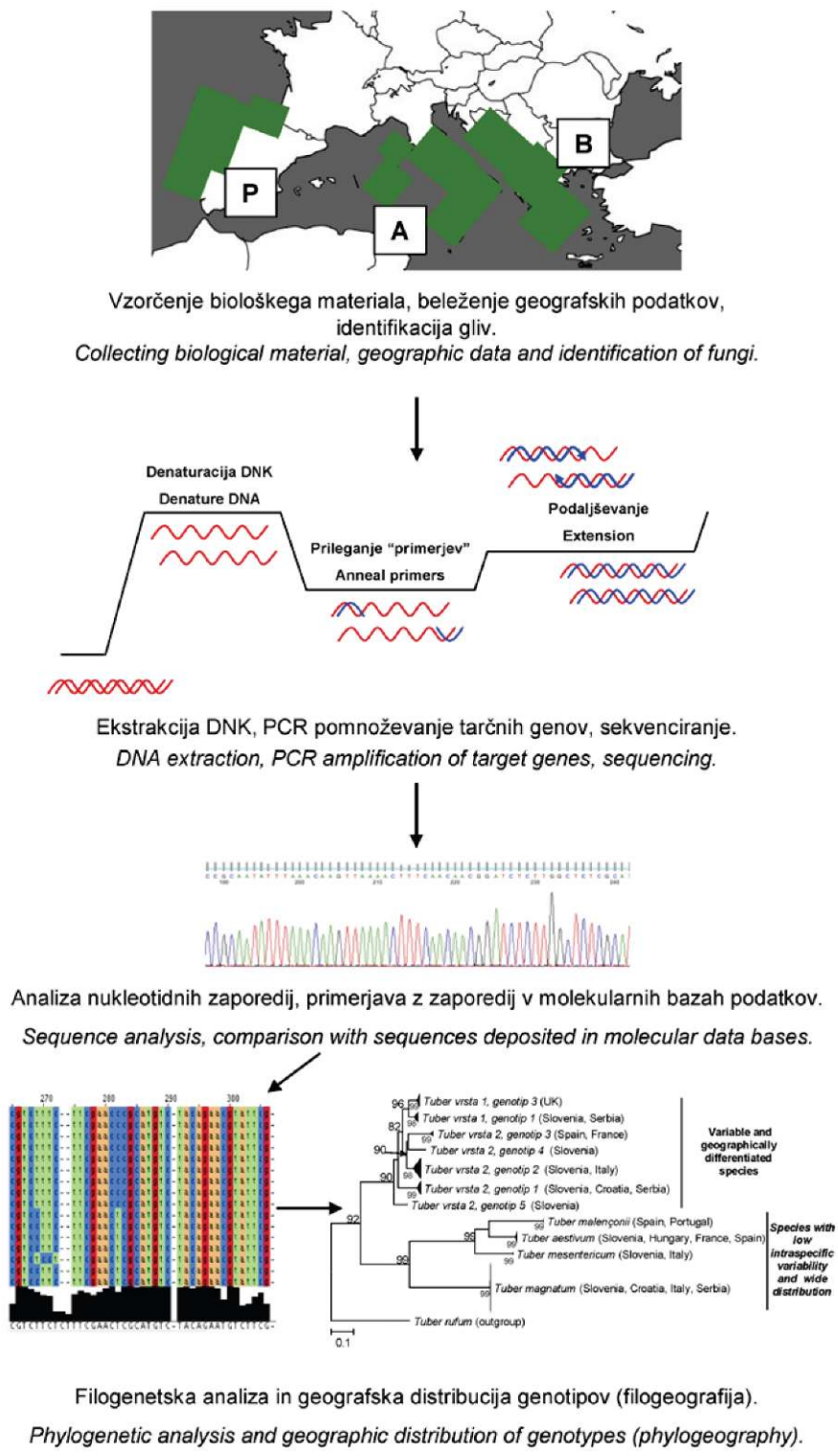
FILOGENETSKA ANALIZA GLIVNIH PARTNERJEV

V filogenetsko analizo in kasneje filogeografsko opredelitev smo vključili 92 različnih nukleotidnih zaporedij iz rodu *Tuber*, tako da smo zajeli vrste, ki so izkazovale znotraj vrstno variabilnost v predhodnih študijah, ter izbrane nevariabilne oziroma stabilne vrste. Vsi vzorci so bili na osnovi morfoloških znakov določeni do vrste. Za ugotavljanje filogenetskih odnosov lahko uporabimo kateregakoli od številnih orodij in matematičnih pristopov izdelave filogenetskega drevesa, ki za izbrana nukleotidna zaporedja omogočajo optimalne rezultate.

Filogenetsko analizo rodu *Tuber* smo izvedli na nukleotidnih zaporedjih, poravnanih v spletni verziji programa MAFFT (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/index.html>). Poravnavo zaporedij smo naredili s funkcijo za vzporejanje nukleotidnih zaporedij »E-INS-I« (Kalloh in sod., 2005). Filogenetski položaj smo določili s programom PHYML c2.4.5 in izdelali ML (maximum likelihood) filogenetsko drevo. Filogenetsko drevo ML za izbrana nukleotidna zaporedja smo izdelali z uporabo modela substitucij GTR - Generalised Time Reversible model (Tavaré, 1986). Končno filogenetsko drevo smo oblikovali in uredili v programu MEGA 4.

GEOGRAFSKA PORAZDELITEV HAPLOTIPOV DREVESNIH PARTNERJEV IN SOVPADANJE S FILOGENETSKO PORAZDELITVIJO GLIVNIH PARTNERJEV V EKTOMIKORIZI

Na osnovi razpoložljivih podatkov herbarijskega materiala za analizirane vzorce iz rodu *Tuber* (Grebenc in sod., v pripravi) se na rastiščih največkrat kot potencialni ektomikorizni partnerji pojavljajo hrasti (*Quercus* spp.) in beli



Slika 1: Shematski prikaz izhodnih podatkov in analiz v filogeografiji.
Figure 1: Data and analyses in the phylogeography approach.

gabri (*Carpinus* spp.). Poledeniške migracijske poti hrastov so jasno diferencirane glede na območja refugijev zadnje poledenitve in smo jih povzeli po Petit in sod. (2002) in Ferris in sod. (1998). Za razliko od hrastov je geografska razporeditev haplotipov belih gabrov (*Carpinus betulus* in *C. orientalis*) manj ugodna za pojasnjevanje dobljenih filogenetskih rezultatov, saj večji del vseh razpoložljivih vzorcev iz rodu *Tuber* izvira iz območja enega prevladujočega haplotipa obeh vrst. Poleg tega rod danes ni razširjen na Pirenejskem polotoku, kot enem od območij ledenodobnih zatočišč (Grivet in Petit, 2003).

REZULTATI IN DISKUSIJA

FILOGEOGRAFIJA - SHEMATSKI PREGLED METODE IN REZULTATI ANALIZ ZA ROD TUBER

Filogeografski pristop nam poleg povezovanja genetskih in geografskih podatkov omogoča testiranje številnih hipotez, vezanih na sorodstvene odnose, porazdelitev vrst in mehanizmov, ki vodijo speciacijo in posredno navezovanje na razlage vplivov geologije, klime itn., na biotsko raznovrstnost analizirane skupine (Hickerson in sod., 2010). Informacije in nukleotidna zaporedja smo analizirali z izbranim filogenetskim pristopom in izdelali filogenetsko drevo, ki prikazuje sorodstvene odnose v rodu in znotrajvrstno pestrost nekaterih morfološko stabilnih vrst (Slika 1).

Analizirane vrste izhajajo iz treh glavnih področij ledeniških refugijev (Apeninski, Balkanski in Pirenejski polotok) in poledeniških migracijskih poti v centralni in južni Evropi. Največjo filogenetsko diferenciacijo kaže vrsta *Tuber* sp. 1, znotraj katere na osnovi analiziranih nukleotidnih zaporedij obstaja pet različnih končnih grozdov, od katerih trije sovpadajo z ledeniški refugiji in poledeniškimi migracijami hrastov. Diferenciacija znotraj morfološke vrste *Tuber* sp. 2 je manj značilna, ločita se le dve skupini genotipov, prva omejena na Balkanski polotok in druga, ki sega od Slovenije preko večjega dela zahodne Evrope.

SOMIGRACIJE EKTOMIKORIZNIH GLIV IN DREVENIH PARTNERJEV

Migracijske poti rastlinskih vrst v začetku holocena, predvsem po zadnji ledeni dobi, so relativno dobro znane, tako na osnovi palinoloških raziskav, kot tudi iz značilne geografske razporeditve genotipov (haplotipov) analiziranih vrst (Adams in Faure, 1997; Randi, 2007; Ballian in sod., 2006). Za razliko od drevesnih partnerjev je manj znanega o pomenu in (so)migraciji glivnih partnerjev v ektomikorizi (Wilkinson, 1998). Dogodki, ki bi lahko pripeljali do diferenciacije gliv na genetskem nivoju med posameznimi refugiji in kasneje migracijskimi potmi, so:

- Umikanje termofilne in zmerne vegetacije z ektomi-

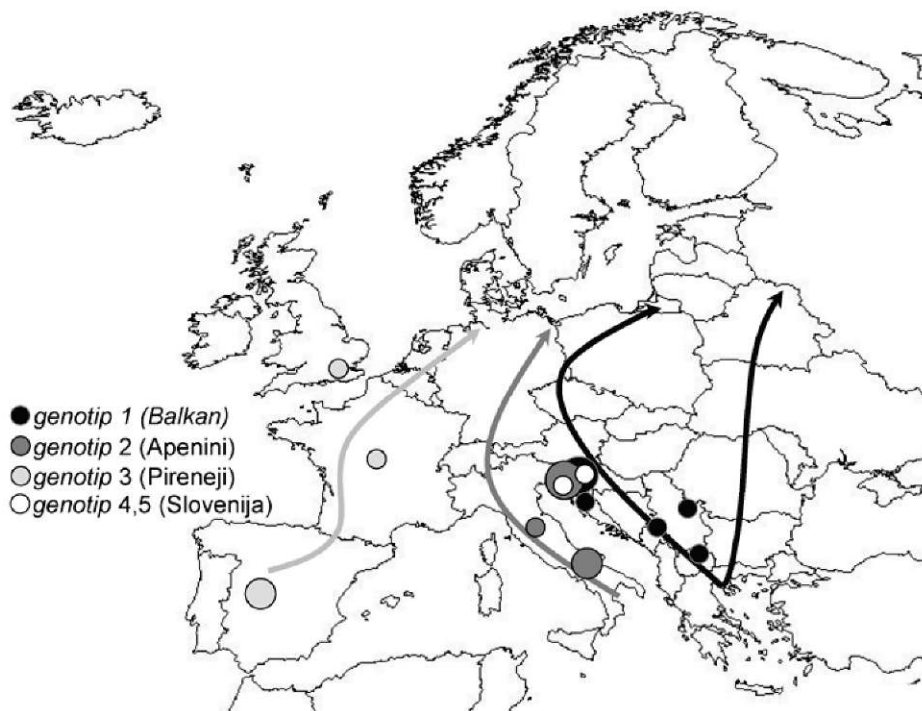
koriznimi glivami v južne predele Evrope, pretežno na hribovite dele polotokov, kjer se je ohranila v refugiju v času mlajšega drias, pred ca. 10.500 leti (Randi, 2007)

- Zmanjševanja pestrosti in števila drevesnih in predvidoma tudi ektomikoriznih partnerjev v času ledene dobe. Tako je v obdobju mlajšega drias (10.500-6.000 pr.n.š.) prišlo do t.i. ozkega grla (Adams in Faure, 1997), kar so dokazali pri ektomikorizni vrsti *Tuber melanosporum* (Murat in sod., 2004).
- Po umiku ledu konec mlajšega drias, in najkasneje do ca. 5.000 let pr.n.š., so se preživeli genotipi rastlin in njihovih partnerjev v ektomikorizi postopno začeli vračati v ponovno ugodna rastišča osrednjih delov Evrope, predvsem v smeri SV in SZ (za primer hrastov glej Petit in sod., 2002), dokler niso dosegli današnje razširjenosti (Dawson, 1996).
- Na območjih, kjer so se migracijske poti križale ali mešale, je prišlo do pojavljanja večjega števila genotipov iste vrste. Posledica mešanja je velika biološka raznovrstnost teh območij (Myers in Cowling, 1999). Področje Slovenije je tak primer vroče točke (Mršič in Gantar, 1997) za nekatere vrste ektomikoriznih gliv.

Rod *Tuber* je s stališča biotske raznovrstnosti na območju južne (Montecchi in Sarasini, 2000; Jeandroz in sod., 2008) in jugovzhodne Evrope (Halasz in sod., 2005; Piltaver in Ratoša, 2006; Marjanović in sod., 2009) dobro poznan in v zadnjem desetletju zadovoljivo vzorčen, filogeografsko pa je bila do sedaj opredeljena le vrsta *Tuber melanosporum* (Murat in sod., 2004).

Filogenetska študija je podprla predhodno opažene razlike genov rRNA znotraj posameznih vrst (Pomarico in sod., 2007; Jeandroz in sod., 2008; Marjanović in sod., 2009; Grebenc in sod., v pripravi). Korelacija z geografskim izvorom je pokazala, da se nekatere vrste iz posameznega filogenetskega grozda značilno pojavljajo vzdolž razporeditve enega od haplotipov hrastov (Slika 2). Rezultati potrjujejo predhodno opažena razporejanja genotipov za vrsto *Tuber melanosporum*, kjer so avtorji uspeli povezati migracijske poti haplotipov hrastov in genotipov gomoljike na področju Francije in severne Italije (Murat in sod., 2004).

Kot zanimivo območje mešanja dveh različnih filogenetskih tipov obeh variabilnih vrst se je pokazalo območje Slovenije, predvsem prehodni del med Dinarskim in Submediteranskim področjem. Dobljeni rezultati potrjujejo predvidene dogodke v preteklosti, vključno s poledeniškimi migracijami, saj velika molekularna pestrost (Grebenc in sod., v pripravi) nakazuje na možnost križanja oziroma mešanja dveh migracijskih poti na tem področju. To daje omenjenemu območju dodatno vrednost s stališča biotske raznovrstnosti. Poznavanje genetske pestrosti in funkcionalne povezave glivnih in rastlinskih genotipov sta nujna tudi za uspešno obnavljanje gozda, usmerje-



Slika 2: Geografska distribucija genotipov variabilnih vrst iz rodu *Tuber*, glede na poledeniške migracijske poti hrastov (povzeto po Petit in sod., 2002). Krogi predstavljajo genotipe in področje vzorčenja trosnjakov.
Figure 2: Geographic distribution of genotypes from the variable tuber species in regard to the postglacial migration of oak haplotypes (adapted from petit et al., 2002). Dots represent genotype and the area of ascocarp sampling.

no sajenje, dolgoročno stabilnost gozdnega ekosistema in končno tudi kot usmeritev pri morebitnem načrtnem gojenju drevesnih in glivnih partnerjev v simbiozi z namenom pridelave gliv.

ZAHVALE

Večino uporabljenih sekvenc smo povzeli po člankih Marjanovič in sod., 2009 in Grebenc in sod., (v pripravi). Vsem soavtorjem se najlepše zahvaljujemo za možnost uporabe podatkov. Analizo in pripravo publikacije so sofinancirali projekti EUREKA EI3835 EUROAGRI- CULTUBER "Improvement of truffle cultivation via novel quality control, soil analysis and inoculation methods", SYNTHESYS ESTAF-1729, CRP »Konkurenčnost Slovenije 2006-2013« V4-0492 (ARRS in MKGP) in Raziskovalni program P04-0107 »Gozdna biologija, ekologija, tehnologija« v okviru ARRS. Andreju Verliču se zahvaljujemo za tehnično pomoč pri urejanju besedila.

LITERATURA

1. Adams J.M., Faure H. (1997). QEN members. Review and Atlas of Palaeovegetation: Preliminary land ecosystem maps of the world since the Last Glacial Maximum (1997) Oak Ridge National Laboratory, TN, USA. <http://www.esd.ornl.gov/projects/qen/adams1.html> (17. 3. 2010)
2. Agerer R. (1987-2006) Colour Atlas of Ectomycorrhizae. 13th ed. Einhorn-Verlag Schwabisch Gmund, München, (loč. pag.)
3. Avise J.G. (2000) Phylogeography: the history and formation of species. Harvard University Press, Cambridge, USA, 447
4. Ballian D., Grebenc T., Božič G., Melnik v., Wraber T., Kraigher H. (2006) History, genetic differentiation and conservation strategies for disjunct populations of Sibiraea species from Southeastern Europe and Asia. Conservation Genetics, 7: 895-907
5. Dawson A.G. (1996) Ice age Earth: late Quaternary geology and climate. Routledge, New York, 293
6. Ferris C., King R.A., Väinölä R., Hewitt G.M. (1998) Chloroplast DNA recognizes three refugial sources of European oaks and suggests independent eastern and western immigration to Finland. Heredity, 80: 584-593
7. Frank J.L., Barry S., Southworth D. (2006) Mammal mycophagy and dispersal of mycorrhizal inoculum in Oregon White oak woodlands. Northwest Science, 80, 4: 264-273
8. Grivet D., Petit R.J. (2003) Chloroplast DNA phylogeography of the hornbeam in Europe: Evidence for a bottleneck at the outset of postglacial colonization. Conservation Genetics, 4: 47-56
9. Grove A.T., Rackham O. (2001) The nature of Mediterranean Europe: An ecological history. Yale University Press, New Haven, CT, 384
10. Halasz K., Bratek Z., Szego D., Rudnoy S., Racz I., Laszity D.,

- Trappe J.M. (2005)** Tests of species concepts of the small, white, European group of *Tuber* spp. based on morphology and rDNA ITS sequences with special reference to *Tuber rapaeodorum*. *Mycological Progress*, 4: 281-290
11. **Hailing R.E., Osmundson T.W., Neves M.-A. (2008)** Pacific boletales: Implication for biogeographic relationship. *Mycological Research*, 112, 4: 437-447
 12. **Hickerson M.J., Carstens B.C., Cevander-Bares J., Crandall K.A., Graham C.H., Johnson J.B., Rissler L., Victoriano P.F., Yoder A.D. (2010)** Phylogeography's past, present and future: 10 years after *Avis*, 2000. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 54, 1: 281-301
 13. **Hosaka K., Castellano, M.A., Spatafora, J.W. (2008)** Biogeography of Hysterangiales (Phallomycetidae, Basidiomycota). *Mycological Research*, 112, 4: 448-462
 14. **jeandroz S., Murat C., Wang Y., Bonfante P., le Tacon F. (2008)** Molecular phylogeny and historical biogeography of the genus *Tuber*, the »true truffles«. *Journal of Biogeography*, 35, 5: 815-829
 15. **Katoh K., Kuma K., Toh H., Miyata T. (2005)** MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Research*, 33, 2: 511-518
 16. **Kirk P.M., Cannon P.F., Minter D.W., Stalpers J.A. (2008)** *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi*, 10th edition. CABI Publishing, Surrey, UK., 708
 17. **Læssle T., Hansen K. (2007)** Truffle trouble: what happened to the Tuberales? *Mycological Research*, 111: 1075-1099
 18. **Marjanović Ž., Grebene T., Marković M., Glišić A., Milenković, M. (2009)** Ecological specificity and molecular diversity of truffles (genus *Tuber*) originating from mid-west of the Balkan Peninsula. *Sydowia* (in print)
 19. **Moncalvo J.-M., Buchanan P.K. (2008)** Molecular evidence for long distance dispersal across the Southern Hemisphere in the *Ganoderma applanatum-australe* species complex (Basidiomycota). *Mycological Research*, 112, 4: 425-436
 20. **Montecchi A., Sarasini M. (2000)** *Fungi ipogei d'Europa*. A.M.B. Fondazione Centro Studi Micologici, Vicenza, Italy, 714
 21. **Mršič N., Gantar P. (1997)** Biotic diversity in Slovenia : Slovenia - the »hot spot« of Europe. Ministry for Environment and Spatial Planning, Ljubljana, 129
 22. **Murat C., Diez J., Luis P., Delaruelle C., Dupre C., Chevalier G., Bonfante P., Martin F. (2004)** Polymorphism at the ribosomal DNA ITS and its relation to postglacial re-colonisation routes of the Perigord truffle *Tuber melanosporum*. *New Phytologist*, 164: 401-411
 23. **Myers N., Cowling R.M. (1999)** Mediterranean Basin. V: Hotspots: Earth's Biologically Richest and Most Endangered Terrestrial Ecoregions. Mittermeier R.A. (ur.), Meyers N. (ur.), Robles Gil P. (ur.), Mittermeier C.G. (ur.), CEMEX, Mexico: 254-267
 24. **Paolocci F., Rubini A., Riccioni C., Topini F., Arcioni S. (2004)** *Tuber aestivum* and *Tuber uncinatum*: two morphotypes of two species? *FEMS Microbiology Letters*, 235: 109-115
 25. **Petit R.J., Brewer S., Bordacs S., Burg K., Cheddadi R., Coart E., Cottrell J., Csaiik U.M., van Dam B.C., Deans J.D., Fineschi S., Finkeldey R., Glaz I., Goicoechea P.G., Jensen J.S., König A.O., Lowe A.J., Madsen S.F., Matyas G., Munro R.C., Popescu F., Slade D., Tabbener H., de Vries S.M.G., Ziegenhagen B., de Beaulieu J.-L., Kremer A. (2002)** Identification of refugia and post-glacial colonization routes of European white oaks based on chloroplast DNA and fossil pollen evidence. *Forest Ecology and Management*, 156: 49-74
 26. **Piltaver A., Ratoša I. (2006)** Prispevek k poznavanju podzemnih gliv v Sloveniji. *Gozdarski Vestnik*, 64, 7/8: 303-312, 329-330
 27. **Pomarico M., Figliuolo G., Rana G.L. (2007)** *Tuber* spp. biodiversity in one of the southernmost European distribution areas. *Biodivers. Conserv.*, 16: 3447-3461
 28. **Randi E. (2007)** Phylogeography of South European mammals. V: *Phylogeography of Southern European refugia*. Weiss S. (ur.), Ferrand N. (ur.), Springer, 101-126
 29. **Tavaré S. (1986)** Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA Sequences. *American Mathematical Society: Lectures on Mathematics in the Life Sciences*, 17: 57-86
 30. **Wang Y., Tanm Z.M., Zhang D.C., Murat C., jeandroz S., Le Tacon F. (2006)** Phylogenetic relationships between *Tuber pseudoexcavatum*, a Chinese truffle and other *Tuber* species based on parsimony and distance analysis of four different gene sequences. *FEMS Microbiology Letters*, 259: 269-281
 31. **Wilkinson D.M. (1998)** Mycorrhizal fungi and Quaternary plant migrations. *Global Ecology and Biogeography Letters*, 7: 137-140