

Dorota HILSZCZAŃSKA

Instytut Badawczy Leśnictwa  
Zakład Fitopatologii Leśnej  
Sękocin Las, 05-090 Raszyn  
e-mail: D.Hilszczanska@ibles.waw.pl

## WPŁYW DESZCZOWANIA NA KOLONIZACJĘ MIKORYZOWĄ I ZAWARTOŚĆ ERGOSTEROLU W KORZENIACH SIEWEK SOSNY ZWYCZAJNEJ (*PINUS SYLVESTRIS* L.)

INFLUENCE OF WATERING ON MYCORRHIZAL COLONIZATION  
AND ERGOSTEROL CONCENTRATION IN FINE ROOTS  
OF SCOTS PINE (*PINUS SYLVESTRIS* L.) SEEDLINGS

**Abstract.** *The study describes the effect of soil moisture availability on mycorrhizal development and mycorrhizas vitality on Scots pine seedlings in bare root nursery. Seedlings grown under nursery conditions on sandy soil, were subjected to different watering regimes: 1– dry regime (non-watered), 2 – wet regime. Higher percentage of ectomycorrhizal short roots that had better vitality possessed seedlings from wet regime. Irrespective of treatment the same fungi were engaged in mycorrhizal colonization in both treatments with the exception of ectomycorrhizas of *Cenococcum geophilum* that were found only on seedlings from dry treatment. The content of ergosterol in seedling roots was the index allowing to determine the vitality of mycorrhizas.*

**Key words:** *Scots pine, mycorrhizas, watering, ergosterol.*

## 1. WSTĘP

Sosna zwyczajna (*Pinus sylvestris* L.), podobnie jak inne gatunki iglaste, jest drzewem obligatoryjnie mikoryzowym. Oznacza to, że pozostaje w stałym mutualistycznym związku z określonymi gatunkami grzybów kolonizującymi najdrobniejsze korzenie (SMITH i READ 1997). Rola ektomikoryzy sprowadza się przede wszystkim do usprawnienia pobierania substancji pokarmowych i wody z gleby oraz stymulowania rozwoju korzeni. Na rozwój mikoryz mają wpływ czynniki środowiska edaficzne i klimatyczne, takie jak odczyn, dostępność azotu i fosforu, wilgotność i temperatura. Dotychczasowa wiedza wskazuje, że wilgotność podłoża może wywierać wpływ na kształt symbiozy mikoryzowej. Niektóre gatunki grzybów mikoryzowych z rodzajów *Laccaria*, *Hebeloma*, *Thelephora*, (szczególnie często tworzących mikoryzy u siewek) preferują wilgotne stanowiska (UNES-TAM i SUN 1995). Ten fakt może wyjaśniać, dlaczego gatunki te są często spotykane w szkółkach leśnych, które poddawane są intensywnemu deszczowaniu.

Z kolei grzybnia *Cenococcum geophilum* preferuje gleby o niskim uwilgotnieniu, zwiększając odporność roślin na stres wodny (WORLEY i HACSKALYO 1959; PIGGOT 1982; COLEMAN i in. 1989). Zdolność grzybów mikoryzowych do pozytywnego oddziaływania na bilans wodny rośliny jest szczególnie ważna w sytuacji, gdy sadzonki przeznaczone są do zalesiania terenów z niedoborem wody. CROMER już w 1935 r. zauważył, że u *Pinus radiata* mikoryzy mogą zwiększyć odporność na suszę dzięki ochronie korzeni przed wysychaniem i zwiększonemu pobieraniu wody z niższych poziomów gleby przez strzępki grzybni. DIXON i in. (1983) badając bilans wodny u siewek *Quercus velutina* z odkrytym i zakrytym systemem korzeniowym odnotował, że siewki inokulowane grzybem *Pisolithus tinctorius*, które przesadzono na powierzchnię otwartą, miały znacznie wyższy potencjał wodny pędu niż siewki nieinokulowane.

Z uwagi na duże zróżnicowanie grzybów mikoryzowych odnośnie preferencji wilgotnościowych podłoża i rośliny gospodarza podjęto badania w otwartej szkółce leśnej w celu określenia wpływu deszczowania na zmiany ilościowe i jakościowe ektomikoryz siewek sosny zwyczajnej *Pinus sylvestris* L.

Ilościowe badania ektomikoryz można wykonywać według metody tradycyjnej, polegającej na liczeniu wierzchołków korzeni mikoryzowych i autotroficznych, przypadających na cały system korzeniowy, jego część lub na jednostkę gleby. Alternatywą dla tej metody są testy chemiczne, które pozwalają określić żywotność mikoryz. Metody te wykorzystują analizę substancji specyficznych dla grzybów, którymi są niektóre węglowodany (np. chityna i trehaloza) czy związki o charakterze lipidowym, np. ergosterol. Ergosterol jest związkiem lipidowym o budowie trójterpenu, który jest głównym składnikiem błon komórkowych u grzybów (WEETE, 1974), silnie związanym z cytoplazmą (NYLUND i WALLANDER 1994). SALMONOWICZ i NYLUND (1988) stwierdzili, że zawartość ergosterolu jest różna w grzybni różnych gatunków grzybów ektomikoryzowych. W związku z tym, me-

tość oznaczania ergosterolu zaleca się w doświadczeniach kontrolowanych, w których określa się stopień kolonizacji mikoryzowej siewek z jednym określonym symbiontem grzybowym. Badania prowadzone przez WALLANDER i in. (1997) oraz MARKKOLA i in. (1996) wskazują jednak, że ta metoda może również służyć do porównywania intensywności kolonizacji mikoryzowej w warunkach polowych.

## 2. MATERIAŁ I METODY

Badania terenowe prowadzono na powierzchni otwartej szkółki leśnej Nadleśnictwa Garwolin, użytkowanej wiele lat, w której stwierdzono znaczne ograniczenie składu gatunkowego zbiorowisk grzybów glebowych. Podłoże stanowił piasek słabogliniasty. Poletka doświadczalne w szkółce leśnej założono w układzie losowym na dwóch powierzchniach: kontrolnej (nienawadnianej, rośliny korzystały jedynie z wody opadowej) i zabiegowej (nawadnianej). Nawadnianie wykonywano zgodnie z wytycznymi DGLP (1991), od maja do sierpnia 2000 r., według następującego schematu:

- w pierwszej fazie wzrostu, od wysiewu do masowych wschodów (początek maja) 2 mm brutto ( $2 \text{ l/m}^2$ ) codziennie,
- od masowych wschodów do 15 czerwca 5 mm brutto ( $5 \text{ l/m}^2$ ) co drugi dzień,
- po 15 czerwca do końca sierpnia około 6 mm netto ( $6 \text{ l/m}^2$ ).

Pomiary wilgotności i temperatury podłoża wykonywano w tym samym okresie, na głębokości 10 cm z zastosowaniem miernika reflektometrii czasowej TDR (Time-Domain Reflectometry) według metody MALICKIEGO (1996). Przyjęto dwa warianty zabiegowe:

- 1) deszczowanie, zgodnie z wytycznymi DGLP dotyczącymi nawadniania szkółek leśnych, traktowane jako „normalna” wilgotność (wariant zabiegowy),
- 2) zaniechanie deszczowania, traktowane jako „niedobór” wilgotności (wariant kontrolny).

W wariacie pierwszym opad naturalny wraz z nawadnianiem wynosił około 625 mm ( $625 \text{ l/m}^2$ ) w ciągu sezonu wegetacyjnego, a w wariacie drugim siewki korzystały tylko z wody opadowej, tj. około 355 mm ( $355 \text{ l/m}^2$ ).

Cechy morfologiczne mikoryz obserwowano pod mikroskopem stereoskopowym przy powiększeniu od 10 do 50 razy. Frekwencję (%) mikoryz obliczano według wzoru:

$$\frac{100 \times \text{liczba korzeni mikoryzowych}}{\text{ogólna liczba korzeni}}$$

W opisie identyfikacyjnym najczęściej występujących typów morfologicznych mikoryz na korzeniach siewek sosny były uwzględniane tylko dobrze rozwinięte mikoryzy. Typy mikoryz określano na podstawie barwy, budowy mufki grzybniowej i obecności sznurów grzybniowych (AGERER 1987, INGELBY 1990). Cechy morfologiczne mikoryz mogą być różne w zależności od podłoża czy rośliny – gospodarza, stąd przy opisie mikoryz u siewek sosny kierowano się przede wszystkim własnymi obserwacjami, podobnie jak to czynili CONN i DIGHTON (2000). Opis wyróżnianych mikoryz przedstawia tabela 1.

Do analiz pobierano losowo po 30 siewek z każdego wariantu. Następnie z uśrednionej próby wydzielono losowo po 10 siewek. Analizę przeprowadzano na 10 korzeniach pobranych losowo z 30 siewek dla każdej kwatery (wariantu). Korzenie krótkie cięto na małe fragmenty (ok. 1 cm), pobierając je z górnej, środkowej i dolnej części systemu korzeniowego (PARLADE i in. 1996).

Ekstrakcję i analizę ergosterolu przeprowadzono według zmodyfikowanej metody NYLUNDA i WALLANDERA (1994). Do analiz pobierano z każdego wariantu losowo po 30 siewek, z różnych miejsc poletek. Z uśrednionej próby wydzielono losowo po 11 siewek, z których odcięto korzenie drobne o średnicy 1 mm. Około 100–200 mg świeżej masy zamrożono w ciekłym azocie. Następnie roztarto w moździerzu na proszek i przeniesiono do probówek wirówkowych. Próbkę zalano 5 ml 96% etanolu i wytrząsano przez 2 min. w temperaturze pokojowej. Próby były wirowane przez 15 min., płyn z nad osadu zebrano, a osad ponownie wytrząsano z 5 ml 96% etanolu i wirowano. Z otrzymanego ekstraktu 10 ml wymieszano z 2 ml 60% KOH i ogrzewano do temp. 100 °C przez 15–20 min. Po ochłodzeniu dodano 5 ml heksanu i wytrząsano przez 20 sek., po czym zebrano frakcję heksanu i powtórzono czynność. Heksan odparowano do sucha w temp. 40 °C. Suchy ekstrakt rozpuszczono w 0,5 ml 100% metanolu i przesączono pod ciśnieniem przez filtr Millipore 0,45 µm. Oczyszczone ekstrakty rozdzielono metodą wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej (HPLC) firmy Waters z detektorem UV przy 280 nm, stosując kolumnę Waters Nova-Pack C<sub>18</sub> (150×4 mm) i czysty metanol jako fazę ciekłą (1,6 ml×min<sup>-1</sup>). Na kolumnę podawano 10–20 µl oczyszczonego ekstraktu; temperatura kolumny wynosiła 30 °C. Jako wzorzec przyjęto czysty ergosterol (5,7,22-ergostatrien-3ol, Sigma). Ilość ergosterolu w próbach została obliczona na podstawie krzywej wzorcowej przy pomocy programu komputerowego Maxima 820.

Oszacowanie zależności między liczebnością mikoryz a wilgotnością podłoża na podstawie współczynnika korelacji wykonano za pomocą testu nieparametrycznego korelacji rang Spearmana, a ocenę żywotności mikoryz (na podstawie zawartości ergosterolu) wykonano według testu *t*–Studenta. Porównywano średnią wilgotność na powierzchni badanych wariantów ze średnią liczebnością mikoryz.

### 3. WYNIKI

Na podstawie cech morfologicznych wyróżniono 5 morfotypów mikoryzowych u siewek sosny zwyczajnej w szkółce Nadleśnictwa Garwolin (tab. 1).

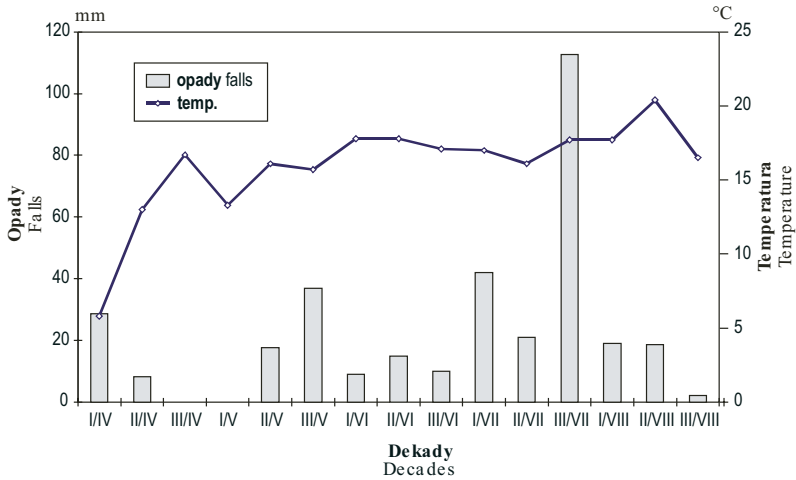
Pomiary wilgotności podłoży wykazały, że w wariancie niedeszczowanym w dniach 7 i 8 maja oraz od 13 do 17 maja wilgotność podłoża była bliska wilgotności w punkcie trwałego więdnięcia roślin, tj. 3% wilgotności odpowiadającej 13% ppw. Rośliny korzystały z wody trudno dostępnej. Na podłożu deszczowanym wilgotność wynosiła ok. 7%, czyli 30,4% ppw. Średnia wilgotność podłoży wyliczona na podstawie pomiarów z maja i lipca była różna z uwagi na odmienny przebieg warunków pogody (ryc. 1): na podłożu naturalnym deszczowanym wynosiła średnio 11,3 % (51% ppw), a na niedeszczowanym – 9,7% (44% ppw).

Ektendomikoryzy (typ 1) liczniej występowały u siewek na podłożu niedeszczowanym. Niezależnie od poziomu wilgotności podłoża u siewek dominowały mikoryzy wyróżnione jako typ 2, tworzone przez grzyba *Thelephora terrestris* Ehrh.: Fr (ryc. 2). Na korzeniach siewek rosnących na podłożu nienawadnianym wyróżniono rzadko stwierdzone w tych badaniach mikoryzy tworzone przez grzyba *Cenococcum geophilum* Fr. (typ 5).

**Tabela 1**  
Table 1

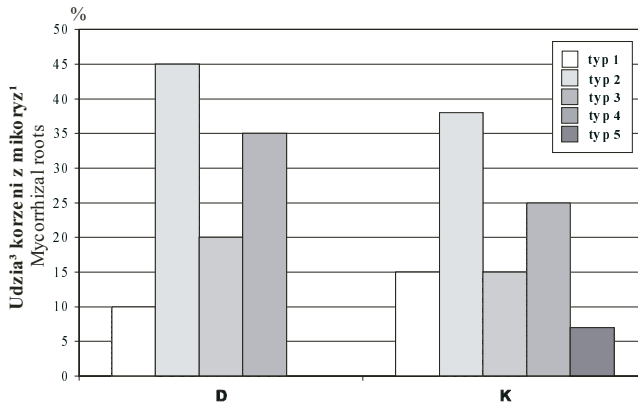
**Klasyfikacja morfotypów mikoryzy**  
Classification of mycorrhizal types

Morfotyp Morphotype	Opis Description
typ 1	ektendomikoryza ectendomycorrhiza
typ 2	młode mikoryzy białe, starsze barwy od pomarańczowej do rudobrazowej, mufka gładka bez widocznej grzybni zewnętrznej, sznury grzybniowe tej samej barwy, co mikoryzy, typ <i>Thelephora</i> white when young, from orange to dark brown when old, mantle smooth, strands the same colour as mycorrhizas, <i>Thelephora</i> typ
typ 3	mufka kremowo biała i welnista, sznury grzybniowe kremowe mantle opaque milk-white and wooly, strands opaque milk
typ 4	mikoryzy jasnopomarańczowe, mufka gładka ze śladami białej ziarnistej grzybni, brak sznurów grzybniowych bright orange mycorrhizas, mantle smooth with traces of whitish mycelium, no ryzomorphs
typ 5	mufka czarna, gruba, z promieniście odchodzącymi strzępkami, typ <i>Cenococcum</i> black and thick mantle with smooth, stiff hyphae radiating mantle <i>Cenococcum</i> type



Ryc. 1. Opady i temperatura powietrza w szkółce leśnej Nadleśnictwa Garwolin w 2000 r.

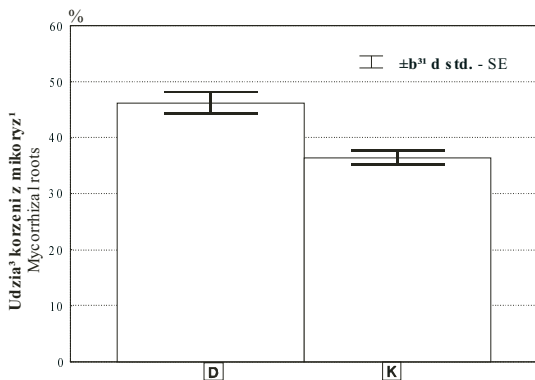
Fig. 1. Means fall and air temperature in Garwolin nursery in year 2000



Ryc. 2. Zróżnicowanie częstości występowania morfotypów mikoryz u siewek sosny na powierzchni deszczowanej – D i kontrolnej –K

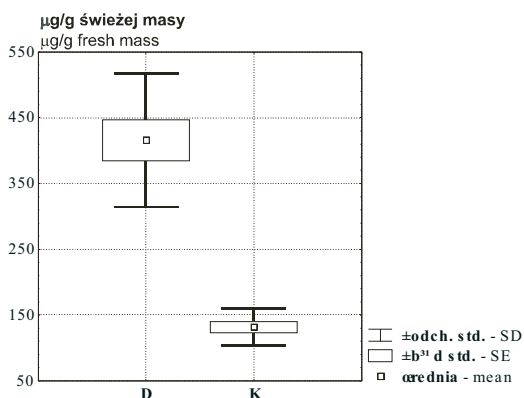
Fig. 2. Diversity of mycorrhizal morphotype on Scots pine seedlings in two tratments: D – watered, K – non-watered

Udział wszystkich mikoryz u siewek nawadnianych wyniósł 46%, a u nienawadnianych 36%. Stwierdzono istotną zależność między liczebnością mikoryz u siewek a wilgotnością badanych podłoży (ryc. 3). W korzeniach siewek nawadnianych średnia zawartość ergosterolu wynosiła 416 mg/g świeżej masy, natomiast u siewek nienawadnianych była 3 razy niższa i wynosiła 131 mg/g świeżej masy (ryc. 4), przy czym różnice były statystycznie istotne.



**Ryc. 3.** Frekwencja mikoryz u siewek sosny w zależności od poziomu wilgotności, D – deszczowanie, K – kontrola ( $r=0,72$ ,  $p=0,0003$ ) (test korelacji rang Spearmana,  $n=20$ )

Correlation between mycorrhizas (per cent) and level of soil moisture in Scots pine seedlings, D – watered and K – control,  $r=0,72$ ,  $p=0,0003$  (Spearman rank correlation,  $n=20$ )



**Ryc. 4.** Zawartość ergosterolu w korzeniach siewek sosny w wariancie deszczowanym – D, i kontrolnym (niedeszczowanym) – K

Ergosterol concentration in Scots pine roots in two treatments: D – watered, and K – control.

## 4. DYSKUSJA

Wilgotność podłoża jest czynnikiem, który może kształtować skład zbiorowiska grzybów mikoryzowych (WORLEY i HACSKALYO 1959). W glebach narażonych na wysychanie zróżnicowanie zbiorowiska tych grzybów było małe (FOGEL 1980). Brak jednak odpowiedzi, czy stan taki jest wynikiem hamowania wzrostu korzeni przez roślinę gospodarza czy bezpośredniego oddziaływania czynnika stresowego na grzyby. PIGGOT (1982) wykazał, że niska wilgotność podłoża prowadzi do wzrostu udziału mikoryz tworzonych przez grzyb *Cenococcum geophilum*. Jednakże COLEMAN i in. (1989) zwracają uwagę, że wśród izolatów *C. geophilum* istnieje duże zróżnicowanie wewnątrzgatunkowe. Wspomniani autorzy, prowadząc badania w czystych kulturach, uzyskali trzy różne reakcje grzybni *C. geophilum* w zależności od poziomu wilgotności podłoża. Dla jednych izolatów

wysoka wilgotność była czynnikiem stymulującym wzrost grzybni, podczas gdy dla innych okazała się czynnikiem ograniczającym. Natomiast trzeci typ reakcji polegał na braku wrażliwości w stosunku do wilgotności podłoża. Wyniki prezentowane w pracy wskazują, że lokalny gatunek *C. geophilum* należał prawdopodobnie do szczepów hydrofobowych.

Wysoki udział mikoryz tworzonych przez *T. terrestris* w przeprowadzonych badaniach, zarówno na powierzchni niedeschczowanej, jak i kontrolnej, potwierdza obserwacje COLPAERTA (1999), z których wynika, że jest to grzyb o charakterze kosmopolitycznym i stanowi dużą konkurencję dla innych grzybów ektomikoryzowych. Jednakże wyższa liczebność mikoryz tego grzyba u siewek nawadnianych zdaje się potwierdzać jego hydrofilny charakter (UNESTAM i SUN 1995). Stąd wysoka wilgotność podłoża może być czynnikiem stymulującym rozwój mikoryz *T. terrestris* (HILSZCZAŃSKA 2001).

Podobne do mikoryz *T. terrestris* preferencje wilgotnościowe wykazywały mikoryzy typu 3 i typu 4 (ryc. 2). Być może grzyby tworzące te mikoryzy należą także do gatunków hydrofilnych. Jednak brak informacji na temat rodzaju czy gatunków tworzących wymienione mikoryzy (nie posiadały tak charakterystycznych cech, jak np. mikoryzy tworzone przez *Thelephora* czy *Geophilum*) nie pozwala zająć jednoznacznego stanowiska w tej kwestii.

Uzyskana w prezentowanych badaniach wyższa liczebność mikoryz na podłożu deszczowanym wskazuje, że wilgotność podłoża może kształtować również cechy ilościowe mikoryz. Przy czym nadrzędne znaczenie zdaje się mieć typ gleby. SWATY i in. (1998) uważają, że to właśnie typ gleby (struktura fizykochemiczna, przepuszczalność i porowatość) decyduje o wrażliwości mikoryz na zmiany wilgotności. Stwierdzili bowiem, że na podłożu piaszczysto-gliniastym wzrost wilgotności nie powodował zmian w liczebności mikoryz, podczas gdy na podłożu pochodzenia wulkanicznego ich udział znacznie się zwiększył.

Stwierdzenie przez MANNINEM i in. (1998) dodatkowej zależności pomiędzy poziomem kolonizacji mikoryzowej a stężeniem ergosterolu w korzeniach znalazło potwierdzenie w prezentowanych badaniach. Wydaje się, że wysokie stężenie ergosterolu u siewek nawadnianych może mieć związek ze strukturą mikoryz, tj. z udziałem poszczególnych morfotypów. WALLANDER i in. (1997) wykazali, że mikoryzy wielokrotnie rozgałęzione mają znacznie wyższy poziom ergosterolu w jednostce masy niż mikoryzy pojedyncze. KIELISZEWSKA-ROKICKA (2000) podaje, że wśród 7 morfotypów mikoryzowych sosny zwyczajnej najniższym poziomem ergosterolu charakteryzowały się mikoryzy z czarną mufką grzybniową. Wyższy udział mikoryz typu 2 (*Thelephora*), które tworzyły mikoryzy koralowate na korzeniach siewek nawadnianych, jak również obecność „czarnych” mikoryz u siewek nienawadnianych wydaje się potwierdzać wyniki uzyskane przez wymienionych autorów.



## 5. WNIOSKI

1. Wilgotność podłoża jest czynnikiem powodującym zmiany liczebności i składu zbiorowiska mikoryz siewek sosny.

2. Niezależnie od wilgotności podłoża (piasek słabogliniasty) na korzeniach siewek sosny dominują mikoryzy tworzone przez grzyba *Thelephora terrestris*.

3. Wysokie stężenie ergosterolu w korzeniach siewek nawadnianych wskazuje na dużą ich żywotność.

*Autorka dziękuje serdecznie pani doc. dr hab. Barbarze Kieliszewskiej-Rokickiej za wykonanie analiz umożliwiających oznaczenie zawartości ergosterolu w korzeniach mikoryzowych sosny.*

Praca została złożona 11.04.2003 r. i przyjęta przez Komitet Redakcyjny 19.08.2003 r.

## INFLUENCE OF WATERING ON MYCORRHIZAL COLONIZATION AND ERGOSTEROL CONCENTRATION IN FINE ROOTS OF SCOTS PINE SEEDLINGS

### Summary

The mycorrhizal community structure in root systems 1-year old seedlings of *Pinus sylvestris* L. seedlings was studied. Evaluation of vitality of mycorrhizas was done on the basis of concentration of ergosterol-substance specific for fungi.

Seedlings of Scots pine, grown under nursery conditions on sandy soil, were subjected to different watering regimes for five months. The plants grown in two soil water regimes: 1–dry regime (non-watered), 2– wet regime (watered according to the nursery routine). In this experiment, the highest percentage of ectomycorrhizal short roots possessed seedlings, which grown in wet regime. Concentration of ergosterol in roots of watered seedlings was 3 times higher than seedlings from dry regime. Differences were statistically significant. The data clearly show that better properties for mycorrhizal development on seedlings were in wet treatment. Mycorrhizal diversity was higher in dry treatment (one more morphotype than in wet treatment). Among mycorrhizal morphotypes *Thelephora terrestris* type was dominant, both for seedlings from wet and dry treatments. *Cenococcum geophilum* ectomycorrhizas were found only on seedlings from dry treatment.

The results show that watering in bare root nursery (sandy soil) is necessary in order to stimulate the mycorrhizal development and high vitality of mycorrhizas.

## PIŚMIENNICTWO

- COLEMAN M. D., BLEDSOE C. S., LOPUSHINSKY W. 1989. Pure culture of ectomycorrhizal fungi to imposed water stress. *Can. J. Bot.* 67: 29-39.
- COLPAERT J. V. 1999. *Thelephora*. [W:] Ectomycorrhizal Fungi Key Genera in Profile (Eds J. W. G. Cairney, S. M. Chambers), Springer.
- CROMER D. A. N. 1935. The significance of the mycorrhiza of *Pinus radiata*. *Bulletin of Forest Bureau of Australia*, 16: 1-19.
- DIXON R. K., PALLARDY S. G., GARRETT H. E., COX G. S., SANDER I. L. 1983: Comparative water relations of container-grown and bare-root ectomycorrhizal and nonmycorrhizal *Quercus velutina* seedlings. *Can. J. Bot.*, 61: 6, 1559-1565.
- FOGEL R. 1980. Mycorrhizae and nutrient cycling in natural forest ecosystems. *New Phytol.* 86, 2: 199-212.
- HILSZCZAŃSKA D. 2001. Wpływ wilgotności podłoża na rozwój mikoryz siewek sosny zwyczajnej *Pinus sylvestris* L. Rozprawa doktorska SGGW, Wydział Leśny, Warszawa.
- INGLEBY K., MASON P. A., LAST F. T., FLEMING L. V. 1990. Identification of ectomycorrhizas. ITE Research Publication 5, HMSO, London.
- KIELISZEWSKA-ROKICKA B. 2000. Żywotność ektomikoryz – kryteria fizjologiczne. *Sylwan*, 4: 41-53.
- MALICKI M. A., PLAGGE R., ROTH C. H. 1996. Improving the calibration of dielectric TDR soil moisture determination taking into account the solid soil. *Eur. J. Soil Sci.* 47: 357-366.
- MANNINEN A. M., LAATIKAINEN T., HOLOPAINEN T. 1998. Condition of Scots pine fine roots and mycorrhizae after fungicide application and low-level ozone exposure in a 2-year field experiment. *Trees*, 12: 347-355.
- MARKKOLA A. M., OHTONEN A., AHONEN-JONNARTH U., OHTONEN R. 1996. Scots pine responses to CO<sub>2</sub> enrichment – I. Ectomycorrhizal fungi and soil fauna. *Environ. Pollut.*, 94: 309-316.
- NYLUND J. E., WALLANDER H. 1994. Ergosterol analysis as a means of quantifying mycorrhizal biomass. *Techniques for Mycorrhizal Research*, 25: 538-548.
- PARLADE J., ALVAREZ I. F., PERA J. 1996. Inoculation of containerised *Pseudotsuga menziesii* and *Pinus pinaster* seedlings with spores of five species of ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*, 6: 237-245.
- PIGGOT C. D. 1982. Survival of mycorrhiza formed by *Cenococcum geophilum* Fr. in dry soils. *New Phytol.*, 92: 513-517.
- SALMONOWICZ B., NYLUND J. E. 1988. High performance liquid chromatography determination of ergosterol as a measure of ectomycorrhizal infection in Scots pine. *Eur. J. For. Pathol.*, 18: 291-298.
- SMITH S. E., READ D. J. 1997. Structure and development of ectomycorrhizal roots. [W:] *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press, San Diego: 163-232.
- SWATY R. L., GEHRING C. A., VAN-ERT M., THEIMER T. C., KEIM P., WHITHAM T. G. 1998. Temporal variation in temperature and rainfall differentially affects ectomycorrhizal colonization at two contrasting sites. *New Phytol.*, 139, 4: 733-739.
- UNESTAM T., SUN Y. P. 1995. Extramatrical structures of hydrophobic and hydrophilic ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 5: 301-311.
- WALLANDER H., MASSICOTE H. B., NYLUND J. E. 1997. Seasonal variation in protein, ergosterol and chitin in five morphotypes of *Pinus sylvestris* L. ectomycorrhizae in a mature Swedish forest. *Soil Biol. Biochem.*, 29: 45-53.
- WETTE J. D. 1974. Structure and function of sterols in fungi. *Adv. Lipid Res.*, 23:115-167.
- WORLEY J. F., HACSKAYLO E. 1959. The effect of available soil moisture on the mycorrhizal association of virginia pine. *For. Sci.*: 267-268.
- Wytyczne stosowania deszczowni w szkółkach leśnych i zadrzewieniowych, 1991. Lasy Państwowe, Naczelny Zarząd LP, Instytut Badawczy Leśnictwa, Warszawa, 1991.