

JOLANTA BEHNKE-BOROWCZYK

Bioróżnorodność grzybów igliwia sosny zwyczajnej porażonej przez jesienną osutkę sosny

Biodiversity of fungi community on Scots pine needles infected of the autumn needle cast

ABSTRACT

Behnke-Borowczyk J. 2018. Bioróżnorodność grzybów igliwia sosny zwyczajnej porażonej przez jesienną osutkę sosny. Sylwan 162 (4): 288-294.

Needle casts belong to the fungal diseases of the assimilation apparatus, which affect the success and quality of the renewal of pine stands. The aim of this study was to investigate the diversity of communities of fungi, which occurred on Scots pine needles. Samples were collected in autumn 2015 from Scots pine saplings from Przedborów Forest District (17°58'34"E 51°31'57"N). Material was sequenced for DNA using Illumina system. The results were compared with the NCBI base sequences. The results show significant dominance of fungi from *Ascomycota* division. The taxa responsible for the occurrence of Scots pine needle cast disease were also found. In this group, a significant share characterized the following species: *Lophodermium pinastri*, *Cyclaneusma minus*, *Lophodermium seditiosum*, *Sydowia polyspora*, *Cenangium ferruginosum* and *Beauveria bassiana*. The presented research should enhance the knowledge about the diversity of fungi inhabiting pine needles and about the contribution of pathogenic taxa, which can be used in a more efficient use of protective measures in forest management practice.

KEY WORDS

Scots pine needle cast disease, diversity, system Illumina

ADDRESSES

Jolanta Behnke-Borowczyk – e-mail: jbehnke@up.poznan.pl

Katedra Fitopatologii Leśnej, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu; ul. Wojska Polskiego 71c, 60-625 Poznań

Wstęp

Osutki należą do grzybowych czynników chorobotwórczych porażających aparat asymilacyjny i wpływających na udatność odnowienia (zwłaszcza naturalnego) drzewostanów sosnowych [Andrzejczyk i in. 2009]. Znacząco obniżają one przyrost grubości sosny [Sierota 2001] i przyczyniają się do powstawania strat ekonomicznych w gospodarce leśnej.

Zbiorowisko grzybów zasiedlających igły sosny zwyczajnej jest różnorodne. Wynika to ze zróżnicowania genetycznego poszczególnych roślin-gospodarzy, ich struktury wiekowej, wieku igieł i modyfikującego wpływu środowiska. Dotychczas wyniki badań dostarczyły informacji na temat gatunków wywołujących osutkę i ich potencjału infekcyjnego oraz strategii życiowej, co ma znaczenie dla prowadzenia skutecznej ochrony drzewostanów sosnowych [Kowalski, Majka 1989]. Osutki to zespół chorobowy wywołwany przez różnych sprawców, silnie podlegający wpływowi środowiska i charakteryzujący się szerokim spektrum objawów. Do wyodrębnionych jednostek

chorobowych należą: osutka wiosenna, którą u młodych drzew wywołuje *Lophodermium seditiosum* Minter, Stanley et Millar, a u starszych sosen – *L. pinastri* (Schrad.) Chevall; osutka jesienna, której sprawcami są głównie *Cyclaneusma minus* (Butin) DiCosmo, Peredo & Minter, *Sydowia polyspora* (Bref. & Tavel) E. Müll. (synonim *Sclerophoma pithyophila* Corda v. Höhn), *Epicoccum purpurascens* Ehrenb. i *Coniothyrium fuckelli* (Sacc.); osutka północna wywoływana przez grzyb *Hypodermella sulcigena* (Link) Tubeuf oraz osutka śnieżna, której sprawcą jest *Phacidium infestans* P. Karst. Pozostałe osutki mają mniejsze znaczenie w gospodarce leśnej. Wiedza dotycząca zróżnicowania osutek spowodowała modyfikację terminów i rodzajów prowadzonych działań ochronnych w drzewostanach dotkniętych osutką [Grzywacz 1996].

Celem pracy było określenie ilościowego i jakościowego składu zbiorowiska grzybów występujących w igłach sosny zwyczajnej porażonej przez jesienną osutkę sosny. Dodatkowym celem było sprawdzenie skuteczności metody sekwencjonowania następnej generacji (NGS) opartej na systemie Illumina w określeniu ilościowego i jakościowego składu zbiorowiska grzybów.

Material i metody

Do badań wybrano 7 sosen zwyczajnych rosnących w leśnictwie Wanda (Nadleśnictwo Przedbórz, 17°58'34"E 51°31'57"N): 6 w wieku od 4 do 11 lat, na których zaobserwowano objawy osutki (I-VI), i jedną niewykazującą objawów porażenia (kontrola – K). Zbioru igieł dokonano jesienią, po ukazaniu się objawów osutki. Pobierano igły zeszłoroczne i starsze z pędów zlokalizowanych w dolnej i środkowej części korony z jednakowym nasileniem objawów. Pojedynczą próbę stanowiło 15 igieł losowo wybieranych z każdego drzewa. Igły sterylizowano w roztworze podchlorynu sodu o stężeniu 10% przez 2 min, następnie każdą partię igieł trzykrotnie płukano w sterylnej wodzie przez 10 min. Wysuszone igły roz tarto w mrożeniu do –70°C.

Izolację DNA przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu *Bead-Beat* Micro AX Gravity (A&A Biotechnology), zgodnie z protokołem producenta. Do identyfikacji gatunkowej zbiorowiska grzybowego wykorzystano region 1/2 ITS rDNA. Analizę przeprowadzono z wykorzystaniem specyficznych starterów gITS7 5'GTG ART CAT CGA RTC TTT G 3' [Ihrmark i in. 2012] i ITS4 5'TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3' [White i in. 1990]. Mieszanina reakcyjna składała się z 2,5 µl DNA, 0,2 µl każdego startera, 10,6 µl wody dejonizowanej oraz 12,5 µl 2X PCR MIX (A&A Biotechnology). Reakcja amplifikacji przeprowadzona w termocyklerze obejmowała: denaturację wstępną (94°C, 5 min), 35 cykli denaturacji (94°C, 30 s), annealing (56°C, 30 s), elongację (72°C, 30 s) oraz końcową elongację (72°C, 7 min). Następnie produkt sprawdzono na jednoprocetowym żelu agarozowym barwionym przez Midori Green Advance DNA (Genetics). Otrzymany produkt oczyszczono i sekwencjonowano z wykorzystaniem technologii SBS firmy Illumina w Centrum Badań DNA (Poznań).

Tabelę operacyjnych jednostek taksonomicznych (OTU) przygotowano z wykorzystaniem oprogramowania PIPITS, wersja 1.2.0 [Gweon i in. 2015]. Otrzymane sekwencje przekonwertowano do formatu FASTA i scalono w pojedynczy plik z wykorzystaniem PEAR, wersja 0.9.6 [Zhang i in. 2014], następnie filtrowano z progiem jakości 30 przez FASTX-Toolkit, wersja 0.0.13 (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit). Przygotowane sekwencje zostały dereplikowane, a podregiony ITS wybrano za pomocą oprogramowania ITSx, wersja 1.0.11 [Bengtsson-Palme i in. 2013]. Sekwencje unikalne i te krótsze niż 100 bp zostały usunięte z dalszej analizy. Pozostałe sekwencje grupowano z 97-procentową identycznością sekwencji. Z powstałych sekwencji usunięto chimery przy użyciu zestawu danych referencyjnych UNITE UCHIME, wersja 6.0 (<https://unite.ut.ee>). Sekwencje wejściowe zmapowano na sekwencje reprezentatywne i utworzono tabelę OTU. Taksony zidentyfikowano przez porównanie z sekwencjami referencyjnymi z bazy danych National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Liczebność mikroorganizmów przyjęto jako liczbę OTU w próbie. Bioróżnorodność taksonów określono jako liczbę pojedynczych taksonów. Przeprowadzono porównanie różnorodności wewnątrz i między zbiorowiskami mikroorganizmów za pomocą wskaźników różnorodności obliczonych dla każdego zbiorowiska [Magurran 1988]. Bogactwo gatunkowe ustalono jako całkowitą liczbę gatunków w zbiorowisku według indeksu Margalefa (DMg) i indeksu różnorodności Shannona (H'). Dominację gatunku w zbiorowisku określono z wykorzystaniem wskaźnika równości Shannona (E), indeksu Simpsona (D) i indeksu Bergera-Parkera (d).

Wyniki

W wyniku sekwencjonowania otrzymano 128 179 sekwencji w badanych próbach oraz 130 w kontroli. W igłach pochodzących z drzew z objawami osutki stwierdzono 99,22% oznaczonych taksonów grzybowych, 0,45% niehodowanych grzybów, 0,31% sekwencji, dla których nie znaleziono sekwencji referencyjnej w bazie danych, oraz nieliczne sekwencje niegrzybowe (0,027%) należące do *Pinus sylvestris* L. i *Dioscorea polystachya* Turcz. W przypadku kontroli nie otrzymano sekwencji niegrzybowych oraz sekwencji, dla których nie było sekwencji referencyjnych w bazie danych. Oznaczone sekwencje grzybowe stanowiły 84,62%, a niehodowalne 15,38%. Otrzymane zbiorowisko grzybowe reprezentowane było przez taksony należące do gromad *Ascomycota* i *Basidiomycota*. Nie otrzymano żadnych taksonów należących do *Zygomycota*. Gromada *Ascomycota* reprezentowana była przez 73 taksony w próbach z objawami oraz 10 w kontroli. W przypadku gromady *Basidiomycota* było to odpowiednio 16 taksonów i 1 takson. Najliczniej reprezentowane były gatunki *Lophodermium pinastri* (43,71-77,48%), *Cyclaneusma minus* (Butin) (12,11-30,09%), *Cenangium ferruginosum* Fr. (0,54-10,05%), *Sydowia polyspora* (Bref. & Tavel) E. Müll (0,05-9,15%), *L. seditiosum* (0,02-20,24%) oraz *Beauveria bassiana* (Bals. Criv.) (0-16,6%) i *Epicocum nigrum* (0-1,54%) (tab. 1).

Różnorodność gatunków w poszczególnych zbiorowiskach mierzona indeksem Margalefa była wyższa w próbach z objawami niż w kontroli. Dominacja pojedynczych taksonów w zbiorowisku grzybów doprowadziła do niewielkich wartości wskaźnika równości Shannona i wysokich wartości wskaźników dominacji (tab. 2).

Dyskusja

W badaniach otrzymano zbiorowiska o dużym zróżnicowaniu gatunkowym. Dominowały gatunki uważane są za sprawców osutki (*Lophodermium pinastri*, *Cyclaneusma minus*, *L. seditiosum* i *Sydowia polyspora*) oraz powodujący zamieranie pędów sosny *Cenangium ferruginosum* i entomofagiczny gatunek grzyba *Beauveria bassiana*. Podobne wyniki uzyskali w swoich badaniach Kowalski i Poździk [1993]. Wykazali oni, że znaczną frekwencję w zbiorowisku grzybowym (ponad 5%) na igłach sosen osiągnęły *C. minus*, *C. ferruginosum*, *L. seditiosum*, *L. pinastri*, *S. polyspora* oraz *Anthostomella formosa* Kirschst. Kowalski i Poździk [1993] zaobserwowali, że częściej niż igły pierwszoroczne zasiedlane przez grzyby były igły zeszłoroczne oraz że na zróżnicowanie pod względem jakościowym i ilościowym zbiorowiska grzybowego wpływ miało także położenie igieł w obrębie korony drzewa. *Lophodermium pinastri*, *L. seditiosum* i *C. ferruginosum* zasiedlały igły pochodzące z dolnych partii korony, natomiast *A. formosa* zasiedlał igły szczytowych części koron drzew. Zbiorowisko grzybowe z leśnictwa Wanda zbliżone było do otrzymanego przez Kowalskiego i Poździka [1993]. Jediną różnicą był brak obecności *A. formosa*. Różnica ta może wynikać z miejsca pobrania materiału do badań (pochodził on ze środkowej i dolnej części korony).

Z kolei Mańka i Lipińska [1992] wykazały, że igły z młodych sosen zwyczajnych z objawami osutki zebrane wiosną, latem i jesienią były zasiedlone głównie przez *S. polyspora* i *Lophodermium* sp.

Tabela 1.

Udział [%] poszczególnych taksonów w zbiorowisku grzybowym i liczebność grzybów, izolatów, taksonów oraz taksonów grzybowych dla badanych prób (I-VI) i kontroli (K)

Frequency (Udział [%]) of individual taxa in fungi community as well as total number (Liczebność) of fungi, isolates, taxa and fungi taxa for analysed test designations (I-VI) and control (K)

	I	II	III	IV	V	VI	K
	Udział						
<i>Ascomycota</i> sp.	0,13	0,24	0,65	0,37	8,36	0,39	1,54
<i>Beauveria bassiana</i> (Bals. Criv.) Vuill. 1912		2,45	12,32		16,60		
<i>Cenangium ferruginosum</i> Fr. 1818	7,29	3,36	1,43	10,05	0,16	0,54	2,31
<i>Epicoccum nigrum</i> Link 1816	0,01	0,04	0,03	0,03	0,95		1,54
<i>Lophodermium pinastri</i> (Schrad.) Chevall. 1826	67,86	77,48	53,81	43,71	46,15	76,50	69,23
<i>Lophodermium seditiosum</i> Minter, Staley & Millar 1978	0,33	0,09	0,02	20,24	0,10	0,69	2,31
<i>Cyclaneusma minus</i> (Butin) DiCosmo, Peredo & Minter 1983	19,02	12,67	30,09	20,36	12,11	14,18	17,69
<i>Sydowia polyspora</i> (Bref. & Tavel) E. Müll. 1953	3,95	0,05	0,08	2,40	9,15	0,62	
<i>Ascomycota</i> razem	99,60	99,20	99,57	98,73	95,88	98,38	98,46
<i>Ascomycota</i> in total							
<i>Basidiomycota</i>	0,10	0,03	0,07	0,03	0,18	0,08	0,77
Niehodowalny grzyby Uncultured fungi	0,24	0,30	0,21	1,01	2,48	1,54	0,77
<i>Plantae</i>	0,01	0,01	0,06				
Brak sekwencji w bazie NCBI No sequence in NCBI database	0,06	0,47	0,083	0,22	1,46		
	Liczebność						
Grzyby Fungi	20 389	40 896	50 363	5 906	8 902	1 298	130
Izolaty Isolates	20 402	41 090	50 436	5 919	9 034	1 298	130
Taksony Taxa	55	88	74	43	66	31	13
Taksony grzybowe Fungi taxa	49	75	61	41	59	31	13

Tabela 2.

Wartości indeksu Margalefa (DMg), indeksu różnorodności Shannona (H'), wskaźnika równości Shannona (E), indeksu Simpsona (D) i indeksu Bergera-Parkera (d) dla badanych prób (I-VI) i kontroli (K)

Values of Margalef's diversity index (DMg), Shannon's diversity index (H'), Simpson's diversity index (D), Shannon's evenness index (E) and Berger-Parker dominance index (d) for analysed test designations (I-VI) and control (K)

	I	II	III	IV	V	VI	K
DMg	5,442	8,189	6,741	4,835	7,136	4,185	2,465
H'	0,444	0,883	1,157	1,516	1,694	0,927	1,115
D	0,496	0,382	0,060	0,716	0,728	0,394	0,491
E	0,111	0,197	0,269	0,403	0,404	0,270	0,435
d	0,679	0,775	0,538	0,437	0,461	0,765	0,692

Nie stwierdzono ich na igłach pierwszorocznych. *S. polyspora* odnotowano głównie na igłach dwuletnich, a *Lophodermium* sp. na trzyletnich. Grzyby rodzaju *Lophodermium* dominowały w zbiorowisku latem, a *S. polyspora* jesienią [Mańka, Lipińska 1992]. W niniejszych badaniach stwierdzono obecność *S. polyspora* i *Lophodermium* sp., jednak nie potwierdzono, że jesienią dominuje *S. polyspora* [Mańka, Lipińska 1992], gdyż w otrzymanych zbiorowiskach dominował rodzaj *Lophodermium*.

Kowalski i Majka [1989] wykazali, że w procesie zakażenia istotną rolę odgrywał wiek drzew. Analizując preferencje badanych gatunków grzybów, stwierdzili oni, że *C. minus* zasiedlał głównie igły sosen w uprawach między 6 a 10 rokiem życia drzew i nie zakażał on igieł pierwszego rocznika. *Lophodermium pinastri* dominował w zbiorowisku igieł sosen w wieku od 3 do 5 lat, infekując trzyletnie igły. *Lophodermium seditiosum* rzadko infekował sosny w uprawach, lecz 4 razy częściej był stwierdzany w igłach siewek. Kowalski i Majka [1989] zauważyli również, że *L. seditiosum* sporadycznie zasiedlał igły razem z *L. pinastri*, natomiast stwierdzili współwystępowanie *L. pinastri* i *C. minus*, co potwierdzają również wyniki badań opisanych w niniejszym opracowaniu. Potwierdzono też prawidłowość dotyczącą preferencji współwystępowania, tłumaczącą znaczny udział *L. pinastri* i *C. minus*, a niższy *L. seditiosum*. Wyniki otrzymane przez Kowalskiego i Majkę [1989] dowodzą bogactwa i różnorodności organizmów grzybowych występujących zarówno na igłach żywych, jak i martwych. Wykazali oni również, że zarówno żywe, jak i martwe igły charakteryzują się typowymi dla siebie zespołami licznie występujących grzybów oraz takimi, które stwierdza się dość rzadko. Stwierdzili, że najistotniejszymi gatunkami grzybów powodujących osutki są *L. seditiosum* i *C. minus*. *Lophodermium pinastri*, choć jest powszechnie spotykany, to ze względu na preferencje do zasiedlania igieł trzeciego rocznika został zaklasyfikowany do patogenów o mniejszej roli w powstawaniu choroby niż wspomniane wyżej gatunki. Spostrzeżenia Kowalskiego i Majki [1989] pokrywają się z uzyskanymi wynikami zróżnicowania frekwencji grzybów, ponieważ dominującym gatunkiem był *L. pinastri*, który choć występuje powszechnie z *C. minus*, to znacząco przewyższa go liczebnością. Znaczej frekwencji *L. pinastri* można spodziewać się w igłach trzeciego rocznika – biorąc pod uwagę miejsce zbioru igieł, potwierdzono powyższą zależność.

Wśród interesujących taksonów grzybowych stwierdzonych w wyniku przeprowadzonej analizy, lecz występujących w śladowych ilościach, można wymienić *Aureobasidium pullans* (de Bary & Löwenthal) G. Arnaud, *Alternaria alternaria* (Fr.) Keissl. i *Epicocum nigrum*. Według Kowalskiego i Poździka [1993] gatunki te charakteryzują się epifitycznym i kosmopolitycznym trybem życia. Zasiedlają powierzchniowe warstwy organów roślin. Szczególnie gdy dochodzi do uszkodzenia igieł w wyniku działalności owadów, gatunki te mają możliwość wniknięcia do środka igły i wówczas uznawane są za endofity. Podobną zależność wykazuje *S. polyspora*, również stwierdzony w przeprowadzonej analizie.

Beauveria bassiana wywołuje u owadów chorobę nazywaną białą muskardiną. Ma on duży zasięg występowania i dużą liczbę żywicieli. Poraża owady z rodzin Lepidoptera, Coleoptera i Hemiptera oraz z Diptera i Hymenoptera, a w glebie występuje jako saprofit [Żukowski, Bajan 1996]. Obecność grzyba *B. bassiana* na igłach sosen może wiązać się z występowaniem na sosnach, z których pochodził materiał owadów, np. korowca sosnowego (*Aradus cinnamomeus* Panz.). *Beauveria bassiana* jest przydatny do zwalczania tego szkodnika [Dobrowolski, Popowska-Nowak 1999].

W wyniku przeprowadzonej analizy stwierdzono niewielką frekwencję taksonów z królestwa roślin: sosny zwyczajnej i pochrzynu chińskiego *Dioscorea polystachya*, który jest obcym gatunkiem dla flory naszego kraju. Jego obecność w analizowanym zbiorowisku może wynikać z błędu powstałego w trakcie analiz lub z błędnie zdeponowanej sekwencji w bazie danych NCBI.

Wyniki sekwencjonowania bazują głównie na podobieństwie otrzymanych sekwencji do zdefiniowanej wcześniej sekwencji referencyjnej. Błędy mogą być powodem wcześniejszej, źle przeprowadzonej identyfikacji.

Dotychczasowe metody identyfikacji zbiorowiska grzybowego oparte były na morfotypowaniu (tzw. metoda klasyczna), reakcjach biochemicznych oraz metodach molekularnych, takich jak klonowanie, trawienie restrykcyjne i sekwencjonowanie Sangera. Od lat 80. ubiegłego wieku coraz większe zastosowanie w określaniu zbiorowisk mikroorganizmów mają metody biologii molekularnej, w tym coraz częściej metody sekwencjonowania drugiej oraz trzeciej generacji określane jako sekwencjonowanie nowej (następnej) generacji – NGS (ang. Next-Generation Sequencing). Identyfikacja grzybów metodami klasycznymi jest uzależniona od hodowli *in vitro*, która dla większości mikroorganizmów nie jest możliwa, natomiast metody molekularne umożliwiają identyfikację bezpośrednio z pobranego materiału. Sekwencjonowanie NGS umożliwia identyfikację dużej liczby taksonów. Zastosowanie metody opartej o system Illumina gwarantuje wysoki poziom dokładności i niezawodności. W otrzymanym zbiorowisku ponad 90% taksonów zidentyfikowano do rodzaju lub gatunku. Dokładna klasyfikacja taksonomiczna otrzymana w powyższych badaniach była wyższa niż podawana przez Ovaskainen i in. [2013] oraz Kubartová i in. [2012] – z zastosowaniem sekwencjonowania metodą 454 uzyskali oni 40% sekwencji niezidentyfikowanych, nawet do poziomu rodzaju.

Wnioski

- ✦ Potwierdzono obecność grzybów powodujących osutki. Wśród nich największą frekwencję osiągnęły grzyby *Lophodermium pinastri* i *Cyclaneusma minus*. Były to grzyby dominujące w zbiorowisku. Frekwencja *L. seditiosum* była znacznie niższa od dwóch pozostałych.
- ✦ W badaniach stwierdzono również niewielki udział *Cenangium ferruginosum*, grzyba związanego z zamieraniem pędów sosny.
- ✦ Metoda NGS jest skuteczna w określaniu ilościowego i jakościowego składu zbiorowiska grzybów.

Literatura

- Andrzejczyk T., Aleksandrowicz-Trzeńska M., Żybyra H. 2009. Wpływ cięć rębnych na zagęszczenie, wzrost i stan zdrowotny odnowień naturalnych sosny w warunkach Nadleśnictwa Tuszyna. Leś. Pr. Bad. 70 (1): 5-18.
- Bengtsson-Palme J., Veldre V., Ryberg M., Hartmann M., Branco S., Wang Z., Nilsson R. H. 2013. Improved software detection and extraction of ITS1 and ITS2 from ribosomal ITS sequences of fungi and other eukaryotes for analysis of environmental sequencing data. *Methods in Ecology and Evolution* 4: 914-919.
- Dobrowolski M., Popowska-Nowak E. 1999. Stosowanie zarodników *Beauverria bassiana* (Bals.) Vuill. do zwalczania korowca sosнового (*Aradus cinnamomeus* Panz., *Hemiptera-Heteroptera*). *Prace Instytutu Badawczego Leśnictwa Seria A* 871: 95-102.
- Grzywacz A. 1996. Choroby sosny. *Sylvan* 140 (12): 47-52.
- Gweon H. S., Oliver A., Taylor J., Booth T., Gibbs M., Read D. S., Schonrogge K. 2015. PIPITS: An automated pipeline for analyses of fungal internal transcribed spacer sequences from the Illumina sequencing platform. *Methods in Ecology and Evolution* 6 (8): 973-980.
- Ihrmark K., Bödeker I. T., Cruz-Martinez K., Friberg H., Kubartová A., Schenck J., Strid Y., Stenlid J., Brandström-Durling M., Clemmensen K. E., Lindahl B. D. 2012. New primers to amplify the fungal ITS2 region-evaluation by 454-sequencing of artificial and natural communities. *FEMS Microbiology Ecology* 82 (3): 666-677.
- Kowalski T., Majka K. 1989. Sprawcy osutki sosny i rezerwuary ich materiału infekcyjnego w drzewostanach Nadleśnictwa Oława. *Zeszyty Naukowe Akademii Rolniczej im. H. Kołłątaja w Krakowie* 232 (23).
- Kowalski T., Poźdźzik P. 1993. Grzyby endofityczne w żywych igłach. *Acta Agraria Et Silvestria Series Silvestris* 31.
- Kubartová A., Ottosson E., Dahlberg A., Stenlid J. 2012. Patterns of fungal communities among and within decaying logs, revealed by 454 sequencing. *Mol. Ecol.* 21: 4514-4532. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2012.05723.x.
- Magurran A. E. 1988. *Ecological diversity and its measurement* Princeton. Princeton University Press, NJ.

- Mańka M., Lipińska A. 1992.** Fungi inhabiting needles of young scots pines (*Pinus sylvestris* L.). *Phytopathologia Polonica* 3 (15): 59-64.
- Ovaskainen O., Schigel D., Ali-Kovero H., Auvinen P., Paulin L., Norden B., Norden J. 2013.** Combining high-throughput sequencing with fruit body surveys reveals contrasting life-history strategies in fungi. *ISME J.* 7 (9): 1696-1709. DOI: 10.1038/ismej.2013.61.
- Sierota Z. 2001.** Choroby lasu. CILP, Warszawa.
- White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J. 1990.** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: W: Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J. [red.]. A Guide to Methods and Applications.* Academic Press, San Diego, CA. 315-322.
- Zhang J., Kobert K., Flouri T., Stamatakis A. 2014.** PEAR: A fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR. *Bioinformatics* 30 (5): 614-620.
- Żukowski K., Bajan C. 1996.** Badania przydatności *Beauveria bassiana* do zwalczania prusaków (*Blattella germanica* L.). *Roczn. PZH* 47 (3): 343-349.