

Dorota HILSZCZAŃSKA \*

## **METODY IDENTYFIKACJI EKTOMIKORYZ**

### **METHODS OF ECTOMYCORRHIZA IDENTIFICATION**

***Abstract.** Identification of the fungi forming ectomycorrhiza is still a great challenge. Much of knowledge on fungal diversity resulted from field surveys of sporocarps. Two methods are currently being used to describe ECM fungal communities associated with root tips: molecular techniques and morphological classification. Morphological and anatomical descriptions of ectomycorrhizal roots have provided useful data for identifying the fungi below ground, but most species have not been described by this method. According to current knowledge morphotyping (based on morphological classification) can be very useful as the primary method of ectomycorrhizal classification, when used in conjunction with molecular techniques. Although molecular techniques based on restriction fragment length polymorphism- (RFLP) internal transcribed spacer (ITS) analysis of polymerase chain reaction (PCR) are effective tools to identify ectomycorrhiza, but do have their limitations. For instance, many types of ectomycorrhiza remain unknown because no matching RFLP type is observed in available databases. It seems that promising method for identifying ectomycorrhizas can be DNA-sequence analysis.*

***Key words:** ectomycorrhiza, identification, morphotyping, PCR-RFLP.*

---

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

## 1. WPROWADZENIE

Identyfikacja grzybów tworzących ektomikoryzy wciąż pozostaje dużym wyzwaniem nawet dla specjalistów z tej dziedziny. Choć dokonano już identyfikacji gatunkowej komponenta grzybowego wielu ektomikoryz drzew leśnych rosnących w różnych warunkach środowiskowych, to jednak dużo morfotypów mikoryz określanych na podstawie cech morfologicznych i anatomicznych pozostaje nierozpoznanych.

W celu określenia różnorodności i struktury ektomikoryzowego zbiorowiska grzybów (ECM) stosuje się różne metody. Najczęściej stosowaną metodą było, i w pewnym zakresie jest nadal, identyfikowanie grzybów ektomikoryzowych na podstawie owocników, których przynależność do rodzaju czy gatunku określa się przy użyciu standardów taksonomicznych. Jednakże, takie podejście nie odzwierciedla w pełni rzeczywistego składu gatunkowego zbiorowiska grzybów ektomikoryzowych (Jonsson i in. 1999, van der Heijden 1999). Istnieje bowiem, wiele gatunków grzybów ECM, zwłaszcza tych, które należą do: *Ascomycota*, *Corticiaceae* i *Thelephoraceae*, które tworzą małe lub łatwe do przeoczenia owocniki. Inne grzyby ektomikoryzowe, które tworzą owocniki hypogeiczne lub – tak jak np. grzyb *Cenococcum geophilum* – nie mają owocników, mogą zostać w ogóle nie odnotowane. Należy również pamiętać, że rozwój owocników zależy od czynników środowiskowych (wilgotność i temperatura), a zatem nie wytwarzają się one co roku. Stąd, w celu określenia gatunków grzybów, które są aktywnie związane z korzeniami roślin, niezbędne jest badanie ektomikoryz.

Obecnie stosuje się dwie metody pozwalające badać zbiorowisko ECM związane z wierzchołkami korzeni: techniki molekularne i klasyfikację morfologiczną. Techniki molekularne opierają się na reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) zwielokrotniającej fragmenty grzybowego rybosomowego DNA (rDNA). Natomiast klasyfikacja morfologiczna polega na badaniu mikoryz pod stereo i/lub złożonym mikroskopem. W większości badań techniki te stosowane są równolegle, lecz z przewagą jednej z nich. Ektomikoryzy są zwykle rozdzielane na grupy i po oszacowaniu ich cech pod mikroskopem, poddawane analizie molekularnej. Często stosuje się techniki molekularne w celu potwierdzenia, czy klasyfikacja ECM metodą morfotypowania wykonana została prawidłowo.

## 2. CHARAKTERYSTYKA MORFOTYPOWANIA EKTOMIKORYZ I IDENTYFIKACJA GRZYBÓW JE TWORZĄCYCH NA PODSTAWIE ANALIZY DNA

Struktura ektomikoryzy składa się z tkanek grzyba, których ułożenie i budowa są używane do opisu gatunku grzyba w takim samym stopniu, jak inne taksonomicznie ważne cechy. Ektomikoryzy tworzą różne struktury w zależności od gatunku

grzyba tworzącego ektomikoryzę. Jest to szczególnie widoczne w odniesieniu do ryzomorf (Agerer, 1987–1997). O kształcie struktury ektomikoryz decyduje wiek drzewa i stanowisko, na którym rośnie, oraz stosowany rodzaj nawożenia i dostępność wody w podłożu. Ponadto dowiedziono, że niektóre grzyby ektomikoryzowe mogą wrastać swoimi strzępkami grzybni do wnętrza ryzomorf i ektomikoryz innych grzybów (Agere 1990), co sugeruje, że te grzyby mogą ograniczać ich negatywny wpływ na odżywianie rośliny czy wytwarzanie owocników.

W licznych pracach o charakterze fizjologicznym, ekologicznym i taksonomicznym wykazano, że różne ektomikoryzy są odpowiedzialne za różne potrzeby życiowe rośliny-gospodarza. Dlatego konieczne jest poznanie struktur ektomikoryz.

Opisu cech morfologicznych dokonywano już w latach 80. XIX wieku. Dokładne rysunki ektomikoryz *Fagus sylvatica* i *Carpinus betulus* opublikowane zostały przez Franka (1885). Autor przedstawił szczegółowo cechy mufki grzybniowej okrywającej mikoryzowe korzenie. Przez pewien czas pomijano fakt, że wykonane przez Franka opisy dotyczą jednej z najbardziej istotnych cech ektomikoryz. Dopiero w latach 60. ubiegłego wieku powrócono do tej metody (Fontana 1963). Pierwsze ważne charakterystyki ektomikoryz wykonane zostały przez Trappe (1965) i Zak (1973). W latach 80. XX w. Agerer (1987–1997) przedstawił sposób przygotowania próbek korzeniowych do analiz i cechy niezbędne do identyfikacji ektomikoryz świerka i sosny.

W opisach morfologicznych najczęściej uwzględnia się: kształt ektomikoryzy (u sosny jest największa różnorodność kształtów; dichotomia, wielokrotne rozgałęzienie, formy koralowate), barwę i budowę mufki grzybniowej, obecność i budowę ryzomorf, typ połączeń strzępek grzybni ekstramatrykalnej i obecność cystydii, tworzenie się kryształów soli na powierzchni ektomikoryz (Hilszczańska 2003).

Na początku lat 90. XX wieku rozwinięta została metoda identyfikacji grzybów ektomikoryzowych oparta na analizie DNA. Technika wykorzystująca łańcuchową reakcję polimerazy (tzw. PCR) sprzężoną z analizą polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RLFP) usprawniła zdolność dokumentowania różnorodności grzybów ektomikoryzowych. Dzięki tej metodzie grzyby mogą być identyfikowane bezpośrednio ze struktur wegetatywnych, a dane genetyczne są dostępne niemal bezpośrednio po wykonaniu analizy (Bruns i in. 1991). Zaletą tej metody jest możliwość zwielokrotnienia określonego fragmentu DNA grzybowego w wielu milionach kopii, począwszy od minimalnej ilości DNA, która może być wyekstrahowana z pojedynczego wierzchołka mikoryzowego (Gardes i Bruns 1993). Analizowanym fragmentem DNA grzybowego mikoryz jest zwykle rDNA (DNA jądrowe odpowiedzialne za sekwencję rRNA), a w jego obrębie regiony ITS (wewnętrzna sekwencja niekodująca) oraz IGS (zewewnętrzna sekwencja niekodująca). Zwielokrotnienie regionu ITS pozwala wykazać zmienność międzygatunkową grzybów mikoryzowych, a w przypadku zwielokrotnienia regionu IGS można poznać ich zróżnicowanie wewnątrzgatunkowe. Ponieważ u większości grzybów długość zwielokrotnionych fragmentów DNA może być taka sama, konieczna jest dalsza analiza przy użyciu endonukleaz, która umożliwi rozróżnienie produktów PCR charakterystycznych dla poszczególnych gatunków.

### 3. DODATNIE I UJEMNE STRONY METOD IDENTYFIKACJI EKTOMIKORYZ

Techniki molekularne bazują na obserwacji ITS oraz regionu rDNA, który wykazuje wysoki poziom zmienności pomiędzy gatunkami grzybów tworzących ECM i minimalne zróżnicowanie wewnątrzgatunkowe, dlatego jest dobrym wskaźnikiem składu gatunkowego ECM (Gardes i Bruns 1996). Kiedy grzybowy DNA uzyskany z jednej ektomikoryzy zostanie zwielokrotniony, region ITS poddaje się trawieniu enzymami restrykcyjnymi w celu uzyskania RFLP (restrykcyjnego fragmentu polimorficznego), który służy do wyróżnienia większości gatunków grzybów zaangażowanych w kolonizację mikoryzową (Karen i Nylund 1997, Aanen i in. 2001). Jeśli dysponujemy owocnikami, to wyizolowane z nich RFLP można porównać z RFLP pochodzącym z mikoryz, aby zidentyfikować symbionta grzybowego. Jeżeli mikoryzowe RFLP nie pasuje do RFLP owocnikowego, można odcinek ML5/ML6, stanowiący region mitochondrialnej podjednostki rDNA, zwielokrotnić i sekwencjonować, a następnie porównać z bazami danych (Horton i Bruns 2001), aby przypisać grzyb do rodziny. Sekwencjonowanie fragmentu ITS może zostać wykorzystane do określenia taksonomicznego pokrewieństwa grzybów ECM (Chambers i in., 1999).

Główne zalety technik molekularnych polegają na możliwości identyfikacji grzyba z względną pewnością i możliwości oszacowania zewnętrznej i wewnętrznej zmienności genetycznej (Dahlberg 2001).

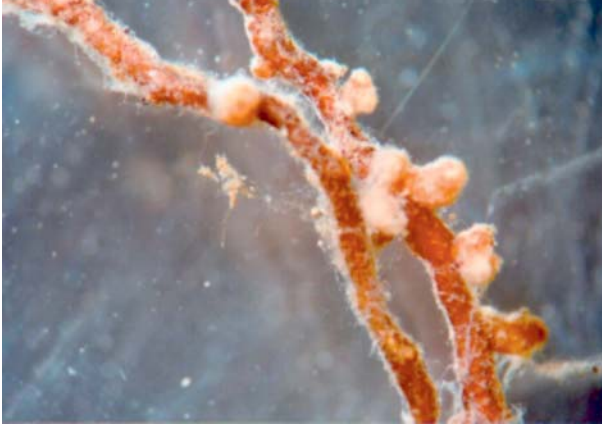
Do ich wad należy to, że powodzenie ekstrakcji i amplifikacji nie jest jednakowe dla wszystkich grzybów i istnieją niekiedy duże różnice. Stąd zastosowanie tej metody do przypadkowo zebranych korzeni, bez uprzedniej morfologicznej klasyfikacji, nie może służyć do ilościowego opisu zbiorowiska grzybów ECM. Należy również pamiętać o kosztach i czasie, jakiego wymagają analizy molekularne, co powoduje, że tylko mała część ektomikoryz może być badana tą metodą. Ponadto, homogeniczne pod względem morfologicznym gatunki grzybów mogą wykazywać małą zmienność w obrębie regionu ITS w zależności od miejsca pochodzenia, bez względu na roślinę-gospodarza, z którym tworzą mikoryzę. Oznacza to, że najbezpieczniejszą metodą identyfikacji jest porównywanie wzorów RFLP z mikoryz do wzorów RFLP uzyskanych z lokalnie lub regionalnie występujących owocników (Karen i in. 1997). Brak właściwych wzorców często sprawia, że nie można dopasować wzorów RFLP, nie uzyskuje się więc żadnych wskazówek, do której klasy (*Basidiomycetes* czy *Ascomycetes*) grzybów należy badany partner grzybowy. Ponadto, blisko spokrewnione gatunki mogą mieć pokrywające się wzory restrykcyjne, co czyni niemożliwym rozróżnienie gatunków biorących udział w kolonizacji mikoryzowej. Kolejną niedogodnością tej metody jest zróżnicowanie wewnątrzgatunkowe, które, podobnie jak pojedyncza miejscowa mutacja, może powodować obecność różnych wzorów RFLP, a zatem istnieje duże prawdopodobieństwo błędnej klasyfikacji gatunku grzyba tworzącego badany typ mikoryzy.

W przypadku niektórych grzybów mikoryzowych, np. z rodzaju *Cortinarius* (zasłonak), obejmujących wiele gatunków i często wykazujących polifimorfizm (wielopostaciowość), nie jest możliwe wyróżnienie gatunków metodą PCR RFLP, przy zastosowaniu tylko trzech enzymów trawiących. Badania prowadzone w Szwecji (Dahlberg i in. 1997) wykazały, że grupę *Cortinarius* (gatunki należące do rodzaju *Cortinarius*) tworzą liczne mikoryzy u sosny i świerka, szczególnie w wieku młodocianym gospodarza, do której włączono 14 gatunków o identycznym wzorze RFLP. Oznacza to, że nie jest możliwe uzyskanie informacji na temat rzeczywistej liczby gatunków należących do rodzaju *Cortinarius*, przy zastosowaniu wyłącznie metody RFLP. Liczebność gatunków z rodzaju *Cortinarius* pozostaje zatem nieoszacowana z powodu ich morfologicznych i sekwencyjnych podobieństw.

Morfotypowanie stosuje się już od wielu lat, aby rozróżnić mikoryzy tworzone przez różne grzyby (Haug i Oberwinkler 1987). Aby było ono efektywne, zaleca się dokładnie opisać znaczną ilość cech obserwowanych pod mikroskopem z użyciem dużego i małego powiększenia (Goodman i in. 1996). Od początku lat 80. ubiegłego wieku kilka grup badawczych opublikowało standardowe opisy ektomikoryz w Europie i Ameryce Północnej ułatwiające morfotypowanie (Agerer 1987–1997, Ingleby i in. 1990). Morfotypowanie ektomikoryz jest metodą stosowaną z wielkim powodzeniem przy określaniu specyfiki gospodarza (Massicotte i in. 1999), fizjologii ektomikoryz (Wallenda i Read 1999) i sukcesji (Visser 1995) oraz wpływu zabiegów hodowlanych (Jones i in. 1997), nawożenia (Rudawska 2001), efektu cieplarnianego (Rygiewicz i in. 2000) i zanieczyszczeń na zbiorowisko grzybów ektomikoryzowych (Roth i Fahey 1998). Jest również efektywną metodą selekcji blisko spokrewnionych grzybów ECM w celu dalszych badań genetycznych (Vralstad i in. 2000). Tą metodą można zbadać wiele wierzchołków korzeniowych we względnie krótkim czasie (setki w ciągu jednego dnia). Dokładność i szybkość morfotypowania zależy od indywidualnych zdolności i doświadczenia badacza wykonującego analizy. Nylund i in. (1995) oraz Mehmman i in. (1995) sugerują, że klasyfikacja morfologiczna może nie być zbyt precyzyjna. Nauczenie się tej metody zajmuje ponadto dużo czasu (Dahlberg 2001). W efekcie mogą być trudności w porównywaniu mikoryz pomiędzy laboratoriami czy pracowniami.

Techniki molekularne mogą być bardzo pomocne w potwierdzeniu dokładności klasyfikacji ektomikoryz w początkowym etapie badań. Niemniej jednak, pewne grzyby, które mogą być rozpoznane tylko przez zastosowanie PCR RFLP, nie mogą być wyróżnione morfologicznie nawet przez bardzo doświadczonych badaczy (Ebrhardt i in. 1999). Ta sama prawidłowość odnosi się do owocników i prawdopodobnie wynika z tego, że różnice genetyczne pojawiają się wcześniej niż różnice morfologiczne (Taylor i in. 2000). Ponadto, wciąż mało wiemy o poziomie fenotypowego zróżnicowania ektomikoryz rozwijających się na różnych gospodarzach i w różnych warunkach środowiskowych (Egger 1995).

Na rycinach nr 1 i 2 przedstawiono mikoryzy identyfikowane metodą PCR RFLP przy użyciu trzech endonukleaz oznaczonych symbolami *Hinf*I, *Mbo* I i *Tag* I. Mimo różnic morfologicznych są to te same ektomikoryzy, tworzone przez grzyb *Suillus bovinus* (Hilszczańska, dane niepublikowane).



**Ryc. 1.** Ektomikoryzy sosny zwyczajnej rosnącej na gruncie porolnym, tworzone przez *Suillus bovinus*. Wielkość fragmentu DNA (liczba par zasad): ITS (792); *Hinf* I (203 139 81 46 30); *Mbo* I (247 154 75); *Tag* I (187 84 60)

Fig. 1. Ectomycorrhiza of *Suillus bovinus* on roots of Scots pine on post-agricultural land. Size of DNA fragment (number of base pairs): ITS (792); *Hinf* I (203 139 81 46 30); *Mbo* I (247 154 75); *Tag* I (187 84 60)



**Ryc. 2.** Ektomikoryzy sosny zwyczajnej rosnącej na gruncie marginalnym, tworzone przez *Suillus bovinus*. Wielkość fragmentu DNA (liczba par zasad): ITS (784); *Hinf* I (205 140 83 50 34); *Mbo* I (241 148 68); *Tag* I (185 79 61)

Fig. 2. Ectomycorrhiza of *Suillus bovinus* on roots of Scots pine on marginal soil. Size of DNA fragment (number of base pairs): ITS (792); *Hinf* I (203 139 81 46 30); *Mbo* I (247 154 75); *Tag* I (187 84 60)

#### 4. PERSPEKTYWY USPRAWNIENIA IDENTYFIKACJI MIKORYZ

W ciągu ostatniego dziesięciolecia opublikowano liczne prace dotyczące zbiorowisk grzybów mikoryzowych, w których autorzy próbowali określić tożsamość partnera grzybowego. Do tej pory wykorzystanie opisu cech morfologicznych i anatomicznych ektomikoryz pozwoliło na identyfikację partnera grzybowego niewielkiej liczby badanych morfotypów (Fransson i in. 2000). Stąd dla usprawnienia identyfikacji ektomikoryz właściwe będzie stosowanie szczegółowego morfotypowania połączonego z sekwencjonowaniem fragmentu ITS (produktu PCR). Liczba mikoryz zidentyfikowanych na poziomie gatunku jest wciąż niewielka, co wynika ze słabo wyposażonych we wzory grzybowe baz danych. Stan ten można jednak zmienić, stosując porównanie sekwencji DNA. Połączenie metody PCR RFLP z sekwencjonowaniem jest obiecującym sposobem identyfikacji partnera grzybowego (Haug 2002, Sakakibara i in. 2002).

Sprawna identyfikacja ektomikoryz jest szczególnie ważna przy ocenie udatności zabiegu sztucznej mikoryzacji sadzonek, ocenie zmian sukcesyjnych w zbiorowiskach grzybów oraz przy ocenie rzeczywistej skuteczności chemicznych zabiegów zwalczania zgorzeli siewek.

Praca została złożona 7.07.2003 r. i przyjęta przez Komitet Redakcyjny 2.07.2004 r.

## LITERATURA

- Aanen D. K., Kuyper T. W., Hoekstra R. F. 2001. A widely distributed ITS polymorphism within a biological species of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma velutipes*. *Mycol. Res.*, 105: 284-290.
- Agerer R. 1987-1997. Colour Atlas of Ectomycorrhizae. Einhorn Verlag, Schwabisch-Gmünd.
- Agerer R. 1990. Studies of ectomycorrhizae. XXIV. Ectomycorrhizae of *Chroogomphus helveticus* and *C. rutilus* (*Gomphidiaceae*, *Basidiomycetes*) and their relationship to those of *Suillus* and *Rhizopogon*. *Nova Hedvigia* 50:1-63.
- Bruns T. D., White T., Taylor J. W. 1991. Fungal molecular systematics. *Annual Rev. Ecol. and Syst.*, 22: 525-564.
- Chambers S. M., Sawyer N. A., Cairney J. W. G. 1999. Molecular identification of co-occurring *Cortinarius* and *Dermocybe* species from southeastern Australian sclerophyll. *Mycorrhiza*, 9: 85-90.
- Conn C., Dighton J. 2000. Litter quality influences on decomposition, ectomycorrhizal community structure and mycorrhizal root surface acid phosphatase activity. *Soil Biol. Biochem.*, 32: 489-496.
- Concise Descriptions of North America Ectomycorrhizae. Mycologue Publications, Victoria, BC.
- Dahlberg A., Jonsson L., Nylund J. E. 1997. Species diversity and distribution of biomass above and below ground among ectomycorrhizal fungi in an old-growth Norway spruce forest in south Sweden. *Can. J. of Bot.*, 75: 1323-1335.
- Dahlberg A. 2001. Community ecology of ectomycorrhizal fungi: an advancing interdisciplinary field. *New Phytol.*, 150: 555-562.
- Eberhardt U., Walter L., Kottke I. 1999. Molecular and morphological discrimination between *Tylospora fibrillose* and *Tylospora asterophora* mycorrhizae. *Can. J. of Bot.* 77: 11-21.
- Egger K. N. 1995. Molecular analysis of ectomycorrhizal fungal communities. *Can. J. of Bot.* 73: S1415-S1422.
- Fontana A. 1963. Mycorrhizal symbiosis of *Hebeloma hiemale* with a Willow and a Poplar. *Allionia* 9.
- Frank A. 1885. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 3:128-145.
- Fransson P. M. A., Taylor A. F. S., Finlay R. D. 2000. Effects of continuous optimal fertilization on below-ground ectomycorrhizal community structure in a Norway spruce forest. *Tree Physiol.* 20: 599-606.
- Gardes M., Bruns T. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizas and rusts. *Mol. Ecol.* 2: 113-118.
- Gardes M., Bruns T. 1996. Community structure of ectomycorrhizal fungi in a *Pinus muricata* forest: Above- and below- ground views. *Can. J. of Bot.* 74: 1572-1583.
- Goodman D. M., Durall D. M., Trofymow J. A. 1996. Describing morphology and anatomy. [W:] Concise Descriptions of North America Ectomycorrhizae (D. M. Goodman, D. M. Durall, J. A. Trofymow, S. M. Berch eds): 3A.1-3A.5 Mycologue Publications, Victoria, BC.
- Goodman D. M., Durall D. M., Trofymow J. A., Berch S. M. (eds.) 1996-2000.
- Horton T. R., Bruns T. D. 2001. The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black-box. *Mol. Ecol.*, 10: 1855-1877.
- Haug I., Oberwinkler F. 1987. Some distinctive types of spruce mycorrhizae. *Trees-Struct. and Funct.*, 1: 172-188.

- Haug I. 2002. Identification of *Picea*-ectomycorrhizae by comparing DNA-sequences. *Mycol. Prog.* 1(2): 167-178.
- Hilszczańska D. 2003. Wpływ deszczowania na kolonizację mikoryzową i zawartość ergosterolu w korzeniach siewek sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) *Prace Inst. Bad. Leś.*, A, 4:55-64.
- Ingleby K., Mason P. A., Last F. T., Fleming L. V. 1990. Identification of ectomycorrhizas. ITE research publication no.5. Institute of Terrestrial Ecology. London: HMSO.
- Jones M. D., Durall D. M., Harniman S. M. K., Classen D. C., Simard S. W. 1997. Ectomycorrhizal diversity on *Betula papyrifera* and *Pseudotsuga menziesii* seedlings grown in the greenhouse or outplanted in single-species and mixed-plots in southern British Columbia. *Can. J. of For. Res.*, 27: 1872-1889.
- Jonsson L., Dahlberg A., Nilsson M. C., Zackrisson O., Karen O. 1999. Ectomycorrhizal fungal communities in late-successional Swedish boreal forests, and their composition following wildfire. *Mol. Ecol.*, 8: 205-215.
- Karen O., Hogberg N., Dahlberg A., Jonsson L., Nylund J. E. 1997. Inter- and intraspecific variation in the ITS-region of rDNA of ectomycorrhizal fungi in Fennoscandia as detected endonuclease analysis. *New Phytol.*, 142: 577-585.
- Karen O., Nylund J. E. 1997. Effects of ammonium sulphate on the community structure and biomass of ectomycorrhizal fungi in a Norway spruce stand in southwestern Sweden. *Can. J. of Bot.*, 75: 1628-1642.
- Massicotte H. B., Molina R., Tackaberry L. E. Smith J. E., Amaranthus M. P. 1999. Diversity and host specificity of ectomycorrhizal fungi retrieved from the adjacent forest sites by five host species. *Can. J. of Bot.*, 77: 1053-11076.
- Mehmann B., Egli S., Braus G. H., Brunner I. 1995. Coincidence between molecularly or morphologically classified ectomycorrhizal morphotypes and fruitbodies in spruce forest. [W:] *Biotechnology of Ectomycorrhizae-Molecular Approaches* (V. Stocchi, P. Bonfante, M. Nuti – eds). Plenum Press, New York: 41-52.
- Nylund J. E., Dahlberg A., Hogberg N., Karen O. G. K., Jonsson L. 1995. Methods for studying species composition of mycorrhizal fungal communities in ecological studies and environmental monitoring. [W:] *Biotechnology of ectomycorrhizae* (V. Stocchi ed.). Plenum Press, New York, 229-233.
- Roth D. R., Fahey T. J. 1998. The effects of acid precipitation and ozone on the ectomycorrhizae of red spruce saplings. *Water, Air and Soil Poll.*, 103: 263-276.
- Rygiel P. T., Martin K. J., Tuininga A. R. 2000. Morphotype community structure of ectomycorrhizas on Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii* Mirb. Franco) seedlings grown under elevated atmospheric CO<sub>2</sub> and temperature. *Oecology*, 124: 299-308.
- Rudawska M., Leski T., Gronowicz R. 2001. Mycorrhizal status of *Pinus sylvestris* L. nursery stock in Poland as influenced by nitrogen fertilization. *Dendrobiologia*, 46: 49-58.
- Sakakibara S. M., Jones M. D., Gillespie M., Hagerman S. M., Forrest M. E., Simard S.W., Durall D. M. 2002. A comparison of ectomycorrhiza identification based on morphotyping and PCR-RFLP analysis. *Mycol. Res.*, 106: 868-878.
- Taylor J. W., Jacobson D. W., Kroken S., Kasuga T., Geiser D. M., Hibbet D. S., Fisher M. C. 2000. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fun. Genet. and Biol.*, 31: 21-31.
- Trappe J. M. 1962. *Cenococcium graniform*-ts distribution, ecology, mycorrhiza and inherent variation. PhD Diss. University of Washington, Seattle, Washington. Van der Heijden E. W., Vries F. E., Kuyper T. W. 1999. Mycorrhizal association of *Salix repens* L. in succession of dune ecosystem. *Can. J. of Bot.*, 77: 1821-1832.
- Visser S. 1995. Ectomycorrhizal fungal succession in jack pine stands following wildfire. *New Phytol.*, 129: 389-401.
- Vralstad T., Fossheim T., Schumacher T. 2000. *Piceihiza bilorata* expression of the *Hymenoscyphus ericae* aggregate? *New Phytol.*, 145: 549-563.
- Wallenda T., Read D. J. 1999. Kinetics of amino acid uptake by ectomycorrhizal roots. *Plant, Cell and Envir.*, 22: 179-187.
- Zak B. 1973. Classification of ectomycorrhizae. [W:] *Ectomycorrhizae: their ecology and physiology* (G. C. Marks and T. T. Kozlowski, eds). Academic Press, New York.