

Określenie składu gatunkowego oraz stężenia zarodników grzybów występujących w gawrach niedźwiedzich



Raport z badań sfinansowanych ze środków funduszu leśnego Państwowego Gospodarstwa Leśnego Lasy Państwowe przekazanych Tatrzańskiemu Parkowi Narodowemu w 2016 roku.

Wykonawca: dr hab. inż. Wojciech Pusz, Zakład Fitopatologii i Mykologii, Katedra Ochrony Roślin, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Wrocław listopad 2016

1. Metodyka badań

Analizę powietrza gawr przeprowadzono metodą zderzeniową z wykorzystaniem aparatu Air Ideal 3P z użyciem podłoża hodowlanego PDA (Potato Dextrose Agar) firmy Biocorp. Próbkę powietrza zostały pobrane w następujących gawrach:

- *Nad Jaworzynką*: w roku 2015 wykonano pierwszą serię badań. Zimą 2014/2015 zimowała tam samica bez młodego. Podczas kolejnego zimowania, 2015/2016 stwierdzono w gawrze obecność samicy z młodym;
- *Nad Pisaną*: zimą 2015/2016 w gawrze zimował samiec Hugo;
- *Pod Granią*: zimą 2015/2016 w gawrze prawdopodobnie zimowała samica z młodym;
- *Głowniowa Nyża*: zimą 2015/2016 w gawrze prawdopodobnie zimowała samica z młodym;
- *Siwa Nyża*: gawra nie była zasiedlona od co najmniej 5 lat.

W trakcie analizy mykologicznej powietrza pobierano próbki o objętości 10 l i 50 l. W każdym obiekcie pomiar wykonywany był w trzech powtórzeniach. Dodatkowo wykonano analizę powietrza w okolicach gawr. Inkubację pobranych na podłoże PDA próbek powietrza prowadzono w temperaturze pokojowej (22 °C) przez okres 7 dni. Po zakończeniu inkubacji zliczano ukazujące się kolonie, oznaczono do gatunku wg. cech morfologicznych (próbki z 2015 roku) oraz na podstawie badań genetycznych (próbki z 2016 roku), a następnie obliczano liczbę jednostek tworzących kolonie (JTK) w przeliczeniu na 1000 l (1 m³) powietrza. Liczba kolonii grzybów wyrosłych na szalce przeliczano na 1 m³ powietrza wg wzoru:

$$X = (a \times 1000) / V$$

w którym: a – suma kolonii grzybów, które wyrosły na szalce pobranej próbki powietrza atmosferycznego, V – objętość pobranego powietrza atmosferycznego w litrach.

Analizie mykologicznej poddano także resztki roślinne znajdujących się w gawrze tj. gałęzie, igliwie, siano itp. Inkubację kolonii i ich oznaczenie wykonano identycznie jak w przypadku kolonii uzyskanych z powietrza gawr. Kolejnym etapem badań były badania molekularne.

Izolacja DNA

DNA było izolowane z 7-dniowych kolonii wyhodowanych na płynnej pożywce glukozowo-ziemniaczanej (PDB – Potato Dextrose Broth, Difco). Uzyskaną grzybnię przeplukano wodą sterylną i odsączono przy pomocy zestawu filtrującego składającego się z lejka Büchnera,

kolby i pompy próżniowej. Tak przygotowaną grzybnię poddano liofilizacji przez 2 doby w liofilizatorze CoolSafe (Scanvac), a następnie homogenizacji przy użyciu kwarcowych kulek w homogenizatorze MagnaLyser (Roche). DNA ekstrahowano z 30 mg sproszkowanej grzybni przy użyciu zestawu Genomic Mini AX Yeast (A&A Biotech).

Pomiaru stężenia uzyskanego DNA dokonano przy użyciu fluorometru Quantus (Promega). DNA rozcieńczono w wodzie dejonizowanej do stężenia $20 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ i przechowywano w temperaturze -20°C .

Reakcja PCR, sekwencjonowanie i analiza danych

Reakcję PCR przeprowadzono w objętości $37,5 \mu\text{l}$ zawierającej $2 \text{ mM}/\mu\text{l}$ MgCl_2 , $0,25 \text{ mM}/\mu\text{l}$ DTP i $0,05 \text{ U}/\mu\text{l}$ Taq polimerazy DNA pochodzących z odczynników 2xPCR MixPlus (A&A Biotech), po $0,6 \text{ pM}/\mu\text{l}$ dwóch starterów (ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' and ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3', White et al. 1990) oraz $4 \text{ ng}/\mu\text{l}$ DNA.

Amplifikacji dokonano w urządzeniu Eppendorf Mastercycler według protokołu reakcyjnego: denaturacja wstępna w 94°C przez 5 min., 35 cykli (94°C przez 1 min., 52°C przez 1 min., 72°C przez 2 min.) i końcowe wydłużanie w 72°C przez 5 min. Obecność produktów reakcji weryfikowano podczas rozdziału elektroforetycznego przeprowadzonego na żelu o 1.2% stężeniu agarozy (Pronadisa). W celu wizualizacji produktów w świetle, do żelu dodano odczynnik SimplySafe (EUR_x).

Produkty amplifikacji były oczyszczone i sekwencjonowane przez Genomed (Polska). Do analizy otrzymanych sekwencji użyto programu BioEdit Sequence Alignment Editor (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>). Analizę ClustalW przeprowadzono w programie Mega6 Toolbar (Tamura et al. 2013). Do identyfikacji gatunkowej na podstawie kontigów sekwencji wykorzystano *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)* w bazie NCBI (The National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

2. Wyniki

W trakcie przeprowadzonej analizy aeromykologicznej powietrza gawr stwierdzono obecność 13 gatunków grzybów (Tabela 1). Największą liczbę gatunków (10) grzybów notowano w powietrzu gawry *Nad Jaworzynką*, podczas analizy wiosennej, w kilka tygodni po wyjściu niedźwiedzi z młodym. Po 6 gatunków grzybów stwierdzono w gawrach: *Pod Granią* i *Główniowej Nyży*, które były prawdopodobnie zasiedlone przez samice z młodymi. Natomiast najmniej gatunków stwierdzono w gawrze *Nad Pisaną* w której zimował samiec Hugo, a także w roku 2015 w gawrze *Nad Jaworzynką*, która zimą 2014/2015 zajęta była przez samotną samicę. W niezasiedlonej od co najmniej 5 lat gawrze *Siwa Nyża* stwierdzono obecność 4 gatunków grzybów.

We wnętrzu gawr, w których zimowały samice z młodymi najwięcej zarodników należało do grzybów z rodzaju *Penicillium*. Z kolei w przypadku gawr gdzie nie zimowały samice z młodymi najwyższe stężenia zarodników zanotowano dla gatunku *Thysanophora*

penicillioides: około 6000 JTK/ m³ w gawrze *Nad Jaworzynką* w roku 2015 i prawie 7000 JTK/ m³ w gawrze samca Hugo (gawra *Nad Pisaną*). Gatunek ten stwierdzano na poziomie ponad 90 JTK/m³ gdy zimowała samica z młodym (gawra *Nad Jaworzynką*), 650 JTK/m³ w gawrze *Głowniowa Nyża* (gdzie prawdopodobnie była samica z młodym) i 340 JTK/m³ w niezasiedlonej gawrze *Siwa Nyża*. W gawrze *Pod Granią*, gdzie prawdopodobnie zimowała samica z młodym stężenie *T.penicillioides* osiągnęło stosunkową wysoką wartość bo ponad 3000 JTK/ m³. W powietrzu gawr stwierdzano także obecność innych grzybów takich jak: *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea* czy też *Trichoderma* spp.

Analizując stężenie jednostek tworzących kolonię w 1 m³ powietrza (JTK/m³) stwierdzono, że najwyższe wartości występowały w gawrach *Nad Pisaną* – 6700 JTK/m³ oraz w roku 2015 w gawrze *Nad Jaworzynką* – 6100 JTK/m³. Obydwie te gawry były wcześniej zasiedlone odpowiednio – przez samca oraz samotną samicę. Stężenia JTK w 1 m³ na poziomie około 5000 notowano w gawrach, w których prawdopodobnie zimowały samice z młodymi: *Pod Granią* i *Głowniowa Nyża*. Natomiast w gawrze *Nad Jaworzynką*, w kilka tygodni po wyjściu samicy z młodym wartość JTK/m³ wynosiła nieco ponad 800. W gawrze niezasiedlonej *Siwa Nyża* wartość ta wyniosła 600 JTK/m³.

Porównując stężenia zarodników w powietrzu wewnątrz gawr do stężenia jakie występowało na zewnątrz widać wyraźnie, że wartości JTK/m³ z wnętrza gawr są wielokrotnie wyższe niż te określone na otwartej przestrzeni (Tabela 2). Najwyższe stężenia stwierdzono w najbliższej okolicy gawry *Siwa Nyża* – ponad 1000 JTK/m³, a najniższe podczas analizy wiosennej w okolicy gawry *Nad Pisaną* – 270 JTK/m³. Najwyższe stężenia osiągały takie gatunki jak *T. penicillioides*, *B. cinerea* czy też grzyby z rodzaju *Penicillium*.

Najwięcej gatunków grzybów wyizolowanych z materiału roślinnego zgromadzonego w gawrze stwierdzono w gawrze *Pod Granią* – 6 gatunków. 3 gatunki grzybów wyizolowano z gawry *Nad Pisaną*; po 2 w gawrze *Nad Jaworzynką* i *Głowniowa Nyża*. Największym udziałem charakteryzował się grzyb *Mucor hiemalis* (gawry *Nad Pisaną* i *Pod Granią*). W gawrach *Nad Jaworzynką* i *Głowniowa Nyża* najwięcej było kolonii *Mortierella hyaline* (Tabela 3).

3. Omówienie wyników

Grzyby stanowią istotny element ekosystemu obiektów podziemnych pełniąc w nich różne role (destruenci, pokarm, pasożyty). Występują przede wszystkim na materii organicznej takiej jak odchody ludzi i zwierząt, czy też martwy materiał roślinny. W podziemiach grzyby występują najczęściej w postaci zarodników, które dostają się do wnętrza z prądami powietrza, wodą oraz są roznoszone przez zwierzęta zamieszkujące obiekty podziemne (nietoperze, gryzonie, stawonogi), a także przez ludzi (Tsuneda i in. 2011, Vanderwolf i in. 2013, Pusz i in. 2014). Najczęściej występującymi grzybami w podziemiach są grzyby z

rodzajów: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Fusarium*, *Trichoderma* oraz *Cladosporium* i *Alternaria* (Rusca i in. 2008, Pusz i in. 2014).

Spośród wymienionych rodzajów grzybów największym udziałem w tatrzańskich gawrach charakteryzowały się grzyby z rodzaju *Penicillium*: *P. biourgeianum*, *P. commune*, *P. swiecickii* oraz *Thysanophora penicillioides*, którego nazwa synonimowa brzmi *P. glaucoalbidum*. Grzyby z rodzaju *Penicillium* są znane jako saprotrofy oraz patogeny wtórne roślin. *T. penicillioides* jest wymieniany jako jeden z głównych gatunków powodujących dekompozycję igieł świerka (Koukol i in. 2008), stąd może być tłumaczony jego stosunkowo duży udział w powietrzu zarówno wewnątrz jak i na zewnątrz gawr. Grzyby z rodzaju *Penicillium* mogą mieć także potencjalnie negatywny wpływ na zdrowie człowieka oraz zwierząt, będąc przyczyną poważnych chorób infekcyjnych (Kuttin i Müller 1994), zakażenia organów wewnętrznych i zewnętrznych jak np. zakażenia skóry, szpiku, jelit, nerek, zapalenia rogówki, zapalenie płuc, wsierdza, otrzewnej, układu moczowego (Gamboa i in. 1996, Nielsen 2003) oraz alergii u ludzi i zwierząt (Cabral 2012), tym bardziej, że są zdolne do produkcji dużej liczby zarodników konidialnych (Pusz i in. 2014). Charakteryzują się również zdolnością do tworzenia mykotoksyn, które mogą występować w obiektach podziemnych (Grajewski i Twarożek 2004, Pławińska-Czarnak i Zarzyńska 2010). Mykotoksyny wykazują niekorzystny wpływ na zdrowie narażonych na kontakt z nimi ludzi oraz zwierząt wnikając do organizmu przez układ pokarmowy, oddechowy czy też skórę (Sweeney i Dobson 1998). Analizując wartości JTK/m³ powietrza gawr można stwierdzić, że w gawrze *Nad Pisaną*, gdzie stwierdzono stężenie zarodników na poziomie 6500 JTK/m³, oraz w gawrze *Nad Jaworzynką* (gdzie nie przebywała tam samica z młodym), a wartość JTK/m³ sięgała prawie 6000 JTK/m³, powietrze wg. Polskiej Normy (PN-89 Z-04111/03) jest uznane za powietrze zanieczyszczone i mogące wywierać negatywny wpływ na zdrowie człowieka (Tabela 5).

Tabela 5. Opis skali zanieczyszczenia powietrza bakteriami i promieniowcami wg zaleceń normy PN-89 Z-04111/02 oraz grzybami wg zaleceń normy PN-89 Z-04111/03

Stopień zanieczyszczenia powietrza	Stężenia mikroorganizmów w powietrzu (JTK/m ³)	
	Bakterie	Promieniowce
Silnie zanieczyszczone	$>3 \times 10^3$	$>1 \times 10^2$
Średnio zanieczyszczone	$1 \times 10^3 - 3 \times 10^3$	$1 \times 10 - 1 \times 10^2$
Niezanieczyszczone	$<1 \times 10^3$	$<1 \times 10^1$
		Grzyby
Powietrze zanieczyszczone, stwarzające zagrożenie dla człowieka		$>1 \times 10^4$

Powietrze zanieczyszczone, wywierające potencjalnie negatywny wpływ na człowieka	$5 \times 10^3 - 1 \times 10^4$
W przybliżeniu czyste powietrze atmosferyczne	$3 \times 10^3 - 5 \times 10^3$

Taki stan rzeczy wskazuje, że dłuższe przebywanie w tych gawrach w celach badawczych (np. podczas pobierania próbek) może stanowić potencjalne ryzyko dla zdrowia, szczególnie u osób, u których stwierdzono alergię na grzyby (Rusca i in. 2008, Pusz i Ogórek 2012). Nie wiadomo czy wysokie wartości stężenia zarodników grzybów wpływają negatywnie na zdrowie oraz kondycję zwierząt. W literaturze niewiele jest doniesień na ten temat. Niektórzy badacze z dużym prawdopodobieństwem stwierdzają, że obecność niektórych gatunków grzybów w powietrzu obiektów podziemnych może wpływać negatywnie na zdrowie przebywających tam zwierząt np. nietoperzy, przede wszystkim ze względu na ich zdolność do produkcji mykotoksyn lub prowadzić do mikoz oraz innych schorzeń układu oddechowego (Sweeney i Dobson 1998, Jurado i in. 2010). Przeprowadzone badania zimowisk nietoperzy wykazały, że oprócz mykotoksynotwórczych gatunków z rodzaju *Penicillium*, w powietrzu zimowisk nietoperzy stwierdzano także zarodniki grzybów z rodzaju *Aspergillus*, które również mogą stanowić potencjalne zagrożenie dla nietoperzy. Najwyższe wartości tych grzybów stwierdzano w styczniu, podobnie jak w przypadku *Penicillium* spp. Jest możliwe, że zarodniki tych grzybów zostały wniesione do wnętrza podziemi wraz z prądami powietrza, a także przez ludzi i zwierzęta, a następnie rozwijały się na martwej oraz żywej materii organicznej np. odchodach (Kokurewicz i in. 2016) czy też martwej materii organicznej jak np. siano gromadzone przez niedźwiedzie na czas zimowania (Pusz i in. 2015). Najwięcej siana stwierdzono w gawrze *Nad Pisaną* i tam stwierdzono tylko dwa gatunki grzybów oraz najwyższe ich stężenia. Natomiast w gawrze *Nad Jaworzynką*, w momencie gdy zimowała tam samica z młodym, dno gawry wyścielone było tylko świeżymi gałęziami roślin iglastych (kosodrzewina, świerk). W tej gawrze stwierdzono z kolei najwięcej gatunków grzybów przy jednocześnie najniższej wartości JTK/m³. Prawdopodobnie wydzielane przez pędy roślin iglastych związki aromatyczne powodowały dezynfekcję powietrza.

Spośród innych gatunków grzybów, które wyizolowano z martwego materiału roślinnego, którym wyścielone było dno gawry należy wspomnieć o gatunku *Mortierella hyaline*, który była izolowany także przez innych badaczy z gleby w jaskiniach i według niektórych autorów stanowi składnik mykocenozy obiektów podziemnych (Out i in. 2016). Z kolei grzyb *Sordaria fimicola*, który jest bardzo często izolowany z odchodów zwierząt, także tych przebywających w jaskiniach (Saleem i in. 2001) był izolowany z gawr *Nad Pisaną* oraz *Pod Granią*. Ciekawostką jest fakt, iż w gawrze *Nad Granią*, z podłoża wyizolowano także grzyba z rodzaju *Entomocorticium*. Grzyby te są opisywane jako jeden ze składowych mykocenoz korytarzy drążonych m.in. w świerkach przez różne gatunki korników, a także był izolowany z chrząszczy. Nie jest do końca znana rola tych grzybów ani w rozwoju owadów ani w procesie rozkładu drewna (Khadempour i in. 2012). Inne stwierdzone w podłożu gawr gatunki grzybów znane są jako typowe saprotrofy jak np. *Mucor hiemalis*, *P. commune* oraz *Alternaria alternata*. Niektórzy badacze podają informację o tym, iż niedźwiedzie mogą być

rezerwuarami grzybów patogenicznych dla ludzi w tym dermatofitów (Hubálek i Rudolf 2010). W prowadzonych badaniach nie stwierdzono tego typu gatunków.

Przeprowadzone badania gawr tatrzańskich były pierwszymi tego typu analizami na świecie. Dotychczasowe doniesienia wskazywały na domniemaną rolę grzybów w tworzeniu gawr w drzewach (Bull i in. 2000) natomiast nie badano gawr zlokalizowanych w niewielkich jaskiniach oraz szczelinach skalnych jak ma to miejsce w Tatrach. Nie badano również szczegółowo interakcji zachodzących na linii niedźwiedź – grzyby – środowisko chociaż sugerowano dosyć skomplikowane układy współzależności. Rizzo (2005) udowadnia, że masowe występowanie rdzy na *Pinus albicaulis*, powodujące jej zamieranie, może wpływać na populację niedźwiedzi grizzly, które na wyższych wysokościach odżywiają się nasionami tej rośliny. Wydaje się więc, że tego typu badania, powinno się poszerzyć nie tylko o aspekty mykologiczne ale również mikrobiologiczne. Uwagę powinno się zwrócić także na analizy chemiczne zarówno powietrza wewnątrz gawr jak i materii organicznej zalegającej na podłożu gawry, gdyż można mniemać, iż świeże gałęzie drzew iglastych tworzą barierę dezynfekcyjną dla rozwoju grzybów, mogących stanowić niebezpieczeństwo dla młodych.

4. Wnioski

- W gawrach gdzie zimowały samice z młodymi stwierdzono niższe wartości JTK/m³ powietrza przy jednocześnie większej liczbie gatunków, z kolei tam gdzie przebywały osobniki bez młodych wykazano znacznie wyższe wartości JTK/m³ przy jednocześnie niższej liczba gatunków,
- W powietrzu gawr gdzie stwierdzono zimowanie osobników bez obecności młodych – wartości JTK/m³ osiągały poziomy potencjalnie zagrażające zdrowiu człowieka
- Z materiału roślinnego, którym wyłożone było dno gawr izolowano gatunki: *Mortierella hyalina* (tam gdzie zimowała samica z młodymi) oraz *Mucor hiemalis* (samotne osobniki)

Literatura:

- Bull E.J., Akenson J.J. Henjum M.G. 2000. Characteristics of Black Bear Dens in Trees and Logs in Northeastern Oregon. *Northwestern Naturalist* 81, (3): 148-153.
- Cabral J.P. 2012 - Can we use indoor fungi as bioindicators of indoor air quality? Historical perspectives and open questions - *Sci of Total Environ* 408: 4285-4295
- Gamboa P, Jauregui I, Urrutia I, Antepara I, Gonzalez G, Mugica V. 1996. Occupational asthma in a coal miner. *Thorax* 51: 867-868
- Grajewski J, Twarożek M. 2004. The healthy aspects of the influence of moulds and mycotoxins. *Alergia*, 13: 45-45
- Hubálek Z., Rudolf I. 2010. Vertebrates as Hosts and Reservoirs of Zoonotic Microbial Agents. In: *Microbial Zoonoses and Sapronoses*. Springer Netherlands, p. 83-128.

- Jurado V., Laiz L., Rodriguez-Nava V., Boiron P., Hermosin B., Sanchez-Moral S., Saiz-Jimenez C. 2010. Pathogenic and opportunistic microorganisms in caves. *International Journal of Speleology*, 39:15-24.
- Khadempour L., LeMay V., Jack D., Bohlmann J., Breuil, C. 2012. The relative abundance of mountain pine beetle fungal associates through the beetle life cycle in pine trees. *Microbial ecology*, 64(4): 909-917.
- Kokurewicz T., Ogórek R., Pusz W., Matkowski K. 2016. Bats Increase the Number of Cultivable Airborne Fungi in the “Nietoperek” Bat Reserve in Western Poland. *Microbial Ecology* 72 (1): 36-48
- Koukol O., Beňová B., Vosmanská M., Frantík T., Vosátka M., Kovářová, M. 2008. Decomposition of spruce litter needles of different quality by *Setulipes androsaceus* and *Thysanophora penicillioides*. *Plant and soil*, 311(1-2): 151-159.
- Kuttin E.S., Müller J. 1994. The fungal flora of zoo animals' ears. *Mycoses* 37, (1-2): 59–60
- Nielsen KF. 2003. Mycotoxin production by indoor molds. *Fungal Genet. Biol.* 39, 103-117
- Out B., Boyle S., Cheeptham, N. 2016. Identification of fungi from soil in the Nakimu caves of Glacier National Park. *Microbiology & Immunology*, 2: 26-32.
- Pławińska-Czarnak J, Zarzyńska J. 2010. Mycotoxins in food products of animal origin. *Mikol. Lek.*, 17 (2): 128-133
- Polska Norma PN-89/Z-04111/03 (1989) Ochrona czystości powietrza. Badania mikrobiologiczne. Oznaczanie liczby grzybów mikroskopowych w powietrzu atmosferycznym (imisja) przy pobieraniu próbek metodą aspiracyjną i sedymentacyjną. Warszawa, Polski Komitet Normalizacji Miar i Jakości.
- Pusz W, Ogórek R. 2012. Potencjalny szkodliwy wpływ grzybów zasiedlających surowiec tytoniowy podczas przechowywania na pracowników magazynów. *Mikologia Lekarska*, 19 (1): 37-41
- Pusz W., Ogórek R., Uklańska-Pusz C., Zagożdżon P. 2014. Speleomycological research in underground Osówka complex in Sowie Mountains (Lower Silesia, Poland). *International Journal of Speleology*, 43 (1): 27–34.
- Pusz W., Płaskowska E., Weber R., Kita W. 2015. Assessment of the abundance of airborne fungi in cattle barn of dairy farm. *Polish Journal of Environmental Studies* 24 (1): 241-248.
- Rizzo D. M., 2005. Exotic Species and Fungi: Interactions with Fungal, Plant, and Animal Communities. *Mycology Series*, 23: 857.
- Rusca S., Charrière N., Droz P.O., Oppliger A. 2008. Effects of bioaerosol exposure on work-related symptoms among Swiss sawmill workers. *International Archive Occupational Environmental Health*, 81, 2008, s. 415–421.
- Saleem M., Lamb B. C., Nevo E. 2001. Inherited differences in crossing over and gene conversion frequencies between wild strains of *Sordaria fimicola* from “Evolution Canyon”. *Genetics*, 159(4): 1573-1593.
- Sweeney M, Dobson A. 1998. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* Species. *Int. J. Food Microbiol.* 43: 141-158
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A., and Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30:2725–2729.
- Vanderwolf K. J., Malloch D., Mcalpine D.F Forbes G.J. 2013. A world review of fungi, yeasts, and slime molds in caves. *International Journal of Speleology* 42(1): 77–96.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, 315-322. W: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White, eds. Academic Press, San Diego, CA

