

GRASLANDPADDENSTOELEN BOVEN EN ONDER DE GROND

Jorinde Nuytinck¹, Peter-Jan Keizer² & Sofia Gomes³

¹ Naturalis Biodiversity Center, Postbus 9517, 2300 RA Leiden, jorinde.nuytinck@naturalis.nl ² Kruisweg 23 3513CS Utrecht, p.j.keizer@planet.nl ³ Naturalis Biodiversity Center, Postbus 9517, 2300 RA Leiden, sofia.fernandesgomes@naturalis.nl

Nuytinck, J., Keizer, P.-J. & Gomes, S. 2020. Grassland fungi on and in the soil. *Coolia* 63(3): 117–132.

An inventory of fungi was carried out in two unfertilized, yearly mown Arrhenatherion grassland sites which differ in history and vascular plant species composition. Three methods were compared: searching for fungal fruit bodies in the field (three visits in 2017), fungal DNA extraction from soil samples and fungal DNA extraction from plant roots. The analysis of the fungal DNA was based on the ITS region of the genome. The study focused on so-called “typical” grassland fungi (genera *Hygrocybe*, *Camarophylloopsis*, *Entoloma*, *Clavaria*, *Clavulinopsis*, *Ramariopsis*, *Dermoloma* and *Geoglossum*), that cannot be grown axenically.

According to the three methods the two sites differed markedly, the older site being much richer in “typical” grassland fungi. The search for fruit bodies yielded many more species of larger fungi like Agaricales than the DNA analysis. On the other hand the DNA of several species that have never been seen in the field was detected, indicating that species are present which apparently do not or rarely produce fruit bodies. In plant roots fungal DNA of some grassland fungi was detected, suggesting that they may play a role in the ecological functioning of plants.

The interpretation of DNA data using GenBank offered some difficulties, especially for some genera of grassland fungi. It was concluded that several groups of fungi need more (reliable) reference data in GenBank.

Er bestaan tegenwoordig technieken om door middel van DNA-detectie na te gaan welke soorten schimmels in de bodem voorkomen. In de herfst van 2017 bestond de gelegenheid om hier nader gebruik van te maken doordat Lisa Kam, student Biotechnologie (Life Sciences) aan de InHolland Hogeschool ervoor had gekozen om onderzoek aan bodemschimmels te doen. Omdat nog altijd niet is opgehelderd van welke bodemcomponenten de ‘typische’ graslandpaddenstoelen leven en wat hun rol in het ecosysteem is, leek het ons een interessant studie-onderwerp om hierover nadere gegevens te verzamelen. Het onderzoek zou als test kunnen dienen om te zien of de DNA-methode extra zinvolle informatie zou opleveren vergeleken met het opzoeken van bovengronds groeiende vruchtlichamen. We hadden overigens niet de illusie om het raadsel van de graslandpaddenstoelenecologie eventjes op te lossen.

Deze typische graslandpaddenstoelen behoren tot een groep geslachten die de volgende ecologische kenmerken gemeen hebben: 1. Ze groeien overwegend in onbemeste maar wel continu beheerde graslanden, die 2. veelal een lange periode (minstens enkele tientallen jaren) ononderbroken in gebruik zijn geweest en 3. in het laboratorium niet kunnen worden gekweekt. Vanwege dat laatste punt is het erg lastig te bepalen welke voedingsbronnen deze soorten gebruiken en welke ecologische functie ze vervullen. Bij gebrek aan andere informatie wordt veelal aangenomen dat ze een of andere bron van (dood) organisch materiaal als voeding gebruiken, dus een saprotrofe levenswijze hebben. Volgens Halbwachs et al. (2018) is er echter meer en meer reden aan te nemen dat Wasplaten als endofyt (hier: binnen



in andere planten levend, onbekend hoe precies) een biotrofe levenswijze bezitten, met name voor de koolstofbronnen. Voor de stikstofbronnen opperen deze onderzoekers als een mogelijkheid dat de wasplaten leven van of met bodemdieren.

Het gaat hier om de bekende grasland bewonende paddenstoelen van de geslachten Wasplaten (*Hygrocybe*, *Camarophyllopsis*), Satijnzwam (*Entoloma*), Knotszwammen (*Clavaria*, *Clavulinopsis*, *Ramariopsis*), Barsthoed (*Dermoloma*) en Aardtong (*Geoglossum*). Een uitstekend overzicht van de algemene ecologie van deze groep en ecologische karakterisering van individuele soorten van graslandpaddenstoelen is te vinden in Arnolds (2015). Overigens groeit een aantal soorten van deze geslachten soms ook in bossen op rijke bodem. Behalve soorten uit de voornoemde geslachten groeien in graslanden ook vele soorten paddenstoelen waarvan wel duidelijk is waarop ze groeien, zoals Champignons (*Agaricus spp.*) op in de bodem aanwezige humus, Breeksteeltjes (*Conocybe spp.*) op grasresten, of aan mossen gebonden Mosklokjes (*Galerina spp.*). In dit onderzoek ging de aandacht vooral uit naar de hierboven benoemde ‘typische’ graslandpaddenstoelen.

Bij dit onderzoek willen we de verschillen tussen twee graslanden bestuderen. Het betreft hierbij de verschillen in:

- 1) de soortensamenstelling op grond van de gevonden paddenstoelen in het veld;
- 2) de soortensamenstelling op grond van de analyse van in de bodem aangetroffen schimmel-DNA;
- 3) de soortensamenstelling aan de hand van schimmel-DNA dat in plantenwortels is aangetroffen.

Eventuele verschillen in resultaten van de drie methoden willen we evalueren.

Studiegebieden

Er is voor gekozen om twee onderling verschillende, maar qua beheer, bodemtype (voedselrijke maar niet bemeste rivierklei) en een aantal plantensoorten overeenkomstige graslandgebieden te vergelijken. De mycoflora is in beide terreinen boven- en ondergronds onderzocht door: a. bodemmonsters te verzamelen, b. wortels van vier soorten planten te verzamelen en c. bovengronds naar vruchtlichamen te zoeken. De bodemmonsters en de wortelmonsters zijn in het laboratorium onderzocht op schimmel-DNA. Van vruchtlichamen van enkele gevonden soorten is de DNA barcode bepaald, d.w.z. zijn de DNA-eigenschappen bepaald volgens de standaard methode.

De studiegebieden waren het graslandreservaat op het binnenfort van Fort Rhijnauwen (FRN) nabij Bunnik (Figuur 5) en het noord-talud van het Amsterdam Rijnkanaal (ARK) aan weerszijden van de Beusichemmerweg direct bij de brug over het ARK, bij het dorp 't Goy (Figuur 6). De graslanden zijn geselecteerd vanwege het feit dat er geen bomen zijn aangeplant, wat op de meeste plaatsen langs het ARK wel het geval is. Vier soorten planten moesten in beide gebieden aanwezig zijn: de kruiden Smalle weegbree (*Plantago lanceolata*) en Duizendblad (*Achillea millefolium*) en de grassen Rood zwenkgras (*Festuca rubra*) en Rietzwenkgras (*Festuca arundinacea*). Het beheer kwam in beide gebieden enigszins overeen.

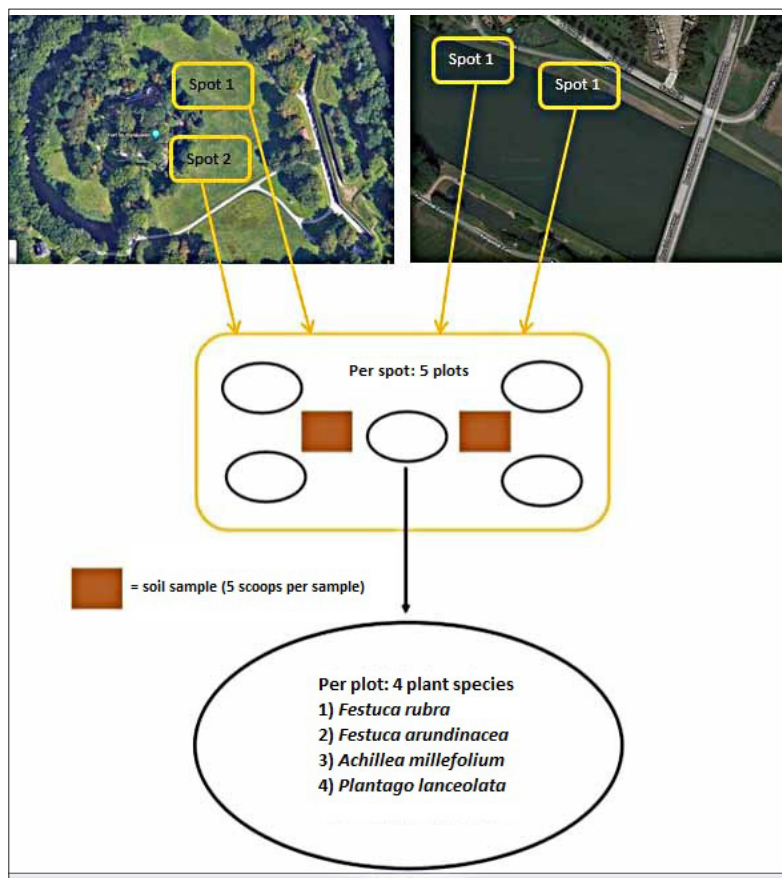
Het voor dit onderzoek benutte deel van het grasland op het FRN heeft een oppervlak van ca. 1 ha. Dit grasland bestaat al sinds de aanleg van het fort in 1869. Het fort was een militair object en dus in gebruik en beheer bij Defensie. Het grasland heeft aanvankelijk dienst gedaan als agrarisch gebruikt weiland. Sinds 1975 is het fort bij Staatsbosbeheer in beheer



gekomen, aanvankelijk met schapenbegrazing. Vanaf 1994 bestaat het beheer uit twee keer per jaar maaien en afvoeren van het maaisel. Al die tijd is het grasland niet of weinig bemest geweest. De vegetatie bestaat uit een bloemrijk Glanshaverhooiland met veel Margrieten en Glanshaver als meest voorkomend gras. Van het grasland op het FRN zijn vrij veel oude gegevens over paddenstoelen bekend want er komen bijzondere graslandpaddenstoelen voor, waardoor het vaak is bezocht. Voor dit onderzoek zijn de gegevens van het karteringsproject gebruikt over de periode 1997 – 2016, aangevuld met enige waarnemingen uit 2017, zie tabel 1 en 2. In 2017 zijn er drie veldbezoeken geweest: 6-10-2017, 13-10-2017, 21-10-2017.

Het onderzochte grasland langs het ARK beslaat ca. 2000 m². Het ARK is (voor wat betreft dit gedeelte) in 1952 opgeleverd. Het kanaal werd voorts tussen 1965 en 1981 verbreed. Het ziet er naar uit dat de aanmeerplaats bij de brug plus de taluds, waar ons onderzoek plaats vond, in 1981 zijn aangelegd. De graslanden op de taluds zijn na een waarschijnlijke initiële inzaai met graszaad jaarlijks 2x gemaaid met afvoer van het maaisel. De vegetatie is wellicht nooit bemest. Het beheer is gedurende vele jaren slordig uitgevoerd waarbij met zware machines wordt gewerkt en veel grasmaaisel onopgeruimd achter is gebleven. De vegetatie is matig arm aan bloeiende kruiden en wordt gedomineerd door Rietzwenkgras en Kropaar, met als voornaamste bloeiende kruiden Scherpe boterbloem en Gewone berenklauw. Het behoort tot een (matig) soortenarme variant van het Glanshaverhooiland. Van de mycoflora van het grasland langs het ARK was niets bekend, maar de veronderstelling was dat het – gezien de minder waardevolle vegetatie – arm zou zijn aan graslandpaddenstoelen. In 2017 zijn drie bezoeken gebracht aan dit terrein: 19-9-2017, 11-10-2017, 4-11-2017. Het resultaat is ook te zien in tabel 1 en 2.

Bij deze excursies is een klein aantal paddenstoelen ingezameld voor nader onderzoek van het DNA.



Figuur 1. De twee onderzoekslocaties met een schema van de bemonstering hierin. Links: Fort Rhijnauwen, rechts: Amsterdam Rijnkanaal. Foto's: Google Maps.

Wetenschappelijke naam	Nederlandse naam	RL	FRN	ARK
<i>Camarophyllopsis hymenoccephala</i>	Donkere wasplaat (Figuur 4)	BE		99
<i>Clavaria daulnnyi</i>	Grijze knotszwam			10
<i>Clavaria falcata</i>	Spitse knotszwam		>15	
<i>Clavaria fragilis</i>	Wormvormige knotszwam	KW	>40	59
<i>Clavaria greletii*</i>	Donkere knotszwam	EB	2	
<i>Clavaria incarnata</i>	Zonnegloedknotszwam	BE	2	5
<i>Clavaria straminea</i>	Strogele knotszwam	BE		1
<i>Clavulinopsis corniculata</i>	Sikkelkoraalzwam	KW	X	
<i>Clavulinopsis helvola</i>	Gele knotszwam	GE	X	
<i>Clavulinopsis laeticolor</i>	Fraaie knotszwam	KW	X	X
<i>Clavulinopsis luteoalba</i>	Verblekende knotszwam	KW	X	
<i>Clavulinopsis microspora</i>	Kleinsporige knotszwam (Figuur 3)	GE		2
<i>Dermoloma cuneifolium</i>	Grauwe barsthoed	BE		42
<i>Dermoloma josserandii*</i>	Variabele barsthoed	BE	21	
<i>Dermoloma pseudocuneifolium</i>	Kleine barsthoed	BE	1	1
<i>Entoloma costatum</i>	Grote trechtersatijnzwam	BE		3
<i>Entoloma incanum</i>	Groensteelsatijnzwam	BE	X	
<i>Entoloma infula</i>	Helmsatijnzwam	BE	7	
<i>Entoloma juncinum</i>	Rondsporige satijnzwam	KW	X	
<i>Entoloma longistriatum*</i>	Vaalgeel staalsteeltje	BE	3	
<i>Entoloma poliopus</i>	Somber staalsteeltje	KW	X	
<i>Entoloma politum</i>	Nitreuze elzensatijnzwam	KW	X	
<i>Entoloma sericeum</i>	Bruine satijnzwam		X	
<i>Entoloma sodale</i>	Bleekbruin staalsteeltje	BE	X	
<i>Entoloma solstitiale</i>	Grauwstelige helmsatijnzwam	BE	X	
<i>Entoloma velenovskyi</i>	Klokhoedsatijnzwam	GE	X	
<i>Geoglossum cookeanum</i>	Brede aardtong	KW		1
<i>Geoglossum fallax</i>	Fijngeschubde aardtong		X	
<i>Hygrocybe acutoconica*</i>	Puntmutswasplaat	KW	6	
<i>Hygrocybe ceracea</i>	Elfenwasplaat	GE	8	
<i>Hygrocybe conica</i>	Zwartwordende wasplaat		36	17
<i>Hygrocybe fornicata</i>	Ridderwasplaat	BE	X	
<i>Hygrocybe glutinipes</i>	Hooilandwasplaat	KW	X	
<i>Hygrocybe insipida</i>	Kabouterwasplaat	KW	X	
<i>Hygrocybe irrigata*</i>	Grauwe wasplaat	KW	4	
<i>Hygrocybe obrussea</i>	Wantsenwasplaat	BE	17	
<i>Hygrocybe pratensis</i>	Weidewasplaat	KW	1	
<i>Hygrocybe pratensis var. pallida</i>	Bleke weidewasplaat	KW	3	
<i>Hygrocybe psittacina</i>	Papegaaizwammetje	GE	2	140
<i>Hygrocybe virginea var. fuscescens</i>	Gevlekt sneeuwzwammetje	GE	X	
<i>Hygrocybe virginea var. virginea</i>	Gewoon sneeuwzwammetje	GE	X	176
<i>Ramariopsis kunzei</i>	Ivoorkoraaltje	BE	X	
<i>Ramariopsis tenuiramosa*</i>	Bezemkoraaltje	BE	1	4
<i>Trichoglossum hirsutum</i>	Ruige aardtong	KW		1
Aantal soorten	Totaal aantal 'typische' graslandfungi: 44		36	16



Tabel 1. Paddenstoelenwaarnemingen van het Amsterdam Rijnkanaal en Fort Rhijnauwen. 'Typische' graslandfungi. **RL:** Rode Lijst (2008) met RL categorieën. **FRN:** Fort Rhijnauwen, grasland binnenfort, periode 1997 – 2017; waarnemers: E. van den Dool, P.J. Keizer, B. Tolsma, M. Veerkamp. Aangegeven aantallen zijn in 2017 aangetroffen. **ARK:** Grasland langs het Amsterdam Rijnkanaal (ARK) in 2017, waarnemers: P.J. Keizer, J. Nuytinck. **X:** Aantallen vruchtlichamen zijn niet opgegeven. **>4** betekent: minstens 4 exemplaren; bij het eerste terreinbezoek waren van de aangetroffen soorten geen aantallen vruchtlichamen bepaald. *****: in 2017 voor het eerst in FRN waargenomen

Onderzoeksmethode

Binnen elk van de twee graslanden zijn twee deelgebiedjes geselecteerd, ongeveer 100 m uit elkaar gelegen. Dit is gedaan om de variatie binnen het terrein beter te benutten dan wanneer alle monsters op één plekje zouden zijn verzameld. In elk van die deelgebiedjes zijn vijf plotjes van ca. 5 x 5 m geselecteerd, gebaseerd op de aanwezigheid van vier geselecteerde plantensoorten: Rood zwenkgras, Rietzwenkgras, Duizendblad en Smalle weegbree. In elk deelgebied zijn twee bodemmonsters gestoken, met een cilinder van ca. 5 cm diameter en ongeveer 10 cm diep (Figuur 2). Eén bodemonster bestond uit een goed gemengd samenvoegsel van 5 dergelijke steken, verzameld in plastic zakjes voor verder onderzoek. Zo zijn er in totaal 8 bodemmonsters verzameld: 2 terreinen × 2 deelgebieden × 2 monsters.

In ieder plot werden van elk van de vier plantensoorten 3 exemplaren uitgegraven, met wortels en al. Deze werden in plastic zakjes gestopt voor nadere verwerking. Zo ontstonden 2 terreinen × 2 deelgebieden × 5 plots × 4 plantensoorten × 3 exemplaren per plantensoort = 240 wortelmonsters.

De wortels werden van de plant gesneden, goed gewassen en aan het oppervlak gesteriliseerd. Voor verdere analyse werden steeds 4–6 stukjes wortel van 1–2 cm lengte gebruikt.

DNA-analyse

Uit de 240 wortelmonsters, de 8 bodemmonsters en de ingezamelde paddenstoelen werd al het aanwezige DNA geëxtraheerd. Door diverse oorzaken is er een aantal monsters afgevalen waardoor er uiteindelijk een wat lager aantal monsters gebruikt kon worden. Vervolgens werd selectief de ITS-regio van het DNA van de fungi geamplificeerd. Via verschillende technieken werden uiteindelijk die DNA-sequenties afgelezen. De precieze beschrijving van het voorbereiden van de bodem- en wortelmonsters en van de ingezamelde paddenstoelen staat in detail in het stageverslag van Lisa Kam. Dit is te technisch en te gedetailleerd om hier weer te geven. Geïnteresseerden kunnen dit bij de auteurs aanvragen.

Voor de DNA-analyse is, zoals gebruikelijk bij dergelijk werk aan paddenstoelen, gebruik gemaakt van de ITS-regio. Dit is om verschillende redenen geschikt voor dit doel (zie hiervoor Wikipedia):

- het is een relatief klein stuk DNA, dat gemakkelijk geamplificeerd of vermeerderd kan worden;
- het is gemakkelijk uit kleine hoeveelheden DNA te detecteren omdat het in veel kopieën voorkomt;
- het evolueert snel, zodanig dat er over het algemeen verschillen op soortniveau zichtbaar zijn.



Tabel 2. Paddenstoelenwaarnemingen van het Amsterdam Rijnkanaal en Fort Rhijnauwen. Overige graslandfungi. Voor verdere uitleg zie bijschrift van Tabel 1.

Wetenschappelijke naam	Nederlandse naam	RL	FRN	ARK
<i>Agaricus arvensis</i>	Gewone anijschampignon		X	
<i>Agaricus campestris</i>	Gewone weidechampignon	GE	X	>4
<i>Agaricus xanthoderma</i>	Karbolchampignon		X	
<i>Agrocybe vervacti</i>	Gelige leemhoed			3
<i>Bolbitius titubans</i>	Dooiergele mestzwam		X	1
<i>Bovista plumbea</i>	Loodgrijze bovist		X	>1
<i>Calocybe carnea</i>	Roze pronkridder		X	
<i>Calvatia excipuliformis</i>	Plooivoetstuiwzwam		X	2
<i>Calyprella capula</i>	Brandnetelklokje		X	
<i>Campanella caesia</i>	Gelatineschelpje			1
<i>Chamaemyces fracidus</i>	Druppelparasolzwam	BE	1	
<i>Clitocybe agrestis</i>	Bleke veldtrechterzwam		X	
<i>Clitocybe amarescens</i>	Mesttrechterzwam			5
<i>Clitocybe rivulosa</i>	Giftige weidetrechterzwam		X	
<i>Conocybe brachypodii</i>	Oker breeksteeltje		2	
<i>Conocybe echinata</i>	Donker breeksteeltje		X	
<i>Conocybe juniana</i>	Tuinbreeksteeltje		X	4
<i>Conocybe macrocephala</i>	Parkbreeksteeltje			3
<i>Conocybe mesospora</i>	Weidebreeksteeltje		X	X
<i>Conocybe ochrostriata</i>	Oker breeksteeltje		1	1
<i>Conocybe pilosella</i>	Berijpt breeksteeltje			>15
<i>Conocybe pubescens</i>	Donzig breeksteeltje		X	
<i>Conocybe rostellata</i>	Bermbreeksteeltje			3
<i>Conocybe subovalis</i>	Dikvoetbreeksteeltje		X	
<i>Coprinus comatus</i>	Geschubde inktzwam		X	
<i>Deconica inquilina</i>	Halmkaalkopje		X	
<i>Deconica micropora</i>	Kleinporig kaalkopje			1
<i>Deconica philipsii</i>	Schelpkaalkopje			X
<i>Galerina clavata</i>	Groot mosklokje		X	1
<i>Galerina graminea</i>	Grasmosklokje		X	19
<i>Galerina unicolor</i>	Weidemosklokje		X	
<i>Galerina vittiformis</i> sl, incl. <i>atkinsoniana</i>	Barnsteenmosklokje sl, incl. Behaard barnsteenmosklokje		X	
<i>Hemimycena candida</i>	Smeerwortelmycena		X	17
<i>Hemimycena delectabilis</i>	Witte stinkmycena	KW	10	
<i>Hemimycena mairei</i>	Wasplaatmycena	BE	X	2
<i>Lepiota cristata</i>	Stinkparasolzwam			X
<i>Lepista sordida</i>	Vaalpaarse schijnridderzwam		X	>6
<i>Leratiomyces laetissimus</i>	Oranjegeel kaalkopje	KW		5

Vervolg Tabel 2 op p. 124



In de mycologie wordt deze ITS-regio erg veel gebruikt, o.a. bij het z.g. barcoding project. Door de waargenomen variatie in dit stukje DNA is het meestal geschikt om verschillen tussen soorten te onderscheiden. Ook is het geschikt om sequenties te relateren aan reeds bestaande (en gepubliceerde) gegevens en om evolutionaire verwantschappen te bepalen tussen nauw verwante soorten. Een andere toepassing is om schimmel-DNA in planten te detecteren, bijvoorbeeld om de schimmel in mycorrhiza's te identificeren.



Figuur 2. Bodem- en plantenmonsters verzamelen langs het Amsterdam Rijnkanaal. (Foto: Peter-Jan Keizer)

Nadat de basenvolgorde van al die stukken ITS in het DNA dat in de bodem of in de plantenwortel of in een verzamelde paddenstoel is bepaald, worden de volgende stappen uitgevoerd. Als eerste worden de stukjes ITS gegroepeerd, zodanig dat de sterk op elkaar gelijkende stukken bij elkaar worden geplaatst. Hiervoor wordt gewoonlijk als grens gehanteerd dat de gelijkenis minstens 97% moet zijn om in dezelfde groep te komen. Deze groepen worden OTU's (Operational Taxonomic Units) genoemd, een ruwe benadering van wat we 'soorten' noemen.

Vervolgens wordt de basenvolgorde van elke OTU vergeleken met de resultaten van eerder onderzoek, dat gepubliceerd is. De publiekelijk toegankelijke online database 'GenBank' bevat veel gegevens over gepubliceerde basenvolgordes van organismen. Als de overeenkomst van het verzamelde (en vermeerderde) DNA uit de bodem, plantenwortel of paddenstoel met de referentie in GenBank goed is (bijvoorbeeld meer dan 97%), kan de naam die in GenBank bij die referentie vermeld stond aan de verzamelde collectie gekoppeld worden. In het geval van bodemonsters of plantenwortels gaat het om meerdere tot vele soorten schimmel-DNA; dan is het resultaat een lange lijst met (voorgestelde) namen. Als één vruchtlichaam of meerdere vruchtlichamen van één soort zijn verzameld, zou er één naam tevoorschijn moeten komen.

Resultaten

1) Verschillen tussen de terreinen op grond van de gevonden paddenstoelen

De in beide gebieden waargenomen paddenstoelen staan vermeld in tabellen 1 en 2: voor de 'typische' graslandsoorten en de overige graslandsoorten. Direct valt het hoge aandeel van Rode-Lijstsoorten onder de typische graslandpaddenstoelen op. Deze zijn immers kenmer-



<i>Lycoperdon lividum</i>	Melige stuifzwam		X	
<i>Lycoperdon nigrescens</i>	Zwartwordende stuifzwam		X	
<i>Marasmius oreades</i>	Weidekringzwam		X	
<i>Mycena aetites</i>	Grijsbruine grasmycena		X	
<i>Mycena filopes</i>	Draadsteelmycena			1
<i>Mycena flavescens</i>	Geelsnedemycena		X	
<i>Mycena flavoalba</i>	Bleekgele mycena		X	18
<i>Mycena leptcephala</i>	Stinkmycena		20	
<i>Mycena olivaceomarginata</i>	Bruinsnedemycena		5	>52
<i>Mycenella trachyspora</i>	Gezellig taaisteeltje	GE		1
<i>Panaeolina foenicisii</i>	Gazonvlekplaat		X	
<i>Panaeolus acuminatus</i>	Spitse vlekplaat		X	
<i>Parasola leiocephala</i>	Geelbruin plooirokje		X	
<i>Parasola plicatilis s.l.</i>	Plooirokje sl.			1
<i>Parasola plicatilis s.s.</i>	Gewoon plooirokje		1	
<i>Psathyrella clivensis</i>	Kalkfranjehoed		X	2
<i>Psathyrella cf. fatua</i>	Lentefranjehoed	KW		1
<i>Psathyrella marcescibilis</i>	Spaanderfranjehoed			X
<i>Psathyrella microrhiza</i>	Kortwortelfranjehoed		X	
<i>Psathyrella prona*</i>	Kleine grasfranjehoed		1	
<i>Psilocybe semilanceata</i>	Puntig kaalkopje	GE	X	
<i>Rickenella fibula</i>	Oranjeel trechtertje		X	
<i>Rickenella swartzii</i>	Paarsharttrechtertje		X	
<i>Stropharia caerulea</i>	Valse kopergroenzwam			1
<i>Stropharia coronilla</i>	Okergele stropharia		X	>3
<i>Tubaria conspersa</i>	Zemelig donsvoetje		X	
<i>Tubaria furfuracea</i>	Gewoon donsvoetje		X	2
<i>Vascellum pratense</i>	Afgeplatte stuifzwam			>31
<i>Volvarella gloiocephala</i>	Gewone beurszwam			1
Totaal aantal soorten	Totaal aantal Overige graslandfungi 67		49	35

kend voor lang in beheer zijnde onbemeste graslanden. De twee gebieden verschillen vrij sterk in mycologisch opzicht. Het grasland van het Fort Rhijnauwen is met 85 soorten aanzienlijk soortenrijker dan het grasland langs het ARK met 51 soorten. Hierbij moet wel worden aangetekend dat het aantal waarnemingsjaren en het totaal aantal bezoeken in het tweede terrein veel lager waren, terwijl ook de oppervlakte ervan kleiner is. Het aantal typische graslandpaddenstoelen was langs het ARK minder dan de helft van die op het Fort, waarbij de grote verschillen vooral zitten in de aantallen soorten satijnzwammen en wasplaten. Dat is in overeenstemming met de verwachting. Het vermoeden dat het grasland langs het ARK van geringe mycologische betekenis is, bleek echter niet gerechtvaardigd. Zoals in Tabellen 1 en 2 is te zien, komt hier sinds de 38-jarige ontwikkeling van het grasland toch al een



aantal bijzondere soorten voor, waaronder ook graslandpaddenstoelen, zoals de Donkere wasplaat (*Camarophyllopsis hymenoccephala*), Kleinsporige knotszwam (*Clavulinopsis microspora*), Grote trechtersatijnzwam (*Entoloma costatum*) en het Kleinporig kaalkopje (*Deconica micropora*).

2) Soorten aangetoond via in de bodem aangetroffen schimmel-DNA

In totaal zijn ongeveer 2000 OTU's ('soorten') bij dit onderzoek gedetecteerd, zowel in de bodemmonsters als in de plantenwortels. Dat is wel een illustratie van de enorme biodiversiteit aan schimmels die op zo'n beperkte oppervlakte voorkomt. Natuurlijk weten we niet welk aandeel hiervan biologisch actief is in het ecosysteem. Een deel van het DNA kan afkomstig zijn van vanuit de omgeving aangewaaide sporen, of ze behoren anderszins niet tot de reguliere bewoners van het grasland-ecosysteem. Een aantal soorten is mogelijk in het gebied aanwezig zonder ooit of hoogst zelden te fructificeren. Veel schimmels behoren ook tot gist-achtige groepen of plantenpathogenen of nog andere groepen van schimmels die geen macroscopisch zichtbare vruchtlichamen vormen. Voorbeelden van die laatste zijn de arbusculaire mycorrhiza vormende schimmels in plantenwortels. Andere aangetroffen soorten zijn niet eigen aan een grasland zoals ectomycorrhiza-vormende schimmels (die bij bomen leven) en houtbewonende soorten.

De algehele biodiversiteit van schimmels (alle aangetroffen OTU's) in de bodemmonsters afkomstig van het Fort Rhijnauwen is veel hoger dan die van het Amsterdam Rijnkanaal. Uit een statistische analyse gebaseerd op de gehele dataset kwam ook naar voren dat beide terreinen significant van elkaar verschillen in soortensamenstelling (hier niet verder gepresenteerd). Dit is in overeenstemming met de gegevens van het veldonderzoek waar naar vruchtlichamen is gezocht. Met name het verschil tussen beide terreinen voor de Graslandgenera is hier opvallend. In tabel 3 zijn de 'typische' grasland-paddenstoelen weergegeven. Direct is te zien dat er een slechte overeenstemming is tussen de in het veld gevonden soorten (tabel 1) en de in de bodemmonsters gedetecteerde soorten. Het aantal in het veld aangetroffen soorten is veel hoger dan het aantal via DNA gedetecteerde soorten.

In de bodemmonsters zijn ook enige soorten van de 'typische' graslandgenera aangetroffen die niet in het veld gezien zijn, sterker, die soms nog nooit in Nederland zijn gezien. Dat is een merkwaardig resultaat, dat laat zien dat er mogelijk in de bodem nog meerdere soorten leven die kennelijk niet fructificeren (als de detecties correct zijn). Een gelijkaardig fenomeen werd eerder uit Nederland gerapporteerd door Geml et al. (2014) in hun studie van bodemmonsters uit Kruipwilg-duinvegetaties (*Salix repens*) langs de kust. In elk geval lijkt het ons voorbarig en ongewenst om de genoemde soorten voor Nederland op te geven, voordat



Figuur 3. Kleinsporige knotszwam (*Clavulinopsis microspora*). (Foto: Peter-Jan Keizer)



Bodemmonsters	ARK	FRN
<i>Clavaria</i> sp.	X	
<i>Clavaria acuta</i>	X	X
<i>Clavaria falcata</i>		X
<i>Clavaria flavostellifera</i> *		X
<i>Clavulinopsis</i> sp.		X
<i>Entoloma defibulatum</i> *	X	
<i>Entoloma infula</i>		X
<i>Entoloma</i> sp. OTU 1505*		X
<i>Geoglossum glabrum</i> *	X	
<i>Geoglossum simile</i> *		X
<i>Geoglossum umbratile</i>		X
<i>Geoglossum variabilisporum</i> *		X
<i>Hygrocybe acutoconica</i>	X	X
<i>Hygrocybe conica</i>	X	X
<i>Hygrocybe</i> sp.		X
<i>Ramariopsis kunzei</i>		X
<i>Trichoglossum hirsutum</i>	X	X
<i>Trichoglossum octopartitum</i> *		X

Tabel 3. Aanwezigheid van DNA van 'typische' graslandpaddenstoelen in de bodemmonsters van het Amsterdam Rijnkanaal (ARK) en het Fort Rhijnauwen (FRN). *: zie opmerking in Blok 1.

Opmerkingen bij de in Tabel 3 en 4 met * aangegeven soorten.

- *Clavaria flavostellifera*. Het ITS - DNA dat in bodem en wortels werd aangetroffen komt meer dan 99% overeen met de gepubliceerde basenvolgorde voor deze soort. Het is een recent uit Baskenland (Spanje) beschreven gele knotszwam (Olariaga et al., 2015), gekenmerkt door gespen aan de basidia en doordat de sporen die in het hymenium achterblijven een stekelige ornamentatie ontwikkelen, terwijl sporen in een sporee glad zijn. Nooit in Nederland gezien.

- Het DNA van in de bodemmonsters en wortelmonsters aangetroffen *Entoloma*-soorten kon vergeleken worden met resultaten van recent Noors onderzoek door Bálint Dima. Nadere informatie over deze soorten van M.E. Noordeloos.
- Rondsporige heidesatijnzwam (*Entoloma defibulatum*). Een soort van heischraal grasland, een habitat dat afwijkt van de hier onderzochte gebieden. Mogelijk zijn verdwaalde sporen of is niet fructificerend mycelium gedetecteerd.
- *Entoloma incarnatofuscescens*. Merkwaardige uitkomst omdat deze soort gewoonlijk in bossen groeit.
- *Entoloma graphitipes*. Zeer zeldzame soort, vrij recent in Duitsland beschreven (Ludwig, 2007), ook één keer gemeld voor Nederland.
- *Entoloma* sp. OTU 1505. Dit is een *Entoloma*-soort waarvoor een overeenkomst met een bestaand taxon werd gevonden. Over dit taxon bestaat echter nog de nodige onduidelijkheid.
- *Entoloma velenovskyi*. Vrij onopvallende bruinige satijnzwam, maar microscopisch goed herkenbaar. Door ons niet in het terrein gevonden.
- *Geoglossum*- en *Trichoglossum*-soorten. In de bodemmonsters zijn zes Aardtongachtige soorten aangetroffen, waaronder enkele soorten die niet uit Nederland bekend zijn. Voorbeelden: *G. variabilisporum* is voor Spanje beschreven (Arauzo en Iglesias, 2014). *T. octopartitum* is een wereldwijd voorkomende soort. Een beschrijving ervan is te vinden in Kučera et al. (2010). Het voert hier te ver om te pogen verdere namen / soorten nader te interpreteren.



Figuur 4. Donkere wasplaat (*Camarophylloopsis hymenoccephala*). (Foto: Peter-Jan Keizer)



de bijbehorende vruchtlichamen daadwerkelijk zijn gevonden.

Het is opvallend dat heel wat in het veld waargenomen soorten niet d.m.v. DNA zijn gedetecteerd. Een deel van de verklaring kan zijn dat van een aantal soorten nooit barcodes zijn bepaald. Dan kunnen ze ook niet in de referentie-databases worden teruggevonden. Enkele voor ons relevante geslachten zoals Wasplaat (*Hygrocybe*) en Barsthoed (*Dermoloma*) zijn nog slechts gedeeltelijk en mogelijk niet volledig betrouwbaar in de databases beschikbaar. Een ander deel van de verklaring kan zijn dat de monstertechniek - een beperkt aantal 'prikjes' in een grote oppervlakte - een ander resultaat oplevert dan een min of meer vlakdekkend onderzoek naar alle vruchtlichamen.

3) De soortensamenstelling aan de hand van schimmel-DNA dat in plantenwortels is aangetroffen.

In de wortels zijn (vanzelfsprekend) veelvuldig arbusculaire mycorrhiza vormende schimmels aangetroffen, behorende tot de Glomeromycota. Dit is hier niet verder geanalyseerd.

Er zijn uiteindelijk 171 wortelmonsters onderzocht. Allereerst viel op dat in 82% van de monsters een schimmel "OTU 84 *Hygrocybe acutoconica*" werd aangetoond. De overige soorten werden slechts weinige keren in de wortels gevonden, in 1 tot maximaal 10% van de monsters. In eerste instantie deed het talrijke voorkomen van DNA van *H. acutoconica* vermoeden dat de monsters of de apparatuur mogelijk te maken hadden met een verontreiniging met DNA van deze soort. Daarom is dit DNA meer nauwkeurig geanalyseerd. Hieruit kwam naar voren dat er sprake was van meerdere (tot wel zeven) verschillende genetische eenheden. Dat duidt erop dat er geen sprake kan zijn van een verontreiniging uit één bron. Het lijkt nu toch mogelijk dat *H. acutoconica* met verschillende 'individuen' algemeen aanwezig was in de wortelmonsters, ook al zijn er amper vruchtlichamen gezien.

In Tabel 4 is weergegeven welke van de 'typische' graslandpaddenstoelen in de wortels zijn gedetecteerd. In 90 (van de 171) wortelmonsters was geen graslandfungi-DNA aanwezig; in 47% van de wortelmonsters werd minstens één van de 'typische' graslandschimmels aangetroffen. Dat is wel een opmerkelijk resultaat, ook al zegt alleen de aanwezigheid niets over de functie of activiteit van de schimmel in de wortel. We zien dat in de plantenwortels uit Fort Rhijnauwen wat meer schimmelsoorten aanwezig waren dan in het grasland langs het ARK.

Een vreemd resultaat is dat op het Fort het DNA van de Donkere wasplaat (*Camarophylloopsis hymenoccephala*) werd geregistreerd, terwijl we deze daar niet hebben gevonden. Daarentegen kwam deze soort talrijk langs het ARK voor, maar is het DNA ervan niet aangetoond.

Er lijkt geen duidelijke voorkeur voor bepaalde plantensoorten aanwezig. We zien ook dat er een vrij sterke overeenkomst is van soorten in de wortelmonsters en in de bodemmonsters.





Tabel 4. In plantenwortels aangetroffen DNA van “typische” graslandpaddenstoelen. **FRN** = Fort Rhijnauwen, **ARK** = Amsterdam Rijnkanaal, **Ach mill** = Duizendblad (*Achillea millefolium*), **P lanc** = Smalle weegbree (*Plantago lanceolata*), **F arun** = Rietzwenkgras (*Festuca arundinacea*) **F rub** = Rood zwenkgras (*Festuca rubra*).

Soort / gebied	FRN				ARK			
Plant	Ach mil	P lanc	F arun	F rub	Ach mil	P lanc	F arun	F rub
<i>Camarophyllopsis hymenoccephala</i>		X	X					
<i>Clavaria acuta</i>		X			X	X	X	
<i>Clavaria falcata</i>					X			
<i>Clavaria flavostellifera</i>	X	X	X	X				
<i>Clavaria</i> sp.			X				X	X
<i>Clavulinopsis</i> sp.		X		X				
<i>Entoloma incarnatofuscescens</i> *					X			
<i>Entoloma</i> sp. OTU 603*		X	X					
<i>Entoloma graphitipes</i> *	X				X		X	
<i>Entoloma strigosissimum</i>					X			
<i>Entoloma velenovskyi</i> *		X						
<i>Geoglossum barlae</i>					X			
<i>Geoglossum cookeanum</i>	X	X	X	X				
<i>Geoglossum glabrum</i>	X		X	X	X		X	
<i>Geoglossum lineare</i>	X	X		X			X	
<i>Geoglossum simile</i>	X	X	X	X	X	X	X	
<i>Geoglossum</i> sp.		X		X				
<i>Geoglossum variabilisporum</i>	X	X	X	X				
<i>Hygrocybe acutoconica</i>	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Hygrocybe conica</i>	X					X	X	
<i>Hygrocybe</i> sp.		X	X			X		X
<i>Ramariopsis kunzei</i>				X				
<i>Trichoglossum hirsutum</i>	X					X	X	
<i>Trichoglossum octopartita</i>		X						
Aantal soorten	10	13	10	10	8	6	9	3





Figuur 5. Glanshavergrasland Fort Rhijnauwen 28 mei 2019. (Foto: P.J. Keizer)

Dat valt wellicht te verklaren uit het feit dat de bodemmonsters in de nabijheid van de plantenwortelmonsters zijn verzameld.

4. Conclusies en discussie

1. Er bestaan duidelijke verschillen tussen de twee onderzochte terreinen. Bij alle gebruikte methoden (registratie vruchtlichamen, DNA uit bodemmonsters, DNA uit plantenwortels) blijkt het grasland van het FRN rijker te zijn dan het grasland langs het ARK. Dat is in overeenstemming met de verschillende leeftijd (ontwikkelingsduur) van de betreffende graslanden.
2. Er blijkt in de plantenwortels wel degelijk DNA van schimmels van de onderzochte ‘typische’ graslandpaddenstoelen voor te komen. Dat is enerzijds verrassend, maar anderzijds in overeenstemming met hetgeen Halbwachs et al. (2018) hebben gevonden, namelijk dat in wasplaatgraslanden de graslandpaddenstoelen veelvuldig in wortels aanwezig zijn en een rol spelen in de voeding van de planten.
3. Er zijn zeker zo’n acht soorten *Geoglossum* (Aardtong) aangetroffen in de bodemmonsters en in de wortels, vooral in het grasland van het FRN. Dat is frappant, omdat in de soortenlijst van dat gebied nauwelijks Aardtongen voorkomen. We concluderen dat in de bodem diverse soorten Aardtongen leven, maar blijkbaar vormen deze maar weinig vruchtlichamen en/of worden deze gemakkelijk bij veldonderzoek gemist. Hier moeten we dus bij verder veldonderzoek goed op letten. Of het dan werkelijk de soorten zijn die overeenkomen met de OTU’s van deze analyse moet dan nog maar blijken; mogelijk is er nog wel wat ruis op die lijn.
4. We vonden een heel beperkte overeenkomst tussen de soorten paddenstoelen die werden gevonden bij de veldinventarisatie en bij de analyse van schimmel-DNA van wortel- en bodemmonsters. Dat kan op verschillende manieren verklaard worden. In de eerste plaats is van een aantal groepen van de ‘typische’ graslandpaddenstoelen nog geen gepubliceerd overzicht van de barcodes van de diverse soorten. De ontbrekende soorten uit die groepen kunnen na-





tuurlijk nooit gedetecteerd worden. In de tweede plaats zijn de methoden van bemonstering van de paddenstoelen sterk verschillend. Een ervaringsfeit is dat mycelia van graslandpaddenstoelen onregelmatig en erg ‘vlekkerig’ verspreid over een terrein voorkomen. Bij een beperkt aantal bodem- en wortelmonsters is de kans op missen van soorten relatief groot, vooral bij zeldzame soorten. Anderzijds zou je kunnen verwachten dat de sporen wel over het terrein verspreid aanwezig zouden kunnen zijn, maar kennelijk onttrekken deze zich aan detectie.

Guldborg Frøslev et al. (2019) vonden bij een zeer uitgebreide vergelijking tussen de DNA-methode en het inventariseren van vruchtlichamen dat bij bodembewonende paddenstoelen per individueel terrein slechts 4,7% van de als vruchtlichaam gevonden soorten ook als OTU gedetecteerd kon worden (maar een hoger percentage wanneer alleen Agaricales werden beschouwd). Ook zij zagen dus een lage overeenkomst, ook al was de bodem intensief bemonsterd (81 deel-bodemmonsters in een proefvlak van $40 \times 40 \text{ m}^2$). Bij ons onderzoek zijn slechts 8 bodem (meng-)monsters betrokken, wat alleen al daarom tot een lage overeenkomst kan leiden.

5. De interpretatie van de resultaten van de DNA-analyse is lastig: DNA-aanwezigheid zegt weinig over biologische activiteit van de aangetoonde soorten. Als voorbeeld: in de bodemmonsters werd DNA van het Gewoon elfenbankje (*Trametes versicolor*) gevonden. In het grasland is deze uiteraard nooit gezien en is ook niet te verwachten. Paddenstoelen in het terrein geven in elk geval aan dat de mycelia biologisch actief zijn, want ze reproduceren zich. Maar bij een veldinventarisatie is er altijd kans dat je soorten mist, die dat jaar of dat op het moment van het terreinbezoek niet fructificeerden.

6. De interpretatie van de aan de OTU's gekoppelde namen levert de nodige problemen op. Dat kan diverse oorzaken hebben:

a. De referentie-database is GenBank. Dat is de database van genetische sequenties van de NIH (National Institutes of Health), een geannoteerde collectie van alle openbaar beschikbare DNA sequenties. Hoewel het een enorme databank is, blijkt deze toch nog onvoldoende gegevens te bevatten om hieraan de resultaten van onze bodem- en wortelmonsters volledig zinvol te toetsen. Zo blijkt het bestand wat betreft het geslacht Wasplaat (*Hygrocybe* s.l.) nog heel onvolledig te zijn. Van het geslacht Barsthoed (*Dermoloma*) waren op het moment van de analyse zelfs in het geheel geen gegevens aanwezig.

Veldinventarisatie versus DNA-bemonstering van bodem en/of plantendelen

De resultaten van de DNA-analyse van bodem- en wortelsamples kunnen niet altijd op soort-niveau geïnterpreteerd worden. Relevanter is deze dan enkel op genusniveau te beschouwen en de OTU's slechts als ruwe benaderingen van soorten te interpreteren. De oorzaken hiervoor zijn van verschillende aard. Ten eerste is er de sampling/staal (=steekproef)-name van de bodem en plantendelen, die relatief beperkt is wegens de hoge kosten van het analyseren van meer dan een 400-tal stalen. Alhoewel op verschillende plaatsen in een gebied stalen kunnen worden genomen die dan gemengd worden en vervolgens ‘gesubsampled’, blijft het aantal gram bodem dat je analyseert beperkt. Fungi met kleine mycelia die in lage dichtheden voorkomen, hebben minder kans opgepikt te worden. Tijdens de DNA-analyse vindt in het lab een amplificatie (vermeerdering) van de ITS-regio plaats. Een tweede stap waar het kan misgaan, is dat deze amplificatie niet bij alle fungi even vlot gaat. Ten derde zijn er de vele problemen met het maken en interpreteren van de OTU's die ten dele hierboven uitgelegd worden.





Figuur 6. Grasland langs ARK 't Goy 14 mei 2018. (Foto: Friso van der Zee)

b. Een van de problemen is voorts dat er te weinig eenstemmigheid onder de mycologen bestaat wat er onder bepaalde namen moet worden verstaan (bijvoorbeeld onze Grauwe wasplaat (*H. irrigata*) verschijnt op twee plaatsen in een verwantschapsboom).

c. Ook zijn er gegevens toegevoegd van geheel verschillende aard, samenhangende met het doel waarvoor de gegevens oorspronkelijk werden verzameld, waardoor taxa op soort-, geslacht- en familieniveau door elkaar in het bestand zitten.

d. De onderzoeker die van een paddenstoel het DNA heeft onderzocht, heeft mogelijk een determinatiefout gemaakt. Daardoor is een andere (verkeerde) naam aan een bepaald DNA-stuk gekoppeld wat tot veel verwarring kan leiden.

e. Het is mogelijk dat binnen wat we nu nog als (morfologische) 'soort' beschouwen, veel genetische variatie voorkomt. Dat blijkt als DNA van verschillende vruchtlichamen van één 'soort' overeenkomst laat zien met verschillende referenties uit GenBank. Bij onze gegevens is dit waarschijnlijk bij de Puntmutswasplaat (*Hygrocybe acutoconica*) het geval.

Hieruit moeten we concluderen dat GenBank als referentie-database nog tamelijk in de kinderschoenen staat. Het toevoegen van veel meer betrouwbare data is daarom sterk gewenst om het bestand beter bruikbaar te maken. Een internationale inspanning om een specifiek voor fungi betere publieke database te maken is de UNITE database (<http://unite.ut.ee>)

Het karakteriseren van een terrein aan de hand van veldinventarisaties heeft ook nadelen. Volgens een vuistregel zou een terrein minstens 3 jaar onderzocht moeten worden, met 3 bezoeken per jaar, om minstens 80% van de aanwezige soorten te vinden. Dat maakt een veldinventarisatie erg langdurig, met een grote tijdsinvestering. Ook het (na)determineren van lastige soorten vergt heel wat tijd. In een droog jaar zijn de aantallen soorten en vruchtli-



chamen erg beperkt. Dat maakt de uitkomst van een veldinventarisatie enigszins onzeker en onvoorspelbaar, zeker als maar één onderzoeksjaar beschikbaar is. Een betrouwbare uitkomst van een mycologische veldinventarisatie vraagt ook ervaren onderzoekers, en die zijn niet overal voorhanden.

Bij een zeer intensieve veldinventarisatie vergeleken met een intensieve bodembemonstering vonden Guldberg Frøslev et al. (2019) voor bodembewonende Agaricales min of meer vergelijkbare resultaten. Voor houtbewoners ging dit veel minder op. Dat is begrijpelijk: in bodemmonsters zit geen mycelium van houtbewonende paddenstoelen. Als het doel is om bijvoorbeeld alleen Rode Lijstsoorten op te sporen, of bepaalde categorieën paddenstoelen (bijvoorbeeld mestbewoners), voldoet het bepalen van bodemmonsters beduidend minder. Zoals ook uit ons onderzoek blijkt, worden met de veldinventarisatie heel wat soorten gevonden, die niet uit een metabarcoding-set komen. Het veldonderzoek blijft dus essentieel.

Dank

Veel dank zijn we verschuldigd aan Lisa Kam en Elza Duijm, die voor het grootste deel het laboratoriumwerk hebben uitgevoerd. Dank ook aan Bálint Dima en Chiel Noordeloos voor resp. informatie over de DNA-sequenties en het voorkomen in Nederland van de *Entoloma* soorten.

Literatuur

- Arauzo, S. & Iglesias, P. 2014. La familia Geoglossaceae en la península Ibérica y la Macaronesia. *Errotari*. 11:166–259
- Arnolds, E. 2015. Wasplaten graslanden in Nederland. Deel I. Ecologische en vegetatiekundige aspecten. *Stratiotes* 47: 45–75.
- Arnolds, E. 2015. Wasplaten graslanden in Nederland. Deel II. De belangrijkste terreinen en natuurbeheersaspecten. *Stratiotes* 48: 15–32.
- Geml, J., Gravendeel, B., van der Gaag, K.J., Neilen, M., Lammers, Y., Raes, N., Semenova, T.A., de Knijff, P. & Noordeloos, M.E. 2014 The contribution of DNA metabarcoding to fungal conservations: diversity assessment, habitat partitioning and mapping red-listed fungi in protected coastal *Salix repens* communities in the Netherlands. *PLoS one* 9: e99852.
- Guldberg Frøslev, T., Kjøllera, R., Bruun, H.H., Ejrnæs, R., Hansen, A.J., Læssøe, T. & Heilmann-Clausen, J. 2019. Man against machine: Do fungal fruitbodies and eDNA give similar biodiversity assessments across broad environmental gradients? *Biological Conservation* 233 (2019) 201–212.
- Halbwachs, H., Easton, G.L., Bol, R., Hobbie, E.A., Garnett, M.H., Peršoh, D., Dixon, L., Ostle, N., Karasch, P. & Griffith, G.W. 2018. Isotopic evidence of biotrophy and unusual nitrogen nutrition in soil-dwelling Hygrophoraceae. *Environmental Microbiology* 20 issue10. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1462-2920.14327>
- Kam, L. 2017. Grassland Fungi in soil and in roots of plants on Dutch flower dikes. Stageverslag van stage bij Naturalis.
- Kučera, V., Lizoň, P. & Kautmanová, I. 2010. Geoglossoid fungi in Slovakia II. *Trichoglossum octopartitum*, a new species for the country. – *Czech Mycol.* 62(1): 13–18.
- Ludwig, E. 2007. Pilzkompendium Band 2 Beschreibungen. Fungicon-Verlag, Berlin.
- Olariaga, I., Salcedo, I., Daniëls, P.P., Spooner, B., Dueñas, M., Martin, M.P. & Kautmanová, I. 2015. Taxonomy and phylogeny of yellow *Clavaria* species with clamped basidia—*Clavaria flavostellifera* sp. nov. and the typification of *C. argillacea*, *C. flavipes* and *C. sphagnicola*. *Mycologia*. 107(1):104–122.
- Wikipedia: https://en.wikipedia.org/wiki/Internal_transcribed_spacer