PROGRESS IN PLANT PROTECTION
65 (2): 92–102, 2025
eISSN 2084-4883

Received: 11.02.2025 / Accepted: 12.05.2025

DOI: 10.14199/ppp-2025-009
Published online: 06.06.2025

ARTYKUŁ ORYGINALNY

Zastosowanie sekwencjonowania nowej generacji (NGS) w analizie mikrobiomu ziaren pszenicy ozimej

Application of next-generation sequencing (NGS) in the analysis of the winter wheat grain microbiome

Katarzyna Pieczul, Ilona Świerczyńska*, Andrzej Wójtowicz

Streszczenie

Mikrobiom ziarna pszenicy ozimej został scharakteryzowany na podstawie wyników sekwencjonowania nowej generacji (NGS) regionów rybosomalnego DNA (rDNA). Uzyskane wyniki ujawniły znaczące różnice w składzie mikrobiomu w kolejnych latach badań. W latach 2020 i 2022 dominującymi gatunkami były *Blumeria graminicola* (40% i 70% zidentyfikowanych sekwencji), *Alternaria infectoria* (14% i 4%) oraz *Mycosphaerella tassiana* (12% i 8%). Natomiast w 2021 roku najczęściej wykrywanymi gatunkami były *M. tassiana* (20%), *Sporobolomyces roseus* (13%) i *B. graminicola* (11%). Analiza potwierdziła obecność grzybów z rodzaju *Fusarium* we wszystkich latach badań, przy czym udział procentowy ich sekwencji podlegał znacznym wahaniom – od 0,5% w 2020 roku do 5,5% w 2021 roku. Zidentyfikowano cztery gatunki: *F. graminearum*, *F. poae*, *F. sporotrichioides* oraz *F. culmorum*. Udział grzybów drożdżoidalnych w całkowitej liczbie odczytanych sekwencji także zmieniał się na przestrzeni lat – w 2020 roku wynosił 20%, w 2021 roku wzrósł do 50%, a w 2022 roku spadł do 12%. Dominowały dwa gatunki: *S. roseus* oraz *Vishniacozyma* spp., w tym *V. victoriae*. Ponadto zidentyfikowano inne gatunki grzybów drożdżoidalnych, m.in. *Filobasidium wieringae*, *Filobasidium stepposum*, *Dioszegia hungarica*, *Aureobasidium pullulans*, *Holtermaniella wattica*, *Bulleromyces albus* oraz *Bullera crocea*. Uzyskane wyniki podkreślają dynamiczny charakter mikrobiomu pszenicy oraz jego wrażliwość na zmieniające się warunki środowiskowe.

Słowa kluczowe: mikrobiom, pszenica ozima, ziarno, grzyby, sekwencjonowanie nowej generacji (NGS)

Abstract

Microbiome of winter wheat grain was characterized based on next-generation sequencing (NGS) of ribosomal DNA (rDNA) regions. The obtained results revealed significant differences in microbiome composition across the study years. In 2020 and 2022, the dominant species were *Blumeria graminicola* (40% and 70% of identified sequences), *Alternaria infectoria* (14% and 4%), and *Mycosphaerella tassiana* (12% and 8%). In contrast, in 2021, the most frequently detected species were *M. tassiana* (20%), *Sporobolomyces roseus* (13%), and *B. graminicola* (11%). The analysis confirmed the presence of *Fusarium* species in all study years, with their sequence percentage fluctuating significantly – from 0.5% in 2020 to 5.5% in 2021. Four species were identified: *F. graminearum*, *F. poae*, *F. sporotrichioides* and *F. culmorum*. The proportion of yeast-like fungi in the total number of sequences also varied over the years, accounting for 20% in 2020, rising to 50% in 2021, and decreasing to 12% in 2022. Two taxons were dominant: *S. roseus* and *Vishniacozyma* spp., including *V. victoriae*. Additionally, other yeast-like fungi were identified, including *Filobasidium wieringae*, *Filobasidium stepposum*, *Dioszegia hungarica*, *Aureobasidium pullulans*, *Holtermaniella wattica*, *Bulleromyces albus*, and *Bullera crocea*. The results highlight the dynamic nature of the wheat microbiome and its sensitivity to changing environmental conditions.

Keywords: microbiome, winter wheat, grain, fungi, next-generation sequencing (NGS)

Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy
ul. Władysława Węgorka 20, 60-318 Poznań
*corresponding author: i.swierczynska@iorpib.poznan.pl

Wstęp / Introduction

Pszenica zwyczajna (*Triticum aestivum* L.) jest jedną z najważniejszych roślin uprawnych w Polsce i na świecie. Rośliny te są podatne na wiele chorób pochodzenia grzybowego, które mogą prowadzić do znacznych strat plonów ziarna i obniżenia jego jakości. Analiza składu gatunkowego grzybów kolonizujących ziarno pszenicy jest więc niezbędna nie tylko dla zapewnienia zdrowego materiału siewnego, ale także dla ograniczenia ryzyka transmisji patogenów oraz zapewnienia bezpieczeństwa żywności (Godfray i wsp. 2016; Nelson 2018; War i wsp. 2023).

Mikrobiom ziaren pszenicy jest zróżnicowaną grupą mikroorganizmów, kolonizujących zarówno powierzchnię, jak i wnętrze ziarniaków (Barret i wsp. 2015). Skład mikrobiomu jest dynamiczny i zależy od wielu czynników, takich jak warunki agrotechniczne, czynniki pogodowe i środowiskowe występujące w trakcie wegetacji, stosowanie pestycydów, fazy rozwojowe rośliny, a także sposób przechowywania ziarna (Karlsson i wsp. 2017; Rojas i wsp. 2020b; Chen i wsp. 2022; Salamon i wsp. 2023).

Grzyby zasiedlające ziarno pszenicy można w uproszczeniu podzielić na trzy grupy: patogeny, saprotrofy oraz mikroorganizmy wspierające wzrost i rozwój roślin. Do taksonów patogenicznych i saprotroficznych najczęściej zasiedlających ziarno należą: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Penicillium*, *Phaeosphaeria*, *Sarocladium*, *Tilletia* (Nicolaisen i wsp. 2014; Solanki i wsp. 2021; Minutillo i wsp. 2022; Salamon i wsp. 2023). Do taksonów wywołujących największe straty w trakcie przechowywania ziarna zaliczane są: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor* i *Eurotium* (Minutillo i wsp. 2022; Wang i wsp. 2024). Grzyby drożdżoidalne występujące na powierzchni ziarniaków mogą korzystnie wpływać na utrzymanie równowagi biologicznej, wzrost, rozwój i odporność roślin, a także na jakość i trwałość przechowywanego ziarna (Nelson 2018; Solanki i wsp. 2021). Mikroorganizmy te dzięki zdolności do kolonizowania powierzchni ziarna, konkurencji o składniki odżywcze, czy produkcji substancji przeciwgrzybiczych ograniczają rozwój szkodliwych mikroorganizmów. Do rodzajów najczęściej identyfikowanych na ziarnie pszenicy należą: *Aureobasidium*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Filobasidium*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Vishniacozyma* i inne (Nicolaisen i wsp. 2014; Rojas i wsp. 2020b; Alfonzo i wsp. 2021; Solanki i wsp. 2021). Wiele analiz podkreśla potencjał grzybów drożdzoidalnych jako naturalnych środków biokontrolnych, które mogą wspierać zrównoważone rolnictwo, zmniejszając jednocześnie potrzebę stosowania chemicznych pestycydów (Solanki i wsp. 2021; Kowalska i wsp. 2022; Salomon i wsp. 2023; Alii wsp. 2024).

Do oceny zasiedlenia ziarna zbóż przez grzyby stosuje się różnorodne metody badawcze. Tradycyjne metody mykologiczne, takie jak np. hodowla grzybów na sztucznych podłożach i ich identyfikacja mikroskopowa, pozwalają na ocenę kolonii oraz wstępną identyfikację mikroorganizmów na podstawie ich cech morfologicznych. Chociaż metody te są skuteczne dla wielu taksonów, mają swoje negatywne aspekty. Do najważniejszych należą ich czasochłonność i pracochłonność oraz ograniczona przydatność w identyfikacji patogenów, które nie rozwijają się na syntetycznych podłożach np.: *Tilletia*, *Puccinia*, czy *Blumeria* (Sharma i Sharma 2016; Patra i wsp. 2020). Dodatkowo, wiele patogenów cechuje się znaczną zmiennością wewnątrzgatunkową lub brakiem wyraźnych cech morfologicznych, co utrudnia ich precyzyjną identyfikację (Kurtzman i wsp. 2011). Szczególnie istotne staje się to w przypadku identyfikacji podobnych morfologicznie gatunków grzybów drożdżoidalnych (Alfonzo i wsp. 2021). Przedstawione aspekty wskazują na potrzebę uzupełnienia tradycyjnych metod badawczych bardziej zaawansowanymi technikami analitycznymi.

Techniki takie, jak PCR (polymeraze chain reaction), real-time PCR, nested-PCR, LAMP (loop-mediated isothermal amplification), czy sekwencjonowania Sangera stanowią istotne uzupełnienie tradycyjnych metod diagnostycznych, zapewniając wysoką dokładność w identyfikacji grzybów na podstawie ich materiału genetycznego. Jednak ich zastosowanie wiąże się z pewnymi ograniczeniami, przede wszystkim z koniecznością użycia specyficznych starterów lub przeciwciał, co ogranicza możliwość identyfikacji nowych lub wcześniej nieopisanych taksonów (Lievens i Thomma 2005; Aslam i wsp. 2017; Bernreiter 2017; Alfonzo i wsp. 2021; Hariharan i Prasannath 2021). Rozwój technologii NGS (next-generation sequencing) przyniósł przełom w monitorowaniu i identyfikacji zbiorowisk grzybów. W przeciwieństwie do tradycyjnych metod diagnostycznych, które koncentrują się na izolacji i identyfikacji pojedynczych mikroorganizmów, NGS umożliwia kompleksową analizę całych mikrobiomów. Dzięki temu technologia ta pozwala na głębsze zrozumienie różnorodności i struktury populacji drobnoustrojów obecnych w próbkach ziaren, w tym grzybów obligatoryjnych, niezdolnych do wzrostu na syntetycznych podłożach (Lanver i wsp. 2018; Díaz-Cruz i wsp. 2019; Tedersoo i wsp. 2019; Salamon i wsp. 2023; Masenya i wsp. 2024). Technologia NGS znalazła już szerokie zastosowanie w rolnictwie, w takich obszarach jak bezpieczeństwo żywności, identyfikacja drobnoustrojów w glebie, ocena różnorodności i funkcjonalności społeczności mikroorganizmów, monitorowanie odporności na fungicydy itp. (Pieczul i Wąsowska 2017; Gałązka i Grządziel 2018; Francesconi 2022; Masenya i wsp. 2024).

Celem badań była szczegółowa analiza składu i różnorodności mikroorganizmów zasiedlających ziarno pszenicy ozimej odmiany Euforia przy zastosowaniu zaawansowanej technologii sekwencjonowania nowej generacji (NGS).

Materiały i metody / Materials and methods

Materiał roślinny

Ziarno pszenicy ozimej odmiany Euforia zostało zebrane w latach 2020–2022 na terenie Polowej Stacji Doświadczalnej w Winnej Górze, należącej do Instytutu Ochrony Roślin – Państwowego Instytutu Badawczego w Poznaniu. Materiał doświadczalny pochodził z poletek niepoddawanych zabiegom ochronnym z zastosowaniem fungicydów. Po zbiorze ziarno zostało starannie wysuszone i przechowywane w warunkach pokojowych, zapewniających stabilność próbek.

Izolacja DNA

Do przygotowania próbek do izolacji DNA odważono 50 g ziarna i umieszczono je w sterylnych pojemnikach. Do każdej próby dodano 100 ml sterylnej wody destylowanej, a następnie zawartość intensywnie wytrząsano przez 10 minut. Po zakończeniu tego procesu ziarno zostało usunięte, a powstałą zawiesinę przeniesiono do sterylnych probówek Falcon o pojemności 50 ml. Probówki odwirowano w wirówce Eppendorf 5804 przy prędkości 6000 rpm (odpowiadającej 4600 × g) przez 5 minut. Uzyskany po wirowaniu osad (30 mg) został ostrożnie zawieszony w buforze i wykorzystany do ekstrakcji całkowitego DNA z zastosowaniem zestawu Plant/Fungi DNA Isolation Kit (Norgen Biotek), postępując zgodnie z protokołem producenta. Wyizolowane DNA zostało poddane kwantyfikacji za pomocą spektrofotometru NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) i zamrożone w temperaturze –20°C.

Reakcja PCR

Reakcję PCR przeprowadzono w mieszaninie o objętości 20 µl zawierającej: 1 µl matrycowego DNA, 1 µM starterów ITS1FI2 i 5.8S z dodatkowymi sekwencjami indeksacyjnymi na końcach 5', 200 µM dNTP (Thermo Fisher Scientific), 1 × HF Buffer (Thermo Fisher Scientific) oraz 0,2 U polimerazy Hot Start Phusion (Thermo Fisher Scientific). Aby zoptymalizować zakres amplifikacji, reakcję PCR przeprowadzono z zastosowaniem trzech różnych temperatur przyłączania starterów (50°C, 53°C i 56°C), wykorzystując gradientowy termocykler Mastercycler ep Gradient S (Eppendorf). Protokół obejmował początkową denaturację w temperaturze 95°C przez 3 minuty, następnie 40 cykli składających się z denaturacji w temperaturze 95°C przez 30 sekund, przyłączania primerów przez 30 sekund w wybranej temperaturze (50°C, 53°C lub 56°C) oraz elongację w temperaturze 72°C przez 30 sekund. Na zakończenie wykonano końcowe wydłużenie w temperaturze 72°C przez 5 minut. Amplifikowane produkty PCR uzyskane w temperaturach 50°C, 53°C i 56°C połączono, tworząc bibliotekę NGS. Stężenie DNA w połączonych próbkach określono przy użyciu zestawu Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific).

Analiza NGS

Sekwencjonowanie wykonano w Genomed SA, na platformie MiSeq w technologii paired-end (PE) 2 × 300 nt, wykorzystując zestaw v3 firmy Illumina. Wstępna analiza danych została zautomatyzowana i przeprowadzona na urządzeniu MiSeq za pomocą oprogramowania MiSeq Reporter (MSR) w wersji 2.6. Proces obejmował dwa kluczowe etapy: demultipleksowanie próbek oraz generowanie plików FASTQ zawierających surowe odczyty sekwencji. Analiza bioinformatyczna obejmowała kilka etapów: usunięcie sekwencji adaptorowych za pomocą programu Cutadapt, ocenę jakości odczytów oraz odrzucenie sekwencji o niskiej jakości, łączenie sekwencji sparowanych przy użyciu algorytmu SeqPrep, klastrowanie odczytów w oparciu o bazę referencyjną za pomocą algorytmu UCLUST, usuwanie chimerycznych sekwencji z zastosowaniem algorytmu USEARCH61 oraz przypisanie taksonomii przy użyciu algorytmu BLAST. Klasyfikacja odczytów do poziomu gatunku została wykonana za pomocą oprogramowania QIIME z wykorzystaniem referencyjnej bazy sekwencji UNITE v8.

Wyniki i dyskusja / Results and discussion

Technologia wysokoprzepustowego sekwencjonowania (HTS – high throughput sequencing) umożliwia kompleksową analizę całych wspólnot grzybowych. Kluczowe znaczenie ma jednak dobór starterów, który bezpośrednio wpływa na to, jakie taksony zostaną wykryte w analizowanych próbkach. W przeprowadzonych badaniach dokonano szczegółowej analizy taksonomicznej grzybów zasiedlających ziarno pszenicy ozimej odmiany Euforia. Identyfikację gatunków oparto na sekwencjonowaniu HTS regionu ITS1 (Internal Transcribed Spacer) rybosomalnego DNA (rDNA), który jest powszechnie stosowanym markerem genetycznym w badaniach mykologicznych (McCartney i wsp. 2003; Schoch i wsp. 2012; Toju i wsp. 2012). Wcześniejsze badania autorów wykazały, że analiza regionu ITS2 pozwalała na identyfikację większej liczby taksonów niż ITS1. Jednak analiza ITS1 okazała się szczególnie przydatna i skuteczna w detekcji kluczowych patogenów pszenicy (Pieczul i wsp. 2025). Uzyskane wyniki analizy rejonu ITS1 nie pokrywają się z wynikami wcześniejszych badań (Pieczul i wsp. 2025). W przedstawionej pracy wykorzystane zostały inne startery, co pozwoliło na oznaczenie dodatkowego zakresu patogenów np. z rodzaju *Blumeria*.

W niniejszej pracy uzyskano 97 610 par odczytów dla próby ziarna z 2020 roku, 52 439 dla próby z 2021 roku oraz 89 312 dla próby z 2022 roku. Na podstawie zgromadzonych danych zidentyfikowano łącznie 163 taksony na poziomie gatunku lub rodzaju. Analiza wykazała znaczące różnice w proporcjach gatunków zasiedlających ziar-

no pomiędzy poszczególnymi latami badań. Największą różnorodność grzybów zaobserwowano w próbie z roku 2020, w której wykryto 134 taksony. W kolejnych latach liczba zidentyfikowanych taksonów wynosiła odpowiednio 122 w 2021 roku i 80 w 2022 roku (tab. 1). Wyniki te wskazują na zmienność mikrobiomu pszenicy w kolejnych latach upraw.

W roku 2020 najczęściej wykrywanym gatunkiem był *Blumeria graminicola*, sprawca mączniaka prawdziwego zbóż i traw – 40% odczytanych sekwencji (39 551). Kolejnymi najliczniej reprezentowanymi taksonami były *Alternaria infectoria* (14%, 14 091 odczyty) oraz *Mycosphaerella tassiana* (12%, 11 940 odczyty). W 2021 roku dominującym gatunkiem był *M. tassiana* (20%, 10 452 odczyty), następnie *Sporobolomyces roseus* (13%, 6677 odczytów) i *B. graminicola* (11%, 5 788 odczytów). W 2022 roku ponownie dominował *B. graminicola*, obejmując 72% odczytów (64 893), podczas gdy sekwencje *M. tassiana* stanowiły 8% (5263 odczytów), a *A. infectoria* 4% (3477 odczytów) (tab. 1, rys. 1). Wyniki wskazują na znaczące zasiedlenie badanego ziarna przez *B. graminicola*. Należy jednak podkreślić, że patogen ten nie jest ściśle związany z transmisją poprzez materiał siewny. Pozostałe z najczęściej identyfikowanych gatunków należały do rodzajów o niskiej agresywności, gatunków saprotroficznych lub grzybów drożdżoidalnych. Drugim najczęściej identyfikowa-

Tabela 1. Liczba i procentowy udział odczytanych sekwencji taksonów grzybów w kolejnych latach badań
Table 1. Number and percentage of read sequences for identified fungal taxa across study years

Gatunki Species	2020		2021		2022		Suma lat Sum of years	
	liczba odczytów number of reads	procent odczytów percent of reads	liczba odczytów number of reads	procent odczytów percent of reads	liczba odczytów number of reads	procent odczytów percent of reads	liczba odczytów number of reads	procent odczytów percent of reads
Acremonium fusidioides	3	0,0	0	0,0	0	0,0	3	0,0
Acremonium rutilum	2	0,0	2	0,0	0	0,0	4	0,0
Alternaria alternata	23	0,0	10	0,0	0	0,0	33	0,0
Alternaria armoraciae	1	0,0	9	0,0	0	0,0	10	0,0
Alternaria brassicae	43	0,0	2	0,0	4	0,0	49	0,0
Alternaria dactylidicola	56	0,1	11	0,0	7	0,0	74	0,0
Alternaria hampshirensis	35	0,0	8	0,0	0	0,0	43	0,0
Alternaria infectoria	**14 091**	**14,4**	**3180**	**6,1**	**3477**	**3,9**	**20 769**	**8,7**
Alternaria mimicula	8	0,0	0	0,0	0	0,0	8	0,0
Alternaria rosae	93	0,1	66	0,1	184	0,2	343	0,1
Alternaria tenuissima	1300	1,3	680	1,3	1432	1,6	3415	1,4
Alternaria terricola	1	0,0	7	0,0	2	0,0	10	0,0
Anthracocystis flocculosa	2	0,0	24	0,0	1	0,0	27	0,0
Antrodiella zonata	1	0,0	0	0,0	0	0,0	1	0,0
Ascochyta pisi	1	0,0	2	0,0	0	0,0	3	0,0
Aspergillus conicus	1	0,0	0	0,0	1	0,0	2	0,0
Aspergillus proliferans	1	0,0	0	0,0	6	0,0	7	0,0
Aureobasidium leucospermi	15	0,0	41	0,1	0	0,0	56	0,0
Aureobasidium namibiae	14	0,0	17	0,0	0	0,0	31	0,0
Aureobasidium pullulans	1013	1,0	**1053**	**2,0**	567	0,6	2636	1,1
Bensingtonia sp.	0	0,0	0	0,0	10	0,0	10	0,0
Bensingtonia unidentified	44	0,0	27	0,1	0	0,0	71	0,0
Bettsia alvei	1	0,0	0	0,0	0	0,0	1	0,0
Bipolaris brizae	5	0,0	1	0,0	3	0,0	9	0,0
Bipolaris sorokiniana	1	0,0	2	0,0	0	0,0	3	0,0
Blumeria graminicola	**39 551**	**40,5**	**5788**	**11,0**	**64 893**	**72,7**	**110 284**	**46,0**

Tabela 1. Liczba i procentowy udział odczytanych sekwencji taksonów grzybów w kolejnych latach badań – cd.
Table 1. Number and percentage of read sequences for identified fungal taxa across study years – continued

Gatunki Species	2020		2021		2022		Suma lat Sum of years	
	liczba odczytów number of reads	procent odczytów percent of reads	liczba odczytów number of reads	procent odczytów percent of reads	liczba odczytów number of reads	procent odczytów percent of reads	liczba odczytów number of reads	procent odczytów percent of reads
Blumeria graminis	3	0,0	0	0,0	8	0,0	11	0,0
Botryotinia pelargonii	189	0,2	26	0,0	24	0,0	239	0,1
Botrytis caroliniana	1	0,0	0	0,0	0	0,0	1	0,0
Botrytis porri	8	0,0	1	0,0	0	0,0	9	0,0
Buckleyzyma aurantiaca	5	0,0	25	0,0	0	0,0	30	0,0
Buckleyzyma aurantiaca	0	0,0	0	0,0	2	0,0	2	0,0
Bullera crocea	227	0,2	782	1,5	296	0,3	1307	0,5
Bullera unica	1	0,0	0	0,0	0	0,0	1	0,0
Bulleromyces albus	1734	1,8	215	0,4	109	0,1	2060	0,9
Camarosporioides phragmitis	4	0,0	1	0,0	0	0,0	5	0,0
Candida spp.	965	1,0	32	0,1	0	0,0	998	0,4
Chalastospora gossypii	0	0,0	4	0,0	0	0,0	4	0,0
Cladosporium aphidis	2	0,0	0	0,0	0	0,0	2	0,0
Cladosporium delicatulum	**1942**	**2,0**	**1727**	**3,3**	0	0,0	3674	1,5
Cladosporium grevilleae	3	0,0	0	0,0	0	0,0	3	0,0
Cladosporium langeronii	5	0,0	2	0,0	0	0,0	7	0,0
Cladosporium ramotenellum	0	0,0	6	0,0	0	0,0	6	0,0
Claviceps spartinae	5	0,0	0	0,0	0	0,0	5	0,0
Coprinellus unidentified	0	0,0	1	0,0	0	0,0	1	0,0
Cryptococcus unidentified	0	0,0	2	0,0	0	0,0	2	0,0
Curvibasidium cygneicollum	0	0,0	36	0,1	0	0,0	36	0,0
Cystobasidium ritchiei	0	0,0	2	0,0	0	0,0	2	0,0
Cystofilobasidium infirmominiatum	29	0,0	1	0,0	0	0,0	30	0,0
Cystofilobasidium macerans	553	0,6	337	0,6	241	0,3	1132	0,5
Didymella rhei	24	0,0	1	0,0	22	0,0	47	0,0
Didymella viburnicola	1	0,0	4	0,0	0	0,0	5	0,0
Dioszegia fristingensis	109	0,1	217	0,4	84	0,1	411	0,2
Dioszegia hungarica	1191	1,2	**1231**	**2,3**	495	0,6	2921	1,2
Dioszegia unidentified	67	0,1	83	0,2	0	0,0	150	0,1
Dothiora sorbi	2	0,0	0	0,0	0	0,0	2	0,0
Endophoma elongata	0	0,0	1	0,0	0	0,0	1	0,0
Epicoccum dendrobii	**3757**	**3,8**	508	1,0	1361	1,5	**5631**	**2,4**
Filobasidium chernovii	17	0,0	28	0,1	0	0,0	45	0,0
Filobasidium floriforme	139	0,1	438	0,8	251	0,3	829	0,3
Filobasidium globisporum	2	0,0	6	0,0	0	0,0	8	0,0
Filobasidium magnum	107	0,1	240	0,5	104	0,1	452	0,2
Filobasidium oeirense	206	0,2	588	1,1	312	0,3	1107	0,5
Filobasidium spp.	3	0,0	2	0,0	0	0,0	5	0,0
Filobasidium stepposum	742	0,8	**1279**	**2,4**	950	1,1	2974	1,2
Filobasidium wieringae	453	0,5	**2802**	**5,3**	620	0,7	3881	1,6
Fusarium culmorum	0	0,0	0	0,0	469	0,5	469	0,2

Tabela 1. Liczba i procentowy udział odczytanych sekwencji taksonów grzybów w kolejnych latach badań – cd.
Table 1. Number and percentage of read sequences for identified fungal taxa across study years – continued

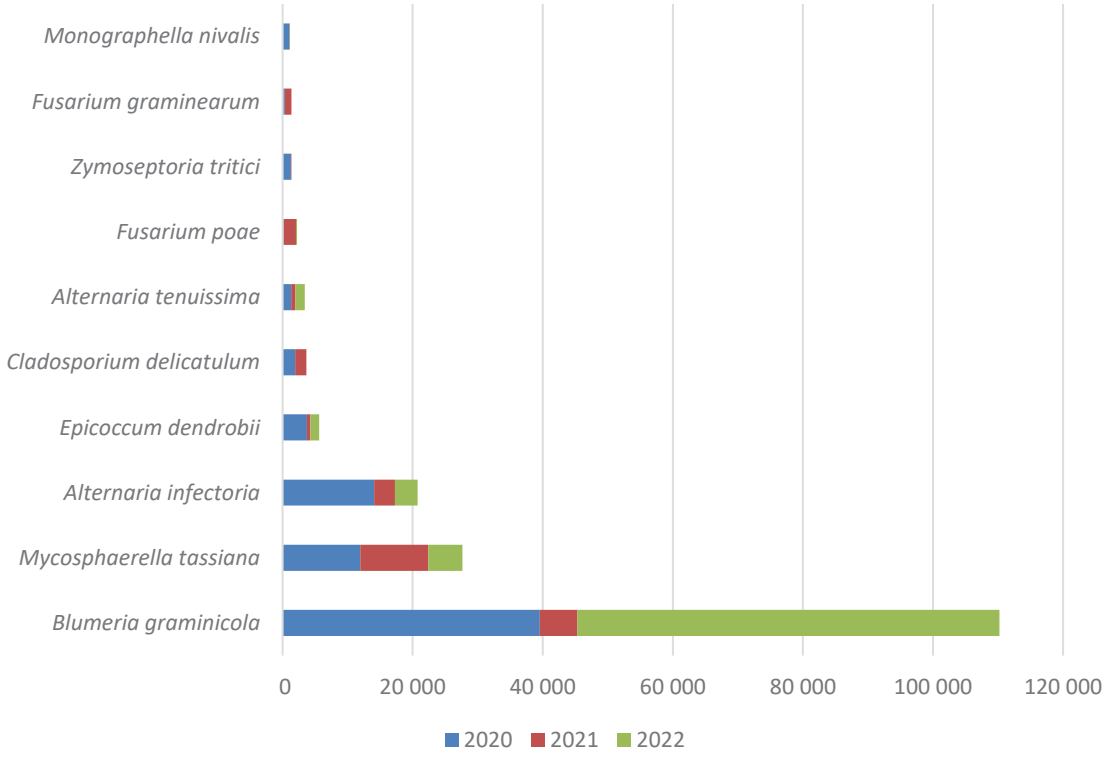
Gatunki Species	2020		2021		2022		Suma lat Sum of years	
	liczba odczytów number of reads	procent odczytów percent of reads	liczba odczytów number of reads	procent odczytów percent of reads	liczba odczytów number of reads	procent odczytów percent of reads	liczba odczytów number of reads	procent odczytów percent of reads
Fusarium graminearum	334	0,3	1009	1,9	0	0,0	1345	0,6
Fusarium poae	119	0,1	**1921**	**3,7**	166	0,2	2210	0,9
Fusarium sporotrichioides	3	0,0	14	0,0	57	0,1	74	0,0
Fusarium spp.	9	0,0	2	0,0	215	0,2	226	0,1
Genolevuria amylolytica	1	0,0	2	0,0	3	0,0	6	0,0
Hannaella coprosmae	0	0,0	1	0,0	0	0,0	1	0,0
Hannaella zeae	0	0,0	1	0,0	0	0,0	1	0,0
Holtermanniella festucosa	52	0,1	23	0,0	5	0,0	80	0,0
Holtermanniella wattica	1153	1,2	990	1,9	222	0,2	2368	1,0
Hormonema macrosporum	2	0,0	3	0,0	0	0,0	5	0,0
Hypholoma fasciculare	7	0,0	0	0,0	0	0,0	7	0,0
Itersonilia pannonica	443	0,5	352	0,7	152	0,2	948	0,4
Itersonilia perplexans	1	0,0	0	0,0	0	0,0	1	0,0
Kondoa sorbi	0	0,0	1	0,0	0	0,0	1	0,0
Kwoniella pini	109	0,1	14	0,0	0	0,0	123	0,1
Leptospora rubella	0	0,0	1	0,0	0	0,0	1	0,0
Leucosporidium escuderoi	0	0,0	1	0,0	0	0,0	1	0,0
Leucosporidium fragarium	1	0,0	34	0,1	20	0,0	55	0,0
Leucosporidium golubevii	2	0,0	4	0,0	1	0,0	7	0,0
Lophiostoma multiseptatum	0	0,0	0	0,0	11	0,0	11	0,0
Microsphaeropsis spartii-juncei	3	0,0	1	0,0	0	0,0	4	0,0
Monographella nivalis	1062	1,1	5	0,0	20	0,0	1088	0,5
Mrakiella aquatica	7	0,0	15	0,0	8	0,0	30	0,0
Mucor hiemalis	0	0,0	2	0,0	0	0,0	2	0,0
Mycosphaerella tassiana	**11 940**	**12,2**	**10 452**	**19,9**	**5263**	**5,9**	**27 687**	**11,6**
Naganishia adeliensis	18	0,0	5	0,0	0	0,0	23	0,0
Naganishia cerealis	1	0,0	5	0,0	0	0,0	6	0,0
Naganishia liquefaciens	0	0,0	1	0,0	0	0,0	1	0,0
Naganishia unidentified	0	0,0	16	0,0	5	0,0	21	0,0
Nectriaceae unidentified	182	0,2	14	0,0	0	0,0	196	0,1
Neoascochyta exitialis	1	0,0	0	0,0	0	0,0	1	0,0
Neoascochyta graminicola	463	0,5	134	0,3	163	0,2	761	0,3
Neodidymelliopsis ranunculi	22	0,0	1	0,0	5	0,0	28	0,0
Neosetophoma clematidis	3	0,0	0	0,0	0	0,0	3	0,0
Neosetophoma samararum	1	0,0	2	0,0	0	0,0	3	0,0
Nigrospora musae	0	0,0	0	0,0	2	0,0	2	0,0
Nigrospora oryzae	18	0,0	7	0,0	14	0,0	39	0,0
Papiliotrema flavescens	72	0,1	81	0,2	72	0,1	225	0,1
Papiliotrema frias	3	0,0	161	0,3	37	0,0	201	0,1
Papiliotrema mangalensis	3	0,0	2	0,0	0	0,0	5	0,0
Papiliotrema siamensis	5	0,0	0	0,0	0	0,0	5	0,0

Tabela 1. Liczba i procentowy udział odczytanych sekwencji taksonów grzybów w kolejnych latach badań – cd.
Table 1. Number and percentage of read sequences for identified fungal taxa across study years – continued

Gatunki Species	2020		2021		2022		Suma lat Sum of years	
	liczba odczytów number of reads	procent odczytów percent of reads	liczba odczytów number of reads	procent odczytów percent of reads	liczba odczytów number of reads	procent odczytów percent of reads	liczba odczytów number of reads	procent odczytów percent of reads
Papiliotrema wisconsinensis	2	0,0	0	0,0	0	0,0	2	0,0
Parastagonospora caricis	0	0,0	0	0,0	9	0,0	9	0,0
Parastagonospora forlicesenica	2	0,0	16	0,0	0	0,0	18	0,0
Parastagonospora nodorum	50	0,1	1	0,0	194	0,2	245	0,1
Peniophora cinerea	1	0,0	0	0,0	0	0,0	1	0,0
Phaffia unidentified	0	0,0	1	0,0	0	0,0	1	0,0
Piniphoma wesendahlina	63	0,1	0	0,0	13	0,0	76	0,0
Protomyces inouyei	0	0,0	0	0,0	4	0,0	4	0,0
Pseudoophiobolus rosae	1	0,0	0	0,0	0	0,0	1	0,0
Pyrenophora lolii	3	0,0	0	0,0	27	0,0	30	0,0
Pyrenophora tritici-repentis	40	0,0	13	0,0	20	0,0	73	0,0
Radulidium subulatum	4	0,0	0	0,0	21	0,0	25	0,0
Ramularia vizellae	1	0,0	1	0,0	1	0,0	3	0,0
Rhodocollybia butyracea	2	0,0	0	0,0	0	0,0	2	0,0
Rhodosporidiobolus colostri	1	0,0	17	0,0	0	0,0	18	0,0
Rhodosporidiobolus odoratus	62	0,1	0	0,0	0	0,0	62	0,0
Rhodotorula babjevae	1	0,0	26	0,0	2	0,0	29	0,0
Rhodotorula dairenensis	1	0,0	0	0,0	0	0,0	1	0,0
Sarocladium bactrocephalum	13	0,0	49	0,1	7	0,0	69	0,0
Sarocladium strictum	0	0,0	0	0,0	8	0,0	8	0,0
Septoriella hirta	5	0,0	2	0,0	1	0,0	8	0,0
Sporidiobolus unidentified	74	0,1	41	0,1	0	0,0	115	0,0
Sporisorium unidentified	0	0,0	1	0,0	2	0,0	3	0,0
Sporobolomyces phaffii	0	0,0	0	0,0	1	0,0	1	0,0
Sporobolomyces roseus	**5054**	**5,2**	**6677**	**12,7**	**1977**	**2,2**	**13 726**	**5,7**
Sporobolomyces ruberrimus	11	0,0	3	0,0	0	0,0	14	0,0
Stagonospora pseudovitensis	9	0,0	0	0,0	12	0,0	21	0,0
Stemphylium beticola	8	0,0	1	0,0	0	0,0	9	0,0
Stemphylium eturmiunum	4	0,0	1	0,0	70	0,1	75	0,0
Stemphylium lycii	2	0,0	0	0,0	0	0,0	2	0,0
Stemphylium vesicarium	197	0,2	40	0,1	0	0,0	237	0,1
Symmetrospora coprosmae	211	0,2	260	0,5	69	0,1	541	0,2
Taphrina carpini	0	0,0	8	0,0	0	0,0	8	0,0
Taphrina carpini	0	0,0	0	0,0	3	0,0	3	0,0
Tausonia pullulans	0	0,0	1	0,0	0	0,0	1	0,0
Tilletia puccinelliae	1	0,0	4	0,0	6	0,0	11	0,0
Torula herbarum	1	0,0	0	0,0	0	0,0	1	0,0
Trichothecium roseum	8	0,0	0	0,0	0	0,0	8	0,0
Udeniomyces megalosporus	0	0,0	1	0,0	0	0,0	1	0,0
Udeniomyces puniceus	1	0,0	5	0,0	0	0,0	6	0,0
Udeniomyces pyricola	385	0,4	97	0,2	25	0,0	508	0,2

Tabela 1. Liczba i procentowy udział odczytanych sekwencji taksonów grzybów w kolejnych latach badań – cd.
Table 1. Number and percentage of read sequences for identified fungal taxa across study years – continued

Gatunki Species	2020		2021		2022		Suma lat Sum of years	
	liczba odczytów number of reads	procent odczytów percent of reads	liczba odczytów number of reads	procent odczytów percent of reads	liczba odczytów number of reads	procent odczytów percent of reads	liczba odczytów number of reads	procent odczytów percent of reads
Ustilago unidentified	0	0,0	1	0,0	0	0,0	1	0,0
Vagicola chlamydospora	1	0,0	0	0,0	13	0,0	14	0,0
Verticillium dahliae	2	0,0	2	0,0	0	0,0	4	0,0
Vishniacozyma carnescens	475	0,5	405	0,8	193	0,2	1074	0,4
Vishniacozyma dimennae	1	0,0	13	0,0	0	0,0	14	0,0
Vishniacozyma foliicola	31	0,0	35	0,1	6	0,0	72	0,0
Vishniacozyma globispora	40	0,0	308	0,6	56	0,1	405	0,2
Vishniacozyma spp.	**2532**	**2,6**	**4071**	**7,8**	**2170**	**2,4**	**8783**	**3,7**
Vishniacozyma victoriae	**2178**	**2,2**	**3394**	**6,5**	**1855**	**2,1**	**7436**	**3,1**
Wallemia canadensis	3	0,0	0	0,0	0	0,0	3	0,0
Wallemia muriae	15	0,0	3	0,0	7	0,0	25	0,0
Wickerhamomyces anomalus	6	0,0	14	0,0	0	0,0	20	0,0
Zymoseptoria brevis	8	0,0	1	0,0	164	0,2	173	0,1
Zymoseptoria tritici	1258	1,3	91	0,2	0	0,0	1350	0,6
	97 610	100,0	52 439	100,0	89 312	100,0	239 561	–

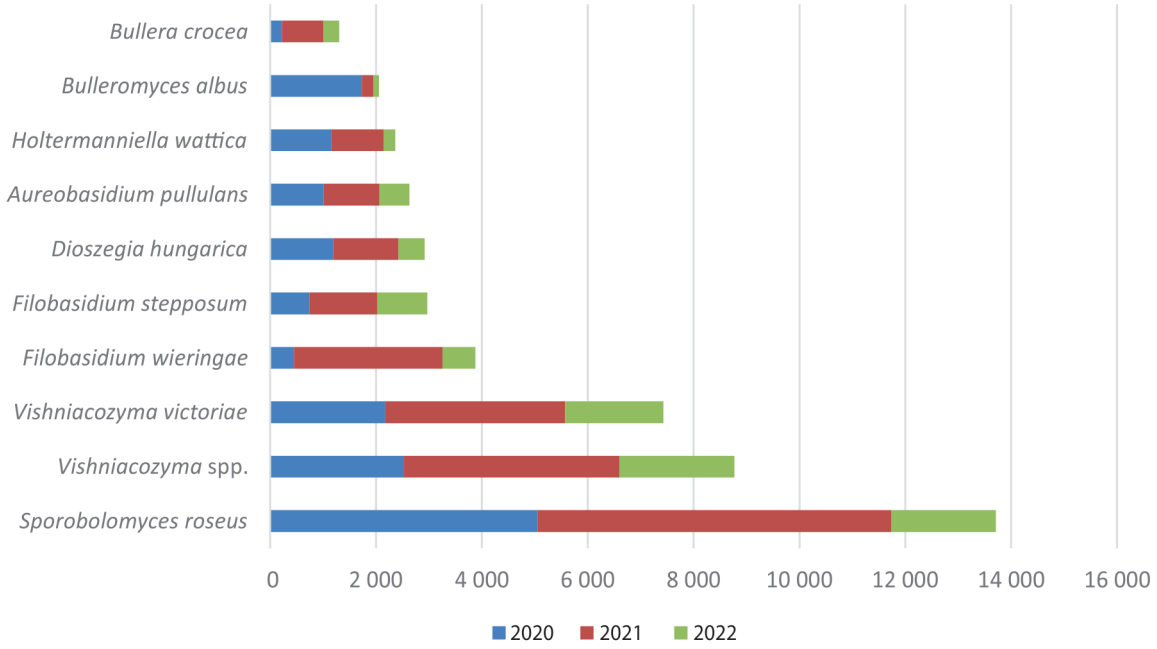


Rys. 1. Najczęściej identyfikowane gatunki grzybów patogenicznych i saprotroficznych dla pszenicy ozimej na podstawie analizy NGS
Fig. 1. Most commonly identified pathogenic and saprotrophic fungal species for winter wheat based on NGS analysis

nym gatunkiem był *M. tassiana* – saprotrof lub słaby patogen, który wraz z innymi grzybami z rodzaju *Cladosporium* może konkurować z agresywnymi patogenami, takimi jak *Fusarium*. Jego rozwój tym samym ogranicza wzrost innych grzybów, w tym patogenicznych. Kolejny istotny gatunek – *A. infectoria* wraz z *A. alternata* i *A. tenuissima* zasiedlają kłosy i ziarno, co może prowadzić do obniżenia jakości plonów oraz problemów podczas ich przechowywania (tab. 1, rys. 1). Zarówno *Alternaria* spp., jak i *Cladosporium* spp. były opisywane jako kluczowe składniki mikrobiomu pszenicy, co podkreśla ich znaczenie w ekosystemie upraw (Nicolaisen i wsp. 2014; Rojas i wsp. 2020b; Minutillo i wsp. 2022; Abdelsalam i wsp. 2024).

Patogeny z rodzaju *Fusarium* odgrywają kluczową rolę w mikrobiomie zbóż ze względu na ich zdolność do syntezy mykotoksyn, takich jak deoksyniwalenol (DON), niwalenol (NIV), zearalenon (ZEA) oraz toksyny T-2 i HT-2. Obecność tych toksyn stanowi poważne zagrożenie dla jakości plonów oraz bezpieczeństwa żywności i pasz (Rojas i wsp. 2020b). W niniejszej pracy patogeny z rodzaju *Fusarium* zostały wykryte we wszystkich latach badań, przy czym ich procentowy udział w całkowitej liczbie odczytanych sekwencji wykazywał znaczną zmienność. Najniższy odnotowano w 2020 roku (0,5%) i w 2022 roku (1%), natomiast w 2021 roku ich obecność wzrosła znacząco, osiągając 5,5% odczytanych sekwencji. Zidentyfikowano cztery gatunki: *F. graminearum*, *F. poae*, *F. sporotrichioides* oraz *F. culmorum*, przy czym skład gatunkowy różnił się w poszczególnych latach. W 2020 roku dominował *F. graminearum*, w 2021 roku – *F. poae*, a w 2022 roku – *F. culmorum* (tab. 1, rys. 1). Zaskakującym wynikiem była nieobecność sekwencji *F. culmorum* w latach 2020 i 2021 oraz *F. graminearum* w 2020 roku, pomimo że w Polsce są one uznawane za dominujące patogeny pszenicy.

W poszczególnych latach zaobserwowano różnice w liczbie taksonów i częstotliwości sekwencji grzybów drożdżoidalnych. W 2020 roku zidentyfikowano 56 taksonów (20% odczytanych sekwencji), w roku 2021 – 62 taksony (50%), a w roku 2022 – 34 taksony (12%). Do często identyfikowanych gatunków należały *S. roseus* i *Vishniacozyma victoriae*, a następnie: *Filobasidium wieringae*, *Filobasidium stepposum*, *Dioszegia hungarica*, *Aureobasidium pullulans*, *Holtermaniella wattica*, *Bulleromyces albus* oraz *Bullera crocea* (tab. 1, rys. 2). Większość z wymienionych gatunków grzybów drożdżoidalnych jest powszechnie obecna w środowisku rolniczym, jednak ich specyficzna rola w kształtowaniu mikrobiomu zbóż wciąż wymaga dalszych badań (Rojas i wsp. 2020b; Alfonzo i wsp. 2021). Przykładem są grzyby endofityczne wyizolowane z pszenicy, takie jak *Aureobasidium proteae*, *A. pullulans*, *Sarocladium kiliense*, *Naganishia albidosimilis*, *Naganishia albida*, *Cryptococcus albidus*, *Rhodotorula glutinis*, *Trichoderma* spp. i *Sarocladium strictum*, które wykazują potencjał biokontrolny przeciwko *Fusarium* spp. i innym patogenom pszenicy (Comby i wsp. 2017; Rojas i wsp. 2020a; Solanki i wsp. 2021). Niektóre z nich, jak np. *R. glutinis* czy *Sporobolomyces* sp. mogą zmniejszać poziom mykotoksyn w tkankach roślin porażonych przez *Penicillium expansum*



Rys. 2. Najczęściej identyfikowane gatunki grzybów drożdżoidalnych dla pszenicy ozimej na podstawie analizy NGS

Fig. 2. Most commonly identified yeast-like fungal species for winter wheat based on NGS analysis

(Castoria i wsp. 2015; Ianiri i wsp. 2017; Salamon i wsp. 2023). W przeprowadzonych badaniach nie stwierdzono korelacji między wzrostem liczby sekwencji grzybów drożdżoidalnych a *Fusarium* spp. Wręcz przeciwnie, największe liczby odczytów sekwencji DNA odnotowano dla obu grup w 2022 roku.

Należy podkreślić, że niezależnie od wybranego regionu DNA, każda analiza HTS obejmuje jedynie część rzeczywistej różnorodności mikroorganizmów. Dlatego dobór primerów powinien być przemyślany i uwzględniać takie czynniki, jak efektywność amplifikacji, zmienność danego regionu oraz jego zgodność z referencyjnymi bazami danych, w celu zapewnienia jak najbardziej reprezentatywnej i wiarygodnej identyfikacji grzybów. Dzięki możliwości uzyskania możliwie pełnego profilu metagenomicznego, technologia NGS umożliwia dokładniejsze zrozumienie roli różnych grup organizmów w ekosystemach rolniczych. Poznanie tej różnorodności jest kluczowe dla opracowywania efektywnych strategii w zakresie ograniczania chorób roślin, poprawy bezpieczeństwa żywności oraz zwiększenia wydajności produkcji rolniczej (Minutillo i wsp. 2022).

Wnioski / Conclusions

1. Skład mikrobiomu pszenicy ozimej wykazywał istotną zmienność między latami badań, przy czym najwyższą różnorodność grzybów odnotowano w 2020 roku (134 taksony), a najniższą w 2022 roku (80 taksonów).
2. Dominujące gatunki mikrobiomu różniły się między sezonami, choć najczęściej wykrywano *B. graminicola*, *M. tassiana* (ok. 20%) oraz *A. infectoria*.
3. Patogeny z rodzaju *Fusarium* były obecne we wszystkich latach badań, jednak ich udział procentowy oraz skład gatunkowy wykazywały zmienność. Obecność dominujących gatunków nie zawsze pokrywała się z uznaniem *F. graminearum* i *F. culmorum* za główne patogeny pszenicy w Polsce.
4. Liczba taksonów grzybów drożdżoidalnych ulegała zmianom w kolejnych latach badań. Największą różnorodność zaobserwowano w 2021 roku. Do najczęściej wykrywanych należały *S. roseus* i *V. victoriae*.
5. Nie wykazano korelacji pomiędzy liczebnością grzybów drożdżoidalnych a zasiedleniem ziarna przez *Fusarium* spp.

Literatura / References

Abdelsalam S.S.H., Mugwanya M., Gad A.G., Basyony A.B.A. 2024. Deciphering the wheat seed core mycobiome of two Egyptian cultivars (Giza 171 and Sids 14) by using high throughput amplicon sequencing of the ITS2 region. Journal of Plant Pathology 106 (2): 1325–1334. DOI: 10.1007/s42161-024-01689-x

Alfonzo A., Sicard D., Di Miceli G., Guezenec S., Settanni L. 2021. Ecology of yeasts associated with kernels of several durum wheat genotypes and their role in co-culture with *Saccharomyces cerevisiae* during dough leavening. Food Microbiology 94 (1–2): 103666. DOI: 10.1016/j.fm.2020.103666

Ali A., Ölmez F., Zeshan M.A., Mubeen M., Iftikhar Y., Sajid A., Abid M., Kumar A., Divvela P.K., Solanki M.K. 2024. Yeast-based solutions in controlling plant pathogens. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 58: 103199. DOI: 10.1016/j.bcab.2024.103199

Aslam S., Tahir A., Aslam M.F., Alam M.W., Shedayi A.A., Sadia S. 2017. Recent advances in molecular techniques for the identification of phytopathogenic fungi – a mini review. Journal of Plant Interactions 12 (1): 493–504. DOI: 10.1080/17429145.2017.1397205

Barret M., Briand M., Bonneau S., Préveaux A., Valière S., Bouchez O., Hunault G., Simoneau P., Jacquesa M.A. 2015. Emergence shapes the structure of the seed microbiota. Applied and Environmental Microbiology 81 (4): 1257–1266. DOI: 10.1128/AEM.03722-14

Bernreiter A. 2017. Molecular diagnostics to identify fungal plant pathogens – a review of current methods. Ecuador es Calidad: Revista Científica Ecuatoriana 4: 26–35.

Castoria R., Morena V., Caputo L., Panfili G., De Curtis F., De Cicco V. 2005. Effect of the biocontrol yeast *Rhodotorula glutinis* strain LS11 on patulin accumulation in stored apples. Phytopathology 95 (11): 1271–1278. DOI: 10.1094/PHYTO-95-1271

Chen J., Sharifi R., Khan M.S.S., Islam F., Bhat J.A., Kui L., Majeed A. 2022. Wheat microbiome: structure, dynamics, and role in improving performance under stress environments. Frontiers in Microbiology 12: 821546. DOI: 10.3389/fmicb.2021.821546

Comby M., Gacoin M., Robineau M., Rabenoelina F., Ptas S., Dupont J., Profizi C., Baillieul F. 2017. Screening of wheat endophytes as biological control agents against *Fusarium* head blight using two different *in vitro* tests. Microbiological Research 202: 11–20. DOI: 10.1016/j.micres.2017.04.014

Díaz-Cruz G.A., Smith C.M., Wiebe K.F., Villanueva S.M., Klonowski A.R., Cassone B.J. 2019. Applications of next-generation sequencing for large-scale pathogen diagnoses in soybean. Plant Disease 103 (6): 1075–1083. DOI: 10.1094/PDIS-05-18-0905-RE

Francesconi S. 2022. High-throughput and point-of-care detection of wheat fungal diseases: Potentialities of molecular and phenomics techniques toward in-field applicability. Frontiers in Agronomy 4: 980083. DOI: 10.3389/fagro.2022.980083

Gałązka A., Grządziel J. 2018. Fungal genetics and functional diversity of microbial communities in the soil under long-term monoculture of maize using different cultivation techniques. Frontiers in Microbiology 9: 76. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00076

Godfray H.C., Mason-D'Croz D., Robinson S. 2016. Food system consequences of a fungal disease epidemic in a major crop. Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences 371 (1709): 20150467. DOI: 10.1098/rstb.2015.0467

Hariharan G., Prasannath K. 2021. Recent advances in molecular diagnostics of fungal plant pathogens: A mini review. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology 10: 600234. DOI: 10.3389/fcimb.2020.600234

Ianiri G., Pinedo C., Fratianni A., Panfili G., Castoria R. 2017. Patulin degradation by the biocontrol yeast *Sporobolomyces* sp. is an inducible process. Toxins 9 (2): 61. DOI: 10.3390/toxins9020061

Karlsson I., Friberg H., Kolseth A.K., Steinberg C., Persson P. 2017. Organic farming increases richness of fungal taxa in the wheat phyllosphere. Molecular Ecology 26 (13): 3424–3436. DOI: 10.1111/mec.14132

Kowalska J., Krzymińska J., Tyburski J. 2022. Yeasts as a potential biological agent in plant disease protection and yield improvement – A short review. Agriculture 12 (9): 1404. DOI: 10.3390/agriculture12091404

Kurtzman C.P., Fell J.W., Boekhout T., Robert V. 2011. Methods for isolation, phenotypic characterization, and maintenance of yeasts. s. 87–110. W: The Yeasts: A Taxonomic Study, Chapter 7, 5th ed. (C.P. Kurtzman, J.W. Fell, T. Boekhout, red.). Elsevier B.V., Amsterdam, The Netherlands, 2354 ss. DOI: 10.1016/B978-0-444-52149-1.00007-0

Lanver D., Müller A.N., Happel P., Schweizer G., Haas F.B., Franitza M., Kahmann R. 2018. The biotrophic development of *Ustilago maydis* studied by RNA-Seq analysis. The Plant Cell 30 (2): 300–323. DOI: 10.1105/tpc.17.00764

Lievens B., Thomma B.P.H.J. 2005. Recent developments in pathogen detection arrays: implications for fungal plant pathogens and use in practice. Phytopathology 95 (12): 1374–1380. DOI: 10.1094/PHYTO-95-1374

Masenya K., Manganyi M.C., Dikobe T.B. 2024. Exploring cereal metagenomics: unravelling microbial communities for improved food security. Microorganisms 12 (3): 510. DOI: 10.3390/microorganisms12030510

McCartney H.A., Foster S.J., Fraaije B.A., Ward E. 2003. Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. Pest Management Science 59 (2): 129–142. DOI: 10.1002/ps.575

Minutillo S.A., Ruano-Rosa D., Abdelfattah A., Schena L., Malacrinò A. 2022. The fungal microbiome of wheat flour includes potential mycotoxin producers. Foods 11 (5): 676. DOI: 10.3390/foods11050676

Nelson E.B. 2018. The seed microbiome: Origins, interactions, and impacts. Plant and Soil 422: 7–34. DOI: 10.1007/s11104-017-3289-7

Nicolaisen M., Justesen A.F., Knorr K., Wang J., Pinnschmidt H.O. 2014. Fungal communities in wheat grain show significant coexistence patterns among species. Fungal Ecology 11: 145–153. DOI: 10.1016/j.funeco.2014.06.002

Patra J.K., Das G., Das S.K., Thatoi H. 2020. Isolation, culture, and biochemical characterization of microbes. s. 25–45. W: A Practical Guide to Environmental Biotechnology (J.K. Patra, G. Das, S.K. Das, H. Thatoi, red.). Springer, Singapore, 182 ss. DOI: 10.1007/978-981-15-6252-5_4

Pieczul K., Świerczyńska I., Wójtowicz A. 2025. Advanced rDNA-based detection of wheat pathogens in grain samples using next-generation sequencing (NGS). Pathogens 14 (2): 164. DOI: 10.3390/pathogens14020164

Pieczul K., Wąsowska A. 2017. The application of next-generation sequencing (NGS) for monitoring of *Zymoseptoria tritici* Qoi resistance. Crop Protection 92: 143–147. DOI: 10.1016/j.cropro.2016.10.026

Rojas E.C., Jensen B., Jørgensen H.J.L., Latz M.A.C., Esteban P., Ding Y., Collinge D.B. 2020a. Selection of fungal endophytes with biocontrol potential against *Fusarium* head blight in wheat. Biological Control 144: 104222. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2020.104222

Rojas E.C., Sapkota R., Jensen B., Jørgensen H.J.L., Henriksson T., Jørgensen L.N., Nicolaisen M., Collinge D.B. 2020b. Fusarium head blight modifies fungal endophytic communities during infection of wheat spikes. Microbial Ecology 79 (2): 397–408. DOI: 10.1007/s00248-019-01426-3

Salamon S., Mikołajczak K., Błaszczyk L. 2023. Constellation of the endophytic mycobiome in spring and winter wheat cultivars grown under various conditions. Scientific Reports 13: 6089. DOI: 10.1038/s41598-023-33195-y

Schoch C.L., Seifert K.A., Huhndorf S., Robert V., Spouge J.L., Levesque C.A., Chen W. 2012. Fungal Barcoding Consortium author list. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for *Fungi*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 109 (16): 6241–6246. DOI: 10.1073/pnas.1117018109

Sharma P., Sharma S. 2016. Paradigm shift in plant disease diagnostics: A journey from conventional diagnostics to nano-diagnostics. s. 237–264. W: Current Trends in Plant Disease Diagnostics and Management Practices (P. Kumar, V. Gupta, A. Tiwari, M. Kamle, red.). Springer, Cham, Switzerland, 469 ss. DOI: 10.1007/978-3-319-27312-9_11

Solanki M.K., Abdelfattah A., Sadhasivam S., Zakin V., Wisniewski M., Droby S., Sionov E. 2021. Analysis of stored wheat grain-associated microbiota reveals biocontrol activity among microorganisms against mycotoxigenic fungi. Journal of Fungi 7 (9): 781. DOI: 10.3390/jof7090781

Tedersoo L., Drenkhan R., Anslan S., Morales-Rodriguez C., Cleary M. 2019. High-throughput identification and diagnostics of pathogens and pests: Overview and practical recommendations. Molecular Ecology Resources 19 (1): 47–76. DOI: 10.1111/1755-0998.12959

Toju H., Tanabe A.S., Yamamoto S., Sato H. 2012. High-coverage ITS primers for the DNA-based identification of ascomycetes and basidiomycetes in environmental samples. PLoS One 7 (7): e40863. DOI: 10.1371/journal.pone.0040863

Wang R., Li M., Jin R., Liu Y., Guan E., Mohamed S.R., Bian K. 2024. Interactions among the composition changes in fungal communities and the main mycotoxins in simulated stored wheat grains. Journal of the Science of Food and Agriculture 104 (1): 373–382. DOI: 10.1002/jsfa.12928

War A.F., Bashir I., Reshi Z.A., Kardol P., Rashid I. 2023. Insights into the seed microbiome and its ecological significance in plant life. Microbiological Research 269: 127318. DOI: 10.1016/j.micres.2023.127318