

## SZAKMAI ZÁRÓJELENTÉS

a „**Száraz területek fás szárú növényeinek nem-patogén gyökér kolonizáló gombái – diverzitás és specificitás**” (K72776)

és a hozzá tartozó kiegészítő

„**Félszáraz homokterületek inváziós növényeinek arbuskuláris mikorrhiza képző gombái**” (NI81157)

*pályázatokról.*

**Témavezető: Kovács M. Gábor**

ELTE Biológiai Intézet, Növény szerkezet-tani Tanszék

**Beszámolási időszak:**

2008. június 1. – 2013. május 31. (K72776)

2010. március 1. – 2013. május 31. (NI81157)

A szárazföldi edényes növények döntő többsége gyökerén keresztül különböző gombákkal él mutualista szimbiózisban és ezt a funkcionális, strukturális egységet **mikorrhizának** nevezzük (Smith és Read 2008, Trappe 1996, Wang és Qiu 2006). A mikorrhizák egyik legfontosabb funkciója, hogy a gomba segíti a növény tápanyagfelvételét a talajból, és cserébe asszimilátumokat és vitaminokat kap a növénytől (Smith és Read 2008). Számos egyéb hatását is igazolták már a mikorrhiza kapcsolatoknak, mind az egyedek, mind a társulások, mind ökoszisztémák szintjén.

Nagyon gyakori mikorrhiza típus az **ektomikorrhiza** (EM), melyet általában tömlős és bazídiumos gombák – gyakran az úgynevezett „nagygombák” – leggyakrabban fás szárú növényekkel képzik, kolonizálva a gyökér kéregsejtjeinek intercellulárisait és gyakran gombaköpenyt hozva létre a gyökéren (Smith és Read 1997).

A Földön leginkább elterjedt, leggyakoribb mikorrhiza típus (Brachmann és Parniske 2006), az úgynevezett **arbuskuláris mikorrhiza** (AM). Ezt a mikorrhizát az gyökér kéregsejtbe intracellulárisan behatoló, többszörösen elágazó, fácskára emlékeztető gombaképletekről, az arbuskulumokról nevezték el (Smith és Read 1997). Az összes szárazföldi növénycsoportban találunk arbuskuláris mikorrhiza képző növényeket (Wang és Qiu 2006), de a kapcsolatot képző gombák minden esetben a valódi gombák *Glomeromycota* törzsébe tartoznak.

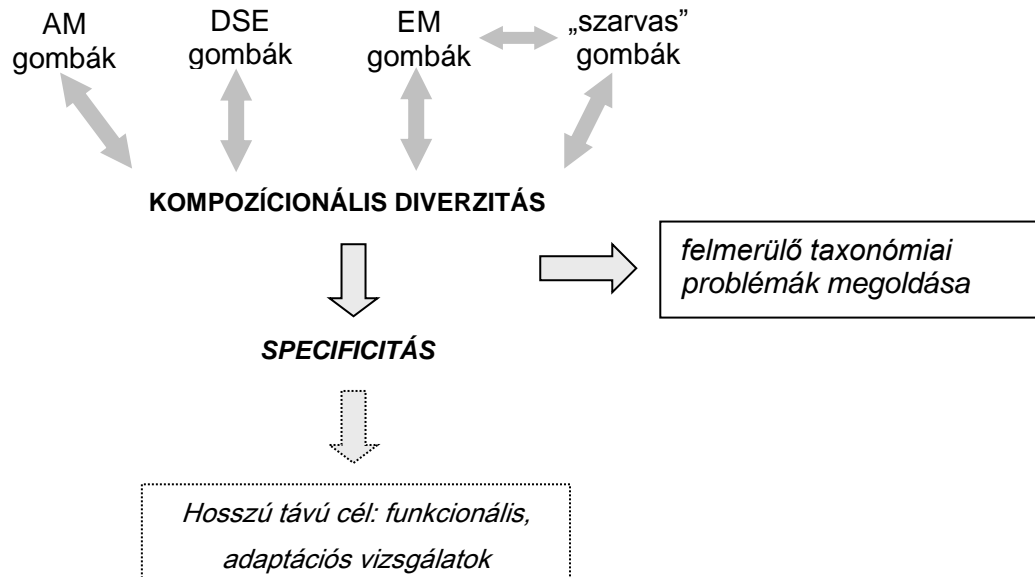
A mikorrhizák mellett gyakori gyökérkolonizáló gombák azok az endofitonok, amelyek sötét, melanizált, szeptált hifáik miatt a „**sötét-szeptált-endofitonok**” (dark septate endophytes, DSE) formacsoportba sorolhatók (Jumpponen és Trappe 1998, Jumpponen 2001, Mandyam és Jumpponen 2005). Habár a leggyakrabban tömlős gombákhoz tartozó DSE gombák növénykapcsolatai a szó klasszikus értelmében nem mikorrhizák, hatásuk változatos (Newsham 2011) egyes szélsőséges időjárású területeken gyakoriságuk és szerepük összemérhető a mikorrhizákéval (Jumpponen 2001).

Az olyan élőhelyeken, ahol az abiotikus stressz jelentős, mint például a félszáraz, száraz területek, a mutualista gomba-növény kölcsönhatások jelentősége is növekszik. Habár születtek eredmények a szárazság mikorrhiza képző gombákra gyakorolt hatásáról, a legtöbb szárazság stressz hatását vizsgáló munka a növényekre fókuszál. Ugyanígy elmondható, hogy **a gombák diverzitására irányuló kutatások között a (fél)száraz területek erősen alulreprezentáltak.**

Jelentős probléma, hogy kevés ismeretünk arról, hogy **mennyire** tekinthetők egyes (fél)száraz területek gyökérkolonizáló gombái **specifikusnak** az élőhelytípusra. Egy egyértelműen specializált csoportot jelentenek a mikorrhiza-képző **sivatagi szarvasgombák**

(Díez és mtsai. 2002, Kovács és Trappe 2013), melyeknél a földalatti termőtest-képzés is értelmezhető egyfajta adaptációs jellegként.

Az OTKA által támogatott kutatások fő irányvonalait és célkitűzéseit vázlatosan az 1. ábra foglalja össze. A pályázat **a három fő interakció (AM, EM, DSE) mikocentrikus vizsgálatát** tűzte ki célul. Fontos célunk volt egy olyan módszer fejlesztése, mellyel az interakciótípusok szimultán vizsgálhatók.



1. ábra: A kutatás irányainak vázlatos áttekintése.

Munkáink során célunk volt annak a hipotézisnek a vizsgálata, hogy léteznek (fél)száraz élőhelyekhez adaptálódott, specializálódott mutualista gyökérkolonizáló gomba-csoportok, továbbá, hogy **vannak ezeken a területeken az őshonos növényekhez specializálódott gomba-partnerek és generalisták**. Erre az őshonos és az inváziós növényeket kolonizáló gombaközösségek összevetésével következtethetünk, hiszen az inváziós növények, amennyiben gombapartnerrel élnek együtt (Pringle és mtsai. 2009, Bever és mtsai. 2010), feltehetően az adott terület generalista gombáival kapcsolnak.

Ez utóbbi munkahipotézis alapján végzett kutatások korai eredményei vezetett arra, hogy az inváziós növényeket kolonizáló AM-gomba (AMF) közösségeket részletesebben is vizsgáljuk.

#### A KUTATÁSOK SORÁN HASZNÁLT ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK VÁZLATOS ÁTTEKINTÉSE

Az anatómiai vizsgálatoknál elsősorban fénymikroszkópos módszereket használtunk. A gyökerekben *színtelenítéses* (KOH, esetleg H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) után egyszerű *festéssel* (anilinkék) tettük láthatóvá a gomba-struktúrákat. Ektomikorrhizák esetében a morfortípusokat szeteromikroszkóp alatt válogattuk, a köpeny szerkezetét Nomarski (DIC) optikával vizsgáltuk. Termőtestek vizsgálatánál a *perídium* szerkezete, az *aszkus* és *aszkospóra* jellemzőit vizsgáljuk, száraz, herbáriumi anyagoknál rehidratáció (víz, vagy 5% KOH – ez utóbbi hatékonyabb, de egyes csoportoknál megváltoztatja a spóra jellemzőket) után gyakran festést (gyapotkék) alkalmazva. A spóra ornamentáció vizsgálatához *pásztázó elektron mikroszkópiát* (SEM) is alkalmaztunk. Az AMF ivartalan spórákat talajból történő

mosásos izolálás után, tiszta és Meltzer reagenses PVLG-s lefedés után vizsgáljuk DIC optikával. Ultrastruktúra vizsgálatokhoz, mind gyökereknél mind termőtesteknél, glutáraldehydes fixálást követően Spurr-féle vagy durkupán műgyantába ágyasztuk a mintákat és félvékony vagy vékony metszeteket készítettünk. A szimultán vizualizációhoz alkalmazott technika vázlatos módszertana az adott eredmények bemutatásánál teszem meg.

Gombatorzseket *termőtestekből* vagy felszín sterilizált (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, vagy HOCl és etanol) *gyökérdarabokból* izoláltunk, leginkább MMN táptalajon. Az *in vitro* kísérleteknél felszín sterilizált magokból nevelt növénykéket fertőztünk a vizsgálni kívánt gombatorzsekekkel – zárt, táptalajos rendszerekben, kontrollált körülmények között.

A molekuláris filogenetikai, taxonómiai és diverzitási vizsgálatoknál teljes DNS vontunk ki az EM-ekből, gyökerekből (*in planta* AMF vizsgálatok), izolátumokból vagy termőtestekből. Ezekhez vagy a klasszikusnak számító *CTAB pufferes* eljárást vagy *DNS kivonó kitéket* használtunk (EZNA Omega, Qiagen). A vizsgálatok céljától és az összehasonlítandó adatoktól függően különböző szakaszait amplifikáltuk polimeráz láncrakcióval (PCR) elsősorban a magi riboszómális RNS-t kódoló gén-komplex (nrDNS; (SSU, ITS, LSU)) esetleg egyéb génszakaszok (pl. RPB1) megfelelő régióit. Ezeket direkt szekvenál(tat)tuk (esetleg több részletben, ha az amplikon hossza megkövetelte), vagy amennyiben a diverzitás vizsgálata volt a cél, vagy a minta megkövetelte, klónozás után szekvenáltunk, esetleg a klónok egy előszűrés (RFLP) után kerültek szekvenálásra. Filogenetikai számítások esetén megfelelő adatbázis (homológ szekvenciák például adott családból vagy rendből) kialakítása, illesztése (mafft, prankster) után maximum likelihood módszerrel (Modeltest, jModeltest) választottuk ki a legjobban illeszkedő nukleotidszubsztitúciós modellt, majd ezt használtuk genetikai távolság számításra és ebből Neighbor-Joining (NJ) módszerrel számítottunk fát. Maximum-Likelihood, Maximum-Parszimónia és Bayes MCMC módszerrel is kalkuláltuk törzsfákat, becsülve az elágazások megbízhatóságát (bootstrap, posterior valószínűség). Diverzitási vizsgálatoknál a kimérák tesztelése után megfelelő „threshold” értékkel klasztereket (MOTU) hoztunk létre, és különböző számításokat végeztünk (pl. mintavételi elegendőség, diverzitások) elsősorban a mothur program (Schloss és mtsai. 2009) segítségével. A nyilvános adatbázisokat (pl. GenBank, unite) használtuk és ezekbe a publikált adatainkat deponáltuk.

Az „új-generációs” szekvenáláson alapuló munkáinknál Roche-féle piroszekvenálási technikát alkalmaztunk, „Lib-L” kémiával, a „mid” azonosítókkal és megfelelő adapterekkel ellátott amplifikációs primereket alkalmazva. Volt munka (EM NGS alapú munkák) ahol az NGS szekvenálást szolgáltató labor végezte, míg máshol (AMF mikroskála) a munkát a nemzetközi együttműködő laborunkkal közösen mi végeztük, a teljes folyamatot az ELTE Biológiai Intézetének genomikai laboratóriumában fejezve be.

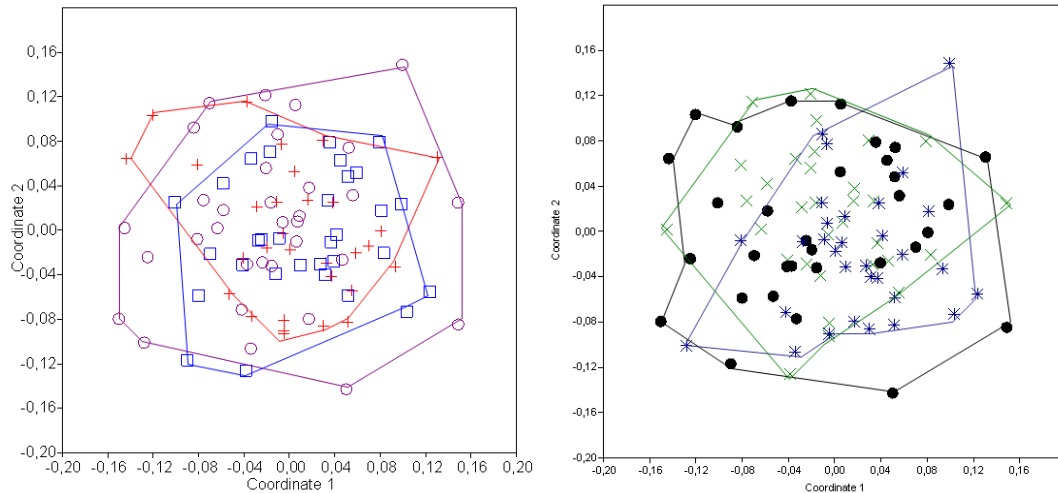
## ARBUSZKULÁRIS MIKORRHIZAKÉPZŐ GOMBÁK (AMF)

### **A boróka**

Az AMF közösségek vizsgálatánál a legnagyobb lélegzetvételű munka során három alföldi területen a közönséges boróka (*Juniperus communis*) AM gombáinak összehasonlítását végeztük el. A három homokterületről (Bugac, Fülöpháza, Tatárszentgyörgy) 10-10 megjelölt *Juniperus communis* egyedről gyűjtöttünk gyökérmintát egy-egy tavaszi, nyári és őszi mintát három év alatt. A borókat kolonizáló AMF-ek molekuláris diverzitási vizsgálataihoz az nrDNS SSU egy szakaszát (~550 bp) szaporítottuk fel az NS31-AM1 primer pár (Simon és mtsai. 1992, Helgason és mtsai. 1998) segítségével. Összesen 91 gyökérmintából (egy helyről meg kellett ismételnünk a mintavételt) összesen 2953 klón RFLP vizsgálata után 1728-at választottunk ki szekvenálásra, ebből 1512 bizonyult megfelelő minőségűnek, ebből a kevesebb, mint 6% kiméra és inkorrekt „reading”, és kevesebb, mint 2.25% aspecifikus amplikon kizárása után 1445 AMF szekvencia maradt. Ebből 427 volt egyediek („unique”) szekvencia; 1,5%-os eltérés szintjén definiált 78 MOTU-ba, az Öpik-féle (Öpik és mtsai. 2010) „virtuális taxonokból” 42-VTX-be rendeződnek. Az AMF nagyrészt ismert, más

területekről is kimutatott AMF-ek, viszont csupán 37%-uk tartalmaz ismert, leírt taxonok szekvenciáit, a többi csak szekvencia szinten ismert AMF leszármazási vonalakat képvisel.

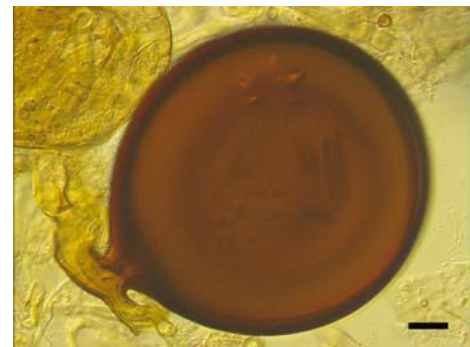
Az AMF közösségek szerkezetét sem a területek, sem az évszakok nem befolyásolták (2.



**2. ábra:** NMDS elemzések 78 MOTU prezencia-abszencia adatai alapján. **A:** Évszakok (lila kör: őszi; piros kereszt: nyár; kék négyzet: tavasz) **B:** mintavételi területek (zöld x: Bugac; fekete kör: Fülöpháza; sötétkék csillag: Tatárszentgyörgy) szerint.

**ábra).** Ezek az első olyan eredmények, melyek az AMF közösségek szezonálisitását 3 év adatain alapulva vizsgálták, hasonló eredménnyel, mint amire egy éves vizsgálatok (Davison és mtsai. 2012) jutottak.

A molekuláris munkálatok kiegészítéseként minden gyűjtöttünk, hogy vizsgáljuk, a csoport mely fajait tudjuk azonosítani a talajban található ivartalan spórájuk (3. **ábra)** alapján. A vizsgálat a talajmintákból közvetlenül és azoknak csapdanövényekkel való együtt tartása után történt. A korábbi hasonló vizsgálathoz képest (Takács és Bratek 2006) több faj, **28 ismert és két, feltehetően a tudományra új AMF faj spórája került elő a mintákból.** Az nrDNS lókuszokkal (SSU, ITS, LSU) végzett molekuláris taxonómiai vizsgálatai azt mutatják, hogy új fajok a *Diversispora* nemzetségbe tartoznak (1. **táblázat).**



**3. ábra:** *Glomus aureum* kiskunsági homoktalajból izolált klamidospórája. Fotó: Balázs K. Tímea

### **Inváziós növények**

A generalista csoportok kiszűréséhez megkezdjük a területen inváziós AMF képző növények vizsgálatát, melynek során a fent említett területeinken gyűjtött *Ailanthus altissima* és *Ambrosia artemisiifolia* gyökerekben vizsgáljuk az AMF diverzitást. Mind a fülöpházi, mind a tatárszentgyörgyi területen gyűjtöttünk mintákat, és ~800 AMF szekvencia alapján úgy látszik, hogy a gyakori AMF leszármazási vonalak (mint pl. a *Glomus (Rhizophagus) intraradices/irregulare*) generalisták, azok mind az őshonos, mind az inváziós növények gyökereiből kimutathatók voltak. Ezen adatok interpretálását nagymértékben nehezíti, hogy a talaj heterogenitása egyértelműen befolyásolhatja az AMF közösséget, és így akár kis

távolságokra lévő egyedek/fajok esetében sem biztos, hogy a növények faji hovatartozása határozza meg az esetleges *in planta* AMF közösségek különbségeit.

### **Mikroskála vizsgálatok**

A tatárszentgyörgyi területen két borókabokorba is belenőtt egy-egy bálványfa (*Ailanthus altissima*). Ez lehetővé tette, hogy mindkét bokornál olyan kis térfogatú talajmintákat vehessünk (~0,25 l), melyben mind a *Juniperus*, mind a bálványfa gyökerei megtalálhatók voltak. A két faj gyökerei könnyen megkülönböztethetők egymástól és egyéb, a környezetükben esetleg előforduló fajok gyökereitől is. Ilyen összefonódó gyökerek esetében **feltételezhettük, hogy az esetleges AMF közösségbeli különbségeket a növényfajok okozhatják**. Hét mintapár LSU régióra irányuló (da Silva és mtsai. 2006) diverzitásvizsgálata során 600 megfelelő minőségű AMF szekvenciát kaptunk klónozás és Sanger-szekvenálás után. Az LSU gén ezen szakaszára nincs elfogadott és általánosan használt „threshold” érték a MOTU-k kijelöléséhez, ezért Arthur Schüssler munkacsoportjának adatbázisát használva, a *Diversispora* nemzetséget figyelembe véve, meghatároztunk egy olyan küszöböt, mely hozzávetőlegesen megfeleltethető fajoknak. Ezzel a 3%-os küszöbértékkel 70(!) MOTU-t kaptunk a 7 mintapárból (innen 55 MOTU-t mutattunk ki a *Juniperus* SSU alapú munkákban). A **nagy csoportok** (mint például a *Glomus* (*Rhizophagus*) *intraradices/irregulare*) **generalistának mutatkoztak** (Gáspár és mtsai. 2012).

Habár a teljes mintára és a bokor-párokra minta-telítést megközelítőleg megkaptuk, az egyes mintákra nem, ami elbizonytalanítja a következtetéseinket. Ezért NGS elemzést indítottunk, a da Silva féle LSU primereket használva (ezen primerek első ilyen jellegű használata az AMF kutatásokban). Itt 8 mintapárból sikerült az amplifikáció és könyvtárkészítés, az ekvimoláris elegyítés után, sikeres emPCR-t és futtatás (Roche Junior platform) követően, a minőségi szűrés szigorúságának függvényében 60-90 ezer szekvenciát kaptunk (a szekvenciák értékelése folyamatban van).

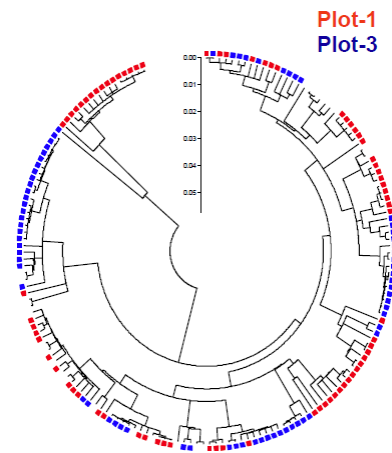
### **Primerrendszerek összehasonlító elemzése**

Amint az fentebb és a taxonómiai munkákban is látható, számos primerrendszert publikáltak, mint az AM gombákra specifikus PCR primereket. **Feltételeztük, hogy a különböző primerekkel végzett diverzitás-vizsgálatok különböző eredményekre vezetnek**. Ennek tesztelésére négy primerrendszert teszteltünk egy 14 fajból álló mesterséges AMF-közösségen. Az SSU-ra irányul a leggyakrabban használt NS31-AM1 (Simon és mtsai 1992, Helgason és mtsai. 1998) és az AML1-AML2 (Lee és mtsai. 2008) primerpár, az SSU 5' részétől és az LSU 3' részéig amplifikálja az nrDNS-t a Krüger és mtsai (2009) által publikált primerrendszer, és az SLU D1-D2 variabilis régióját erősíti fel a da Silva és mtsai. (2006) által tervezett primer. A publikált „annealing” hőmérsékleteket és az optimális reakciókörülményeket alkalmaztuk, és klónozás után minden esetben 96 klónt szekvenáltunk. Az eredmények jelentős különbségeket mutattak a leghatékonyabb rendszer (da Silva és mtsai. 2006) is csak hat fajt mutatott ki (Kovács és mtsai. 2012).

### **Ecuador**

2009 tavaszán expedíciót sikerült szerveznünk, melynek célja az volt, hogy mintákat gyűjtsünk dél-ecuadori magashegységi száraz területekről és vizsgáljuk az ott előforduló AMF közösségeket. Az egyik területről sikerült további vizsgálatokra alkalmas mintákat gyűjteni: a Catamayo folyó völgyében három mintavételi helyről összesen 6 növényfaj

(*Baccharis* sp., *Stachytarpheta steyermarkii*, *Croton wagneri*, *Euphorbia* sp., *Gaya calyprate*, *Peperomia peltigera*) két-két egyedét mintáztuk. A fajok AMF kolonizációja egyértelmű különbségeket mutatott. A molekuláris diverzitási vizsgálatokhoz egy újabb, de szintén az nrDNS SSU szakaszra irányuló primer rendszert (Lee és mtsai. 2008) használtunk. A nyert 350 AMF szekvencia 49(!) MOTU-ba rendeződött 1,5%-os „threshold” alkalmazásával, és sikerült **különbséget** kimutatnunk **a legalacsonyabban és legmagasabban** (700 m szintkülönbség) **fekvő mintavételi helyek között** (Kovács és mtsai. 2010a) (4. ábra). Nagy valószínűséggel teljesen új „virtuális taxonokat” (Öpik és mtsai. 2010) is sikerült kimutatnunk a területen. A gyökérminták mikroszkópos vizsgálatai viszont meglepő eredményre vezettek: a DSE kolonizáció szinte minimális mértékű volt.



**4. ábra:** A Catamayo folyó (Ecuador) völgyéből gyűjtött növények *in planta* AMF SSU szekvencia diverzitásának vázlatos bemutatása egy NJ fán. A kék és piros jelölés a két legtávolabbi mintavételi területről származó szekvenciákat jelölik

### Új taxonok leírása

Prof. Janusz Błaszkowski (Szczecin, Lengyelország) az alföldi AMF spóraizolálásokra irányuló együttműködésünk mellett az általa homokdűnékről izolált, morfológiájuk alapján feltehetően új AMF taxonok molekuláris filogenetikai jellemzését végezve dolgoztunk együtt. A beszámolási időszakban sikerült a fentebb már említett taxonok mellett számos új fajt leírunk illetve más esetekben ezek leírása folyamatban van (1. táblázat).

**1. táblázat:** Munkáink során leírt, leírás folyamatában lévő és a közeljövőben leírásra kerülő új Glomeromycota fajok áttekintése. A nemzetségek elnevezésénél az eredeti publikációkban szereplő nevek kerültek megadásra, a *Glomus* nemzetség revíziója sok esetben új kombinációkat eredményezett.

### Új AMF fajok

<i>Glomus achrum</i> Błaszk., D. Redecker, Koegel, Schützek, Oehl & Kovács, sp. nov. <sup>1</sup>
<i>Glomus bistratum</i> Błaszk., D. Redecker, Koegel, Symantcik, Oehl & Kovács, sp. nov. <sup>1</sup>
<i>Glomus perpusillum</i> Błaszk. & Kovács, sp. nov. <sup>2</sup>
<i>Glomus africanum</i> Błaszk. & Kovács, sp. nov. <sup>3</sup>
<i>Glomus iranicum</i> Błaszk., Kovács & Balázs, sp. nov. <sup>3</sup>
<i>Paraglomus majewskii</i> Błaszk. & Kovács, sp. nov. <sup>4</sup>
<i>Septoglomus fuscum</i> Błaszk., Chwat & Kovács, Ryszka, sp. nov. <sup>5</sup>
<i>Septoglomus furcatum</i> Błaszk., Chwat & Kovács, Ryszka, sp. nov. <sup>5</sup>
<i>Diversispora</i> új fajok G.235 és G.238 <sup>6</sup>

<sup>1</sup> Błaszkowski és mtsai. 2009a, <sup>2</sup> Błaszkowski és mtsai. 2009b, <sup>3</sup> Błaszkowski és mtsai. 2010.,

<sup>4</sup> Błaszkowski és mtsai. 2012, <sup>5</sup> Błaszkowski és mtsai. 2013

<sup>6</sup> Balázs, Błaszkowski, Gáspár, Lukács, Kovács (in prep)

Érdekes, hogy sok esetben a tengerparti homokdűnékből izolált AMF fajok molekuláris diverzitási vizsgálatok alapján más élőhelyekről is előkerültek – többek között Magyarországról származó mintákból is, mint például a *G. achrum* faj (Błaszkowski és mtsai. 2009a), melyet azonosítatlan AMF-ként korábban a kunfehértói erdőben élő virginiai holdruta gyökereiben mutattunk ki (Kovács és mtsai. 2007; OTKA D048333).

### **Publikációk**

Az AMF vizsgálatok témájában megjelent cikkek és egyéb publikációk  $\Rightarrow$  *feltöltve a pályázati rendszerbe.*

Az AMF vizsgálatok témájában *négy előkészített kézirat* publikálása várható: a *Juniperus*, a spóra-alapú, a mikroskála és a primerrendszer összehasonlító vizsgálatok eredményeit bemutató kéziratok.

### **Résztevők, együttműködések**

A munkákban részt vett hallgatók: Balázs Tímea (szakdolgozat / helyi TDK, helyezés/; PhD); Gáspár Bence (szakdolgozat /TDK különdíj, OTDK helyezés/); Lukács Alena (szakdolgozóként részben).

Együttműködések: Prof. Janusz Błaszkowski (Szczecin, Lengyelország); Prof. Francois Buscot és Dr. Tesfaye Wubet (UFZ-Helmholtz, Halle, Németország).

## **EKTOMIKORRHIZÁK**

Fő cél a Fülöpháza melletti félszáraz homokterületen az ektomikorrhiza-képző gombák (**EMF**) **diverzitásvizsgálata** volt. Munkánk során az **őshonos naprózsa** (*Fumana procumbens*), **rozmaringlevelű fűz** (*Salix rosmarinifolia*) és **fehér nyár** (*Populus alba*) valamint a tájidegen **feketefenyő** (*Pinus nigra*) EM gombapartnerait vizsgáltuk és hasonlítottuk össze.

A fülöpházi homokpusztagyepből az EM gomba termőtesteket is gyűjtöttünk, azonosítottunk, ezekből törzseket izoláltunk. Ezek mellett a területről Nagy G. László által 10 év során gyűjtött termőtestek ITS „barcoding”-ját is elvégeztük. A termőtestekből nyert ITS szekvenciákat az EM-ákból nyert gomba ITS szekvenciákkal és az talajból nyert (NGS) gomba ITS szekvenciákkal vetettük össze (MOTU-k azonosítása).

Mind a négy növény foltjaiból talajmintákat vettünk fel furatos mintavevő segítségével. A naprózsa minden egyes EM-áját legyűjtöttünk, a másik három vizsgált növény EM-ait pedig talajmintánként morfortípusokba soroltuk, és morfortípusonként fixáltunk mintákat. A közösségek jellemzésére jobb lett volna a randomizált EM gyűjtés, de a nyár és a fűz gyökerei olyan mértékben „csomósodtak” össze, hogy nem lehetett randomizált EM válogatást megvalósítani. Furatonként minden morfortípusból (vagy mintából – *Fumana*) DNS izolálás után a magi riboszomális DNS ITS régióját szaporítottuk fel és szekvenáltattuk.

Összesen **224 talajminta** (*Fumana*: 98 (két foltból), *Salix*: 33 (két foltból), *Populus*: 33 (két foltból), *Pinus*: 60 (egy foltból)) feldolgozása történt meg. Több mint ezer EM-ált gyökérvéget „gyűjtöttünk le” *Fumana* mintákból; 586, 435, illetve 121 morfortípust különítettünk el összesen a talajmintákból a *Salix*, *Populus*, valamint a *Pinus* esetében. Az **ektomikorrhiza mintákból összesen 919 használható gomba ITS szekvenciát** kaptunk

(*Fumana*: 325, *Salix*: 292, *Populus*: 183, *Pinus*: 119). A kapott szekvenciák rendre 28, 58, 50, és 26 molekuláris taxonómiai egységbe (MOTU) rendeződtek (Seress és mtsai. 2012).

Találtunk olyan gombákat, amelyek csak egy-egy vizsgált növény gyökerein előforduló, specialista EM gombák, ilyenek például a feketefenyőhöz kapcsolt, a területen tájidegen *Rhizopogon* és *Suillus* fajok (Seress és Kovács 2010).

Azonosítottunk több, őshonos és tájidegen növényeket egyaránt kolonizáló, **generalistának** tekinthető **EM képző gombát** (például *Geopora arenicola*, *Inocybe dunensis*). Olyan EM gombákat is sikerült kimutatnunk, melyek **korábban nem voltak ismertek a területről** (például *Tuber* és *Tomentella* fajok).

A munka során a fülöpházi homokpusztagyepből gyűjtött **több, mint 180 darab termőtest**, köztük több, mint 90 darab EM gomba termőtest „barcoding”-ja történt meg. A termőtest ITS szekvenciákból létrehozott saját adatbázis nagyon hasznosnak bizonyult a területen talált EM-ák azonosításához, hiszen olyan EM-ák is voltak ezek között, amelyek azonosításához nem volt megfelelő referenciaként szolgáló ITS szekvencia a nyilvános szekvencia adatbázisokban (például *Inocybe javorkae*).

Számos EM képző gombafaj a területen gyűjtött termőtesteiből izoláltunk törzseket, **közel 20 EMF izolátum** áll a rendelkezésünkre.

A talajból kiinduló NGS vizsgálatokra Dr. Geml József (Leiden, Hollandia) biogeográfiai projektjéhez kapcsolódva nyílt lehetőségünk, melynek során egy fenyő és két-két *Salix*, *Populus* és *Fumana* foltból vettünk mintákat, foltonként 20 talajmintát kevertünk/homogenizáltunk, majd ezekből indultak ki az elemzések. ITS adatokkal együtt elemezve az EM adatokat szigorú elveket követtünk az EM taxonok (MOTU-k) azonosítására, és így, **a négy növényről összesen 124 EMF MOTU-t** jelöltünk. Az adatok részletes értékelése folyamatban van, de az már most is látszik, hogy a leginkább a kitett, nyílt *Fumana* foltok térnek el EMF gombaközösségeik szempontjából a másik három növénytől.

### **Publikációk**

Az EM vizsgálatok témájában megjelent cikkek és egyéb publikációk ⇒ *feltöltve a pályázati rendszerbe.*

Az EM vizsgálatok témájában *két előkészített kézirat* befejezése várható: a fülöpházi terület összehasonlító vizsgálata és *Inocybe* fajok EM jellemzésének bemutatása.

### **Résztevők, együttműködések**

A munkákban részt vett hallgatók: Seress Diána (szakdolgozat /TDK, OTDK helyezett/; PhD); Lukács Alena (szakdolgozat /TDK helyezett, OTDK különdíj/); Németh Julianna (szakdolgozat /OTDK különdíj/).

Együttműködések: Dr. Geml József (Leiden, Hollandia), Dr. Nagy G. László (Clark University, USA).

## **SÖTÉT SZEPTÁLT ENDOFITONOK (DSE)**

A bugaci, fülöpházi és tatárszentgyörgyi területeken nyolc honos (*Stipa borysthena*, *Festuca vaginata*, *Populus alba*, *Ephedra distachya*, *Fumana procumbens*, *Helianthemum ovatum*, *Juniperus communis*, *Medicago minima*) és három inváziós növényfaj (*Ailanthus altissima*, *Ambrosia artemisiifolia*, *Asclepias syriaca*) gyökereiből izoláltunk gombatorzseket. A telepek jellemzői alapján izoláltuk az egyes mintákról származó gombákat, és mintánként a



különböző izolátumok nrDNS ITS szakaszát szekvenáltuk. A munkák első szakaszában több mint 300 törzset izoláltunk és ezek közül 241 ITS szekvenciáját határoztuk meg (Knapp és mtsai. 2012.). Különböző rendekbe (Pleosporales, Eurotiales, Hypocreales, Helotiales, Xylariales) tartozó gombákat sikerült izolálni. gombaközösségeihez. Némelyik törzs ITS szekvenciája teljes egyezést mutatott félszáraz, félsivatagos területek gyökérekolonizáló gombáival. A törzsek tulajdonságainak *in vitro* tesztelését is elvégeztük. Póréhagyma növénykéket fertőztünk az ITS szekvenciák alapján kapott fő csoportok (összesen 41 „lineage”, 16 „csoport” /több, mint 2 izolátum/) reprezentáns törzseivel (összesen 59 törzs), hogy vizsgáljuk, a gomba (i) kolonizálja-e a gyökereket, (ii) ez a kolonizáció eredményez-e bármiféle negatív hatást a növény növekedésében, és (iii) létrehozza-e a gomba a DSE formacsoportra jellemző mikroszleróciumokat a gyökerekben. Több csoport egyértelműen endofitonnak bizonyult és ezek közül számos esetben igazolható volt, hogy a gombák mikroszleróciumokat hoztak létre a gyökerekben. A 241 izolátum **~60 %-a adódott DSE-nek**. Hozzá kell tennünk, a DSE interakciók jellemzőinek általánosan ismert variabilitása, gazdanövény és abiotikus környékfüggése miatt (Newsham 2011) feltételezhetjük, hogy a nem DSE gombaként kezelt törzsek is lehetnek DSE-k, vagy legalább endofitonok „természetes” körülmények között. Az AMF vizsgálatok három területének jelölt *Juniperus* egyedéről izoláltunk gombákat, hogy vizsgáljuk a DSE-k szezonálisitását és terület specifikitását. Nem találtunk olyan „nem-singleton” DSE csoportot, amiben ne fordult volna elő legalább két területről és évszaktól származó izolátum (Knapp és mtsai. 2012).

Hasonlóan ehhez, mind az inváziós és őshonos növényekből is előkerültek a több reprezentánssal bíró DSE csoportok – ezek alapján ezeket a DSE gombákat egyértelműen generalistáknak tekinthetjük. Ezek az eredmények elég alapot biztosítanak ahhoz, hogy az izolátum-gyűjtemény leggyakoribb gombáit funkcionális kísérletekhez használjuk.

Az eredményeink azt mutatták, hogy a **félszáraz homokterületeink DSE közösségének „core” tagjai generalisták**, nem mutatnak sem terület specifikitást sem szezonálisitást. Ráadásul megegyeznek észak-amerikai félszáraz füves területek DSE közösségeinek fő tagjaival. Ez alapján kiterjesztettük a korábban az észak-amerikai gyepekre vonatkoztatott hipotézist, azzal, hogy feltételezhető, hogy a (fél)száraz gyepek DSE közösségei globálisan hasonló „core” tagokkal bírnak.

A kutatások ezt követő szakaszában az nrDNS ITS szakaszára tervezett diagnosztikai PCR segítségével célzottan izoláltunk négy DSE csoportból (*Cadophora*, *Rhizopycnis*, *Periconia*, Pleosporales csoport), majd az izolátumokon Inter Sample Sequence Repeat (ISSR) elemzéseket végeztünk a gombákon általánosan használt primerek segítségével. Habár a módszer – amint az várható is volt – a csoportok nagyobb variabilitását mutatta ki, mint az ITS szekvenciák elemzése, az kapott csoportok sem mutattak összefüggést gazdanövényekkel, évszakokkal vagy mikrohabitatokkal (Knapp és Kovács 2012; Knapp és mtsai. 2013).

### **Publikációk**

A DSE vizsgálatok témájában megjelent cikkek és egyéb publikációk  $\Rightarrow$  *feltöltve a pályázati rendszerbe.*

### **Résztevők, együttműködések**

A munkákban részt vett hallgatók: Knapp Dániel (szakdolgozat /TDK, OTDK helyezett/; PhD); Zajta Erik (jelenleg szakdolgozó).

## SIVATAGI SZARVASGOMBÁK

A földalatti termőtestképzés értelmezhető egyfajta száraz élőhelyekhez való adaptációként is, mely előny lehet a gombának például spóraszórás szempontjából kedvezőtlen körülmények közötti ivaros szaporodásában, terjedésében. Nem véletlen, hogy például ausztrál (fél)száraz területeken arányaiban is jóval több földalatti termőtestképző „nagygomba” fajt találtak több évtizedes módszeres mintavétellel, mint föld fölöttit (Trappe, nem publikált adatok). A valódi szarvasgombákat (földalatti termőtestű tömlősgombák) általánosan (ekto)mikorrhiza képzőknek tartjuk, így (fél)száraz területeken, mint mutualista partnerek nagyban segíthetik a növényeket, és emellett a termőtestek fontos táplálékul szolgálnak a spóráikat terjesztő mikofág állatoknak. A helyi (ős)lakosság életében is alapvető szerepet játszanak a sivatagi szarvasgombák (Trappe és mtsai. 2008a,b , Alsheikh 1994). **Sivatagi élőhelyekhez adaptálódott leszármazási vonalak többször is megjelentek a csészegombák rendjének evolúciójában** (Kovács és Trappe 2013), ami jelezheti, hogy az ilyen élőhelyekhez való alkalmazkodás genetikai háttere nem túl bonyolult.

A sivatagi szarvasgombákra irányuló egyik munkánk során bizonyítást nyert, hogy **mind délafrikai, mind ausztrál sivatagokban is élnek a *Mattiolomyces* nemzetségbe tartozó szarvasgombák** (Trappe és mtsai. 2010a,b). Ez a nemzetség sokáig monotipikus volt, egyedüli képviselője a hazánkban gyakori homoki szarvasgomba (*Mattiolomyces terfezioides*  $\equiv$  *Terfezia terfezioides*) faj volt. A gomba legtöbb gyűjtése a Kárpát-medencéből került dokumentálásra, ahol elsősorban homokos talajok elegyes akácosaiban gyűjtik – többek között alföldi területeken.

A homoki szarvasgomba termőtestének **ultrastruktúra vizsgálatai** során az általános Pezizaceae karaktereket találtuk, a családban viszont először mutattuk ki szögletes Woronin-testek jelenlétét (Healy és Kovács 2010). Az általános jellemzők mellett számos apró különbség mutatkozott a 2003-ban tévesen ebbe a nemzetségbe sorolt *Mattiolomyces tiffanyae* jellemzőitől. (Healy 2003). A részletes revízió során kiderült, hogy ez a gomba valójában egy új nemzetség (*Temperantia*) képviselője (Kovács és mtsai. 2011a). A faj feltűnése és a legismertebb sivatagi szarvasgomba nemzetség (lásd alább), az Észak Amerika területéről leírt három *Terfezia* fajra irányította figyelmünket, ezek közül egy, a *T. gigantea* Észak-Amerika és Japán területén rendszeresen gyűjtött faj. Igazoltuk, hogy ez az Asa-Gray diszjunkciót mutató taxon nem sorolható a jelenleg ismert nemzetségek egyikébe sem (**2. táblázat**). Ezen túlmenően, nem is a Pezizaceae (mint a valódi *Terfezia* fajok), hanem a Morchellaceae családba tartozik (Kovács és mtsai. 2008). A másik két észak amerikai faj sem tartozik a *Terfezia* nemzetségbe, egyikük számára (*T. longii*) egy új nemzetséget (*Stouffera*) írtunk le, a másik (*T. spinosa*) viszont a *Mattiolomyces* nemzetségbe tartozik (Kovács és mtsai. 2011a) (**2. táblázat**). Érdekesség, hogy az utóbbi faj pakisztáni gyűjtésekből is előkerült (Kovács és mtsai. 2011a). Ausztráliai és dél-afrikai sivatagos területeken gyűjtött szarvasgombák vizsgálatai során, molekuláris taxonómiai módszerekkel sikerült a *Mattiolomyces* nemzetséget mind Ausztráliából, mind Dél-Afrikából kimutatni (Trappe és mtsai. 2010a,b). Közben egy újabb ázsiai anyagról is sikerült igazolni, hogy a *Mattiolomyces* nemzetségbe tartozik (Kovács és mtsai. 2010b), így ma **ez a földalatti nemzetség sokkal elterjedtebb, mint ahogy azt akár 10 éve is gondoltuk**. A *Mattiolomyces* nemzetséget 1971-ben alnemzetség szinten a *Terfezia* nemzetségbe sorolták, de a molekuláris filogenetikai vizsgálatok egyértelműen mutatják: a nemzetség önálló és elkülönül a *Terfezia* nemzetségtől. A *Terfezia* fajok azért érdekesek a kutatásaink szempontjából, mert elsősorban száraz

területeken élnek, a legismertebb sivatagi szarvasgombák tartoznak ide. Herbáriumi anyagok feldolgozásakor vizsgáltuk a spanyolországi *Terfezia* fajok változatosságát (Kovács és mtsai. 2011b). A gyűjtemény-revízió során igazoltuk, hogy a nemzetség bizonyos fajai jól azonosíthatók (pl. *T. arenaria*, *T. claveryi*), de a sejtes (pszeudoparenchimatikus) perídiumú és tüskés spórájú *Terfeziák* nagyon változatosak. A többek által szinonímának tekintett *T. leptoderma* elkülönül, azonosítható faj, de számos leszármazási vonalhoz már nem kapcsolható egyértelmű morfológiai bélyeg, ráadásul az végképp nem eldönthető, hogy a számos érvényes név, leírt faj közül melyik köthető az egyes kládokhoz. (**5. ábra**, Kovács és mtsai. 2011b). Ezeket ezért a legmegfelelőbb ***T. claveryi* faj-komplexxént** kezelni. A munka során nagyfokú **termőtesten belüli ITS heterogenitást** találtunk egyes termőtestekben, célzott klónozáson alapuló vizsgálatainkkal akár 2-7 különböző ITS típust mutattunk ki egy mintából, 1-12(!) nukleotidnyi maximális különbséggel (Kovács és mtsai. 2011b). Már a fénymikroszkópos munkáknál kitűnt néhány *Terfezia*-példány egyedi karakter-kombinációja: sejtes szerkezetű perídiumuk és hálózatos mintájú spórájuk volt. Retikulát spórája csak a *T. claveryi* fajnak van, annak viszont teljesen más szerkezetű a perídiuma; az egyedinek gondolt spóra-ornamentáció miatt feltehetően a rutin határozás során ezt nem ellenőrizték. Az egyedek a molekuláris taxonómiai vizsgálatok során is elkülönültek, egy új fajt írtunk le számukra, melyet *T. alsheikhii*-nek neveztünk el (**2. táblázat**, Kovács és mtsai. 2011b).

**2. táblázat:** A projekt során leírt új földalatti termőtestű Ascomycota taxonok és a revíziók során létrehozott új kombinációk áttekintése.

### Új taxonok és kombinációk

---

*Imaia* Trappe & Kovács, gen. nov.<sup>1</sup>

*Imaia gigantea* (Imai) Trappe & Kovács, comb. nov.<sup>1</sup>

≡ *Terfezia gigantea* Imai

---

*Mattiolomyces* Fischer

*Mattiolomyces austroafricanus* (Trappe & Marasas) Kovács, Trappe & Claridge, comb. nov.<sup>2,3</sup>

≡ *Terfezia austroafricana* Trappe & Marasas

*Mattiolomyces mexicanus* Kovács, Trappe & Alsheikh, sp. nov.<sup>4</sup>

*Mattiolomyces mulpu* Kovács, Trappe & Claridge, sp. nov.<sup>2</sup>

*Mattiolomyces spinosus* (Harkn.) Kovács, Trappe & Alsheikh, comb. nov.<sup>4</sup>

≡ *Terfezia spinosa* Harkn.

---

*Stouffera* Kovács & Trappe, gen. nov.<sup>4</sup>

*Stouffera longii* (Gilkey) Kovács & Trappe, comb. nov.<sup>4</sup>

≡ *Terfezia longii* Gilkey

---

*Temperantia* K. Hansen, Healy & Kovács, gen. nov.<sup>4</sup>

*Temperantia tiffanyae* (Healy) K. Hansen, Healy & Kovács, comb. nov.<sup>4</sup>

≡ *Mattiolomyces tiffanyae* Healy

---

*Terfezia* (Tul. & C. Tul.) Tul. & C. Tul.

*Terfezia alsheikhii* Kovács, M. P. Martín, Calonge, sp. nov.<sup>5</sup>

---

*Ulurua* Trappe, Claridge & Kovács gen. nov.<sup>2</sup>

*Ulurua nonparaphysata* Trappe, Claridge & Kovács sp. nov.<sup>2</sup>

---

<sup>1</sup> Kovács és mtsai. 2008, <sup>2</sup> Trappe és mtsai. 2010a, <sup>3</sup> Trappe és mtsai. 2010b,

<sup>4</sup> Kovács és mtsai. 2011a, <sup>5</sup> Kovács és mtsai. 2011b

Feltehetően ez a határozási rutin eredményezte azt is, hogy *T. claveryi* példányként volt deponálva a madridi herbáriumban egy homoki szarvasgomba példány, amit Madrid belterületén gyűjtöttek – ez jelenleg a homoki szarvasgomba legdélebbi és legnyugatabbi előfordulása (Kovács és mtsai. 2009).

A (fél)száraz területek szarvasgombáin folyó jelenlegi munkáink ausztráliai, részletesen korábban nem vizsgált mintákon folynak. A *Gymnohydnotrya* nemzetség (Zhang és Minter 1989) revíziója és molekuláris filogenetikai vizsgálatai legalább egy, míg a *Tuberaceae* család *Labyrinthomyces-Dingleya-Reddellomyces* /LDR/ csoportjának (Trappe és mtsai. 1992.) revíziója legalább négy új szarvasgomba fajra utalnak. Érdekes részeredmény, hogy az Észak-Afrikában eukaliptusz fák partnereként leírt, ültetett eukaliptuszok alatt a Föld számos pontján (Spanyolországban például rendszeresen (Díez 2005)) gyűjtött *Reddellomyces donkii* fajt sikerült **megtalálni az ausztrál gyűjtések között** – eddig csak feltételezték, hogy a gazdanövényéhez hasonlóan Ausztráliából származik ez a szarvasgomba.

A *Terfezia* nemzetségen végzett munkáink jelentették az alapot arra, hogy további lókuszkok vizsgálatával csatlakozni tudtunk a **gombák DNS-vonalkódjának** kiválasztására létrejött nemzetközi konzorciumhoz. Ezen munka során információtartalmak és praktikus szempontok (pl. amplifikálhatóság) figyelembevételével az nrDNS ITS régió szekvenciáit javasoltuk a gombák DNS-vonalkódjának (Schoch és mtsai 2012), melyet közben már hivatalosan el is fogadtak.

### Publikációk

A sivagati szarvasgombák témájában megjelent cikkek és egyéb publikációk ⇒ *feltöltve a pályázati rendszerbe.*

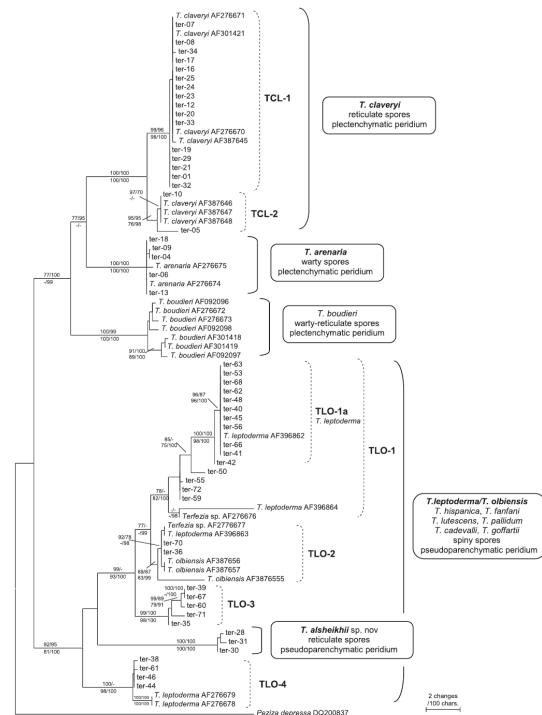
A szarvasgomba vizsgálatok témájában két előkészített kézirat befejezése várható: a *Gymnohydnotrya* revízió/új faj témájában és a *R. donkii* „megtalálása” /rövid közlemény/ bemutatása.

### Résztvevők, együttműködések

A munkákban feladatokat elvégző hallgatók: Balázs Tímea (*Terfezia* ITS variabilitás), Knapp Dániel (*Terfezia* „vonalkód” munkák, *Gymnohydnotrya* molekuláris taxonómia), Seress Diána (*Gymnohydnotrya* molekuláris taxonómia).

Mikroszkópos (TEM, SEM) munkák: Dr. Bóka Károly és Dr. Vági Pál (ELTE Biológiai Intézet).

Együttműködések: Prof. James M. Trappe (Corvallis, Oregon, USA), Prof. Joseph W. Spatafora (OSU, Corvallis, Oregon, USA), Dr. María Paz Martín (RJB Madrid, Spanyolország).



5. ábra: A *Terfezia* fajok ITS szekvenciáiból maximum likelihood módszerrel számított törzsfá. Az elágazásoknál a fenti első érték az ML az utána jövő az MP bootstrap %-ban (70% alatt nincs megadva) alatta pedig a posterior valószínűség %-ban (90% alatt nincs megadva). (Kovács és mtsai. 2011b Fig. 2)

## A SZIMULTÁN VIZSGÁLATOK MÓDSZERE

Az eredeti kutatási tervben nagy hangsúlyt kapott, hogy találjunk és alkalmazzunk egy olyan módszert, mellyel a **különböző interakció-típusokat létrehozó gombák szimultán vizsgálhatók**. Több lehetőség és ötlet után a fluoreszcens *in situ* hibridizációs (FISH) technika alkalmazása mellett döntöttünk, ezen belül is **rRNS FISH** alkalmazása tűnt ígéretesnek. Számos gomba-specifikus próbát próbáltunk alkalmazni, és több eljárás kipróbálásával sikerült egy optimálisnak tekinthető módszert találni. A növényi autofluoreszcencia okozta probléma leküzdésénél különböző növényfajok gyökereinek fluoreszcencia spektroszkópiával végzett vizsgálati eredményeit használtuk az optimális jelölés kiválasztásában. Az rRNS LSU szakaszának D1-D2 régiójára olyan próbákat terveztünk, melyek specifikusan a gyakori *Cadophora* DSE törzshöz és a *Glomus/Rhizophagus intraradices* AMF gombához kötődnek. Ezzel lehetővé vált, hogy ezen két gombával inokulált kukorica gyökereiben egyszerre jelöljük és tegyük láthatóvá a két különböző gombát. Ez a munka az első, ami különböző gombák specifikus szimultán *in planta* vizualizációját mutatja be.

### **Publikációk**

A szimultán vizualizációt bemutató kéziratunk pozitív bírálatok után, jelenleg átdolgozás alatt, a Mycorrhiza folyóirathoz visszaküldés előtt áll.

### **Résztevők, együttműködések**

A munkákban feladatokat elvégző hallgatók: Knapp Dániel, Seress Diána.

A projekben résztvevő Dr. Vági Pál (ELTE Biológiai Intézet) legfontosabb feladata volt ezen a problémán dolgozni.

## HOL REJTŐZKÖDIK A DIVERZITÁS?

A valódi gombák leírt fajainak száma körülbelül 120 000-re tehető. Körülbelül évente 1000 új gomba fajt írnak/írunk le. Számos olyan terület van a száraz élőhelyek mellett, melyeket csak az utóbbi időben kezdünk jobban megismerni, például a **trópusi területek mikorrhiza-képző gombaközösségeit** (Kottke és Kovács 2013) A molekuláris diverzitási vizsgálati módszerek, különösen az NGS technikák rohamszerű fejlődése komoly áttörést hozott, és az ilyen munkákban általában jelentős számú „azonosítatlan MOTU” jelentkezik. Ez mutat(hat)ja a jelentős mennyiségű leíratlan gombafaj létezését is, de nem szabad megfeledkeznünk arról, hogy a leírt fajok jelentős részéről semmiféle szekvencia-adat nem áll rendelkezésünkre. A herbáriumok, típus-anyagok feldolgozása, revideálása nagyon fontos lenne. A talajokban gyakori *Mortierella* nemzetség törzsgyűjteményének elemzésével igazolást nyert, hogy számos azonosítatlan MOTU nem új taxont, hanem leírt, de szekvencia-adatokkal nem reprezentált fajt reprezentált (Nagy és mtsai. 2011). Feltételezhetően ez más nemzetségeknél is hasonló lehet. A **gyűjteményekben „rejtőzködő” diverzitásra** több példát is adtak a különböző sivatagi szarvasgombák revíziói. A monotipikus *Mattiolomyces* nemzetség számos új tagját azonosítottuk gyűjteményekben, számos új nemzetséget azonosítottunk, vagy éppen új fajt, esetleg élőhelyet „találtunk” nem megfelelően azonosított gyűjteményi példányok vizsgálatakor (ld. fentebb).

## ÁLTALÁNOS MEGJEGYZÉSEK, PROBLÉMÁK

A kutatásokat eredetileg négy évre terveztük – így egyértelmű, hogy az öt éves időtartam az eredeti tervek megváltozását jelzi. Számos olyan lehetőség, tudományos probléma és kérdés vetődött fel a munkák során, ami indokoltta tette a pályázat meghosszabbítását. A kiegészítő pályázat elnyerésénél egy kisebb adminisztrációs probléma miatt a költségeinkkel átmenetileg erősen vissza kellett fogni (mivel alkalmazás nem volt a pályázaton, ez – többek között a nemzetközi együttműködések miatt – nem okozott szerencsére jelentős problémát), így a hosszabbítás finanszírozása sem jelentett gondot.

A pályázat 2007-ben készült, számos olyan elemet tartalmazott, ami akkor elfogadható, költséghatékony volt. Például a Sanger-szekvenálásnál csupán „futtatni” küldtük eleinte a mintákat etc. A szolgáltatások árának csökkenése azonban indokolatlanná tette, hogy ezt ne külső cégekkel végeztessük, így eredetileg „fogyóeszközként” tervezett költségek a szolgáltatások „egyéb” költségén jelentkeztek.

Amikor a pályázat íródott még nem voltak ennyire „alapvető” rutin eljárások és könnyen elérhetők az NGS különböző platformjainak alkalmazásai. Ezek ma már a molekuláris diverzitási munkákban is alapvetőek, rutinszerűen használtak. Egyes rész-munkákat utólag már nem tudtuk kiegészíteni ilyen elemzésekkel (pl. a boróka AMF vizsgálatok) és ez egyértelműen befolyásolja azok publikálhatóságát is. Más esetekben nemzetközi együttműködő partnereken keresztül vált ez lehetővé (pl. EMF diverzitás, Dr. Geml József, Leiden), vagy a kiegészítő pályázat költségeibe a nemzetközi partnerünk (UFZ-Helmholtz, Németország) és hazai lehetőségeink miatt be tudtuk építeni ezeket a vizsgálati módszereket is.

## ELŐKÉSZÍTETT PUBLIKÁCIÓK

A több részénél az eredmények elemzése, ezek interpretálása nem fejeződött még be, vagy éppen a konkrét munkálatok (AMF NGS-munkák, futtatás) még 2013 májusában is folytak. Az egyes fejezeteknél feltüntettem azon tudományos szakcikk-kéziratok hozzávetőleges címét, melyek előkészítése, összeállítása megkezdődött (ezek közül számos eredmény konferenciákon már bemutatásra került). Bár a publikációk elfogadását nehéz megjósolni, feltételezhető, hogy ezen kéziratok a projekt lezárását követő két éven belül a publikálás teljes folyamatán keresztül jutnak – természetesen, minden esetben az OTKA támogatás(ok) feltüntetésével. *Ezen jövőbeli publikációk megadásánál a lehető legszigorúbban jártam el: kizárólag azokat tüntettem fel, melyeknél valóban szinte biztosra vehető a publikálás.* Vannak olyan esetek – mint például az ún. LDR-csoport taxonómiája – ahol olyan nehezen kezelhetőnek tűnnek nevezéktani és típusokhoz köthető problémák, hogy egyáltalán nem biztos, hogy az azonosított gondok feloldhatók, tisztázhatók belátható és vállalható munkával. Ilyen helyzetekben kerültem a jövőbeli publikáció ígéretét.

## ZÁRÓGONDOLATOK, KITEKINTÉS

A projekt fő célkitűzése a (fél)száraz területek nem-patogén gyökérkolonizáló gombáinak kompozicionális diverzitásának és specificitási viszonyainak vizsgálata volt, többek között azzal a céllal, hogy ezen adatok alapján a későbbiekben az izolátumokkal funkcionális vizsgálatokat is végezhessünk. *Ezekhez fontos olyan törzseket használni, melyekről tudjuk,*

hogy generalisták és gyakoriak ilyen területeken, hiszen így lehet releváns a funkcionális eredmények extrapolálása. Ezen adatok és izolátumok birtokunkban vannak, azonban a tervezett mikocentrikus funkcionális vizsgálataink – habár együttes inokulációk elengedhetetlenek – már nem irányulhatnak az összes kölcsönhatás típusra. Több szempont figyelembevételével a DSE gombák funkcionális diverzitási kutatásait tűztük ki célul, és ez a projekt egy elnyert OTKA pályázat támogatásával rövidesen el is indulhat.

#### IRODALOM

- Alsheikh, AM (1994) Taxonomy and mycorrhizal ecology of the desert truffles in the genus *Terfezia*. Ph.D. dolgozat, Oregon State University, Corvallis.
- Bever, JD, Dickie, IA, Facelli, E, Facelli, JM, Klironomos, JN, Moora, M, Rillig, MC, Stock, WD, Tibbett, M, Zobel, M (2010) Rooting theories of plant community ecology in microbial interactions. *Trends Ecol Evol* 25: 468-478.
- Błaszczkowski, J, Kovács, GM, Balázs, T (2009a) *Glomus perpusillum*, a new arbuscular mycorrhizal fungus. *Mycologia* 101: 247-255.
- Błaszczkowski, J, Przemysław, R, Oehl, F, Koegel, S, Wiemken, A, Kovács, GM, Redecker, D (2009b) *Glomus achrum* and *G. bistratum*, two new species of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *Botany* 87: 260-271.
- Błaszczkowski, J, Kovács, GM, Balázs, KT, Orłowska, E, Sadravi, M, Wubet, T, Buscot, F (2010) *Glomus africanum* and *G. iranicum*, two new species of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *Mycologia* 102: 1450-1462.
- Brachmann, A, Parniske, M (2006) The most widespread symbiosis on earth. *PLoS Biology* 4: 1111-1112.
- Davison J, Öpik M, Zobel M, Vasar M, Metsis M, Moora, M (2012) Communities of arbuscular mycorrhizal fungi detected in forest soil are spatially heterogeneous but do not vary throughout the growing season. *PLoS ONE* 7: e41938.
- Díez, J (2005) Invasion biology of Australian ectomycorrhizal fungi introduced with eucalypt plantations into the Iberian Peninsula. *Biol Invasions* 7: 3–15.
- Díez, J, Manjón, JL, Martín, F (2002) Molecular phylogeny of the mycorrhizal desert truffles (*Terfezia* and *Tirmania*), host specificity and edaphic tolerance. *Mycologia* 94: 247–259.
- Gáspár, KB, Wubet, T, Buscot, F, Kovács, GM (2012) Microscale comparison of AMF diversity of native and invasive woody plants., A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2012. évi Nagygyűlése. Absztraktok: 14.
- Healy, RA (2003) *Mattiolomyces tiffanyae*, a new truffle from Iowa, with ultrastructural evidence for its classification in the Pezizaceae. *Mycologia* 95: 765–772.
- Healy, RA, Kovács, GM (2010) Ultrastructural observations on the ascomata and ascospores of the truffle *Mattiolomyces terfezioides*. *Botany* 88: 85-92.
- Helgason T, Daniell TJ, Husband R, Fitter AH, Young JPW (1998) Ploughing up the wood-wide Web? *Nature* 394: 431.
- Jumpponen, A (2001) Dark septate endophytes – are they mycorrhizal? *Mycorrhiza* 11: 207-211.
- Jumpponen, A, Trappe, JM (1998) Dark septate endophytes: a review of facultative biotrophic root-colonizing fungi. *New Phytol* 140: 295-310.
- Knapp, DG, Kovács, GM (2012) Inter Sample Sequence Repeat analysis of major groups of dark septate endophytes of semiarid grasslands., A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2012. évi Nagygyűlése. Absztraktok: 21.

- Knapp GD, Pintye A, Kovács GM (2012) The dark side is not fastidious – dark septate endophytic fungi of native and invasive plants of semiarid sandy areas. *PLoS ONE* 7: e32570.
- Knapp, DG, Zajta, E, Pintye, A, Kovács, GM (2013) The dominant DSE lineages of semiarid sandy areas of the Great Hungarian Plain - What can they point out? Endophytes for plant protection: the state of the art konferencia, Berlin, Germany Absztraktok, p. 248.
- Kottke, I, Kovács, GM (2013) Mycorrhizae – rhizosphere determinants of plant communities. What can we learn from the tropics? In: Eshel, A., Breeckman, T. (eds) *Plant Roots: The Hidden Half* (4th ed). CRC Press, Taylor & Francis Group. pp: 40-1–40-10
- Kovács, GM, Balázs, T, Péntes, Z (2007) Molecular study of the arbuscular mycorrhizal fungi colonizing the sporophyte of the eusporangiate rattlesnake fern (*Botrychium virginianum*, Ophioglossaceae). *Mycorrhiza* 17: 597–605.
- Kovács, GM, Trappe, JM, Alsheikh, AM, Bóka, K, Elliott, TF (2008) Imaia, a new truffle genus to accommodate *Terfezia gigantea*. *Mycologia* 100: 930-939.
- Kovács, GM, Martín, MP, Calonge, FD (2009) First record of *Mattirolomyces terfezioides* from the Iberian Peninsula: its southern- and westernmost locality. *Mycotaxon* 110: 235-330.
- Kovács, GM, Balázs, TK, Błaszowski, J, Buscot, F, Suarez, JP, Espinosa, CI, Kottke, I (2010a) AMF of (semi)arid areas - Case studies and general considerations. Meeting of COST-870: The role of AMF for plants growing in abiotically stressful environments. Jyväskylä, Finland, Abstracts, p. 16.
- Kovács, GM, Hobbie, EA, Nagy, LG, Trappe, JM, Spatafora, JW, Healy, RA (2010b) Truffles connecting continents - an update on the genus *Mattirolomyces*. The 9th International Mycological Congress (IMC9), Edinburgh, Scotland; Abstracts CD.
- Kovács, GM, Trappe, JM, Alsheikh, AM, Hansen, K, Healy, RA, Vági, P (2011a) *Terfezia* disappears from the American truffle mycota as two new genera and *Mattirolomyces* species emerge. *Mycologia* 103: 831-840.
- Kovács, GM, Balázs, TK, Calonge, FD, Martín, MP (2011b) The diversity of *Terfezia* desert truffles: new species and a highly variable species complex with intrasporocarpic nrDNA ITS heterogeneity. *Mycologia* 103: 841-853.
- Kovács, GM, Gáspár, KB, König, S, Schnabel, B, Wubet, T, Buscot, F (2012) Different PCR primer systems reveal strikingly different composition of arbuscular mycorrhizal fungal communities., A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2012. évi Nagygyűlése. Absztraktok: 23.
- Kovács, GM, Trappe, JM (2013) Nomenclatural history and genealogies of desert truffles. In: Kagan Zur, V, Roth-Bejerano, N, Sitrit, Y, Morte, A. (eds) *Desert Truffles. Phylogeny, Physiology, Distribution and Domestication*. Soil Biology series Vol. 38, Springer (in press)
- Krüger, M, Stockinger, H, Krüger, C, Schüssler, A (2009) DNA-based species level detection of Glomeromycota: one PCR primer set for all arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol* 183: 212-223.
- Lee J, Lee S, Young JP (2008) Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiol Ecol* 65: 339-349.
- Mandyam, K, Jumpponen, A (2005) Seeking the elusive function of root-colonising dark septate endophytic fungi. *Stud Mycol* 53: 173-189.
- Nagy, GL, Petkovics, T, Kovács, GM, Voigt, K, Vágvölgyi, C, Papp, T (2011) Where is the unseen fungal diversity hidden? A study of *Mortierella* reveals a high contribution of reference collections to the identification of fungal environmental sequences. *New Phytol* 191: 789-794.
- Newsham, KK (2011) A meta-analysis of plant responses to dark septate root endophytes. *New Phytol* 190: 783-793.
- Öpik, M, Vanatoa, A, Vanatoa E, Moora M, Davison J, Kalwij JM, Reier U, Zobel M (2010) The online database MaarjAM reveals global and ecosystemic distribution patterns in arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *New Phytol* 188: 223-241.
- Pringle, A, Bever, JD, Gardes, M, Parrent, JL, Rillig, MC, Klironomos, JN (2009) Mycorrhizal symbioses and plant invasion. *Ann Rev Ecol Evol Syst* 40: 699-715.



- Schloss, P.D. és mtsai. (2009) Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 75: 7537-7541.
- Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W, and Fungal Barcoding Consortium (... , Knapp DG, ... , Kovács, GM, ...) (2012) Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *PNAS* 109: 6241-6245.
- Seress, D., Kovács, G. M. 2010. Tájidegen ektomikorrhiza-képző gombák a fülöpházi homokpusztagyepben. *Mikol Közlem* 49: 129-137.
- Seress, D, Nagy, LG, Lukács, AF, Németh, JB, Kovács, GM (2012) Őshonos és inváziós növények ektomikorrhiza-képző gombáinak vizsgálata Fülöpházán., V. Magyar Mikológiai Kongresszus, Budapest, Absztraktok: 27-28.
- da Silva, GA, Lumini, E, Maia, LC, Bonfante, P, Bianciotto, V (2006) Phylogenetic analysis of Glomeromycota by partial LSU rDNA sequences. *Mycorrhiza* 16: 183–189.
- Simon, L, Lalonde, M, Bruns, TD (1992) Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesiculararbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. *Appl Environ Microbiol* 58: 291–293.
- Smith, SE, Read, DJ (2008) Mycorrhizal symbiosis. 3rd ed. Cambridge, UK: Academic Press.
- Trappe, JM (1996) What is a mycorrhiza? In: Azcon-Aguilar, C, Barea, J-M (eds) Mycorrhiza in integrated systems – from genes to plant development. *Proceeding of Fourth European Symposium on Mycorrhiza. Commission of the European Union, Luxembourg*, pp 3–6.
- Trappe, JM, Castellano, MA, Malajczuk, N (1992) Australasian truffle-like fungi. II. *Labyrinthomyces, Dingleya* and *Reddellomyces* gen. nov. (Ascomycotina). *Aust Syst Bot* 5: 597-611
- Trappe JM, Claridge AW, Claridge DL and Liddle L (2008a) Desert truffles of the Australian outback: ecology, ethnomycology and taxonomy. *Econ Bot* 62:497-506.
- Trappe JM. Claridge AW, Arora D, Smit WA (2008b) Desert truffles of the African Kalahari: ecology, ethnomycology and taxonomy. *Econ Bot* 62:521-529.
- Trappe, JM, Kovács, GM, Claridge, AW (2010a) Comparative taxonomy of desert truffles of the Australian Outback and African Kalahari. *Mycol Prog* 9: 131-143.
- Trappe, JM, Kovács, GM, Claridge, AW (2010b) Validation of the new combination *Mattiolomyces austroafricanus*. *Mycol Prog* 9: 145.
- Wang, B, Qiu, Y-L (2006) Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza* 16: 299-363.
- Zhang, B-C, Minter, DW (1989) *Gymnohydnotrya*: a new hypogeous ascomycete genus from Australia. *Mycol Res* 92: 192-198.