

OTKA Posztdoktori Pályázat – Zárójelentés

MIKORRHIZÁK VIZSGÁLATAI ALFÖLDI NÖVÉNYTÁRSULÁSOKBAN

Időszak: 2004. október 1. – 2007. szeptember 30.

Témavezető: **Dr. Kovács Gábor**

Vezető kutató: **Dr. Jakucs Erzsébet**

Nyilvántartási szám: **D048333**

BEVEZETÉS, ELŐZMÉNYEK

A szárazföldi edényes növények döntő többsége gyökerén keresztül különböző gombákkal mutualista szimbiózisban és ezt a funkcionális, strukturális egységet **mikorrhizának** nevezzük (Smith és Read 1997, Trappe 1996, Wang és Qiu 2006). A mikorrhizák egyik legfontosabb funkciója, hogy a gomba segíti a növényt a tápanyagfelvételt a talajból, és cserébe asszimilátumokat és vitaminokat kap a növénytől (Smith and Read 1997). Számos egyéb hatását is igazolták már a mikorrhiza kapcsolatoknak, mind az egyedek, mind a társulások, mind ökoszisztémák szintjén.

A leggyakoribb mikorrhiza az **arbuskuláris mikorrhiza** (AM). Az összes nagyobb növénycsoport tagjai képesek AM képzésére, míg a gombapartnernek minden esetben a *Glomeromycota* törzsbe (Schüssler és mtsai. 2001) tartoznak. Másik gyakori mikorrhiza az **ektomikorrhiza** (EM) melyet általában fásszárú növények képeznek különböző tömlős és bazídiumos gombákkal. Gyakori gyökérkolonizálók a **sötét-szeptált-endofiton** (DSE) formacsoportba tartozó gombák, melyek igaz, hogy nem mikorrhizák, hatásuk sok esetben hasonló (Jumpponen és Trappe 1998, Jumpponen 2001, Mandyam és Jumpponen 2005).

Alföldi növénytársulásokban végzett korábbi vizsgálatok számos további vizsgálatra érdemes kérdést vetettek fel. A területen végzett mikorrhizáltsági státuszvizsgálatok során a vizsgált növényfajok nagy részénél kimutattuk **DSE gombák** kolonizációját (Kovács and Bagi 2001, Kovács and Szigetvári 2002). A **virginiai holdruta sporofiton AM** anatómiai vizsgálatai egyedi, ősi struktúrákra emlékeztető arbuskulumok jelenlétét igazolták (Kovács és mtsai. 2003a). Az alföldi elegyes akácokban gyakorta gyűjtött **homoki szarvasgomba** (*Mattiolomyces terfezioides*, \equiv *Terfezia terfezioides*) gazdanövényei nem voltak egyértelműen azonosítva (Kovács és Bagi 2001), igaz, későbbi *in vitro* kísérletek megkérdőjelezték a faj mikorrhizás viselkedését (Kovács és mtsai. 2003b). **Ektomikorrhiza** közösségekre vonatkozó adatok léteztek már alföldi nyárasok, tölgyesek, de a fülöpházi homokgyep egyes növényeire vonatkozóan is (lásd **Kovács 2008**).

Posztdoktori ösztöndíjasként tervezett kutatásaim fő célkitűzése az volt, hogy különböző módszerekkel vizsgáljam elsősorban az alföldi élőhelyekhez köthető mikorrhizákat, és az azokat létrehozó gombák és növények jellegzetességeit. Az ösztöndíj időtartama alatt az eredeti tervek fő irányvonala mentén folytak a kutatások. Szeretném itt is kiemelni, hogy a 2004-ben elnyert támogatás *nem csupán kutatási támogatást nyújtott* – sőt, arányait tekintve ez tette ki a támogatás kisebbik részét – hanem egy állást is három évre, biztosítva a teljes kutatói szabadságot és azt, hogy munkámat az ELTE Növény-szervezettani Tanszékének mikológiai laborjában végezzem.

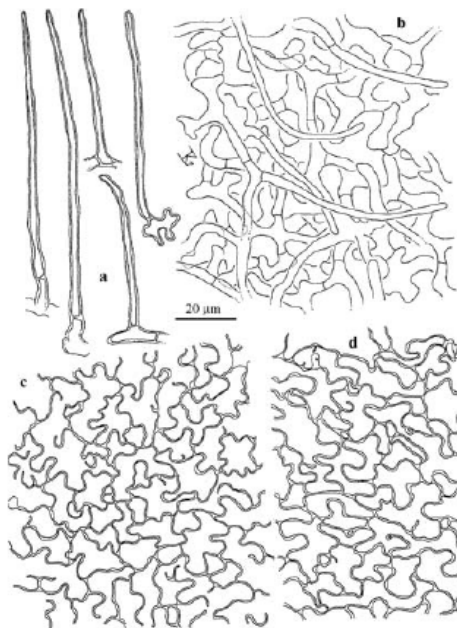
EREDMÉNYEK BEMUTATÁSA

A *fás szárú növények ektomikorrhizáinak vizsgálatában* megfelelően rögzített minták feldolgozásán alapulhatnak a több évet felölelő gyűjtéseket vizsgáló kutatások.

Ezen munkák során többek között a **tomentelloid ektomikorrhizák** alföldi élőhelyeken gyűjtött mintái molekuláris taxonómiai vizsgálatainak utolsó szakaszát végeztük

el. Az eredményeket bemutató cikk (Jakucs és mtsai. 2005) kilenc morfortípus részletes anatómiai jellemzését mutatta be, melyek közül 6 esetben molekuláris módszerekkel a mikorrhizát képző *Tomentella* fajt is sikerült azonosítani, míg a további három esetében a faj azonosítása csak részben sikerült. Az eredményeket a minták négy éves gyűjtése során elvégzett mennyiségi becslésekkel összevetve megállapítható, hogy a tomentelloid fajok állandó, gyakori és diverz tagjai az alföldi erdők ektomikorrhiza képző gombaközösségeinek.

A korábbi gyűjtésekből származó egyik szarvas-gomba által képzettnek határozott ektomikorrhiza anatómiailag teljesen megegyezett a *Tuber borchii* által képzett mikorrhizával (1. ábra), de a molekuláris eredmények alapján biztos volt, hogy ez nem a *T. borchii* ektomikorrhizája. További, elsősorban alföldi élőhelyekről származó *Tuber* fajok által képzett ektomikorrhizák molekuláris és anatómiai vizsgálatát végeztük el (Kovács és Jakucs 2006). Ezen munka során 14 *Tuber* ektomikorrhiza (EM) gombapartnerének nrDNS ITS szekvenciáját sikerült meghatározni, melyek négy fő csoportba rendeződtek az úgynevezett fehér szarvasgombákon belül (2. ábra). A filogenetikai vizsgálatok során sikerült kimutatni egy, a nrRNS gén ITS1 szakaszában egy nagyon jellegzetes inzerció/deléción mintázatot,



1. ábra: *T. rapaeodorum* EM anatómiai jellemzői. a: cisztídiumok; b: a köpeny felszínrehálózattal és cisztídiumokkal; c: a köpeny külső rétege; d: a köpeny belső rétege.

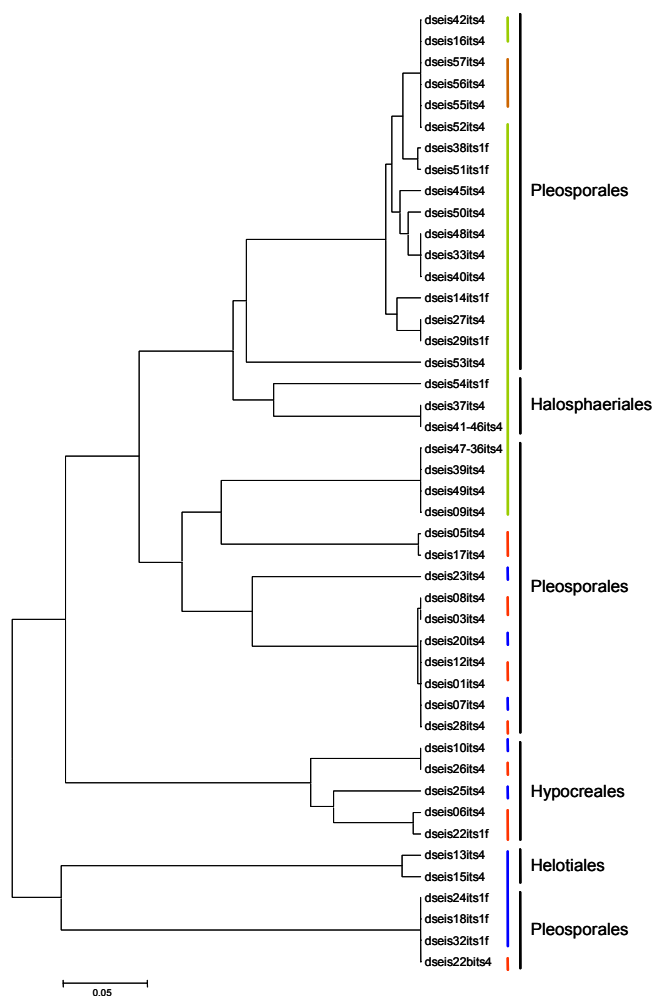
mely megerősítette az ennek a régióknak a kihagyásával végzett filogenetikai számítások eredményeit – „shared derived character”-ként lehetett használni ezeket a jellemzőket. A gombacsoport EM anatómia szinten egységes – hasonlóan például a *Humaria* EM-ekhez (Erős-Honti és mtsai. 2008) – az esetleges eltérések nem egyértelműek, hasonlóan a termőtest morfológiai/anatómiai jellemzőihez. Eredményeink hangsúlyozzák a



2. ábra: a: a 14 általunk vizsgált *Tuber* EM ITS szekvencia elhelyezkedése a fehér szarvasgombák között. NJ filogenetikai fa, százalékos bootstrap értékekkel az elágazásoknál, és az „indel” motívumok betűjeleivel. b: Az ITS-1 régióban detektált „indel” motívum, melyek egyértelműen hozzárendelhetők egyes monofiletikus csoportokhoz.

csoport taxonómiai revíziójának szükségességét.

A lágyszárú növények arbuszkuláris mikorrhiza (AM) és sötét szeptált endogén (DSE) gyökérkapcsolataira irányuló kutatások során A fülöpházi területen négy növényfaj (*Stipa borysthena*, *Festuca vaginata*, *Populus alba*, *Ephedra distachya*) gyökereiből gombatorzseket izoláltunk, vizsgáltuk a telepek jellemzőit, és ennek a közel **60 törzsnek a nrDNS ITS szakaszának szekvenálását** és molekuláris taxonómiai elemzését is elvégeztük. Különböző rendekbe (*Pleosporales*, *Halosphaeriales*, *Hypocreales*, *Helotiales*) tartozó gombákat sikerült izolálni. Általános megoszlásuk nagyon hasonlít észak-amerikai füves területek gyökérkolonizáló endofiton gombaközösségeihez. Némelyik teljes ITS szekvencia egyezést mutatott félsivatagos területek gyökérkolonizáló gomba törzseivel. Érdekes jelenség, hogy a fásszárú és lágyszárú növényekről izolált gombatorzsek minden



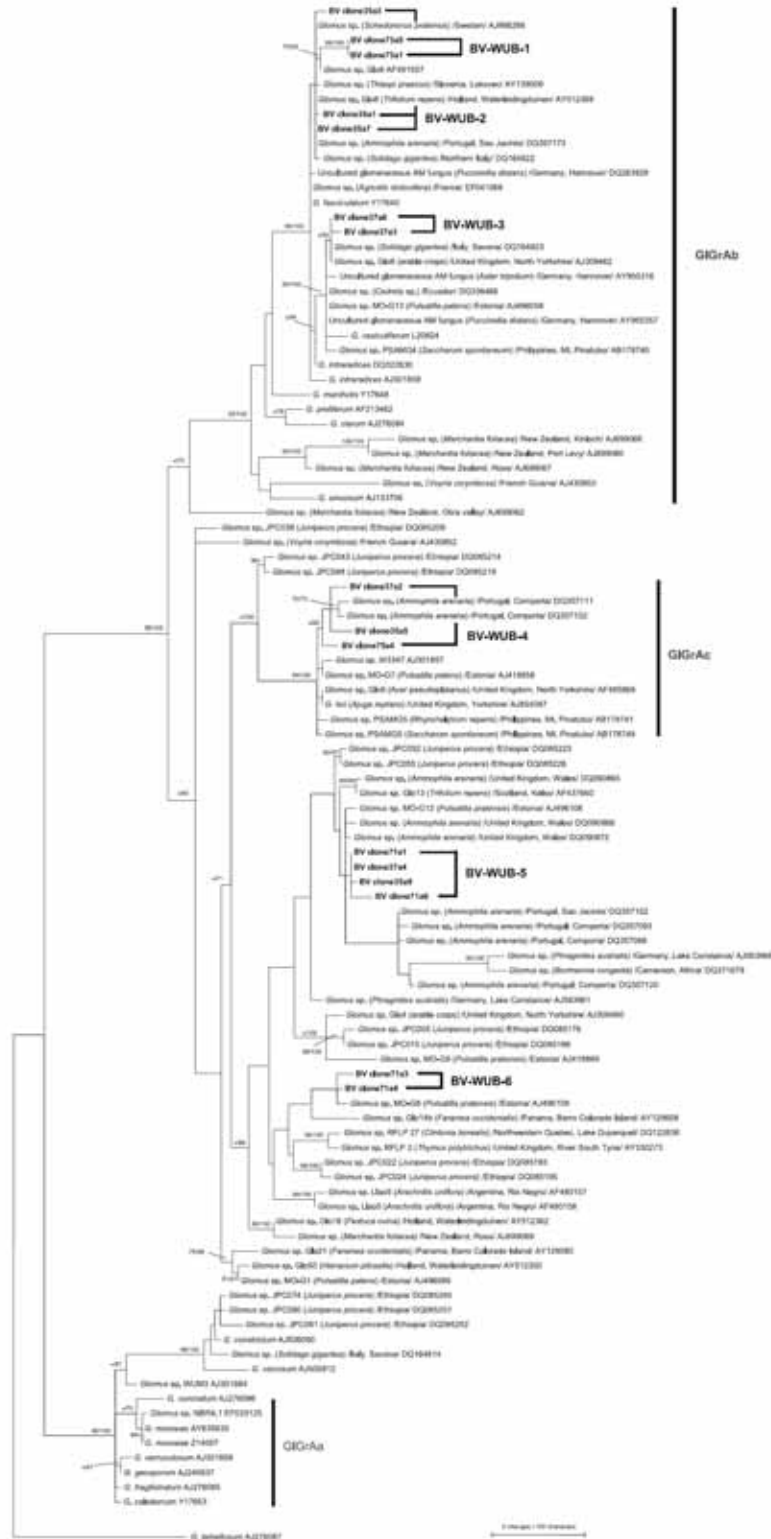
3. ábra: Az izolált endofiton törzsek ITS szekvenciáinak távolságából számított UPGMA fa. A barna és zöld színek a lágyszárú, míg a kék és piros színek a fásszárú gazdanövényeket jelölik.

esetben határozottan elkülönültek egymástól (**3. ábra**). **A törzsek tulajdonságainak in vitro tesztelését** is elvégeztük. *Allium porum* növénykéket fertőztünk a fő csoportok reprezentáns törzseivel, 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 mikroszkleróciumokat a gyökerekben. Több csoport egyértelműen endofitonnak bizonyult (kolonizálta a gyökereket, de nem okozott negatív hatást) és ezek közül számos esetben igazolható volt, hogy a gombák mikroszkleróciumokat hoztak létre a gyökerekben (**4. ábra**).



4. ábra: A DSE18-as törzs által képzett mikroszklerócium *Allium proum* gyökerében. Mércé: 40 μm.

Az **AM képző gombák (AMF)** vizsgálatai során először a **virginiai holdruta** (*Botrychium virginianum*) sporofiton **AM** kapcsolataira irányítottuk a figyelmet. Az AM képző *Glomeromycota* gombákra nagyfokú, egyeden belüli genetikai diverzitás jellemző. A *Botrychium virginianum* sporofitonját kolonizáló **AM** gomba nrDNS SSU és ITS régióra irányuló, ~900-1000 nukleotid hosszú szakasz klónjain alapuló **molekuláris vizsgálatait** elvégeztük. A munkáinkhoz két *Glomeromycota* specifikus primer rendszert (Redecker 2000 és Wubet és mtsai. 2006) használtunk. Az eredmények



5. ábra: Részleges SSU szekvenciákból számolt ML filogenetikai fa, melyen látható 6, a *Botrychium virginianum* sporofitont kolonizáló AMF filotípus elrendeződése a *Glomus* GRa csoporton belül. Az elágazások megbízhatóságát bootstrap és Bayes-elemzésből számított posteriori valószínűségek jelzik.

10-10 egyed, úgy, hogy 3 év alatt minden növényről származzon tavaszi, nyári és őszi minta. A munkához az NS31-AM1 (Simon és mtsai. 1992, Helgason és mtsai. 1998) AMF specifikus primer kombinációt használjuk, mintánként 30 klón RFLP típusát határozzuk meg

vonatkozásában a két primerrendszer hasonlóan működött, és igazoltuk, hogy a sporofitont számos AMF filotípus kolonizálja (Kovács és mtsai. 2007a). Ezek közül több gyakori, széles körben elterjedt taxon (5. ábra). Ezek alapján feltételezhetjük, hogy az AM egyedi struktúráját a növény határozza meg. Ezek az eredmények az első publikált *in planta* AMF vizsgálatok a Kárpát medencéből és ezekkel a módszerekkel párhányt korábban nem vizsgáltak, más laborok eredményei a mi munkánkkal párhuzamosan kerültek közlésre (Winther és Friedman 2007).

Az AMF *in planta* diverzitási vizsgálatokban a csikófark (*Ephedra distachya*) fülöpházi és bugaci állományaiból végeztünk gyűjtéseket – ennél a növénynél összesen két filotípus kolonizációját tudtuk kimutatni.

2006 őszén egy jelentős összehasonlító vizsgálatot kezdtünk meg, melynek során három élőhelyről (Bugac, Fülöpháza, Tatárszentgyörgy) kezdtük meg közösleges boróka (*Juniperus communis*) gyökerét kolonizáló AMF molekuláris vizsgálatait. Évi 3 mintavétellel mintázunk területenként

3 enzimmel. Eddig 40 mintából 1200 klónt vizsgáltunk, és körülbelül 200 szekvenciáját határoztuk meg. Az adatok elemzésével vizsgáljuk majd, hogy van-e területi és szezonális specificitás a borókát kolonizáló AMF közösségben.

A homoki szarvasgomba (*Mattirolomyces terfezioides* \equiv *Terfezia terfezioides*) növénykapcsolatainak vizsgálatához a gomba nrDNS ITS szakaszára *fajspecifikus primer-párt* terveztünk, és az ezzel kivitelezett „nested” PCR segítségével vizsgáltuk a gomba kunfehértói állományából gyűjtött gyökérmintákat. A fajspecifikus primer-párral igazolt gazdanövényeken (7 növényfaj) túl sikerült leírunk egy, a gomba által képzett szkelórciumot (6. ábra). Ez az első föld alatti gomba, ahol ilyen struktúra jelenlétét kimutatták (Kovács és mtsai. 2007b). A gomba növénykapcsolatairól azt is megállapítottuk, hogy nem domináns, kis mértékű a faj gyökérekolonizációja, mely egyértelmű jele annak, hogy a gomba nem lehet jelentős partnere egy növénynek sem, így például mesterséges mikorrhizálásra valószínű nem alkalmas.

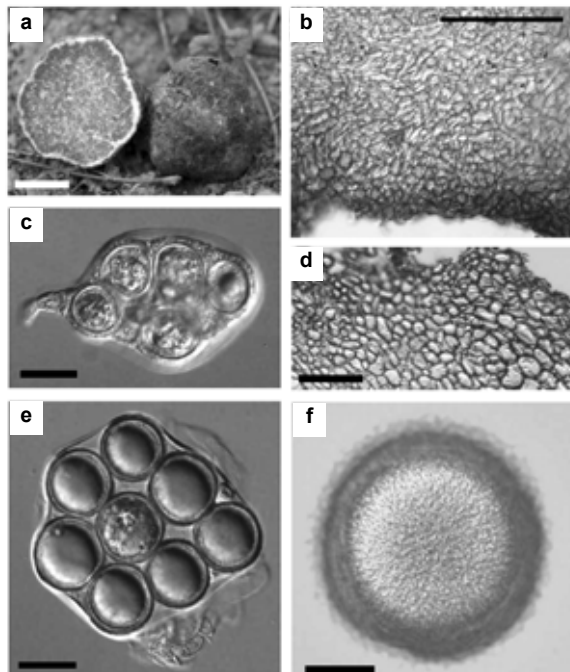


6. ábra: A homoki szarvasgomba gyökereket körbenövő hifa-tömörülése, melyből fiatal termőtest fejlődött. Mércse: 2 cm.

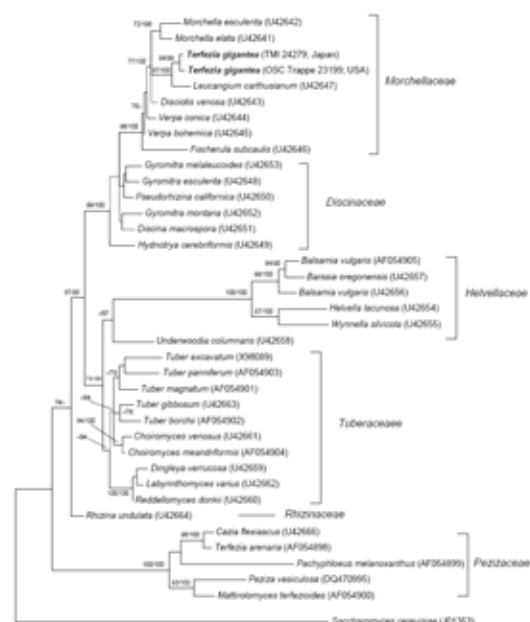
Homoki szarvasgomba termőtestből sikerült a *gomba steril tenyésztését izolálni*. Ezekkel a tenyésztettel kísérleteket állítottunk be és ezekben a kísérletekben a gomba fentebb részletezett nem-specifikus kolonizációja miatt megpróbáltuk a DSE kísérletekben használt *Allium porum* növényeket inokulálni. Sajnos, a gomba semmilyen általunk kipróbált cukorkoncentrációnál nem kolonizálta a gyökereket.

Homoki szarvasgomba termőtestből sikerült a *gomba steril tenyésztését izolálni*. Ezekkel a tenyésztettel kísérleteket állítottunk be

és ezekben a kísérletekben a gomba fentebb részletezett nem-specifikus kolonizációja miatt megpróbáltuk a DSE kísérletekben használt *Allium porum* növényeket inokulálni. Sajnos, a gomba semmilyen általunk kipróbált cukorkoncentrációnál nem kolonizálta a gyökereket.



7. ábra: A *Terfezia gigantea* jellemzői. a: Termőtest és gleba szerkezet. Mércse: 2cm. b-d: A peridium szerkezete. Mércse: 20 μ m. c-e: Fiatal és kifejlett aszkusz. Mércse: 40 μ m. f: Aszkospóra fala fénymikroszkópban. Mércse: 20 μ m.



8. ábra: A *Terfezia gigantea* Pezizales renden belüli helyzetét bemutató ML fa. A számítás a teljes SSU szekvenciák alapján történt. Az elágazások megbízhatóságát bootstrap és Bayes számításokkal teszteltük.

A *Mattiolomyces terfezioides* rokonsági körében taxonómiai vizsgálatokat kezdtük, melynek során ultrastrukturális és molekuláris módszerekkel igazoltuk, hogy a nemzetség monotipikus, korábban tévesen soroltak ide egy fajt, *Mattiolomyces tiffanyae* néven (Healy 2003). Észak Amerika területén három *Terfezia* fajt írtak le, ezek közül egy, a *T. gigantea* Észak-Amerika és Japán területén rendszeresen gyűjtött faj. Számos herbáriumi és frissen gyűjtött anyag fény- és elektronmikroszkópos (TEM és SEM) vizsgálatával (7. ábra) és molekuláris taxonómiai elemzésekkel igazoltuk (8. ábra), hogy ez az Asa-Gray diszjunkciót mutató taxon nem sorolható a jelenleg ismert nemzetségek egyikébe sem. Ezen túlmenően, nem is a *Pezizaceae* családba tartozik, mint a valódi *Terfezia* fajok, hanem a *Morchellaceae* családba. Az új nemzetségre tett javaslatunkat bemutató kézirat jelenleg elbírálás alatt van (Kovács és mtsai. – elbírálás alatt).

A KUTATÁSOK FOLYTATÁSA

A három éves támogatott kutatás eredményei számos további vizsgálat lehetőségét mutatták meg. Az idei évben OTKA támogatást nyert a „Szárak területek fás szárú növényeinek nem-patogén gyökér kolonizáló gombái - diverzitás és specificitás” című pályázat, mely a címében megjelölt kérdés mentén szervesen épít az itt bemutatott eredményekre. Hosszú távú célunk, hogy miután megbízható strukturális diverzitási és specificitási adatokat gyűjtünk, vizsgálni tudjuk ezeknek a kapcsolatoknak funkcionális kérdéseit is.

PUBLIKÁCIÓK A TÁMOGATÁS IDŐTARTAMA ALATT ÉS UTÁN

A kutatásokhoz közvetlenül kapcsolódó publikációkat az OTKA online rendszerében feltöltöttem. A kutatások eredményeiből egy kézirat jelenleg elbírálás alatt van, további három kéziraaton pedig jelenleg dolgozunk:

- Kovács, G. M., Trappe, J. M., Alsheikh, A. M., Bóka, K., Elliott, T. F. *Imaia*, a new truffle genus to accommodate *Terfezia gigantea*. Benyújtva a *Mycologia* folyóirathoz
- Healy, R., Hansen, K., Kovács, G. M. Comparative molecular taxonomic and ultrastructural study of *Mattiolomyces terfezioides*.
- Pintye, A., Kovács, G. M. Isolation and characterisation of root colonizing endophytic fungi from a semi-arid grassland of the Great Hungarian Plain.
- Balázs, T., Vági, P., Pézses, Zs., Kovács, G. M. The mycorrhiza of *Ephedra distachya*.

Habár a kéziratok elkészítése és benyújtása a beszámolási időszak után lesz, a D048333 pályázati támogatása ezekben is feltüntetésre kerül, hiszen az adatgyűjtések a kutatási időszakban történtek.

Az OTKA zárójelentésekhez adott elvi útmutatójában a következő passzus szerepel a feltüntetendő publikációkkal kapcsolatban:

„Ne soroljanak fel és ne mellékeljenek olyan közleményt, amelynek mondanivalója nem kapcsolódik a kutatási projekt eredményeihez. Ez a közlemények számának inflálódásához vezet anélkül, hogy az OTKA támogatásával elért valódi eredményeket mutatna be, és alkalmas lehet a projekt eredményességéről kialakítandó kép eltorzításra, feleslegesen inflálja a szakértők munkáját.”

A zárójelentésben – hasonlóan a részjelentésekhez – nem csupán a kutatási projekt eredményeihez kapcsolódó publikációimat soroltam fel. Ennek az oka az, amit előrébb már írtam; hogy az **OTKA Posztdoktori támogatás három évig nem csupán a kutatási támogatást jelentette, hanem állást is biztosított**. Az egzisztenciális nyugalom és függetlenség lehetővé tette számomra, hogy befejezzek korábbi munkahelyemhez (MTA ÁOTKI) kötődő munkákat, továbbá, hogy más gombacsoportokra irányuló, molekuláris taxonómiai együttműködések is folytassak Dr. Kiss Levente (MTA NKI) csoportjával. Mivel ezeket az eredményeket egyértelműen az OTKA támogatásával értem el, így ezekben,

amikor csak tudtam, az OTKA támogatását feltűnttettem. Elkerülendő a félreértéseket, csak a kutatási projekt eredményeihez kapcsolódó publikációkat jelöltem meg, mint nyilvános közleményeket.

IRODALOM

- Erős-Honti, Zs., Kovács, G. M., Szedlay, Gy., Jakucs, E. 2008. Morphological and molecular characterization of *Humaria* and *Genea* ectomycorrhizae from Hungarian deciduous forests. *Mycorrhiza* (in press)
- Healy, R. A. 2003. *Mattirolomyces tiffanyae*, a new truffle from Iowa, with ultrastructural evidence for its classification in the Pezizaceae. *Mycologia* 95: 765–772.
- Helgason, T., Daniell, T. J., Husband, R., Fitter, A. H., Young, J. P. W. 1998: Ploughing up the wood-wide Web? *Nature* 394: 431.
- Jakucs E, Kovács GM, Szedlay G, Erős-Honti Z 2005. Morphological and molecular diversity and abundance of tomentelloid ectomycorrhizae in broad-leaved forests of the Hungarian Plain. *Mycorrhiza* 15: 459-470.
- 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.
- Kovács M. G. 2008. Magyarországi növények mikorrhizáltsági vizsgálatainak összefoglalása. Mit mondhatnak ezek az adatok? *Kitaibelia* 13: 62-73.
- Kovács GM, Bagi I 2001. Mycorrhizal status of a mixed deciduous forest from the Great Hungarian Plain with special emphasis on the potential mycorrhizal partners of *Terfezia terfezioides* (Matt.) Trappe. *Phyton* 41: 161-168.
- Kovács GM, Jakucs E 2006. Morphological and molecular comparison of white truffle ectomycorrhizae. *Mycorrhiza* 16: 567-574.
- Kovács GM, Szigetvári C 2002. Mycorrhizae and other root-associated fungal structures of the plants of a sandy grassland on the Great Hungarian Plain. *Phyton* 42: 211-223.
- Kovács, G. M., Kottke, I., Oberwinkler, F. 2003: Light and electron microscopic study on the mycorrhizae of sporophytes of *Botrychium virginianum* – arbuscular structures resembling fossil forms. *Plant Biol* 5: 574-580.
- Kovács, G. M., Vágvölgyi, Cs., Oberwinkler, F. 2003. In vitro interaction of the truffle *Terfezia terfezioides* with *Robinia pseudoacacia* and *Helianthemum ovatum*. *Folia Microbiol* 48: 369-378.
- Kovács, GM, Balázs, T, Péntes Z 2007a. Molecular study of the arbuscular mycorrhizal fungi colonizing the sporophyte of the eusporangiate rattlesnake fern (*Botrychium virginianum*, *Ophioglossaceae*). *Mycorrhiza* 17: 597–605.
- Kovács, G. M., Jakucs, E., Bagi, I. 2007. Identification of host plants and description of sclerotia of the truffle *Mattirolomyces terfezioides*. *Mycol Prog* 6: 19-26.
- Kovács, G. M., Trappe, J. M., Alsheikh, A. M., Bóka, K., Elliott, T. F. *Imaia*, a new truffle genus to accommodate *Terfezia gigantea*. *Elbírálás alatt a Mycologia c. folyóiratnál*.
- Redecker D 2000. Specific PCR primers to identify arbuscular mycorrhizal fungi within colonized roots. *Mycorrhiza* 10: 73–80.
- Simon, L., Lalonde, M., Bruns, T. D. 1992. Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. *Appl Environ Microbiol* 58: 291-293.
- Smith, S. E., Read, D. J. 1997. Mycorrhizal symbiosis (2nd ed.). Academic Press, London.
- 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.
- Wang B, Qiu Y-L 2006. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza* 16: 299-363.
- Winther, J. L., Friedman, W. E. 2007. Arbuscular mycorrhizal symbionts in *Botrychium* (Ophioglossaceae). *Am J Bot* 94: 1248-1255.
- Wubet T, Weiss M, Kottke I, Teketay D, Oberwinkler F 2006. Phylogenetic analysis of nuclear small subunit rDNA sequences suggests that the endangered African Pencil Cedar, *Juniperus procera*, is associated with distinct members of *Glomeraceae*. *Mycol Res* 110: 1059-1069.