

Inváziós és őshonos fásszárú növények AMF-közösségének összehasonlítása mikroskálán

OTDK-dolgozat

Gáspár Bence

Biológus MSc szakos hallgató

Témavezető: Dr. Kovács M. Gábor
Egyetemi adjunktus

ELTE, Biológiai Intézet, Növény szerkezet-tani Tanszék
Eötvös Loránd Tudományegyetem
2013.

Tartalomjegyzék

Absztrakt.....	3
Bevezetés	4
Célkitűzéseink	11
Anyag és módszer.....	12
Primerteszt.....	14
Molekuláris munkák.....	17
Eredmények és tárgyalásuk	19
Összefoglalás	26
Köszönetnyilvánítás	28
Irodalomjegyzék	29

Absztrakt

Az arbuskuláris mikorrhizaképző gombák (AMF-ek) ~230 faja a szárazföldi növényfajok több mint 80%-ával áll mutualista szimbiózisban. A növény szolgál a gomba egyedüli szénforrásául, a gomba pedig segíti a növény ásványianyag- és vízellátását. Az AMF-ek az egész Földön elterjedtek; jelentőségük a tápanyagszegény és (fél)száraz területeken kiemelkedő. Csoportunk többek között félszáraz területek idegen- és őshonos növényeinek AMF-közösségeit kutatja. Ezek összevetésével meg lehet határozni a generalista gombapartnereket, melyek későbbi funkcionális vizsgálatokhoz szükségesek.

Tatárszentgyörgyi mintavételi területünkön az őshonos boróka (*Juniperus communis*) és az inváziós bálványfa (*Ailanthus altissima*) AMF-eit vizsgáltam. A mintavétel során olyan kis térfogatú (250 ml) mintákat vettünk, ahol a két növény gyökerei szorosan összefonódtak, ezért feltehető, hogy az AMF-közösségeik különbségéért egyedül a növényfaj felel, és a heterogén környezeti változók hatását kiküszöböltük.

A gyökerekből kivont DNS-ből, AMF-specifikus primerekkel szaporítottam fel egy szakaszt a gombák nrDNA-jának nagy alegységéből. Egy mesterséges AMF-közösség előzetes vizsgálata alapján 4 különböző primerrendszerből választottuk ki a leghatékonyabbat. A minták klónozása és szekvenálása után 600 megfelelő minőségű szekvenciához jutottam, melyek 3%-os különбözőségi küszöbérték mellett 70 csoportba (MOTU) rendeződtek az elemzések során. Ez a 70 taxon több, mint a területről eddig spórák és riboszomális kis alegység génje alapján ismert fajgazdagság. A legtöbb szekvencia környezeti mintákból ismertekkel mutatott hasonlóságot, dominánsak voltak a *Funneliformis* és *Rhizophagus* (egykori *Glomus*) nemzetségek, de a *Glomeromycota* törzs típusfaja, a *Glomus macrocarpum*, valamint a bazális *Paraglomus majewskii* – mely leírásában csoportunk is részt vett – szekvenciáit is kimutattam.

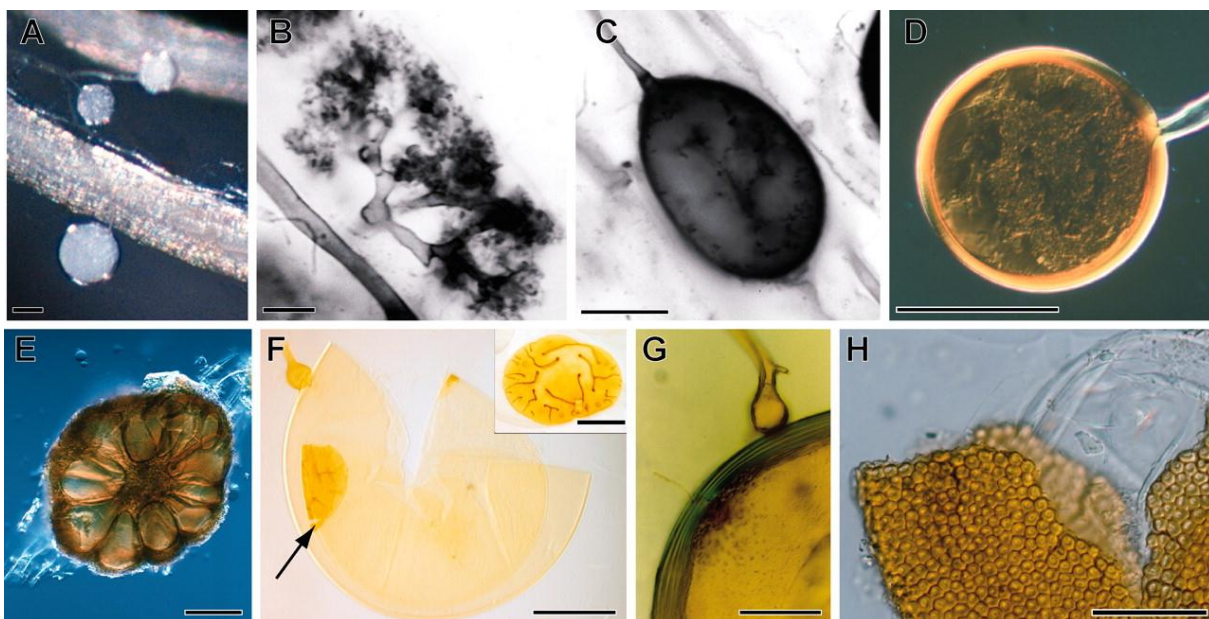
A taxonok megoszlásáról elmondható, hogy a nagy számban reprezentáltakat mindkét fajban előfordultak, de akadtak olyan kládok, melyek csak az egyik faj gyökeréből voltak kimutathatók. A nagy, generalista taxonokon belül elkülönült pár olyan klád, melyek csak az egyik növényből származtak. Eredményeim alapján a *Funneliformis constrictus*, *Rhizophagus intraradices* és *Rhizophagus irregularis* mutatkoztak generalistának; ezek lennének potenciálisan felhasználhatók funkcionális kísérletekhez.

Bevezetés

Az arbuszkuláris mikorrhiza (AM) feltehetően a szárazföldi ökoszisztémák leggyakoribb szimbiózisa (Parniske 2008), mely a szárazföldi növényfajok körülbelül 80%-a és a valódi gombák *Glomeromycota* törzsébe tartozó nagyjából 230 faj között alakul ki. A kapcsolat a szárazföldi növények között pleziomorf karakternek tekinthető, erre 460 millió éves *Glomus*-szerű spórák (Redecker és mtsai. 2000) és 400 millió éves leletekből előkerült arbuszkulumok (Remy és mtsai. 1994) utalnak; minden egyéb tápanyagszerzési mód (más mikorrhizatípusok, szimbiózis nitrogénfixáló baktériumokkal, mikorrhiza nélküli tápanyagfelvétel finomabb struktúrájú gyökérzeten keresztül, rovarémésztés, parazitizmus) evolúciós újdonságnak számít (Brundrett 2009). A mutualista kapcsolat keretein belül a gombapartner segíti a növény tápanyagfelvételét (elsősorban foszfát és ammónium formájában), valamint olyan előnyökhöz juttatja a növényt, mint például jobb szárazságtűrés vagy nagyobb ellenállás gyökérgyökérpatogének ellen. Cserébe a növény asszimilátumokkal látja el a gombát; annak egyedüli szénforrása (Hodge és mtsai. 2010). Az anyagátadás a kapcsolat névadó struktúráján, az arbuszkulumon keresztül történik, mely a gyökér (illetve rizóma, vagy nem magvas növények gametofitonjai) kéregsejtjeinek lumenében, az apoplasztikus tér betűródésében képződő sokszorososan elágazó hifaképlet. Az arbuszkulum és az azt körülvevő "mátrix", amely mindkét fél sejtfaanyagait tartalmazza, valamint a növényi plazmamembránnal folytonos periarbuszkuláris membrán alkotja a szimbiotikus határfelületet. A gomba foszfát- és ammóniumionokat bocsát az apoplasztikus térbe (melyeket a növény aktív transzporttal vesz fel), az odakerülő szén pedig monoszacharidok formájában veszi fel (Bonfante és Genre 2010).

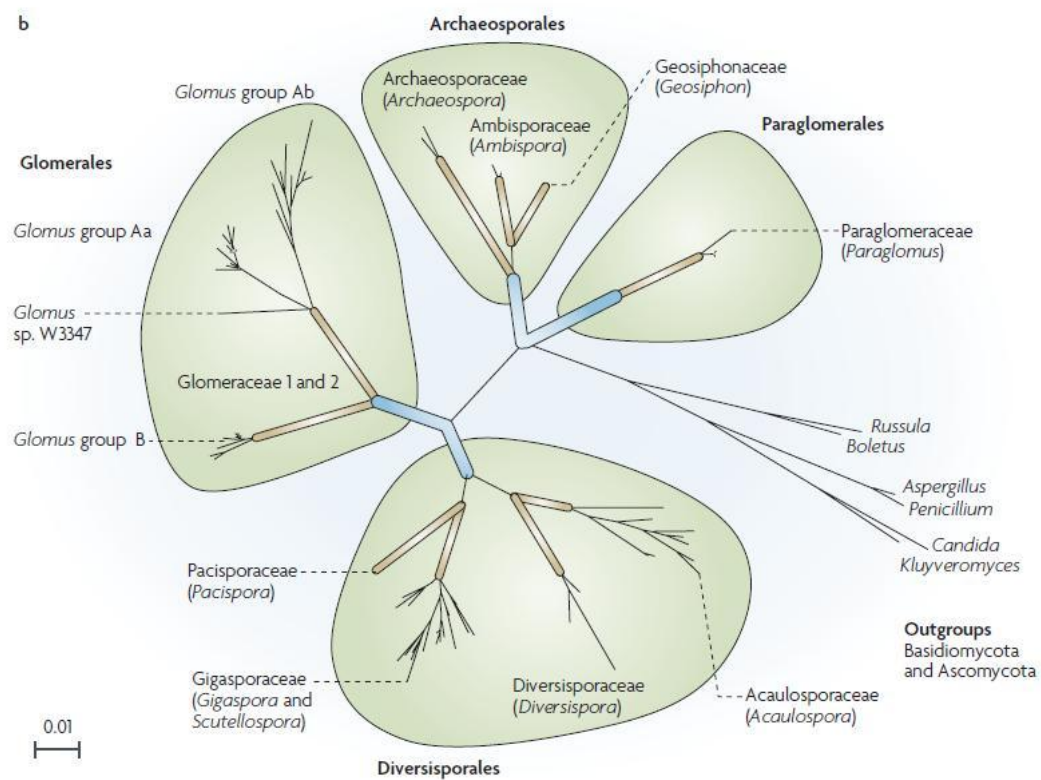
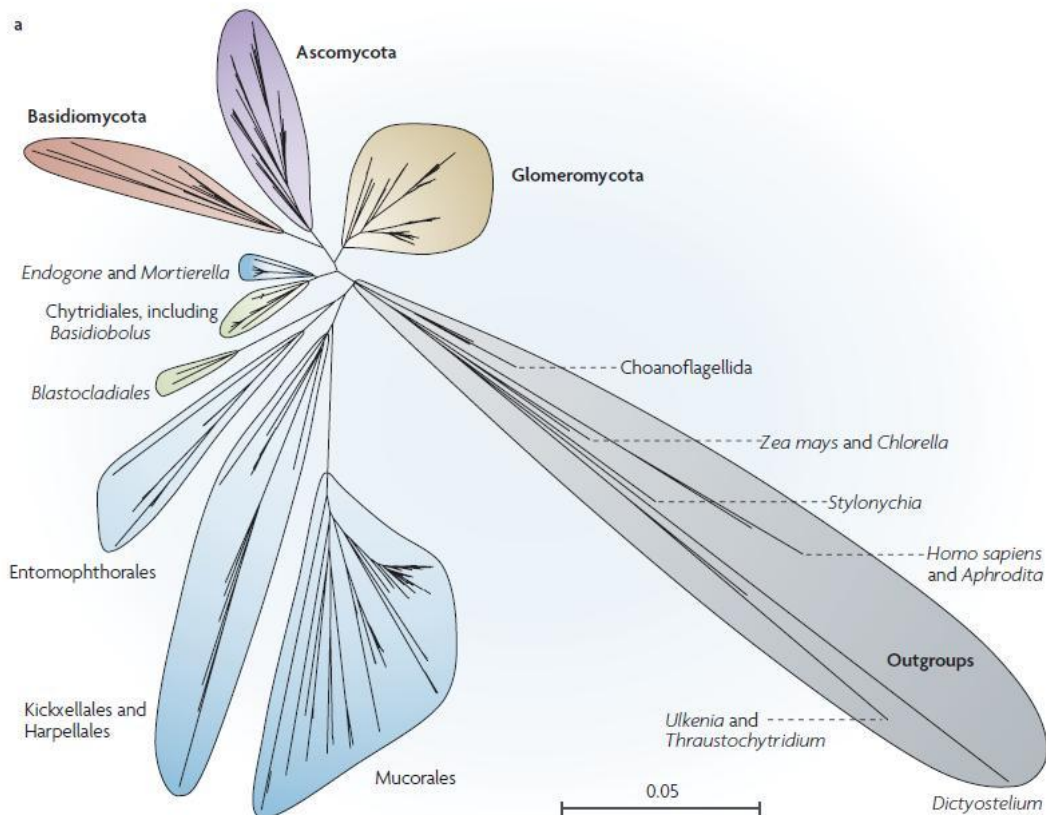
Az arbuszkuláris mikorrhizaképző gombák (arbuscular mycorrhizal fungi, AMF-ek) biológiája rendkívüli: ősi eredetük ellenére szexuális szaporodásuk nem ismert (bár a meiózishoz szükséges gének jelen vannak genomjukban (Halary és mtsai. 2011)), cönocitikus hifákkal rendelkeznek és obligát biotrófok (Bonfante és Genre 2008). Akár több ezer sejtmagot is tartalmazó klamidospóráikkal, kolonizált gyökérdarabokkal, vagy a gyökéren kívüli micéliumukon keresztül terjednek. A talajban megfelelő környezeti körülmények között csírázásnak indulnak spóráik, és a növényi gyökérexudátumokban jelenlévő sztrigolaktonokra

a preszimbiotikus hifa intenzív elágazással válaszol. (A sztrigolaktonokat detektálják egyes gyökérparazita hajtásos növények is, mint például a *Striga* fajok, melyekről a vegyületcsoport a nevét kapta.) Az AMF-ek által kiválasztott lipo-chito-oligoszacharidok (a sokáig azonosítatlan, de nemrég azonosított "myc-faktorok" (Maillet és mtsai. 2011)) hasonló hatással vannak a gyökérre, elágazást indukálnak, valamint beindítják azt a jelátviteli utat, aminek hatására a növényi sejt fogadja a kolonizáló gombát (Parniske 2008). Nagy részben ezzel átfedő jelátviteli útvonal lép működésbe a pillangósvirágúak és *Rhizobium*ok közötti szimbiózis kialakulásakor. A rhizodermisz-sejteken áthaladva a kéregben inter- és intracellulárisan nőhet tovább a hifa. Két fő növekedési típus létezik; az *Arum*-típus esetében (melyet az *Arum maculatum* gyökerében figyeltek meg először) a hifák intercellulárisan nőnek axiális irányban, és ezekből oldalirányban nő be egy-egy arbuszkulum a sejtek lumenébe, azokat teljesen kitöltve. A *Paris*-típusú AM (ami nevét a *Paris quadrifolia* után kapta) intracellulárisan növekszik végig, hifahurkokat, ún. coilokat képezve a sejtekben, melyeken több, kisméretű arbuszkulum képződhet. A két növekedési típus között folyamatos átmenet figyelhető meg, és az adott növény-gomba fajkombináció határozza meg, hogy melyik mintázat alakul ki (Dickson 2004). A szimbiotikus fázis elengedhetetlen az AMF életciklusának befejezéséhez, e nélkül a csírázó spórából kihajtó preszimbiotikus hifa rövid időn belül elhal. Sikeres kolonizáció után azonban (általában) a gomba spórákat képez elsősorban az extraradikális micélium hifáin, de azok akár gyökéren belül is létre jöhetnek. Megfigyelhetők még az intracellulárisan képződő, lipidraktárként szolgáló vezikulumok, illetve a *Gigasporaceae* családban ezek helyett az extraradikális micéliumon létrejövő segédsejtek, melyek szintén raktározó funkcióval bírnak. A törzsbe tarozik egy nem AMF-faj is, a *Geosiphon pyriformis*, mely *Nostoc* cianobaktériumokkal él együtt endocitobiotikus kapcsolatban (Smith és Read 2008).



1. ábra. Az AMF-ek jellemző morfológiai képletei. **A:** *Rhizophagus clarus* hifái és spórája által kolonizált *Plantago media* gyökér. **B:** *Funneliformis mosseae* arbuszkuluma. **C:** *F. mosseae* vezikuluma. **D:** *Glomus* sp. spóra a sporogén hifa csatlakozásával. **E:** *Glomus sinuosum* sporokarpium hifaréteggel körülvéve. **F:** *Scutellospora cerradensis* spóra belső rugalmas fala csírázási pajzzsal (nyíl). **G:** *Gigaspora decipiens* csírázó spóra, csírázó réteg és csírázó hifa. **H:** *Acaulospora denticulata* spóra díszített külső fallal és a belső csírafallal (Redecker és Raab 2006).

A spórák tulajdonságai (szín, festődés, falrétegek száma, képződés módja, csírázás módja stb.) szolgáltak eleinte a fajok azonosítására és az AMF-ek rendszerezésére (1. ábra), mivel egyéb struktúráik (az intra- és extraradikális micélium) karakterekben még szegényebbek, és fajszintű határozásra nem alkalmasak. Ma a *Glomeromycota* törzs rendszerezéséhez, valamint fajleírásokhoz elengedhetetlenek a DNS-alapú molekuláris filogenetikai munkák, mivel kiderült több morfológiailag nagyon hasonló taxonról is, hogy távoli leszármazási vonalak képviselői. A molekuláris munkák leggyakrabban a magi riboszomális RNS-géneken alapulnak, de robusztusabb filogenetikai elemzésekhez más, fehérjekódoló géneket is be szoktak vonni a vizsgálatokba (Redecker és Raab 2006). Utóbbiak alapján a törzs az egykori *Zygomycota* és *Chytridiomycota* csoportokkal kerül rokonságba, míg rDNS alapján és a kettő kombinációja alapján is a Dikarya (*Basidiomycota*+*Ascomycota*) testvércsoportja lesz, viszont mindkét géntípus alapján monofiletikusnak bizonyul (James és mtsai. 2006; Redecker és Raab 2006). A törzs körülbelül 230 faja nagyjából 15 nemzetségbe és 5 rendbe csoportosul (2. ábra), *in planta* mintákból származó adatok alapján azonban jóval több taxon létezhet (Öpik és mtsai. 2009).



2. ábra. A *Glomeromycota* külső (a) és belső (b) filogenetikai kapcsolatai. A mérce az egységnyi ághosszra eső karakterváltozás átlagos valószínűségét jelöli. (Parniske 2008)

AMF-ek morfológián alapuló azonosításához spórák hiányában a gyökéren belüli struktúrák legfeljebb családszinten használhatók, ráadásul több csoport gyökérben képzett struktúrái gyengén vagy egyáltalán nem színeződnek a hagyományos festési eljárásokkal. Ezen felül a spóraprodukció függ a gomba fiziológiai állapotától, illetve az adott környezeti tényezőktől, így a begyűjtött spórák alapján kapott eredmény nem mindig tükrözi az adott terület növényeit ténylegesen kolonizáló AMF-közösséget (Redecker 2003). Az élőhelyeken gyűjtött spórák hátránya továbbá, hogy gyakran fertőzöttek vagy rossz állapotúak, ezért azonosításra alkalmatlanok. Ennek a problémának az áthidalására ún. csapdanövényeket szoktak használni. Az eljárás során terepről begyűjtött talajmintát adnak kontrollált körülmények között arra alkalmas gazdanövények (pl. *Plantago lanceolata*, *Zea mays*) sterilizált talajához, és így lehetőség nyílik egészséges spórák vizsgálatára különböző fejlődési stádiumokban. A növényektől és környezeti tényezőktől függően azonban nem fog az összes talajban található AMF-spóra mikorrhizát kialakítani, ezért ez a módszer a mintában jelenlévő inokulumból, a fertőzőképes AMF-spórákról ad információt. Ha sikerül csapdakultúrából egészséges spórákat nyerni, még mindig nem biztos, hogy lehetséges őket azonosítani. Például a *Glomus* és *Paraglomus* fajok spóramorfológiája egyező, mégis távoli leszármazási vonalak képviselői, valamint léteznek dimorfikus fajok is, amik acaulosporoid (sporogén sacculus nyakáról fejlődő) és glomoid (felfúvódó hifavégből kialakuló) spórát is képeznek (Redecker és mtsai. 2000). További nehézséget jelentett az AMF-ek kutatásában, hogy obligát biotróf életmódjukból kifolyólag nem lehetett őket axenikus kultúrába vonni, de mára már elterjedt módszer *in vitro* fenntartásuk *Agrobacterium rhizogenes*-szel transzformált gyökereken (Fortin és mtsai. 2002). Az eljárást azonban csupán 50-60 faj esetében tudják megbízhatóan alkalmazni.

Diverzitásvizsgálatok során a terület szimbiotikusan aktív AMF-közösségéről úgy kaphatjuk a legmegbízhatóbb képet, hogy azt *in planta* vizsgáljuk molekuláris módszerekkel, vagyis AMF-ek által (remélhetőleg) kolonizált gyökerekből indulunk ki. A DNS kivonása után a vizsgálni kívánt szakaszok PCR általi amplifikációja következik. A PCR során fontos az AMF- specifikus primerek használata, mert a gyökérből kivont DNS nagy része növényi eredetű, valamint elkerülhetetlen a minták keveredése egyéb mikroorganizmusok DNS-ével. Az AMF-ek kutatása során leggyakrabban alkalmazott nrRNA-gének előnye, hogy több száz kópiában vannak jelen a genomban tandem ismétlődések formájában, valamint tartalmazznak

konzervált és variábilis régiókat is, amik a különböző szintű rokonsági viszonyok feltérképezésére adnak lehetőséget. A PCR-termékeket az AMF-ek nrDNS-ének intra- vagy internukleáris heterogenitása, illetve a gyökerek több egyed – és ebből adódóan vélhetőleg több taxon – általi kolonizációja miatt klónozni kell. A diverzitásvizsgálatok körében egyre inkább átveszik a főszerepet a következő generációs szekvenálási (next generation sequencing, NGS) módszerek (Hibbett és mtsai. 2009), amelyek alkalmazásával klónozásra nincs szükség. A szekvenciák meghatározása után azok számítógépes feldolgozása következik, amely során illesztik őket, majd különböző filogenetikai módszerek alkalmazásával fa formájában ábrázolják hasonlóságukat illetve az általuk reprezentált taxonok rokonsági viszonyait.

Mivel az AMF-ek a szárazföldi növények nagy részével asszociáltak, minden szárazföldi biomban jelen vannak. Egyes esetekben a növények által fixált szén akár 20%-a is a gombákhoz kerülhet, az AMF-ek pedig elsősorban foszfátot juttatnak cserébe gazdanövényeiknek, így a globális szén- és foszforkörforgalomban, de a nitrogén körforgásában is fontos szereplők (Rillig 2004b). Az arbuszkuláris mikorrhizát képző növények kevésbé vannak kitéve szárazságstressznek, valamint gyökérpatógének ellen is nagyobb védeltséget élveznek nem mikorrhizált növényekhez képest (Smith és Read 2008). Az AMF-ek a növényközösségek struktúráját és diverzitását is befolyásolják, mivel más-más növényfaj máshogy válaszol egy azonos gombafaj általi mikorrhizáltságra (Bever és mtsai. 2010). Elmondható, hogy egy diverz gombaközösség mellett nagyobb lesz egy növényközösség produkciója, stabilitása, mint egy AMF nélküli vagy kevés AMF-fajjal rendelkező esetében (Van der Heijden és mtsai. 2008). Az AMF-ek a talaj struktúráltságát és szervesanyag-tartalmát is javítják, segítik a talajszemcsék kialakulását (Rillig 2004a).

A (fél)száraz, tápanyagszegény területen élő növények jobban gomba-partnerükre vannak utalva, mint a mérsékelt és jobb tápanyag-ellátottságú környezetben élők, ezért a mikorrhizakutatások ezeken a területeken különösen nagy relevanciával bírnak. Az Alföld területén található homokpusztagyepek – amelyek az eurázsiai sztyepp legnyugatabbi képviselői – félszáraz területek; talajuk dunai eredetű homok, aminek vízelvezető-képessége rendkívül nagy, míg szervesanyag-tartalma rendkívül alacsony. A Kiskunsági Nemzeti Park területe botanikai és vegetációökológiai kutatottsága rendkívül magas, mikorrhizáltsági

vizsgálatokra azonban csak az utóbbi 20 évben került sor, így az ilyen jellegű kutatások folytatása fontos a területen. Csoportunk kutatásainak egyik központi feltevése, hogy léteznek száraz körülményekhez adaptálódott gomba leszármazási vonalak. A másik központi hipotézis, hogy léteznek a területen őshonos növényekre specializálódott gombapartnerrek, illetve generalisták. Ez utóbbiak meglétét úgy tudjuk vizsgálni, hogy idegenhonos, inváziós növényeket vonunk be a kutatásba. A mutualizmus inváziós növények biológiájában betöltött szerepéről tudjuk, hogy a növény csak akkor lehet sikeres az új környezetében, ha nincs szüksége gombapartnerre, vagy az adott területen jelen vannak generalista szimbionták, amelyek kolonizálni képesek az egzótát (Pringle mtsai. 2009). A mikocentrikus megközelítés szerint – a fenti logikát kihasználva – az őshonos és inváziós növényből is kimutatható gombataxont generalistának tekinthetjük.

Célkitűzések

Száraz és félszáraz klímájú területeken a növények fokozottan a gombapartnerre vannak utalva. A területeken megjelenő inváziós növényfajok segítségével feltérképezhetjük az ott jelenlévő generalista AMF-eket. A vizsgálati területünkön jelenlévő idegen- és őshonos növényfajok gombaközösségeinek összevetése során a mindkét csoportot kolonizáló AMF-eket tekintjük generalistának.

Jelen vizsgálat során azt a célt tűztük ki, hogy a tatárszentgyörgyi vizsgálati területünkön az ott jelenlévő inváziós bálványfa (*Ailanthus altissima*) és őshonos boróka (*Juniperus communis*) AMF-közösségének összehasonlításával ismerjük meg a helyi gombaközösséget, hogy meghatározzuk a generalista leszármazási vonalakat. Ezek a későbbiekben felhasználhatók lehetnek funkcionális vizsgálatokhoz, ezekhez azonban először meg kell ismernünk az adott félszáraz terület mikorrhizaképző gombaközösségét.

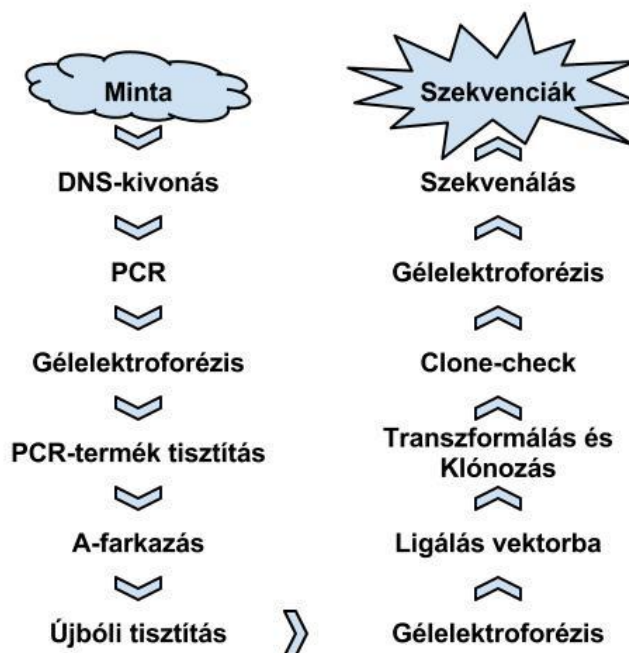
Ha két egymástól távolabb elhelyezkedő növényegyed gyökeréből vett mintákat hasonlítunk össze, nem lehetünk biztosak abban, hogy az AMF-közösségek közti különbség nem a kis távolságokon belül is jelentős eltérést mutató környezeti, elsősorban talajjellemzők miatt jelentkezik. Ezért ebben a vizsgálatban olyan mintapárokból indultunk ki, melyek kis talajtérfogatból kerültek ki, és ebben a két összehasonlított növény gyökerei szorosan össze voltak fonódva egymással, más fásszárú növények azonban nem voltak a kiválasztott növénypárok közelében. Így feltevésünk szerint a talajban esetlegesen fellépő környezeti változók különbségét kizártuk, és csak a növényfaj felelt az AMF-közösségek között fellépő különbségért.

Anyag és módszer

Mintavételi területünk egy tatárszentgyörgyi félszáraz homokterületen volt. A terület éghajlata mérsékelt meleg-száraz. Az éves napsütéses órák száma 2000-2100 körüli, az évi középhőmérséklet 10-12°C, az éves csapadékmennyiség 500 és 600 mm közötti. A terület tengerszint feletti magassága 100-150 m között van (Várallyay 1993, Kovács-Láng és mtsai 2000).

Nyolc 250 ml térfogatú talajmintánkat 2010 és 2011 nyarán két olyan borókabokor (*Juniperus communis*) alól vettük, melyek közepén egy-egy bálványfa (*Ailanthus altissima*) telepedett meg. Korábbi vizsgálatok alapján tudjuk, hogy az AMF-közösség összetételére az évszakosság nincs hatással, ezért nem jelenthet problémát az egyszeri mintavételezés (Balázs és mtsai. 2009; Davison és mtsai. 2012). A két növény pár egymástól 233 méterre található (1-es bokor: N 47°03.486' E 19°24.424', 2-es bokor: N 47°03.572' E 19°24.289'). A bokrok közelében más fásszárú növényfaj nem nőtt, csak fűvek és egyéb lágyszárúak, melyek gyökérzete finomabb gyökerekből áll, ezért ezek előfordulása mintáinkban nem jelentett problémát. A talajmintákból a gyökereket laborba szállítás után azonnal kimostuk, azokat szétválogattuk és 70%-os etanolban, 4°C-on tároltuk. A két faj gyökerét eltérő színük és morfológiájuk miatt könnyen elkülönítettük egymástól. A *Juniperus communis* gyökere sötétbarna, míg az *Ailanthus altissima*-é világossárgás.

A molekuláris munkák folyamata a 3. ábrán látható, részletes leírásuk a fejezet végén a Molekuláris munkák c. alfejezetben található. A teljes DNS-kivonást követően PCR-t végeztem a 28G1/28G2 primerpárral (Da Silva és mtsai. 2006a), ami az nrDNS LSU régiójába köt. A megfelelő primerpár kiválasztásához elvégeztünk egy tesztet, amelyet a fejezet Primerteszt c. alfejezetében ismertetek. A PCR-t követően tisztítás és A-farkazás után vektorba (pGEM-T Easy) ligáltam és klónoztam (TOP10 One Shot) a mintáimat. A klónozás ellenőrzése után mind a 7 pár sikeres mintából 48-48 klónt szekvenáltam Sanger-féle módszerrel ABi 3037XL szekvenátoron, összesen 7x96 (672) mintát.



3. ábra. A molekuláris munkák folyamata

A kapott szekvenciák minőségét a Staden programcsomaggal ellenőriztem (Staden és mtsai. 2000), a szekvenciákat BLAST algoritmus segítségével összevettem a GenBank adatbázissal. A megfelelő minőségű szekvenciákból a mothur programmal (Schloss és mtsai. 2009) molekuláris operatív taxonómiai egységeket (MOTU) képeztem, valamint rarefaction görbék segítségével ellenőriztem, hogy a kapott szekvenciamennyiség megfelelő mintavételnek bizonyul-e a területről, adott clusterezési küszöbérték mellett. Szintén a mothur programmal Shannon diverzitást számoltam az egész mintámra, valamint az almintákra (növényfajok, növénytársulások), Venn-diagramon ábrázoltam, hogy a kapott MOTU-k és a hozzájuk tartozó szekvenciák hogy oszlanak meg a két növényfaj és a két növénytársulás között. A kapott MOTU-kból egy referencia adatbázis szekvenciáival együtt egy Minimum Evolution (ME) fát készítettem a MEGA5 program segítségével (Tamura és mtsai. 2011). Az összes saját szekvenciám segítségével is képeztem egy ME fát, amin jelöltem, hogy melyik szekvencia melyik borkorból és melyik növényfaj gyökeréből származik. Mindkét esetben Kimura-2-paraméteres modellt alkalmaztam. Az 1000 bootstrap ismétlés eredményét 75% felett tüntettem fel az ábrákon.

Primerteszt

A PCR-hez használandó primerpár vagy -rendszer kiválasztásához egy előzetes vizsgálatot végeztünk el. A kísérlet során egy 14 fajból álló mesterséges AMF-közösségen teszteltük három primerpár és egy primerrendszer hatékonyságát, melyek az nrDNS különböző régióit amplifikálják. Ez a négy rendszer általánosan használt az AMF-ek környezeti és taxonómiai vizsgálatai során. A gombák molekuláris vizsgálataihoz használt általános primerpár, az ITS1F-ITS4 sajnos erősen torzít a Dikarya felé, ezért AMF-specifikus primerekre van szükség azok kutatásához. A primerek tervezésénél a fő szempontok a következők: az amplifikáció legyen (i) specifikus, vagyis csak AMF taxonok DNS-e szaporodjon fel, (ii) univerzális, vagyis minden AMF-taxon DNS-e szaporodjon fel, (iii) torzítatlan, vagyis egyik taxon DNS-e se szaporodjon fel preferenciálisan a többihez képest. Tudtuk, hogy sajnos ezen feltételek egyike sem teljesül maradéktalanul ezeknél az elterjedt használatban lévő primereknél, ezért is volt szükséges a primerteszt.

Miután a legelsőként publikált AMF-specifikus primerről, a VANS1-ről (Simon és mtsai. 1992) kiderült, hogy rossz hatékonyságú, nem sokkal megjelent a ma is leggyakrabban használt primer, az AM1, amit az általános eukarióta NS31-gyel használnak együtt (Helgason és mtsai. 1998). Erről azonban a szerzők nem sokkal a publikálás után közölték, hogy a *Glomeromycota* alapi csoportjai rovására torzít. A Lee-féle primerpár (Lee és mtsai. 2008) az AM1 egyfajta továbbfejlesztése, tartalmazza előbbi teljes hosszában, viszont jobban optimalizálták a tervezés során. Míg az előző primerek mind a rendszerezésre általánosan használt kis alegységet kódoló génszakaszba (SSU) kötnek, addig a 28G1/28G2 a nagy alegység (LSU) D₁-D₂ variábilis szakaszokat tartalmazó régióját szaporítja fel (da Silva és mtsai. 2006). A Krüger-féle primerrendszer (Krüger és mtsai. 2009) a specifitást két egymásba ágyazott (nested) primerpárral próbálja megoldani, az univerzalitást pedig degeneráltsággal (vagyis ahogy a szerző szeretik hangoztatni, mindegyik primer igazából néhány pozícióban eltérő keverék).

1. táblázat. A 4 összehasonlított primerrendszer

primer	irodalom	régió	hossz	T _m (°C)
AM1/NS31	Helgason és mtsai, 1998	SSU	~500 bp	58
AML1/AML2	Lee és mtsai, 2008	SSU	~800 bp	50
28G1/28G2	da Silva és mtsai, 2006	LSU	~600 bp	55
1. SSUmAf/LSUmAr 2. SSUmCf/LSUmBr	Krüger és mtsai, 2009	SSU+ITS+LSU	~1500 bp	60 63

A teszthez 14, refereciagyűjteményből (Morton és mtsai. 1993) származó AMF-faj spóráiból kivont DNS-ből azonos térfogatot mértünk a mesterséges közösségként szolgáló keverékbe. A DNS kvantifikálását nem tartottuk fontosnak, mivel *in planta* módszerekhez kerestünk egy optimális primerpárt, és a természetes AMF-közösségekben is egyenlőtlenül oszlik el a jelenlévő gombák DNS-mennyisége, ráadásul az nrRNS-gének kópiaszáma is változó, a különböző számú tandem ismétlődések miatt (akár egy fajon belül is). A DNS-kivonatokat egyenként is ellenőriztük PCR-rel, hogy tartalmazznak-e amplifikálható mennyiségű DNS-t. Pozitív eredményt kaptunk minden kivonatra.

A primerteszt és a mikroskála-vizsgálat során is az 1. ábrán feltüntetett folyamat szerint jutottunk el a mintából kivont DNS-től a szekvenciákig, a módszerek pontos ismertetése pedig a következő alfejezetben olvasható.

Minden egyes primerpárral elvégzett PCR-ből klónozás után 96 klónt válogattunk ki szekvenálásra. A szekvenciák minőségét a Staden programcsomaggal ellenőriztük, majd BLAST algoritmussal összevetettük a GenBank adatbázissal. Az eredményt a 2. táblázat tartalmazza.

2. táblázat. A primerteszt eredménye

Primer-pár	Claroidogonus etunicatum (G. etunicatum)	Funneliformis caledonius (G. caledonius)	Funneliformis constrictus (G. constrictus)	Glomus mosseae (G. mosseae)	Rhizophagus macrocarpum	Rhizophagus darus (G. darus)	Acaulospora intraradices (G. intraradices)	Acaulospora colombiana (E. colombiana)	Diversispora lacunosa	Gigaspora spurca	Racocetra gigantea	Racocetra castanea (S. castanea)	Paraglomus brasiliarium	Nem azonosított AMF	Fajgazdagság (S)	Shannon-Wiener H	nincs találat	rossz szekvencia	prokaróta
NS31-AM1	7	20					57					3	0.8119	5	2	3			
28G1-28G2	22	2	34	10			9	16				6	1.5600	1	2	0			
AML1-AML2	5	24					61					3	0.7767	0	3	0			
Krüger's		3			1		89	2	1	5	0.3542	0	0	0					

Láthatjuk, hogy egyik primerpár sem teljesíti maradéktalanul a korábban meghatározott három szempontunkat; aspecifikus, torzított és nem univerzális amplifikációk figyelhetők meg. A mikroskóla-vizsgálathoz a primerteszt alapján a da Silva-féle 28G1/28G2 primerpárt választottuk ki, mivel a legtöbb számú fajt és a legnagyobb Shannon-diverzitású közösséget ez szaporította fel. Kitekintésként elmondható, hogy a megfelelő primerpárok felé vezető út mindenképpen iteratív, mivel a GenBankban elhelyezett szekvenciák nagy része ezekkel a primerpárokkal készült, és csak kevés ezeken túlnyúló szekvencia van, amik alapján tovább lehetne keresni egy jól működő AMF-specifikus rendszert.

Molekuláris munkák

DNS-Kivonás:

A teljes DNS kivonását a 70%-os etanolban tárolt gyökerekből QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit-tel végeztem el a gyártó által szolgáltatott protokoll szerint.

PCR:

Összetevők	25 µl végtérfogatra (µl)
MgCl ₂ puffer (10x) (Fermentas)	2,5
dNTP (2mM) (Fermentas)	2,5
forward primer (25 µM)	1,3
reverse primer (25 µM)	1,3
<i>Pfu</i> polimeráz (2,5 U/µl) (Fermentas)	0,6
Milli-Q víz	11,8
Target DNS	5

PCR-kondíciók

Szakasz	Hőmérséklet (°C)	Időtartam (s)
Denaturáció	93	180
Denaturáció	93	30
Primer bekötés	Alacsonyabb T _m - 5	30
Lánchosszabbítás	75	120
Lánchosszabbítás	75	600
Hűtés	4	∞

30 ciklus

Agaróz gélelektroforézis:

1,5%-os, etidium-bromidos agaróz gélben 100V-on 10-15 percig futtattam a mintákat.

PCR-termék tisztítása:

A PCR-termék tisztítását a Promega Wizard SV Gel and PCR Clean-Up Systemmel végeztem a gyártó protokollja szerint. 50 µl tisztított DNS-t eluáltam az oszlopról, ezzel dolgoztam tovább.

A-farkazás:

Mivel a PCR során *Pfu* polimerázt használtam, ami „blunt end”-et hagy az amplifikáció során, a vektorba ligáláshoz szükséges volt az amplikonokat „adenin-farokkal” ellátni. Ez *DreamTaq* (Fermentas) polimerázzal végeztem el, 2 mM-os dATP-vel. A reakciót 70°C-on, 15 percig végeztem.

Ligálás:

Az A-farokkal ellátott, tisztított PCR-terméket pGEM-T Easy (Promega) vektorba ligáltam az adott recept szerint, egy órás inkubációs idő mellett szobahőmérsékleten. (A reakció összetevői: 3,3 µl amplikon, 0,7 µl vektor, 1 µl ligáz és 5 µl 2Xpuffer.)

Transzformálás és klónozás:

TOP10-One Shot kompetens *E. coli* sejteket transzformáltam a plazmidba ligált amplikonokkal. Az 50 µl kompetens sejtet két felé osztottam. 2µl ligátumot adtam a sejtekhez és 30 percen keresztül jégen inkubáltam. 40 másodpercig 42°C-os vízfürdőben hősokkoltam a sejteket, majd 5 percig újból jégen inkubáltam őket. 200 µl SOC táplevessel 1 órán át 37°C-on rázattam a sejteket. Ezután ampicillines, IPTG-s, X-Gal-os LB-agar táptalajra szélesztettem minden mintából 50 és 100µl-t. Overnight 37°C-on inkubáltuk a plate-eket.

Klónok ellenőrzése:

A klónokat kék-fehér szelekciója során az inzertet nem tartalmazó után *DreamTaq* enzimmel PCR-eztem és ellenőriztem, hogy a vektorban megvolt-e az inzert.

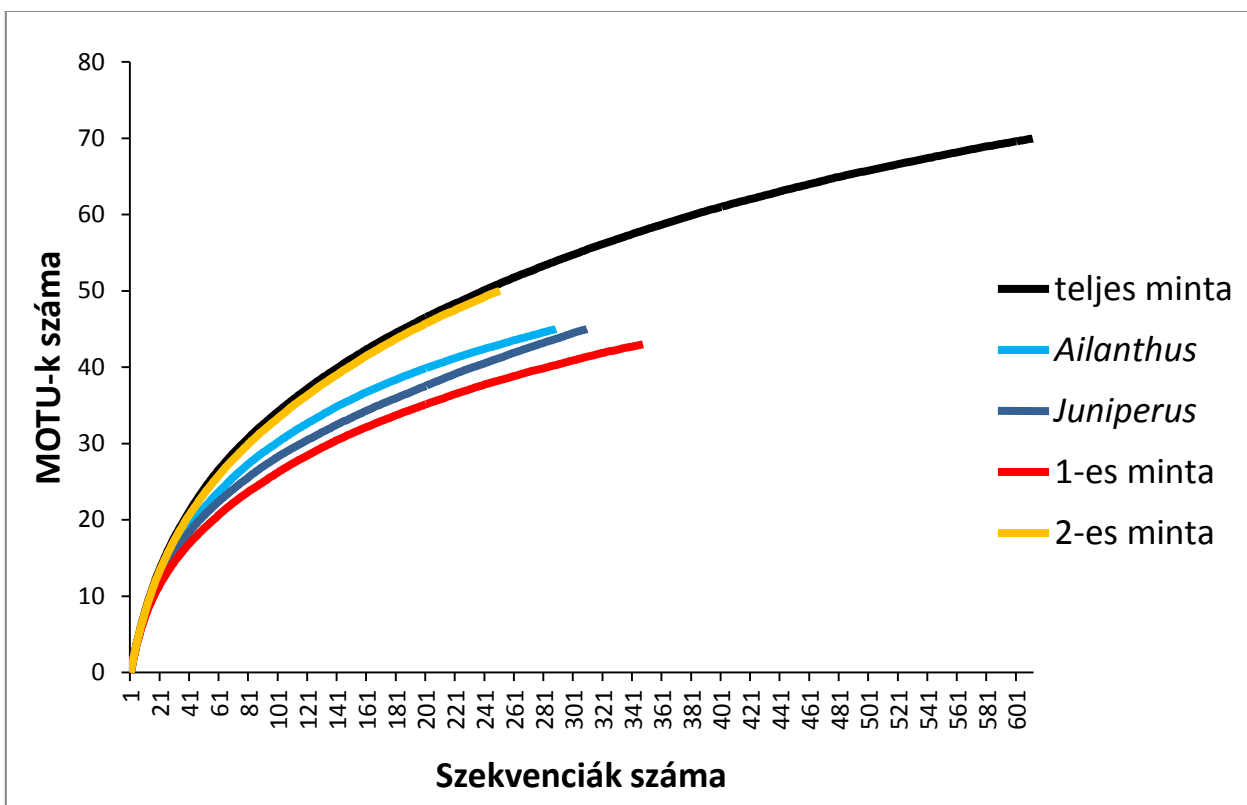
Sanger-szekvenálás:

A PCR-termékeket ExoSap (USB Affymetrix) emésztéssel tisztítottam, BigDye Terminatoral (Invitrogen) végeztem el a szekvenálóreakciót, majd a DNS-t etanolos precipitáció után ABi 3730XL kapilláris elektroforézis szekvenátoron szekvenáltuk.

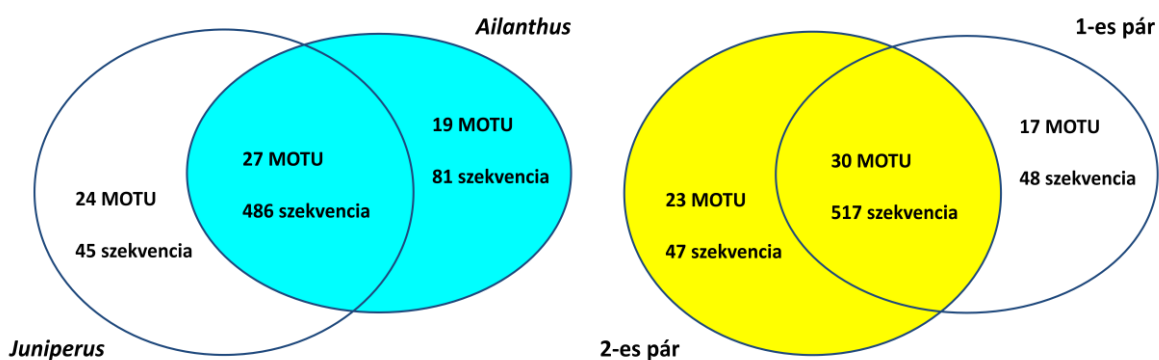
Eredmények és tárgyalásuk

A kapott 622 szekvencia minőségi ellenőrzése után pont 600 szekvenciával dolgoztam tovább. Mivel az AMF-ek LSU-régiójára nincs egy konvencionális küszöbérték, ami mellett MOTU-kat képezhettem volna, az Arthur Schüssler munkacsoportja által összeállított referencia adatbázist (Krüger és mtsai. 2012) hívtam segítségül. Ebben 1084 illesztett szekvencia található, ám nem túl felhasználóbarát módon, ugyanis ebből a mennyiségből csak 299 szekvencia tartalmazza az általam használt LSU-szakaszt teljes hosszában. A taxonómiai jól ismert *Diversispora* nemzetséget választottam referenciának, mivel fajai jól definiáltak, és filogenetikailag közel állnak egymáshoz (az SSU régió alapján el sem különülnek) (Gamper és mtsai. 2009). Megvizsgáltam a mothur programmal, hogy hány százalékos küszöbértékkel képzett klaszterezés mellett különülnek el a fajok a nemzetségen belül. Ez az érték 3%-nak adódott, így ezt használtam az elemzéseim során. Más nemzetségeknél természetesen nem teljesen felelt meg ez a csoportosítás a fajhatároknak, de ezt nem is vártam, hiszen a 3% egy önkényes választás, a különböző AMF-csoportok pedig más-más diverzifikációs rátával rendelkeznek, így akadt olyan, ahol 3% mellett már több faj is egy MOTU-ban csoportosult, illetve olyan is, ahol egy ma érvényes fajon belül több csoport alakult ki. Ezeknek a csoportoknak a taxonómiája azonban nem annyira feltárt, mint a *Diversispora* nemzetségé, erről még eredményeim későbbi tárgyalása során írok.

A mothur programmal számolt MOTU-telítési görbék a 4. ábrán láthatók. A rarefaction-görbékről azt tudjuk leolvasni, hogy a vizsgált területről vajon előkerülnének-e még további taxonok, ha tovább mintavételezünk. A 4. ábrán az egész mintára vonatkozó görbe már majdnem megközelíti az x-tengellyel párhuzamos irányt, és a többi is befordult már; további mintázással azonban még több MOTU kerülhetne a vizsgálatba.



4. ábra. Fajtelítési (rarefaction) görbék a teljes mintára és az almintákra



5. ábra. A MOTU-k és szekvenciák megoszlása a növényfajok és a mintavételi párok között

Az 5. ábrán látszik, hogy a sok szekvencia által képviselt MOTU-k voltak megtalálhatók mindkét növényfajban, illetve mindkét mintavételi helyen is. Azok a MOTU-kat, amik csak az egyikben vagy csak a másikon voltak jelen, csak kevés szekvencia képviselte.

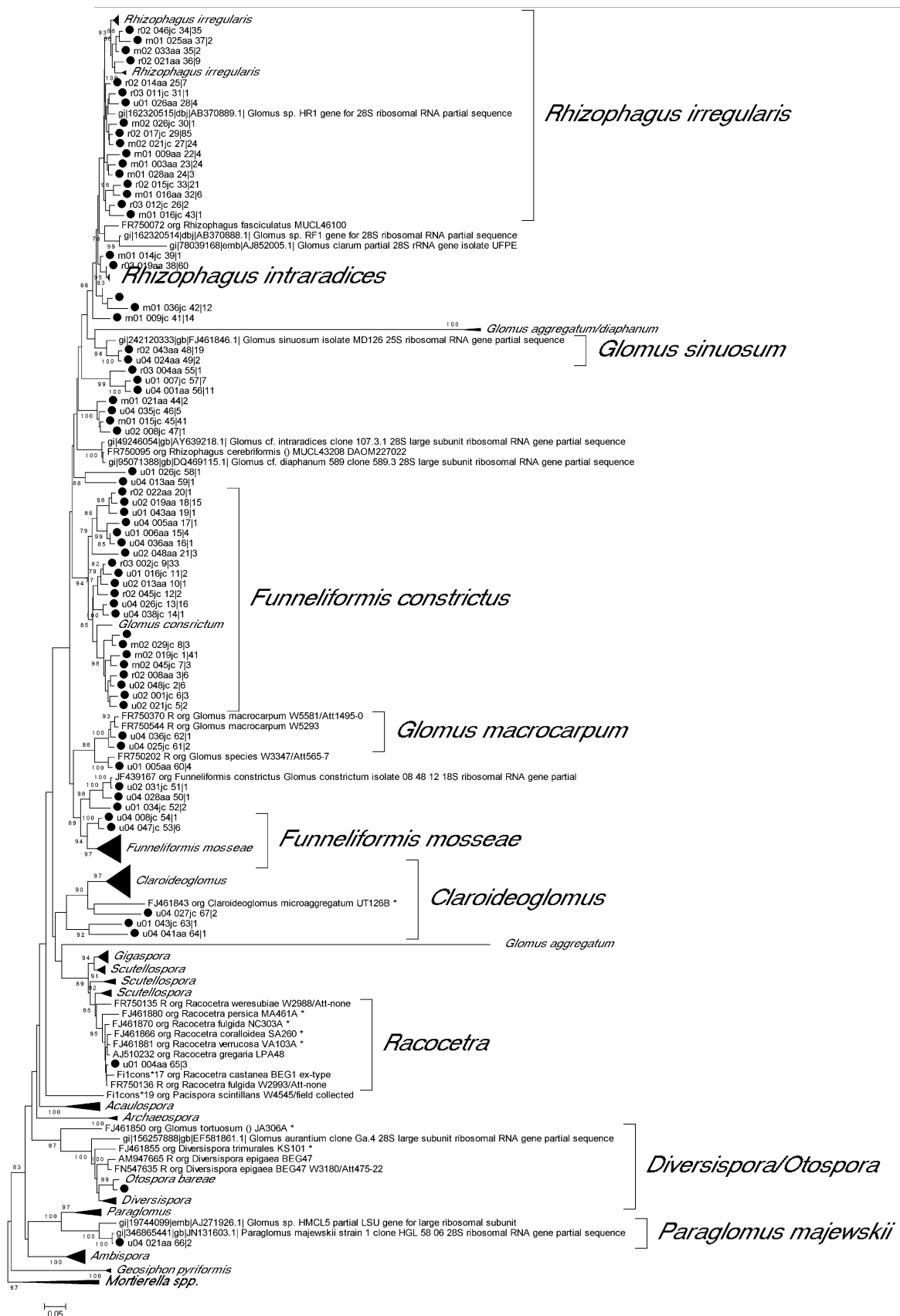
3. táblázat. Shannon-féle diverzitás (H) és egyenletesség (E)

	H	E
teljes minta	3,4199	0,8050
<i>Ailanthus</i>	3,1654	0,7451
<i>Juniperus</i>	3,2077	0,7550
1-es pár	3,0269	0,7125
2-es pár	3,4048	0,8014

A mothur programmal számított Shannon-diverzitási értékek alapján nem volt jelentős diverzitási vagy egyenletességi különbség kimutatható (3. táblázat).

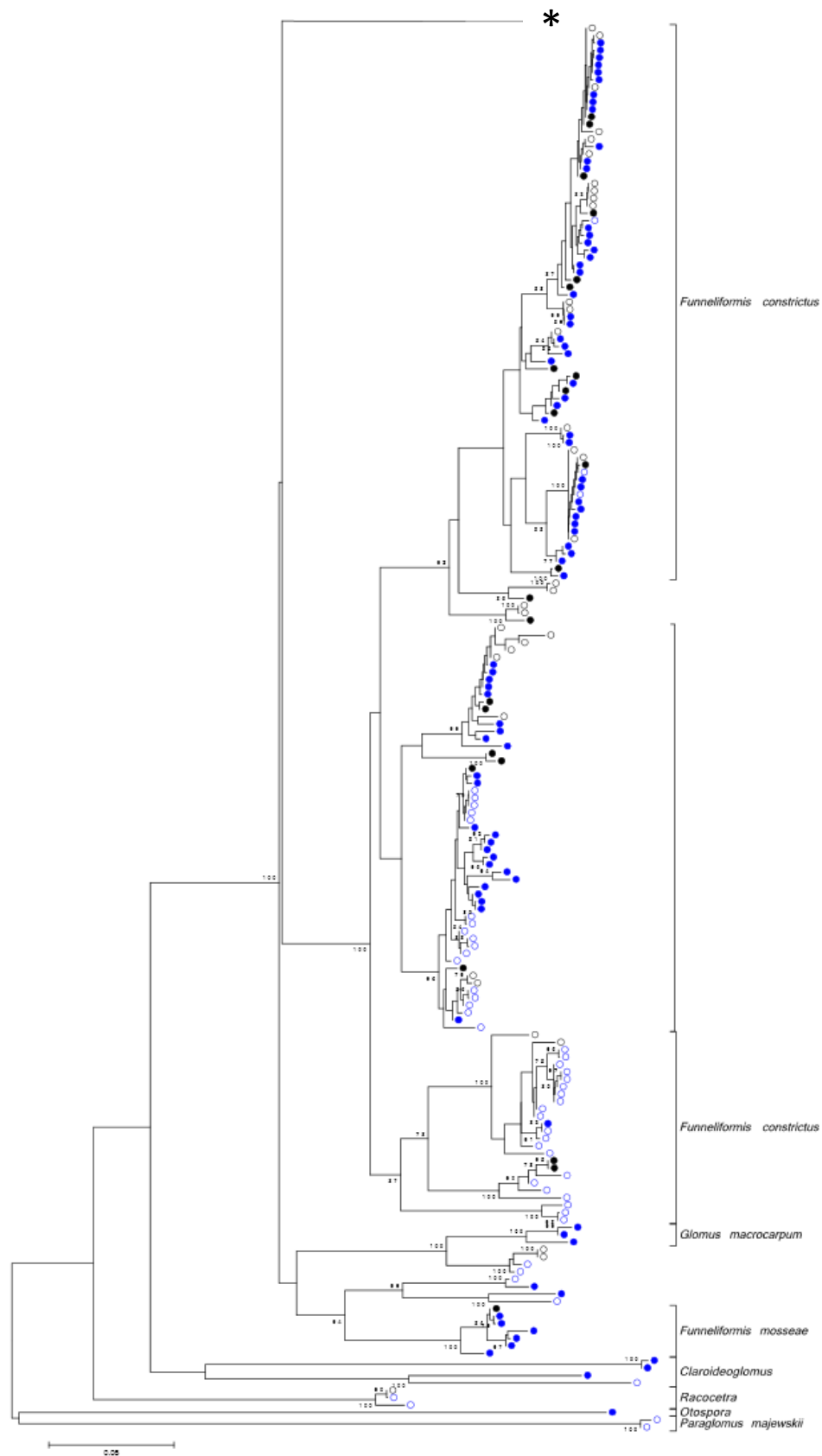
A BLAST-eredményekből már látható volt, hogy a MOTU-kból kiválasztott reprezentáns szekvenciáim túlnyomó többsége kizárólag környezeti mintákból kapottakkal mutatott megfelelő mértékű hasonlóságot, de néhányhoz hozzárendelhető volt ismert taxonómiai helyzetű faj szekvenciája.

A Schüssler-féle adatbázisból és mindegyik általam kapott MOTU reprezentánsaiból kiválasztott 220 szekvenciával kapott ME-fán látható, hogy a MOTU-k nagy része – ezeken belül is a nagy szekvenciaszámmal képviselték – a *Rhizophagus* és *Funneliformis* (egykori *Glomus*) nemzetségekbe tartozik. A *Glomeromycota* törzs típusfaját, a *Glomus macrocarpum*ot képviselő szekvenciákat is kimutattam, továbbá a bazális *Paraglomus majewskii* szekvenciái is előkerültek, amely faj leírásának molekuláris munkáiban én is részt vettem. Az *Diversispora* nemzetségbe ékelődő *Otospora bareai*, valamint a *Racocetra* és *Claroideoglomus* nemzetségekkel nagy hasonlóságot mutató szekvenciák is előkerültek.

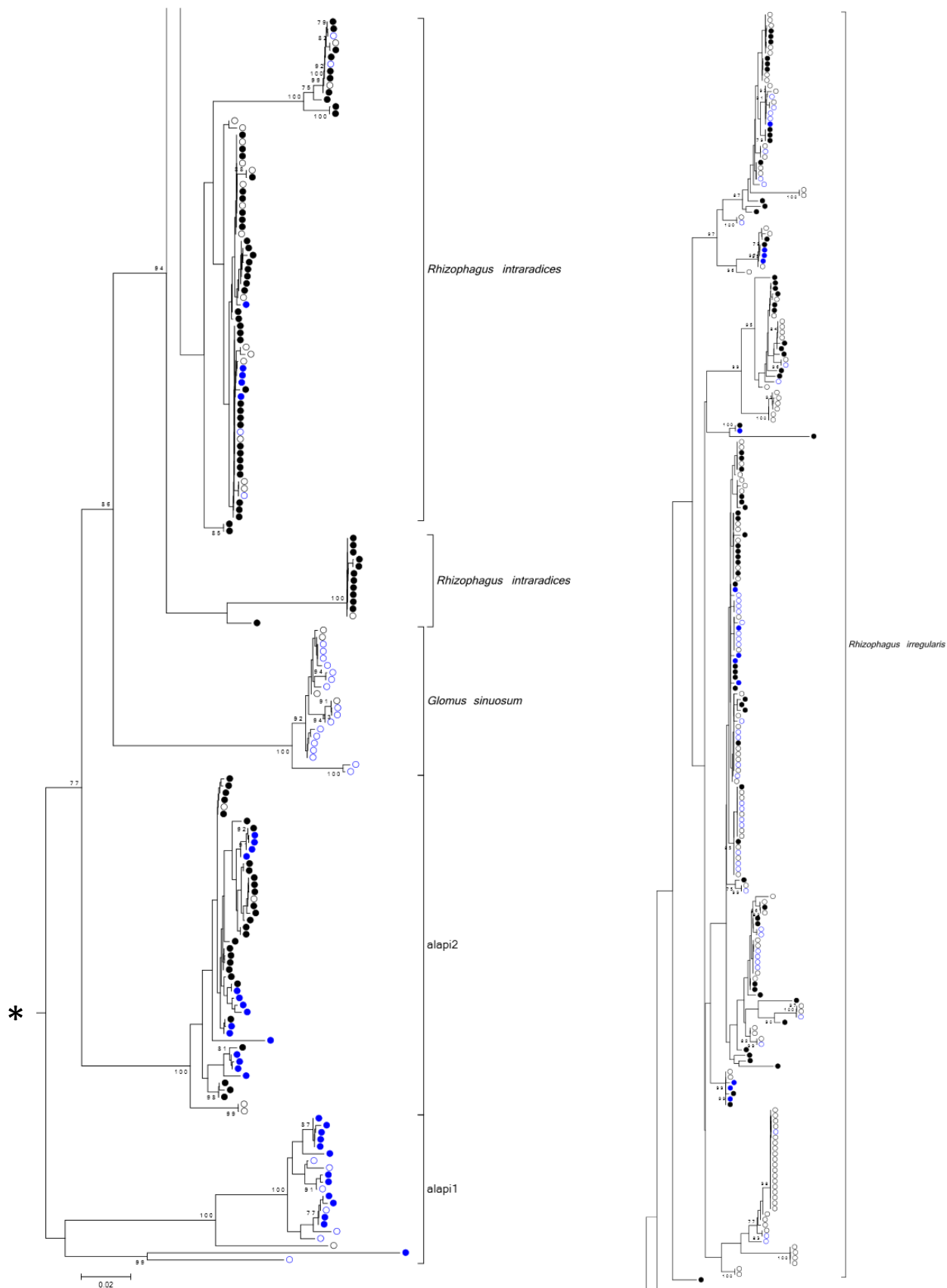


6. ábra. ME fa az azonosított MOTU-k (ponttal jelölve) és 150 referenciaszekvencia alapján; külsőportként *Mortierella humilis* és *M. polycephala* szekvenciákat használtam, a bootstrap értékeket 75% felett tüntettem fel; a mérce az egységnyi ághosszra eső karakterváltozás átlagos valószínűségét jelöli.

A 600 saját szekvenciámból készített ME fa a 8. és 9. ábrán látható. Megfigyelhető, hogy a legnagyobb kládok szekvenciái vegyesek, vagyis *Juniperus*-ból és *Ailanthus*-ból, valamint mindkét növénypárból származó szekvenciák alkotják. Több kis kládnál azonban megfigyelhető valamilyen homogenitás vagy trend, például a *Funneliformis mosseae* vagy *Glomus macrocarpum* fajokat csak *Juniperus*-ból detektáltam, míg a *Glomus sinuosum* csak *Ailanthus*-ból került elő. A *Rhizophagus* nemzetségen belül, a *Rhizophagus irregularis* fajban is több kis elkülönülő klád alakult ki, melyek vagy az egyik, vagy a másik növényfajból származnak. Egy olyan trend is megfigyelhető, hogy az alapi kládokban és a *Funneliformis*-ban a 2-es növénypár szekvenciái vannak túlsúlyban, míg a *Rhizophagus* kládban az 1-esből származók. Szezonális és időbeli hatások a területen élő AMF-közösségeire vonatkozó korábbi vizsgálatok alapján kizárhatók (Balázs és Kovács 2009).



7. ábra. 600 saját LSU szekvenciából készített ME fa, alapi kládok.). Teli kör: *Juniperus*, üres kör: *Ailanthus*, fekete kör: 1-es mintavételi hely, kék kör: 2-es mintavételi hely. A bootstrap értékeket 75% felett tüntettem fel; a mérce az egységnyi ághosszra eső karakterváltozás átlagos valószínűségét jelöli.



8. ábra. 600 saját LSU szekvenciából készült ME fa, koronakládok (*Rhizophagus*). Teli kör: *Juniperus*, üres kör: *Ailanthus*, fekete kör: 1-es mintavételi hely, kék kör: 2-es mintavételi hely. A bootstrap értékeket 75% felett tüntettem fel; a mérce az egységnyi ághosszra eső karakterváltozás átlagos valószínűségét jelöli.

Összefoglalás

Magyarországi felszáráz homokterületekről 2006-ban spóramorfológia alapján 6 AMF-fajt jeleztek (Takács és Bratek 2006), 2009-ben már 22 faj spórája volt ismert csak a tatárszentgyörgyi területéről (Balázs és mtsai. 2009). 2010-ben a magi riboszomális RNS SSU régiója alapján, 1,5%-os klaszterezés mellett 55 MOTU-t mutattak ki a tatárszentgyörgyi terület 10 *Juniperus*-egyedének gyökereiből (Balázs és Kovács 2010). A hét mintapárból detektált 600 szekvenciából, 3%-os különbség mellett kapott 70 MOTU nagyobb taxonszámot jelent, mint a területről eddig ismert taxongazdagságok. Ez az LSU szakasz divergens régióinak vagy az alkalmazott da Silva-féle primerpár magasabb hatékonyságának is lehet az eredménye. Fontos látni azonban, hogy a primertesztünk alapján még ez is egy bőven alulbecsült eredmény, hiszen az ott vizsgált mesterséges közösség fajainak kevesebb mint felét detektálta a primer, bár még ez volt a leghatékonyabb az összes vizsgált rendszer közül. Így feltételezhetjük, hogy a területen is vannak még olyan taxonok, amik nem kerültek kimutatásra, de a szimbiotikusan aktív AMF-közösség részét képezik.

A kimutatott szekvenciák túlnyomó többsége a *Rhizophagus* és *Funneliformis* (egykori *Glomus*) nemzetségekbe tartozik, de több filogenetikailag távolabbi taxont is kimutattam. Ezek a munkacsoportunk által leírt *Paraglomus majewskii* faj a *Glomeromycota* bazális *Paraglomeraceae* családjából; az *Otospora bareai*, amely a *Diversispora* nemzetségbe ékelődik; valamint 3 szekvencia, amely a *Scutellospora* nemzetségbe ékelődő *Racocetrá*-val mutatott nagyfokú hasonlóságot. A *Racocetra* mindkét mintapárból csak *Ailanthus*-ból volt kimutatható. A régebben szintén *Glomus*-ba tartozó *Claroideoglomus* nemzetségbe négy szekvencia került. A *Funneliformis mosseae* – amely segítségével Mosse 1953-ban először mutatta meg, hogy mely gomba alakítja ki az arbuszkuláris mikorrhizát (Mosse 1953) – csak borókából került elő. Ugyanez mondható el a *Glomus macrocarpum*-ról, amely egyes források szerint a törzs típusfaja (míg más szerzők szerint a *G. microcarpum* az). A *Funneliformis constrictus* fajba tartozó szekvenciáim három kládra különülnek el, melyek közül az alapiban megfigyelhető az *Ailanthus* dominanciája, a másik kettő közül pedig az egyikben a *Juniperus*-é. A *Rhizophagus* nemzetség két alapi kládjában is dominálnak a borókából származó szekvenciák, míg a következő klád, a *Glomus sinuosum* csak a bálványfából volt kimutatható. A *Rhizophagus intraradices*-en belül adódott egy klád, melyben egy kivételével csak *Juniperus*-eredetű szekvenciák csoportosultak, a *Rhizophagus irregularis*-on belül az alapi klád pedig kizárólag *Ailanthus*-eredetű. A két faj többi

szekvenciája nem mutatott ilyen csoportosúást. Ezek alapján további funkcionális vizsgálatokhoz a *Funneliformis constrictus*, *Rhizophagus intraradices* és *Rh. irregularis* tűnik potenciálisan megfelelő generalista taxonnak.

A *Rhizophagus* és *Funneliformis* nemzetségek domináns AMF-ek, a gyökereket nagy foltokban kolonizálják, nagy számban képeznek spórákat, sokszor kerülnek elő környezeti mintákból (Parniske 2008). Genetikailag heterogén taxonok, amit az a példa is jól szemléltet, hogy a *Glomeromycota* törzs modellorganizmusa, a *Glomus intraradices* DAOM 197198 klónja molekuláris elemzések után nem lett konspecifikus a *Glomus intraradices* típusfajával, és a *Glomus irregulare* fajba került (Błaszkowski és mtsai. 2008; Stockinger és mtsai. 2009). (Az új nevezéktan szerint mindkét faj a *Rhizophagus* nemzetségbe tartozik (Schüßler és Walker 2010).) Ezzel a genetikai heterogenitással egybecsengenek a *Rhizophagus* és *Funneliformis* nemzetségekre vonatkozó eredményeim, miszerint a nemzetségek 1-1 fajába a 3% mellett képzett MOTU-kból sok került (a MOTU-k túlnyomó többsége). Valószínűleg ezekben a taxonokban az LSU régióra egy magasabb klaszterezési küszöbértéket lenne szükséges alkalmazni, hogy a MOTU-k a ma érvényes taxonokkal egybeessenek.

A Venn-diagramok és a szekvenciáimból készített távolságalapú fák alapján elmondható, hogy a sok szekvencia által képviselt taxonok generalisták, míg a csak egy növényfajból vagy növénypárból detektált MOTU-kban általában kevés szekvencia csoportosult. Adódtak olyan kládok, melyben kizárólag, vagy túlnyomó többségben olyan szekvenciák csoportosultak, melyek csak az egyik almintából származtak, vagyis amelyekről nem derült ki, hogy generalisták lennének.

Mindezek az eredmények közelebb vittek minket a félszáraz homokterületek generalista AMF-csoportjainak és egész AMF-közösségének jobb megismeréséhez.

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Kovács M. Gábornak a rengeteg szakmai segítséget, és a hihetetlen türelmet és emberséget.

Köszönöm a men(s)aa csoport minden tagjának, hogy ilyen jó légkörben dolgozhatok.

A kutatást az Országos Tudományos Kutatási Alapprogram (OTKA NI81157, K60887) támogatta.

Irodalomjegyzék

- Balázs, T., Błaszowski, J. és Kovács, G.M., 2009. Arbuscular mycorrhizal fungi of semiarid sandy areas on the Great Hungarian Plain . What the spores can tell us ? *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 216, p.72776.
- Balázs, T.K. és Kovács, G.M., 2010. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonizing junipers in semiarid sandy areas. , pp.72776–72776.
- Bever, J.D. és mtsai., 2010. Rooting theories of plant community ecology in microbial interactions. *Trends in ecology & evolution*, 25(8), pp.468–78.
- Bonfante, P. és Genre, A., 2010. Mechanisms underlying beneficial plant–fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature Communications*, 1(4), pp.1–11.
- Bonfante, P. és Genre, A., 2008. Plants and arbuscular mycorrhizal fungi: an evolutionary-developmental perspective. *Trends in plant science*, 13(9), pp.492–8.
- Brundrett, M.C., 2009. Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. *Plant and Soil*, 320(1-2), pp.37–77.
- Błaszowski, J. és mtsai., 2008. *Glomus irregulare*, a new arbuscular mycorrhizal fungus in the Glomeromycota. *Mycotaxon*, 106(December), pp.247–267.
- Davison, J. és mtsai., 2012. Communities of arbuscular mycorrhizal fungi detected in forest soil are spatially heterogeneous but do not vary throughout the growing season. *PloS one*, 7(8), p.e41938.
- Dickson, S., 2004. The Arum-Paris continuum of mycorrhizal symbioses. *New Phytologist*, 163(1), pp.187–200.
- Fortin, J. és Bécard, G., 2002. Arbuscular mycorrhiza on root-organ cultures. *Canadian Journal of Botany*, 20, pp.1–20.
- Gamper, H. a, Walker, Christopher és Schüssler, A., 2009. *Diversispora celata* sp. nov: molecular ecology and phylotaxonomy of an inconspicuous arbuscular mycorrhizal fungus. *The New phytologist*, 182(2), pp.495–506.
- Halary, S. és mtsai., 2011. Conserved meiotic machinery in *Glomus* spp., a putatively ancient asexual fungal lineage. *Genome biology and evolution*, 3, pp.950–8.
- Van der Heijden, M.G. a, Bardgett, R.D. és Van Straalen, N.M., 2008. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology letters*, 11(3), pp.296–310.
- Helgason, T. és mtsai., 1998. Ploughing up the wood-wide web? *Nature*, 394(6692), p.431.

- Hibbett, D.S., Ohman, A. és Kirk, P.M., 2009. Fungal ecology catches fire. *The New phytologist*, 184(2), pp.279–82.
- Hodge, a., Helgason, T. és Fitter, a.H., 2010. Nutritional ecology of arbuscular mycorrhizal fungi. *Fungal Ecology*, 3(4), pp.267–273.
- James, T.Y. és mtsai., 2006. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature*, 443(7113), pp.818–22.
- Kovács-Láng, E., Kröel-Dulay, GY., Kertész, M., Fekete, G., Mika, J., Dobi-Wantuch, I., Rédei, T., Rajkai, K., Hahn, I., Bartha, S. 2000. Changes in the composition of sand grasslands along a climatic gradient in Hungary and implications for climate change. *Phytocoenologia*. **30**: 385-407.
- Krüger, M. és mtsai., 2009. DNA-based species level detection of Glomeromycota: one PCR primer set for all arbuscular mycorrhizal fungi. *The New phytologist*, 183(1), pp.212–23.
- Krüger, M. és mtsai., 2012. Phylogenetic reference data for systematics and phylotaxonomy of arbuscular mycorrhizal fungi from phylum to species level. *The New phytologist*, 193(4), pp.970–84.
- Lee, J., Lee, S. és Young, J.P.W., 2008. Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS microbiology ecology*, 65(2), pp.339–49.
- Maillet, F. és mtsai., 2011. Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature*, 469(7328), pp.58–63.
- Morton, J.B., Bentivenga, S.P. és Wheeler, W.W., 1993. Germ plasm in the International Collection of Arbuscular and Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi (INVAM) and procedures for culture development, documentation and storage. *Mycotaxon*, 48(1), pp.491–528.
- Mosse, B., 1953. Fructifications associated with mycorrhizal strawberry roots. *Nature*, 171, p.974.
- Opik, M. és mtsai., 2009. Large-scale parallel 454 sequencing reveals host ecological group specificity of arbuscular mycorrhizal fungi in a boreonemoral forest. *The New phytologist*, 184(2), pp.424–37.
- Parniske, M., 2008. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature reviews. Microbiology*, 6(10), pp.763–75.
- Pringle, A. és mtsai., 2009. Mycorrhizal Symbioses and Plant Invasions. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 40(1), pp.699–715.
- Redecker, D, Morton, J.B. és Bruns, T.D., 2000. Ancestral lineages of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales). *Molecular phylogenetics and evolution*, 14(2), pp.276–84.

- Redecker, Dirk, 2003. Molecular identification of arbuscular mycorrhizal fungi in roots: Perspectives and problems. *Folia Geobotanica*, 7(2), pp.315–124.
- Redecker, Dirk, Kodner, R. és Graham, L.E., 2000. Glomalean Fungi from the Ordovician. *Science*, 289 (5486), pp.1920–1921.
- Redecker, Dirk és Raab, P., 2006. Phylogeny of the glomeromycota (arbuscular mycorrhizal fungi): recent developments and new gene markers. *Mycologia*, 98(6), pp.885–95.
- Remy, W. és mtsai., 1994. Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91(December), pp.11841–11843.
- Rillig, M.C., 2004a. Arbuscular mycorrhizae, glomalin, and soil aggregation. *Canadian Journal of Soil Science*, (January), pp.355–363.
- Rillig, M.C., 2004b. Arbuscular mycorrhizae and terrestrial ecosystem processes. *Ecology Letters*, 7(8), pp.740–754.
- Schloss, P.D. és mtsai., 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and environmental microbiology*, 75(23), pp.7537–7541.
- Schüßler, A. és Walker, C., 2010. The Glomeromycota. A species list with new families and new genera. *Published in libraries at The Royal Botanic Garden Edinburgh, The Royal Botanic Garden Kew, Botanische Staatssammlung Munich, and Oregon State University*.
- Da Silva, G.A. és mtsai., 2006a. Phylogenetic analysis of Glomeromycota by partial LSU rDNA sequences. *Mycorrhiza*, 16(3), pp.183–9.
- Da Silva, G.A. és mtsai., 2006b. Phylogenetic analysis of Glomeromycota by partial LSU rDNA sequences. *Mycorrhiza*, 16(3), pp.183–9.
- Simon, L., Lalonde, M. és Bruns, T.D., 1992. Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. *Applied and environmental microbiology*, 58(1), pp.291–5.
- Smith, S.E. és Read, D.J., 2008. *Mycorrhizal symbiosis*, Academic Press.
- Staden, R., Beal, K.F. és Bonfield, J.K., 2000. The staden package, 1998. *Methods Mol Biol*, 132, pp.115–130.
- Stockinger, H., Walker, Christopher és Schüssler, A., 2009. “Glomus intraradices DAOM197198”, a model fungus in arbuscular mycorrhiza research, is not Glomus intraradices. *The New phytologist*, 183(4), pp.1176–87.
- Takács, T. és Bratek, Z., 2006. Description of am fungi species from semiarid open sandy grasslands in Hungary. *Acta Botanica Hungarica*, 48(1), pp.179–188.

- Tamura, K. és mtsai., 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution*, 28(10), pp.2731–9.
- Várallyay, Gy. 1993. Soils in the region between the rivers Danube and Tisza (Hungary). In: Szujkó-Lacza, J., Kováts, D. (szerk.). The Flora of the Kiskunság National Park. Magyar Természettudományi Múzeum, Budapest, pp. 21-42.