

XXXI. OTDK Biológia Szekció

***A *Salix rosmarinifolia* ektomikorrhiza
gombáinak vizsgálata félszáraz
homokpusztagyepen***

**Írta: Németh Julianna
Biológus MSc, II.évf.**

Témavezetők: Dr. Kovács M. Gábor, Seress Diána



**Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar,
Biológiai Intézet, Növény szervezettani Tanszék**

**Szeged
2013. április 2-4.**

Tartalomjegyzék

1 Absztrakt	3
2 Bevezetés	4
3 Célkitűzések	7
4 Anyag és módszer	8
5 Eredmények	12
6 Értékelés	23
7 Összefoglalás	26
8 Köszönetnyilvánítás	27
9 Felhasznált irodalom	28
10 Hivatkozott Internet oldalak	32
11 Szerzői hozzájárulás	33

1. Absztrakt

A mikorrhiza kapcsolatok fontos szerepet játszanak a szárazföldi ökoszisztémákban, többek között a növények szárazságtűrését is segítik. Számos mikorrhiza típust különböztetünk meg, ezek közül egyik legelterjedtebb az ektomikorrhiza (EM).

Munkám célja a Kiskunságban őshonos rozmaringlevelű fűz (*Salix rosmarinifolia*) EM képző gombáinak diverzitás vizsgálata volt. Ezen kívül a területen vizsgált más őshonos és invazív növények EM képző gombáinak összehasonlítása, illetve a generalista EM gombák azonosítása.

Mintáinkat a Fülöpháza melletti félszáraz homokpusztagyepről gyűjtöttük 2010 és 2011-ben, két *Salix* foltból. A mikorrhizákat sztereomikroszkóp alatt morfortípusok szerint válogattam. A molekuláris vizsgálatok során a gomba nrRNA ITS régióját szaporítottam fel és szekvenáltattam. A kevert mintákat egy endofiton gomba (*Cadophora* sp.) specifikus diagnosztikai PCR alkalmazásával is vizsgáltam. A szekvenciákat a mothur programmal csoportokba (MOTU) osztottam, amelyek alapján a két mintavételi terület, illetve az egyes mintavételek eredményeit vetettem össze. Az egyes MOTU-kat az NCBI Blast és Unite adatbázis segítségével azonosítottam.

A két mintaterületről 44 talajmintát gyűjtöttünk, ebből összesen 294 ITS szekvenciát kaptam. A szekvenciák hasonlóságuk alapján 58 MOTU-ba csoportosultak. Eredményeimet összevetettem a területről származó termőtest adatokkal, valamint más EM képző fajokról származó és talajból kiinduló gomba diverzitási „next generation sequencing” (NGS) adatokkal.

A korábbi termőtest adatok alapján nem várt magas EM diverzitást tapasztaltam. Néhány EM gomba (*Tomentella* spp., *Tuber* sp.) a területre nézve új adatnak bizonyult, ezen kívül számos generalista EM képző gomba taxont azonosítottam a *Salix rosmarinifolia* növényről.

2. Bevezetés

A szárazföldi növények 80-90%-a él együtt valamilyen gombával mutualista szimbiotikus kapcsolatban egészséges felszívó szerveiken (gyökér, rizóma, tallusz) keresztül. Ezt a strukturális és funkcionális egységet nevezzük mikorrhizának (Trappe, 1996). A mikorrhiza kapcsolat során a gombapartner a növény víz- és tápanyagfelvételét segíti elő, míg a növény asszimilátumokkal látja el a gombát. A mikorrhizának jelentős ökológiai szerepük van a szárazföldi ökoszisztémában, többek között növelik a növények szárazságtűrő képességét azáltal, hogy a gyökér felszívó felületét többszörösére növelik (Smith és Read, 2008). A növényi felszívó szervek mikorrhiza gomba kolonizációja lehet intracelluláris vagy extracelluláris, attól függően, hogy a hifa behatol a növény sejtjeibe, vagy nem. Az intracelluláris kolonizációt képző mikorrhiza gombákat endomikorrhizáknak nevezzük, melyeknek több típusa ismert. Ezek közül az orchid, erikoid és arbutoid mikorrhiza típusok a hazai társulásokban kevésbé jelentősek, míg az arbuszkuláris mikorrhiza a világon a legelterjedtebb szimbiotikus kapcsolat (Parniske, 2008). Az arbuszkuláris mikorrhiza (AM) képző gombák mind egy csoportba, a Glomeromycota törzsbe tartoznak. Nevüket a növény sejtjeibe növvő „fácska” alakú hifáról, az arbuszkulumokról kapták. Az edényes növényfajok kb. 73,3%-át kolonizálják (Brundrett, 2009).

Jelen dolgozat témája az ektomikorrhizákra (EM) irányul, amelyek hifái a gyökér kéregsejtjeibe nem nőnek bele, extracellulárisak. Az EM képző gombák a szárazföldi edényes növényfajok kb. 4,5 %-át kolonizálják (Brundrett, 2009), elsősorban fásszárú növényeket (Brundrett, 2002). A mérsékelt égövön az EM gombák rendkívül elterjedtek, ökológiai jelentőségük igen nagy. Magyarországon az erdőalkotó fafajok többsége (*Quercus* spp., *Fagus sylvatica*, *Populus* spp., *Carpinus betulus*, *Alnus glutinosa*) EM gombával él együtt. A magyarországi EM vizsgálatok jelentős hányada az Alföld területére korlátozódik, így erre a területre vonatkozólag kiterjedt irodalom áll rendelkezésünkre (Erős-Honti és mtsai, 2008; Jakucs és mtsai, 2005; Seress és Kovács, 2010; Kovács és mtsai, 2008, Kovács, 2008)

Mintavételi területünk a Fülöpháza melletti homokpusztagyep, amely a Kiskunsági Nemzeti Park fokozottan védett területe 1973 óta, kiterjedése 1992 hektár (knp.nemzetipark.gov.hu). A terület talajkészlete az Ős-Duna hordalékából származik, melyet később a szélmozgások alakítottak át a táj mai arculatává. A talaj humusztartalma alacsonyabb 1%-nál, tápanyagtartalma rendkívül alacsony (Kovács-Láng és mtsai, 2000). Az éves csapadékmennyiség 550 mm, ami a magyarországi átlag (500-650 mm) alsóbb értékeinek felel meg (www.met.hu). A terület növényborítása a geológiai adottságoknak

köszönhetően jellegzetesen mozaikos homoki erdőszytepp, melynek egyik jellegzetes fafaja a *Salix rosmarinifolia*.

A rozmaringlevelű fűz egyéb gyakran használt magyar nevei: cinege fűz és serevény fűz (Borhidi és mtsai, 1999; Király, 2009). A *Salix rosmarinifolia* preferált mikro élőhelye elsősorban a homokhátság buckaközi mélyedései, ahol a talaj enyhén humuszos réti homoktalaj, vízellátottsága a homokpusztagyepi átlaghoz képest kedvező.

Az ektomikorrhiza gombák azonosítását a 1990-es évekig mikroszkópos módszerekkel végezték. Az EM-k jellemző morfológiai bélyegei a gyökérfelszínen létrejövő gomba köpeny, a Hartig-háló és a kiágazó hifák. A gombaköpeny színe, struktúrája rendkívül változékony lehet. Az EM gyökérvégek habitusa alapján való rendszerezés gyakran nemzetség, néha faj szintű meghatározást is lehetővé tesz (Agerer, 2006).

Az 1990-es évek során megjelentek olyan molekuláris módszerek, melyek lehetővé tették az EM gombák azonosítását, amely elsősorban a PCR (Polymerase Chain Reaction) felfedezésének és általános elterjedésének köszönhető. A PCR használata során a DNS szakasznak egy bizonyos régióját szaporítjuk fel (amplifikáljuk). Ez a DNS szakasz a vizsgálataim során a magi riboszomális nrDNS egy szakasza, az ITS szekvencia régió. Az ITS génszakasz használata a mikológusok körében általánosan elterjedt (White és mtsai 1990, Gardes és Bruns, 1993; Kovács és mtsai, 2008), mivel a genomban magas kópiaszámban fordul elő, így amplifikálása nem ütközik különösebb nehézségekbe. Az ITS régió a gombák hivatalos „genetikai vonalkódja” (barcode) (Schoch és mtsai, 2012).

A mintavételi területünkön összesen öt EM kolonizált növényfaj él, melyből négy őshonos, ezek a következők: heverő naprózsa (*Fumana procumbens*), fehér nyár (*Populus alba*), rozmaringlevelű fűz (*Salix rosmarinifolia*) és az ékes napvirág (*Helianthemum ovatum*). Az ötödik faj a tájidegen fekete fenyő (*Pinus nigra*). Az ékes napvirágon kívül (laborunk vizsgálataiból a foltyszerű elhelyezkedése miatt maradt ki) mindegyik növényről gyűjtöttünk EM gyökérvég mintát.

Egy terület EM gombaközösségének a megismerése három módszerrel lehetséges 1, közvetlenül a talajból mintavételezett mikorrhizált gyökérvégekből 2, területről gyűjtött termőtest adatok alapján 3, talajmintákból kivont DNS vizsgálatával. Ez utóbbinál a „next generation sequencing” (NGS) módszerek rendkívül megkönnyítik a talajok gombaközösségeinek vizsgálatát (M. Buée és mtsai, 2009; Metzker 2010). A fentebb ismertetett három módszer közül azonban egyedül az ektomikorrhizált gyökérvégek vizsgálati eredményei köthetők gazdanövényhez.

Munkám eredményei az őshonos rozmaringlevelű fűz ektomikorrhizált gyökérvégeiből származnak. Ezeket az adatokat vettem össze a munkatársak által vizsgált fentebb említett két őshonos és egy tájidegen növény EM gyökérvég adataival. Ezen kívül munkám során felhasználtam a munkatársak által nyert másik két módszer adatait is, az NGS és termőtest adatokat.

3. Célkitűzések

Jelen dolgozat témája a Kiskunságban őshonos rozmaringlevelű fűz (*Salix rosmarinifolia*) EM képző gombáinak vizsgálata a Fülöpháza melletti félszáraz homokpusztagyepen.

A dolgozatban alább bemutatott munka a kutatócsoportunk által végzett EM kutatás egy szegmense. Célunk a Fülöpháza melletti félszáraz homokpusztagyepen őshonos (*Salix rosmarinifolia*, *Populus alba*, *Fumana procumbens*) és tájidegen (*Pinus nigra*) növények EM képző gombáinak azonosítása és összehasonlítása. Ezen kívül megismerni azon EM képző gombákat, amelyek mind az őshonos, mind a tájidegen növényeken előfordulnak, vagyis a generalista EM gombákat. További célunk a specialista (csak egy növényfajról előkerült) EM képző gombák azonosítása is.

Ennek megismerése érdekében jelen dolgozatban a *Salix rosmarinifolia* EM képző gombáit azonosítom és hasonlítom össze a területen vizsgált másik három növényfaj EM gombáival.

4. Anyag és módszer

Mintavételi területünk a Fülöpháza melletti felszáraz homokpusztagyep volt. A *Salix* EM gyökérvégeket két mintavételi foltból gyűjtöttem 2010 és 2011 június, július és augusztus hónapjaiban *1 1/8" X 12" Plated Soil Recovery Probe with Handle* talajmintavevő eszköz segítségével (www.ams-samplers.com). A két mintavételi terület egymástól 960 m távolságra helyezkedik el (*Salix*1-es terület GPS koordinátája: N 46° 52.346'; E 19° 24.669' *Salix*2-es terület GPS koordinátája: N 46° 51.942' ; E 19° 25.1411'). Az ökológiai értelemben releváns mintavételezés a furatonkénti meghatározott számú, random kiválasztott EM gyökérvég vizsgálata lett volna, azonban a vizsgált növények gyökérzetének jellemzői ezt nem tették lehetővé, így a mintavételezést morfortipizálással végeztem el. Az egyes EM gomba taxonok azonban morfológiailag ritkán különíthetők el jól egymástól, így a szekvencia (gyökérvég) diverzitás nem feltétlenül feleltethető meg a taxon diverzitásnak, ennek kiküszöbölésére alkalmaztam több diverzitás számítási módot (lásd lejjebb).

A talajmintákat a laboratóriumban szitával furatonként külön-külön átmostam, majd sztereomikroszkóp alatt morfológiájuk szerint csoportosítottam a gyökérvégeket. A különböző morfortípusokból egy-egy gyökérvéget 1,5 ml-es Eppendorf-csőbe raktam a DNS kivonó Kit 1-es pufferébe (FG1 puffer, lásd lejjebb). A későbbi morfológiai vizsgálatokhoz FEA (formaldehid:ecetsav:etil-alkohol 1:1:18) oldatba raktam el néhány egészséges morfortípust. Az FG1-es pufferbe elrakott morfortípusokból DNS kivonást végeztem E.Z.N.A. Fungal DNA Kit-tel (Omega Bio-Tek) a gyártó utasításait követve. A kivont DNS-nek a nrRNS ITS szekvencia régióját PCR-rel felszorzorosítottam az ITS1F-ITS4 primerpár segítségével (White és mtsai 1990, Gardes és Bruns, 1993; Kovács és mtsai, 2008). A PCR reakció során a denaturációs hőmérséklet 94 °C volt először 5 percig, majd a következő 35 ciklusban 30 sec-ig, az kapcsolási hőmérséklet 52 °C volt 30 sec-ig, majd az lánchosszabbítási hőmérséklet 72 °C-on történt 90 sec-ig ciklusonként. A terminációs lépés 72 °C-on 10 percig tartott. Ezután 2%-os agaróz gélen detektáltam a mintákat. A gélelektroforetikus vizsgálat során előfordult, hogy több amplikon volt látható, ezeket a későbbiekben kevert mintának fogom nevezni. Feltételezésünk szerint a kevert minták jelentős hányadát kettős vagy többszörös gomba kolonizáció okozta, gyakran egy gyökérvéget egy Ascomycota és egy Basidiomycota törzsből származó gomba is kolonizált. Ezért a kevert

minták esetében egy Basidiomycota-ra specifikus primerpárral (ITS1F-ITS4B) is végeztem PCR-t, így növeltem a feldolgozható szekvenciák számát. A kevert mintákat egy diagnosztikus PCR-el is vizsgáltam, ahol egy- a területen gyakran előforduló- endofiton gomba, a *Cadophora* jelenlétét igyekeztem igazolni (*Cadophora* diagnosztikai primereket Knapp G. Dániel tervezte). Ezt a diagnosztikus vizsgálatot azért végeztem el, mert korábbi kutatások (Knapp és mtsai, 2012) kimutatták, hogy ez a *Cadophora* csoport elterjedt a területen.

A gélfotó alapján detektált tiszta mintákat szekvenáltattuk (LGC Genomics KBio Science, Berlin). A nyers szekvenciákat a Staden programban (Bonfield és mtsai, 1995) ellenőriztem. A szekvenciák első elemzését a mothur programban (Schloss és mtsai, 2009) végeztem el, ahol 5%-os küszöbérték mellett csoportokat (clustereket) alkottam a szekvenciákból. Ezeket a csoportokat későbbiekben MOTU-nak (Molecular Operational Taxonomic Units) fogom nevezni.

Ezután a mothur programban a következő elemzéseket végeztem el a már meglévő MOTU-k alapján:

- 1, „faj” (MOTU) telítési görbék kiszámítását a *Salix*1-es és *Salix*2-es mintavételi területekre, ezzel ellenőrizve a további vizsgálathoz az elégséges mintszámot
- 2, szekvencián (gyökérvégen) alapuló Shannon-diverzitás számítást
- 3, szekvencián alapuló Chao diverzitás számítást
- 4, a területen vizsgált négy növény EM képző gombáinak átfedését reprezentáló Venn-diagrammot

A kapott MOTUk reprezentáns szekvenciáinak összevetését nyilvánosan elérhető adatokkal BLAST-al (Basic Local Alignment Search Tool, szekvencia hasonlóságon alapuló keresés) végeztem el, a Unite (<http://unite.ut.ee/>) és az NCBI Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) adatbázisok használatával.

Több féle diverzitás számolást alkalmaztam. Először a fentebb említett Mothur programban számoltam Shannon-diverzitást a két területre külön-külön és együtt is aszerint, hogy egy MOTU hány darab szekvenciával van képviseltetve. Ugyanezen adatokra Chao-diverzitást is számoltam szintén a két *Salix* foltra külön és egybe is. Ezenkívül a MOTU-k furatonkénti előfordulását is Shannon-indexszel számoltam manuálisan a következő képlet alapján:

$$H' = -\sum p_i \ln(p_i)$$

ahol H' = Shannon-index, p_i = i-ik minta relatív gyakoriság értéke. A relatív gyakoriság értéket az alapján számoltam, hogy az egyes MOTU hány darab furatból került elő. Ezzel a diverzitás vizsgálattal a tényleges gyakoriságát lehet vizsgálni az egyes MOTU-knak (taxonoknak), míg a szekvencia (gyökérvég) alapú vizsgálat során a fajon belüli nagy fokú morfológiai variabilitás miatt a tényleges gyakoriságtól eltérő eredményeket kaphatunk.

A két *Salix* terület diverzitás különbségeinek szignifikanciájáról a Hutcheson-teszt segítségével győződtem meg. (online elérhető Hutcheson-teszt kalkulátor: <http://www.graphpad.com>)

A kevert mintákból detektált *Cadophora* adatokra relatív gyakoriságot számoltam az összes kevert mintára vonatkoztatva külön a két *Salix* területre. Az adataimat összehasonlítottam a munkatársak által feldolgozott NGS adatokkal is.

A *Geopora* EM képző gomba nemzetség rendkívül gyakorinak mutatkozott mindkét területen. Ennek a nemzetségnek a közelmúltban történt taxonómiai revíziója (Southworth és mtsai, 2011, Perry és mtsai, 2007), így lehetőség nyílt az elérhető szekvencia adatokat összehasonlítani az általam nyert *Geopora* adatokkal. Ezen adatok használatával filogenetikai fát készítettem erre a nemzetségre. Először a szekvenciákat az online elérhető Prank (<http://www.ebi.ac.uk>) program segítségével illesztettem, majd a MEGA5.0 (Tamura és mtsai, 2011) programban készítettem el a filogenetikai fát „Minimum evolution” módszerrel, a távolságot „Maximum composite likelihood” modellel számoltam, a bootstrap értéket 70%-ra állítottam be.

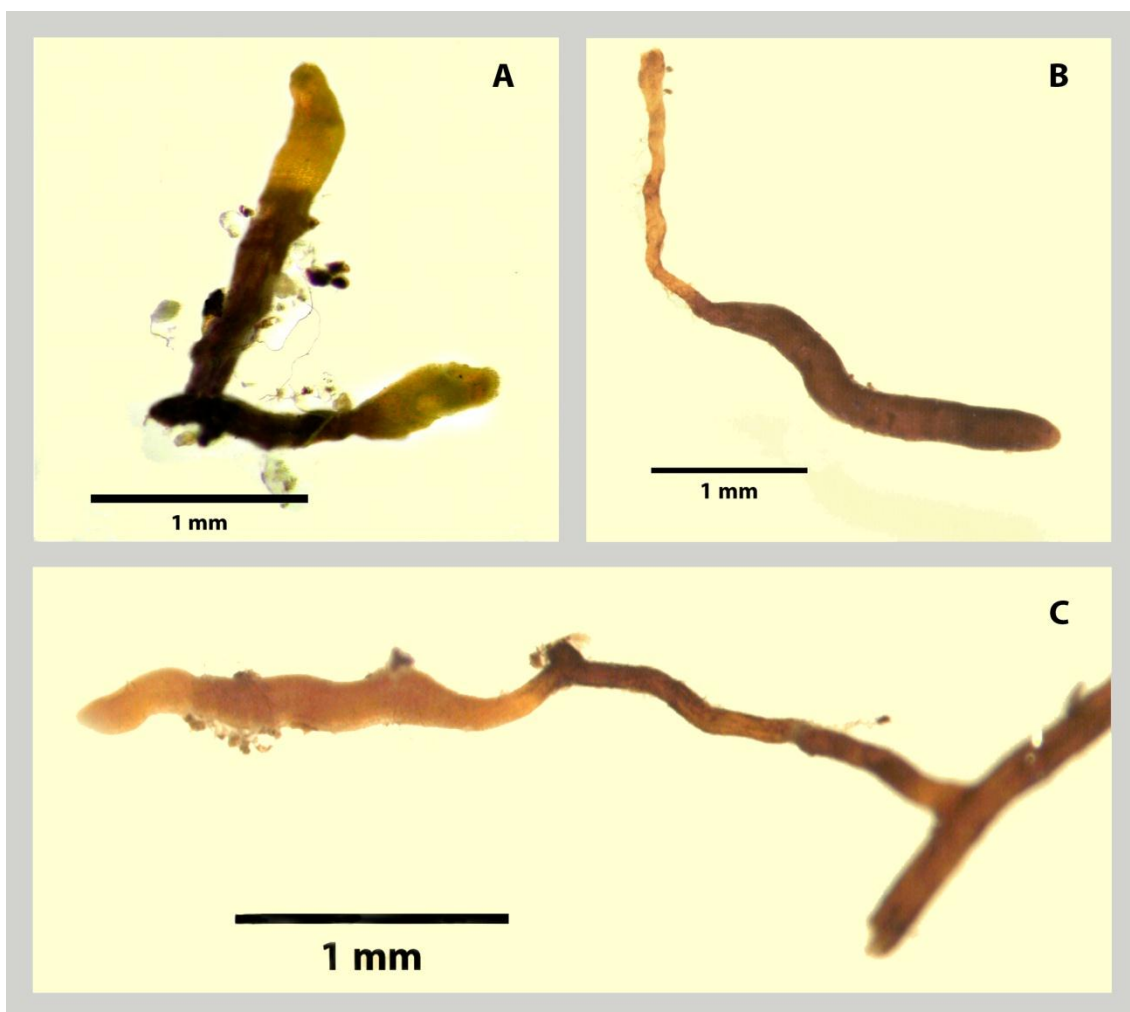
A rozmaringlevelű fűzön kívül a már említett másik két őshonos és egy tájidegen növény ektomikorrhízált gyökérvégeinek szekvencia adataiból készítettem el a mothur program

segítségével a Venn-diagrammot, amely a generalista és specialista EM képző gombákat reprezentálja.

Az NGS technikával nyert adatokat, a termőtest adatokat, a *Populus alba*, *Fumana procumbens* és *Pinus nigra* EM adatokat csoportunk tagjai és az együttműködő kutatók bocsátották a rendelkezésemre.

5. Eredmények

A két területről összesen 44 talajfuratot dolgoztam fel, a *Salix*1-es területről 27-et, a *Salix*2-es területről 17-et. Ezekből a talajmintákból összesen 406 db EM gyökérvéget különítettem el, a *Salix*1-es területről 251 db-ot, a *Salix*2-es területről 155 db-ot. A jellegzetes, *Salix*-on gyakran előforduló, egészséges EM gyökérvégekből összesen 16 db-ot tettem el FEA oldatba, amelyekből készítettem az 1. ábrán látható sztereomikroszkópos felvételeket, amely jól illusztrálja az EM gyökérvégek morfológiai különbségeit.



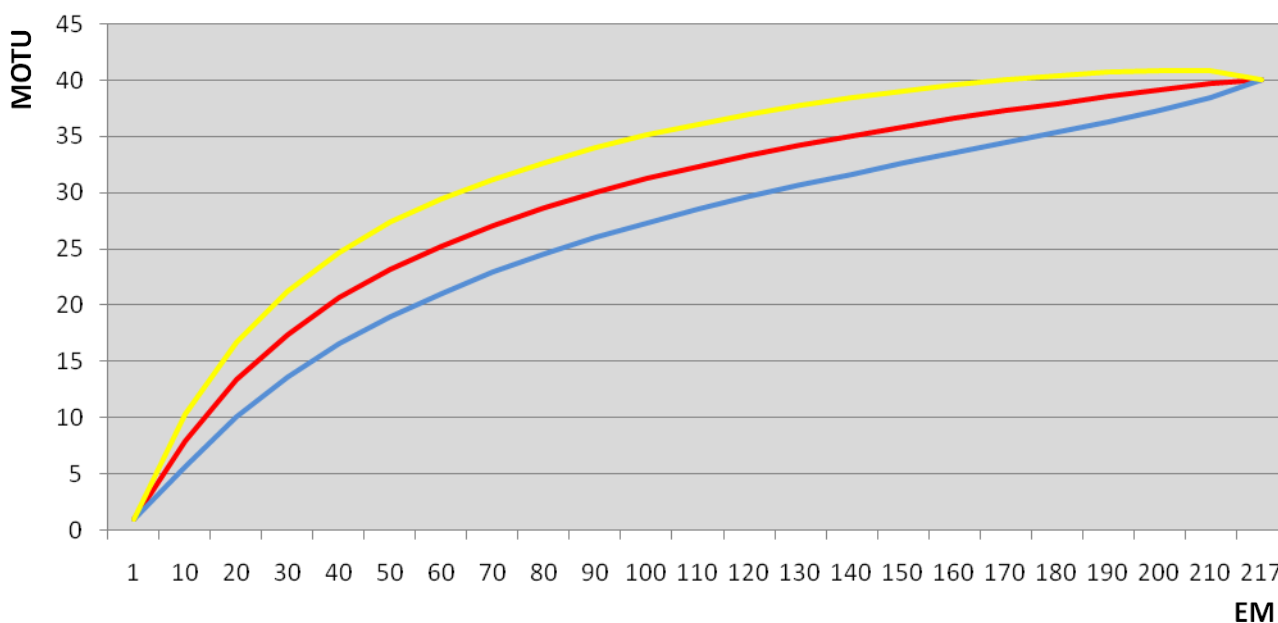
1. **ábra:** EM gyökérvégek jellegzetes morfolópusai. Az ábrákon a vonal= 1mm.
„A” kép=sal17_03, 34-es MOTU, *Mallochybe agardhii* var. *arenaria*
„B” kép=sal02_01, 13-as MOTU, *Tomentella* sp.
„C”kép=sal05_02, 18-as MOTU, *Inocybe* sp.

Az „A” képen látható *Mallocybe agardhii* var *arenaria* elég ritka volt a *Salix* mintavételi területen, a feldolgozott EM mintákból mindössze 4 db mutatkozott ennek a fajnak. A „B” és „C” képen a két *Salix* folt leggyakoribb EM képző gomba nemzetségének, a *Tomentella*-nak és az *Inocybe*-nek láthatjuk egy-egy reprezentáns példányát.

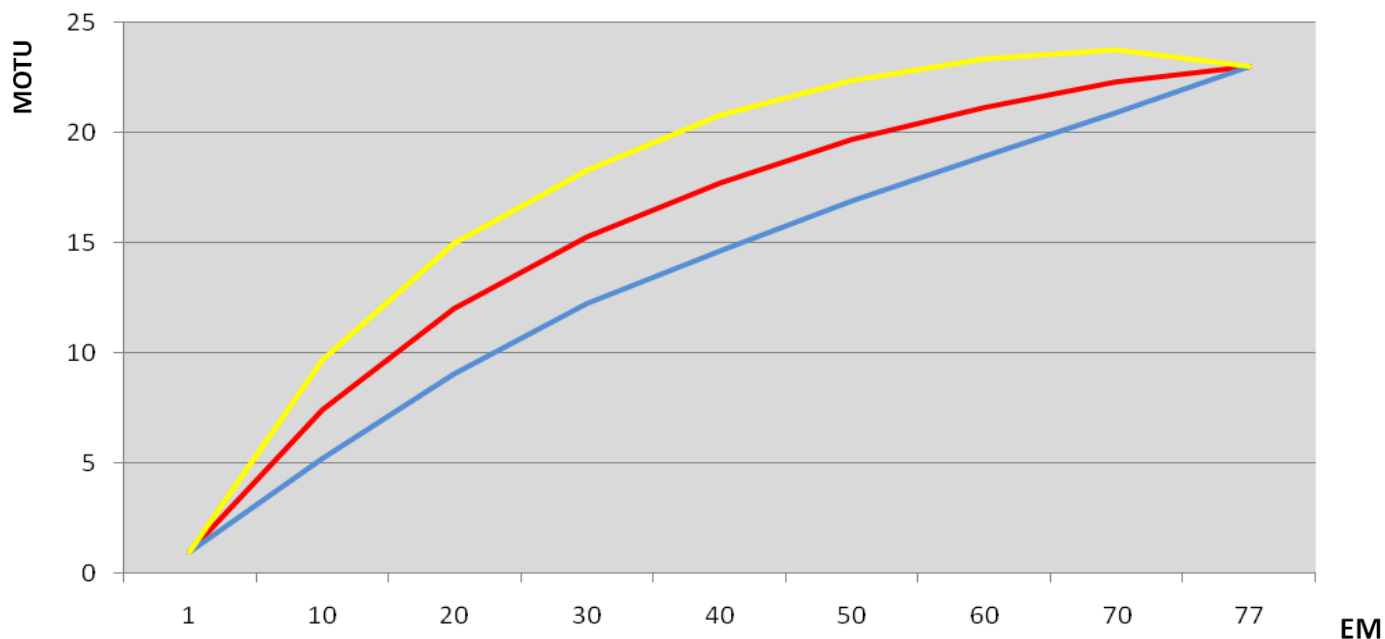
A DNS kivonás során a *Salix*1-es terület mintáiból 240, míg a *Salix*2-es terület mintáiból mind a 155 db-ot dolgoztam fel.

Az ITS1F-ITS4 primerpárral történő PCR reakció során és a kevert mintáknak az ITS1F-ITS4B primerpár használata után összesen 294 db felhasználható ITS szekvenciát kaptam. A későbbi diagrammok és diverzitás számolásokhoz fontos leszögezni, hogy egy szekvencia egy darab EM gyökérvégből lett, vagyis 294 db gyökérvégből nyertem felhasználható szekvenciát.

Ezen szekvenciákból a mothur programban 5%-os küszöbérték mellett összesen 58 MOTU-t kaptam. A *Salix*1-es terület telítési görbéje a 2. ábrán, a *Salix*2-es terület telítési görbéje a 3. ábrán látható.

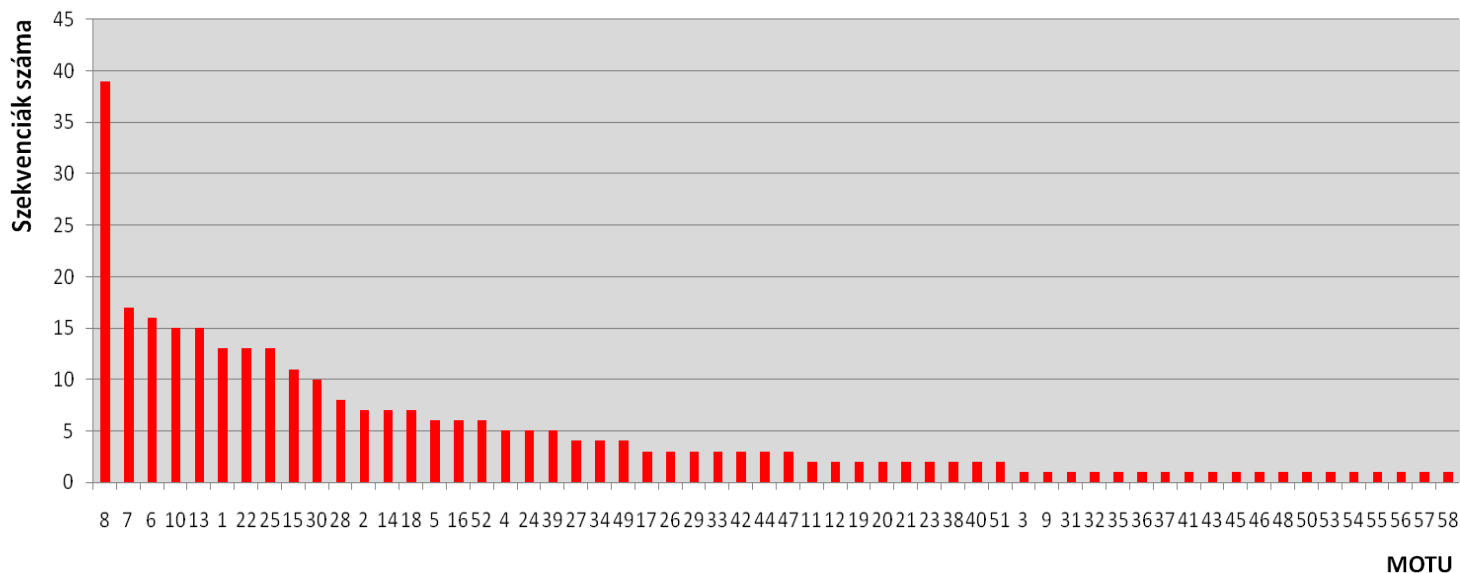


2. ábra: *Salix*1-es terület MOTU telítési (rarefaction) görbéje az EM gyökérvégekből nyert mintaszám függvényében. Piros vonal=telítési görbe, Sárga vonal= 5%-os szignifikancia range alsó értéke, Kék vonal=5 %-os szignifikancia range felső értéke



3. ábra: Salix2-es terület MOTU telítési (rarefaction) görbéje az EM gyökérvégekből nyert mintaszám függvényében. Piros vonal=telítési görbe, Sárga vonal= 5%-os szignifikancia range alsó értéke, Kék vonal=5%-os szignifikancia range felső értéke

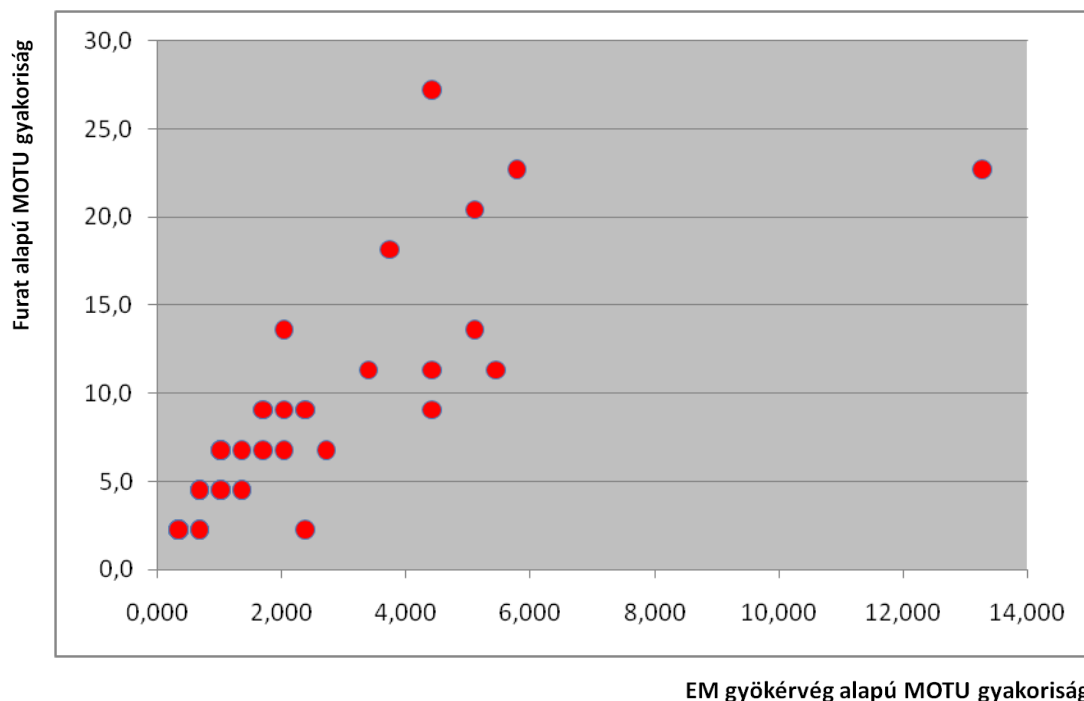
A 4. ábra azt mutatja meg csökkenő sorrendben, hogy az egyes MOTU-k hány darab szekvenciával vannak reprezentálva. Látható, hogy a 8-as MOTU sok szekvenciával van képviseltetve. Ez a MOTU a Unite adatbázis alapján az *Inocybe dunensis*-nek bizonyult.



4. ábra: A MOTU-k száma csökkenő sorrendben az EM minta reprezentáltság alapján

Az egyes MOTU-k gyakoriságát két féle módszerrel számítottam ki. Egyrészt aszerint, hogy egy MOTU hány furatból került elő, másrészt aszerint, hogy egy MOTU hány darab szekvenciával (gyökérvéggel) van reprezentálva. Ennek a két féle gyakoriság számolás

értékeknek az összefüggéseit láthatjuk százalékban az 5. ábrán. Mindegyik pont egy-egy MOTU-t reprezentál, ugyanakkor az ábrán nem 58 pontot láthatunk, aminek oka, hogy a 2% alatti értékek mindkét gyakoriság szempontjából gyakoriak voltak, így ott átfedésben vannak a MOTU-k.



5. ábra: MOTU gyakoriság diagram. X tengely=MOTUgyakoriság az EM gyökérvégek alapján, Y tengely=MOTU gyakoriság talajfuratonként. Az értékek %-ban értendők.

A Shannon-és Chao-diverzitás eredményeket az 1. táblázatban láthatjuk. A furat alapú MOTU diverzitás esetében a relatív gyakoriságot a fentebb leírtak alapján úgy számoltam, hogy egy MOTU hány darab furatból került elő. Ezek alapján a két mintavételi terület közötti Shannon-számítás nem megvalósítható. Az EM gyökérvég alapú diverzitás számításoknál megfigyelhető, hogy mind a Shannon-indexszel, mind a Chao-indexszel a *Salix1*-es terület mutatkozott szignifikánsan diverzebbnek.

1. táblázat: A Shannon- és Chao-diverzitás eredmények

Diverzitás számolások				
	Salix 1	Salix 2	Szignifikancia két terület között	Salix összes
Shannon-index (EM gyökérvég alapú)	3,25±0,14	3,06±0,19	p<0,0001	3,52±0,12
Shannon-index (furat alapú)	nem értelmezhető	nem értelmezhető	nem értelmezhető	3,72±0,015
Chao-index (EM gyökérvég alapú)	52,75	32	p<0,0001	82,14

A Salix1-es és Salix2-es mintavételi terület között volt MOTU eltérés, ugyanakkor számos EM gomba mindkét mintavételi területen előfordult. Ezek a következő taxonok voltak: *Helotiales* sp., *Geopora arenicola*, *Cortinarius* sp., *Inocybe mixtilis*, *Tomentella* sp., *Mallocybe terrigena*, *Hebeloma* sp., *Hebeloma ammophilum* és *Pezizales* sp.. Ezekből a taxonokból a *Geopora arenicola* és *Cortinarius* sp. három különböző MOTU-val is jelen volt mindkét mintavételi területen, ezen kívül a *Tomentella* sp. szintén két MOTU-val volt reprezentálva mindkét Salix területen.

Az egy furatból előkerülő MOTU-k számának átlaga=**3,84**-nek mutatkozott, melynek **szórás** értéke **2,94** volt.

A *Cadophora* specifikus diagnosztikus PCR után összesen 56 db *Cadophora* DSE gombával kolonizált EM mintát detektáltam. Ebből 50 db a Salix1-es területen, 6 db a Salix2-es területen volt. A 2. táblázatban látható, hogy a Salix1-es terület összes kevert mintájára vonatkoztatva a *Cadophora* előfordulás 32,67%-nak adódott, míg a Salix2-es területen ugyanerre az arányra csak 16,21 %-ot kaptam. Ezek alapján elmondható, hogy a két mintavételi terület között jelentős különbség van a *Cadophora* DSE gomba előfordulását tekintve.

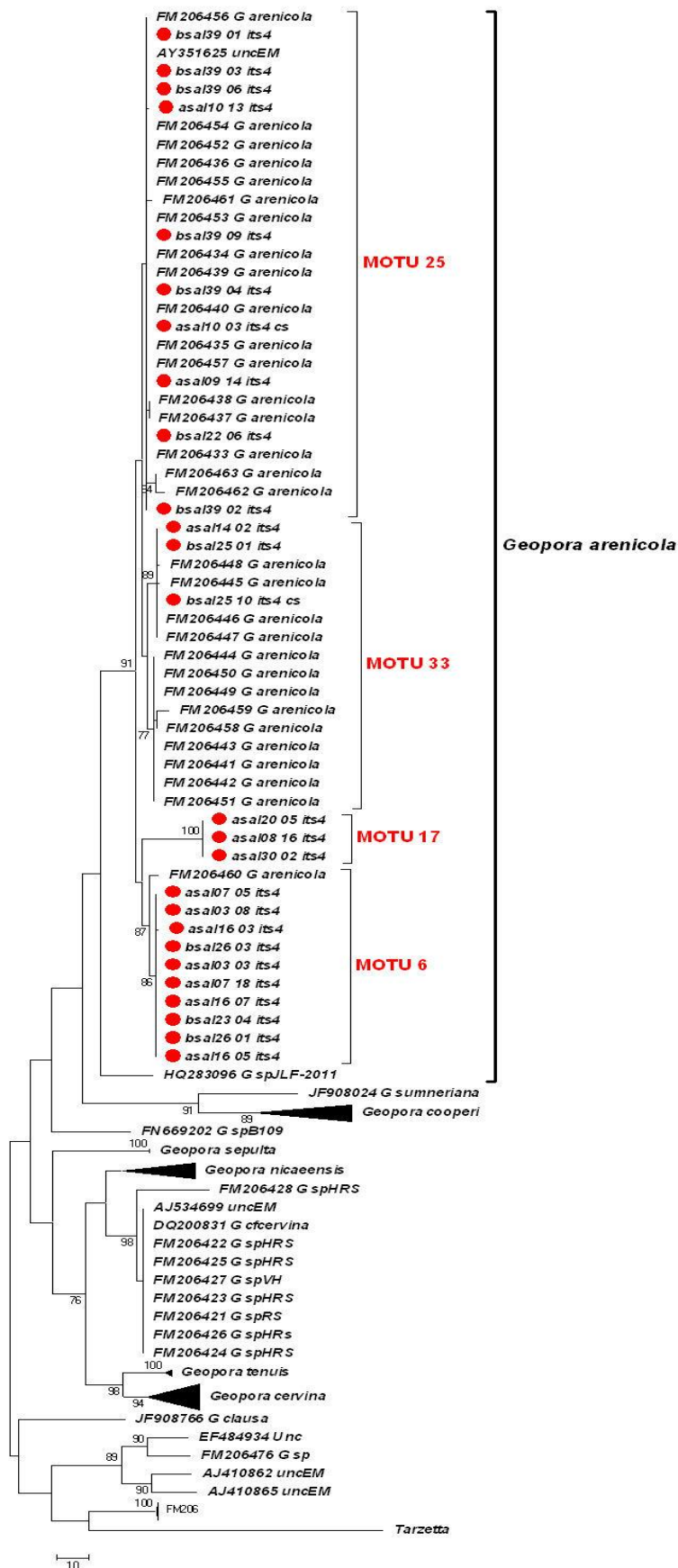
2. táblázat: *Cadophora* nemzetség előfordulásának megoszlása a két Salix mintavételi terület között

	Összes kevert (db)	<i>Cadophora</i> (db)	
Salix 1	153	50	32,67%
Salix 2	37	6	16,21%
Salix összes	190	56	29,47%

Ennek az endofiton gombának a foltszerű előfordulását az NGS adatok is alátámasztották.

A kevert minták *Cadophora* specifikus primerrel és bazidiumos gombára specifikus primerrel lettek amplifikálva. Azoknál a mintáknál, amelyeknél mindkét primerpár pozitív jelet adott, meg lehetett állapítani, hogy a *Cadophora* mellett mely bazidiumos gombák fordulnak elő. Összesen hat ilyen mintát találtam, mind a *Salix*1-es foltból, a hat mintából három *Inocybe*, két *Malloocybe* és egy *Tomentella* volt.

A Unite adatbázissal való összevetésben az 58 MOTU-ból 4 MOTU bizonyult *Geopora arenicola*-nak. A négy MOTU-ból három mindkét mintavételi területen előfordult. Ennek a 4 MOTU-nak a szekvencia adataiból és génbanki referencia adatokból készítettem el a *Geopora* nemzetség filogenetikai fáját (6. ábra).



6. ábra: A *Geopora* nemzetség filogenetikai fája. Piros teli körrel jelölve a *Salix* EM minták. A távolságokat „Maximum Composite Likelihood” modellel, majd a fát „Minimum evolution” módszerrel számítottam. A szakasz 10 várható különbségére utal 100 karakteren.

A filogenetikai fán jól elkülönül az általam is kapott 4 MOTU, amely azonban mind a *Geopora arenicola* fajhoz tartozik. Más *Geopora* nemzetségbe tartozó faj nem került elő a *Salix rosmarinifolia*-ról, ellentétben a munkatársak által vizsgált másik három növényfajjal, ahol más *Geopora* fajok is előfordultak.

A *Salix rosmarinifolia* EM képző gombáit összehasonlítottam a területen vizsgált másik három növény (*Populus alba*, *Fumana procumbens* és *Pinus nigra*) EM képző gombáival. Ennek eredményei a 3. táblázatban láthatóak. A rozmaringlevelű fűzön talált 58 MOTU BLAST eredményeit vetem össze a területen vizsgált másik három növény BLAST eredményeivel. Annak ellenére, hogy 58 MOTU-t kaptam, a 3. táblázatban csak 52 MOTU látható. Ennek oka, hogy 7 db MOTU-t az adatbázisok alapján „uncultured fungi” szinten tudtam csak beazonosítani, ezért az alább bemutatott táblázatból a következő MOTU-k hiányoznak: 27, 28, 31, 39, 45, 53, 54-es MOTU-k.

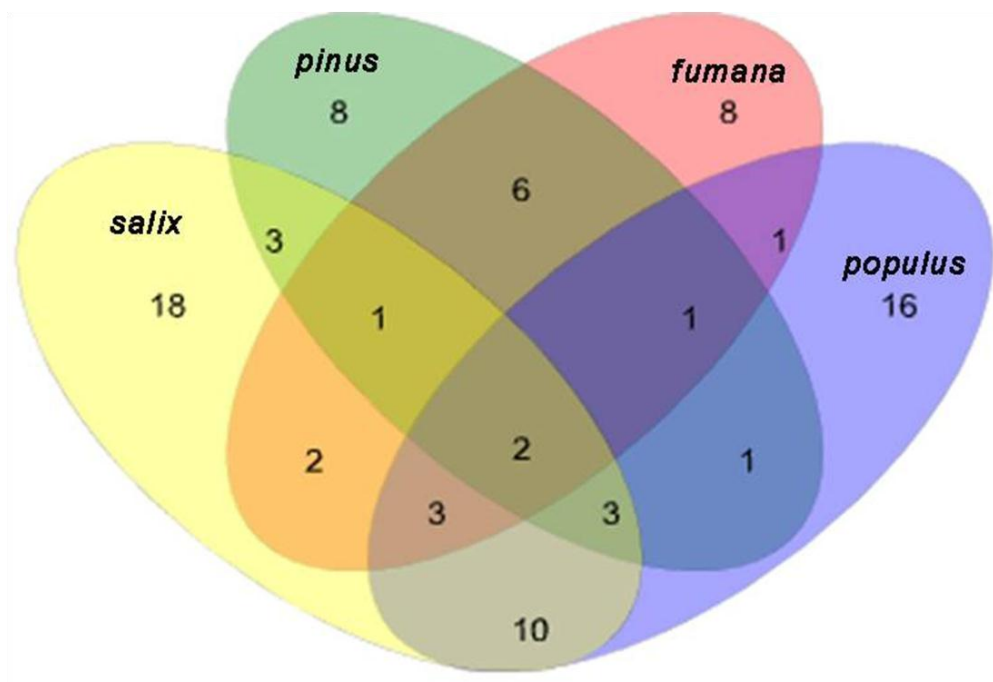
3. táblázat: Fülöpháza melletti homokpusztagyepen vizsgált három őshonos és egy tájidegen növény EM gombáinak összehasonlítása a *Salix rosmarinifolia* MOTU-i alapján

MOTU szám	Blast eredmény	<i>Salix rosmarinifolia</i>	<i>Populus alba</i>	<i>Fumana procumbens</i>	<i>Pinus nigra</i>
1	<i>Helotiales</i> sp. MOTU1	x			
2	<i>Inocybe</i> sp. MOTU1	x	x	x	x
3	<i>Tomentella</i> sp. MOTU1	x	x		x
4	<i>Pezizales</i> sp. MOTU1	x	x	x	x
5	<i>Tomentella</i> sp. MOTU2	x			x
6	<i>Geopora arenicola</i> MOTU1	x	x	x	x
7	<i>Cortinarius</i> sp. MOTU1	x	x	x	
8	<i>Inocybe dunensis</i>	x	x	x	x
9	<i>Cortinarius</i> sp. MOTU2	x			
10	<i>Inocybe mixtilis</i> MOTU1	x			
11	<i>Cortinarius paracephalixus</i> MOTU1	x			
12	<i>Inocybe</i> sp. MOTU2	x	x		
13	<i>Tomentella</i> sp. MOTU3	x			x
14	<i>Mallocybe terrigena</i>	x			
15	<i>Hebeloma</i> sp.	x		x	x
16	<i>Hebeloma ammophilum</i>	x		x	x
17	<i>Geopora arenicola</i> MOTU2	x			
18	<i>Inocybe</i> sp. MOTU3	x	x		
19	<i>Inocybe</i> sp. MOTU4	x	x		
20	<i>Inocybe</i> sp. MOTU5	x			
21	<i>Inocybe umbrinella</i>	x			
22	<i>Cortinarius</i> sp. MOTU3	x			
23	<i>Inocybe</i> sp. MOTU6	x			
24	<i>Cortinarius</i> sp. MOTU4	x			
25	<i>Geopora arenicola</i> MOTU3	x			
26	<i>Pezizales</i> sp. MOTU2	x	x		
29	<i>Cortinarius paracephalixus</i> MOTU2	x			
30	<i>Cortinarius</i> sp. MOTU5	x	x		
32	<i>Tomentella</i> sp. MOTU4	x	x		
33	<i>Geopora arenicola</i> MOTU4	x			
34	<i>Mallocybe agardhii</i> var <i>arenaria</i>	x		x	x
35	<i>Tomentella</i> sp. MOTU5	x			
36	<i>Tomentella</i> sp. MOTU6	x			
37	<i>Tomentella</i> sp. MOTU7	x			
38	<i>Hebeloma testaceum</i>	x			
40	<i>Helotiales</i> sp. MOTU2	x			
41	<i>Cortinarius</i> sp. MOTU6	x			
42	<i>Pezizales</i> sp. MOTU3	x	x		
43	<i>Inocybe psammophila</i>	x	x		
44	<i>Tomentella</i> sp. MOTU8	x	x		
46	<i>Cortinarius paracephalixus</i> MOTU3	x			
47	<i>Candida intermedia</i>	x			
48	<i>Pyrenochaeta cava</i>	x		x	x
49	<i>Inocybe</i> sp. MOTU7	x			
50	<i>Tomentella</i> sp. MOTU9	x			
51	<i>Tomentella</i> sp. MOTU10	x			
52	<i>Tuber</i> sp.	x	x		x
55	<i>Tomentella</i> sp. MOTU11	x			
56	<i>Pezizales</i> sp. MOTU4	x	x		
57	<i>Inocybe mixtilis</i> MOTU2	x			
58	<i>Pleosporales</i> sp.	x			

A táblázatban látható, hogy számos *Salix rosmarinifolia*-ról előkerült EM gomba nem fordul elő a területen vizsgált másik három növény EM gombái között. Ezek a következők voltak: *Inocybe mixtilis*, *Cortinarius paracephalixus*, *Mallocybe terrigena*, *Inocybe umbrinella* és a *Hebeloma testaceum*. Ezek közül a *Mallocybe terrigena* nem került elő a területről sem az NGS, sem a termőtest adatokból, csak a *Salix* EM gyökérvégéről. A táblázat alapján a *Geopora arenicola*, *Inocybe dunensis*, *Tomentella* sp., mind a négy vizsgált növényen előfordul. Megemlítendő, hogy a *Geopora arenicola* a másik három vizsgált növényen csak egy-egy MOTU-val volt reprezentálva, viszont más, a *Salix*-on nem élő *Geopora* fajok gyakran előfordultak a *Fumana procumbens*-en, *Populus alba*-n és *Pinus nigra*-n.

Az általam azonosított 52 MOTU-ból 14 MOTU Ascomycota, és 38 MOTU Basidiomycota taxon volt. A *Geopora arenicola* kivételével (amely az Ascomycota törzsbe tartozik) a gyakoribb fajok mind Basidiomycota-k (pl. *Cortinarius* spp., *Inocybe* spp., *Tomentella* spp.) voltak.

A négy növény EM képző gombáinak átfedését a 7. ábrán látható Venn-diagram is illusztrálja. A négy növényről nyert szekvenciákat az illesztés után a mothur programban MOTU-kra bontottam külön-külön, amelyek alapján elkészítettem a diagramot. Látható, hogy a legnagyobb átfedés a rozmaringlevelű fűz és fehér nyár között található, ugyanakkor olyan MOTU is előfordul, amely mind a négy növényen él, ezek a blast eredmények alapján az *Inocybe dunensis* és *Tomentella* sp. voltak. Mind a táblázat, mind a Venn-diagram alapján úgy tűnik, hogy a specialista EM fajok vannak többségben a rozmaringlevelű fűzön. A Venn-diagram és a táblázat külön elemzésben lett elkészítve, így adódhatnak a MOTU-knak számbeli eltéréseik.



7. ábra: Venn-diagram a Fülöpháza melletti homokpusztagyepen vizsgált őshonos *Salix rosmarinifolia*, *Populus alba*, *Fumana procumbens* és tájidegen *Pinus nigra* EM képző gombáinak átfedéseiről. A számok az adott szegmensben lévő MOTU-k számát reprezentálják.

Az NGS adatokat a már fentebb tárgyalt *Cadophora* nemzetségnél is használtam, ezen kívül összehasonlítottam a talajból DNS kivonás után nyert szekvencia adatok BLAST eredményeit a *Salix* EM képző gombáinak BLAST eredményeivel. Ezen adatok elemzése során mindössze egy olyan taxont kaptam, amely csak EM gyökérvégéből került elő a *Salix rosmarinifolia*-ról, a talaj és termőtest (*Cenococcum geophilum* nem képez termőtestet) adatokban nem volt megtalálható, ez a taxon a *Cenococcum geophilum* volt. (az NGS elemzés eltérő szekvenálási technikája miatt eltérő (általában pontosabb) BLAST eredményt kaphatunk). Ezen kívül megemlíteném, hogy a *Hebeloma ammophilum* volt az egyetlen taxon, amely csak termőtestről és EM gyökérvégéből került elő, talajmintából nem.

A termőtest adatok mind megtalálhatóak voltak EM, NGS vagy mindkettőnek az adatsorai között. Gyakori termőtestnek főként azok bizonyultak, amelyek mindkét másik mintavételezési módszer során is előkerültek, ilyenek pl. a *Geopora* és *Inocybe* nemzetség képviselői.

6. Értékelés

Tekintettel arra, hogy az azonos fajba tartozó EM gyökérvégek morfológiailag nagyon különbözőek tudnak lenni (lásd. 1. ábra), ezért gyakoriság és diverzitás számolások során az EM gyökérvégek (szekvenciák) mellett a talajfuratok számát is mintavételi egységnek tekintettem a releváns adatkezelés érdekében. Az, hogy egy talajfuratból előkerülő MOTU több szekvenciával van reprezentálva, az kizárólag a morfortipizálás hibájából eredhet.

A telítési görbével igazoltam, hogy a területről elegendő mintát gyűjtöttem az értékeléshez. Mind a *Salix*1-es, mind a *Salix*2-es mintavételi területnek a fajtelítési görbáját megkaptam.

A 4. ábra reprezentálja a különböző MOTU-knak a morfológiai variabilitását. A 8-as MOTU kimagasló 39 szekvenciával volt képviseltetve. Ennek oka, hogy ez a MOTU (amely *Inocybe dunensis*-nek mutatkozott) morfológiailag rendkívül változékony, így a morfortipizálás során különböző morfortípusnak tekintettem ugyanabba a MOTU-ba tartozó egyedeket. Tehát a morfortipizálás hibájából adódóan egy furatból egy MOTU (jelen esetben a 8-as) többször is előkerült. Ugyanakkor az *Inocybe dunensis*-nek a furatonkénti relatív gyakorisága is magas volt, 22,7%.

Az 5. ábrán az egyes MOTU-knak a relatív gyakoriságát láthatjuk aszerint, hogy hány furatból került elő, illetve hány szekvenciával van reprezentálva. A diagramm eredményeinél már kifejtettem, hogy a 2% alatti értékek esetében a pontok átfednek, tehát ott több érték van valójában megjelenítve. A diagramon a két kiugró érték közül az egyik a már fentebb említett *Inocybe dunensis*, amely a legtöbb gyökérvéggel volt reprezentálva. A másik kiugró érték az 1-es MOTU-t mutatja, amely a legtöbb furatból került elő, a 44 talajfuratból 12-ben jelen volt. Ez a MOTU a blast eredmények alapján *Helotiales* sp.-nek mutatkozott.

Az 1. táblázatban láthatjuk a diverzitás eredményeket. Mind a Shannon-, mind a Chao-index használatával a *Salix*1-es terület lett diverzebb, amelynek oka lehet bizonyos EM gombák foltszerű előfordulása

Mindössze két olyan EM-t találtam, amely csak a *Salix rosmarinifolia*-ról került elő a területen, viszont mindkét mintavételi foltban megtalálható volt. Ez a két faj az *Inocybe mixtilis* és *Mallocybe terrigena*. Ugyanakkor előfordult olyan faj, amely csak a *Salix*1-es területen volt megtalálható, mégis a furat alapú relatív gyakoriság értéke magas volt, vagyis a *Salix*1-es mintavételi területen több mintából is előkerült. Ilyen volt az *Inocybe dunensis*, a már fentebb említett 22,7%-os relatív gyakoriság értékkel. Ezen kívül a *Mallocybe agardhii*

var *arenaria*, a *Hebeloma testaceum*, *Inocybe umbrinella* és *Cortinarius paracephalixus* is csak a *Salix*1-es területről került elő.

Ezzel szemben néhány olyan MOTU-t is találtam, amely csak a *Salix*2-es területen volt megtalálható. Ezek a következők voltak: *Pyrenochaeta cava*, *Pleosporales* sp. és a *Tuber* sp..

A *Tuber* taxon az Ascomycota törzsön belül a Pezizales rendbe tartozik. A területen már korábban is vizsgálták, mind a *Populus alba*-n, mind a *Pinus nigra*-n található magyarországi előfordulását már korábban leírták (Kovács 2008, Kovács és Jakucs, 2006), ugyanakkor a *Salix rosmarinifolia*-n történő előfordulását még nem detektálták a Fülöpháza melletti homokpusztagyepről.

A *Cadophora* endofiton gomba előfordulása foltszerűnek mutatkozott (2. táblázat), ezt az NGS adatok is igazolták, ahol szintén a *Salix*1-es területen magasabb volt a *Cadophora* előfordulása.

A szekvencia adatok alapján a két *Salix* mintavételi terület Ascomycota aránya 34,4%-nak mutatkozott, míg a Basidiomycota aránya 65,6%-nak. Ezekhez az arányokhoz képest a *Cadophora* 56 db detektált mintájából mindössze 6 db minta volt Basidiomycota-val egy gyökérvégben. Ebből feltételezhető, hogy a *Cadophora* elsősorban Ascomycota EM képző gombával él együtt egy kolonizált gyökérvégben.

A *Geopora* nemzetség filogenetikai fáján látható, hogy az általam mintavételezett *Geopora*-k mind a *Geopora arenicola* fajba tartoznak, ugyanakkor négy, genetikailag jól elkülönülő csoportba, tehát ez a taxonómiaiilag egy fajnak tekintett gomba nagy genetikai variabilitással rendelkezik.

A rozmaringlevelű fűz EM képző gombáinak összevetését láthatjuk a 3. táblázatban a másik három vizsgált növény EM adataival. Láthatjuk, hogy számos EM képző gomba nem fordul elő a másik három vizsgált növényen, csak a *Salix rosmarinifolia*-n. Ugyanakkor generalista MOTU-kból is volt néhány, amelyek nemcsak a három őshonos növényen, hanem a tájidegen fekete fenyővel is együtt élnek, ezek a *Geopora arenicola*, *Inocybe dunensis* és *Tomentella* sp.. Összesen 12 olyan generalista MOTU-t találtam, amely a tájidegen fekete fenyőn és az őshonos rozmaringlevelű fűzön is előfordult.

A négy vizsgált növényfaj EM gombáinak átfedésére egy másik illusztráció látható a 7. ábrán. Ezen a Venn-diagramon megfigyelhető, hogy számos átfedés van a négy növény EM gombái között. Látható, hogy a *Pinus nigra*-nak 11 MOTU-ja átfed valamelyik vizsgált őshonos növény EM gombáival, ugyanakkor specialista EM gombák MOTU-i is láthatóak a diagramon, amelyek között volt a *Suillus* sp. és *Rhizopogon* sp.. Mindkét EM gomba

tájidegen, és specifikusan fenyő ektomikorrhiza (Seress és Kovács, 2010). Mind a táblázatban, mind a Venn-diagramnál láthatjuk, hogy a legnagyobb átfedés a MOTU számot tekintve a *Salix rosmarinifolia* és *Populus alba* között tapasztalható. Ennek oka lehet, hogy mindkét növény a Salicaceae családba tartozik, filogenetikailag közel helyezkednek el egymáshoz (Hryniewicz és mtsai, 2012). Ezt az is igazolhatja, hogy a *Salix* és a *Populus* a Fülöpháza melletti homokpusztagyepen eltérő mikrohabitatban élnek, hiszen a *Salix* a fentebb említett módon a homokbuckák közötti mélyedésekben él, míg a *Populus* a homokbuckákon fordul elő. Ennek köszönhetően a *Salix* jobb vízellátottságú helyen él, mint a *Populus*, EM képző gombáik mégis jelentős mértékben átfednek.

Az NGS és termőtest adatokat jelen munkámban csak a területen detektált fajok ellenőrzésre használtam, tekintettel arra, hogy ezen munka folyamán szükségszerű volt tudni az EM gomba gazdanövényét és mint azt a bevezetésben kifejtettem, a három módszer közül egyedül az EM gyökérvégek mintavételezése köthető a gazdanövényhez. Az NGS adatok összehasonlítása során mindössze egy faj volt, amely csak az EM gyökérvég adatokból került elő, a *Cenococcum geophilum*. NGS adatainkban nem volt megtalálható, termőtestet pedig ez a faj nem képez.

Ezen adatsorok jól mutatják, hogy egy terület EM képző gombáinak a megismerését nagyban elősegíti, ha nemcsak termőtest adatunk van, hanem EM gyökérvég és talajból kivont DNS adatunk is.

7. Összefoglalás

A két mintavételi terület között eltérő MOTU diverzitást tapasztaltam, amelynek oka lehet bizonyos EM képző gombák előfordulásának ritkasága.

Ezen kívül a területről az EM gyökérvég mintáimból a *Cadophora* endofiton gombát is kimutattam, amelynek gyakorisága eltérő volt a két mintavételi terület között.

Munkám során a *Salix rosmarinifolia*-ról több mint 50 ektomikorrhiza képző gombát detektáltam, köztük számos a területre nézve új taxont azonosítottam (*Tomentella* spp., *Tuber* sp.). A vizsgált MOTU-k egy része csak a *Salix*-ról került elő, ugyanakkor szép számmal találtam átfedő MOTU-kat is a területen vizsgált másik három növény EM gombáival. A tájidegen fekete fenyőn és az őshonos rozmaringlevelű fűzön is előforduló generalista EM képző gombák is nagy számmal voltak reprezentálva.

Ezek a detektált generalista gombák elősegíthetik a további kutatási munkáinkat.

8. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek Seress Diánának és Dr. Kovács M. Gábornak, hogy értékes tanácsaikkal és útmutatásaikkal segítették a munkámat.

Köszönettel tartozom Prof. Böddi Bélának, hogy OTDK munkámat a Növénysszervezettani Tanszéken készíthettem el.

Köszönettel tartozom Seress Diánának, Kovács M. Gábornak, Lukács F. Alenának, Nagy G. Lászlónak és Geml Józsefnek az elemzések során felhasznált *Fumana procumbens*, *Pinus nigra*, *Populus alba*, NGS és termőtest adatokért

Anyagi támogatás: **OTKA K72776-** *(Fél)száraz területek fásszárú növényeinek nempatogén gyökérkolonizáló gombái-diverzitás és specificitás*

9. Felhasznált irodalom

- AGERER, R. 2006: Fungal relationships and structural identity of their ectomycorrhizae. *Mycological Progress* **5**. pp. 67-107.
- BONFIELD J. K., SMITH K. F. és STADEN R., 1995: A new DNA sequence assembly program. *Nucleic Acids Res.* **23**, 4992-4999.
- BORHIDI A. és SÁNTA A. (szerk.), 1999: Vörös Könyv Magyarország növénytársulásairól. Kiadó: TermészetBÚVÁR Alapítvány, Budapest ISBN: 963 85249 6 0 Ö
- BRUNDRETT M. C., 2002: Coevolution of roots and mycorrhizas of land plant. *New Phytologist*. **154**:275-304.
- 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**. pp. 37-77.
- BUEÉ M., REICH M., MURAT C., MORIN E., NILSSON R.H., UROZ S., MARTIN F., 2009: 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. *New Phytologist*. **184**: 449-456.
- ERŐS-HONTI ZS., KOVÁCS G. M., SZEDLAY GY. és JAKUCS E., 2008: Morphological and molecular characterization of *Humaria* and *Genea* ectomycorrhizae from Hungarian deciduous forests. *Mycorrhiza* **18**:133–143. DOI 10.1007/s00572-008-0164-7
- GARDES M., BRUNS T.D., 1993: ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes -application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* **2**: 113-118.

- HRYNKIEWICZ K., TOLJANDER Y. K., BAUM C., FRANSSON P. M. A., TAYLOR A. F. S., WEIH M., 2012: Correspondence of ectomycorrhizal diversity and colonisation of willows (*Salix* spp.) grown in short rotation coppice on arable sites and adjacent natural stands. *Mycorrhiza*. DOI 10.1007/s00572-012-0437-z
- JAKUCS E., KOVÁCS G.M., SZEDLAY Gy. és ERŐS-HONTI Zs., 2005: Morphological and molecular diversity and abundance of tomentelloid ectomycorrhizae in broad-leaved forests of the Hungarian Plain. *Mycorrhiza* **15**:459–470. doi:10.1007/s00572-005-0351-8
- KIRÁLY G. (szerk.), 2009: Új magyar fűvészkönyv, Magyarország hajtásos növényei. Kiadó: Aggteleki Nemzeti Park Igazgatóság, Jósvafő ISBN: 978-963-87082-8-1
- KNAPP D.G., PINTYE A., KOVÁCS G.M., 2012: The Dark Side Is Not Fastidious – Dark Septate Endophytic Fungi of Native and Invasive Plants of Semiarid Sandy Areas. *PLoS ONE* **7(2)**: e32570. doi:10.1371/journal.pone.0032570
- KOVÁCS M. G., 2008: Magyarországi növények mikorrhizáltsági vizsgálatainak összefoglalása. Mit mondhatnak ezek az adatok? *Kitaibelia* **XIII.** évf.**1.** szám, pp.: 62-73.
- KOVÁCS M. G., JAKUCS E., 2006: Morphological and molecular comparison of white truffle ectomycorrhizae. *Mycorrhiza*. **16**: 567-574.
- KOVÁCS G. M., TRAPPE J. M., ALSEIKH A. M., BÓKA K., ELLIOTT T. F., 2008: *Imaia*, a new truffle genus to accommodate *Terfezia gigantea* doi: 10.3852/08-023 *Mycologia* vol. 100 no. **6**: 930-939.
- KOVÁCS-LÁNG E., KROEL-DULAY GY., KERTÉSZ M., FEKETE G., MIKA J., DOBI-WANTUCH I., REDEI 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**. pp. 385-407.

- METZKER M. L., 2010: Sequencing technologies-the next generation. *Nature Reviews, Genetics*. DOI: 10.1038/nrg2626
- PARNISKE M., 2008: Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**:763-775.
- PERRY B. A., HANSEN K., PFISTER D. H., 2007: A phylogenetic overview of the family Pyronemataceae (Ascomycota, Pezizales). *Mycological research*. 549-571.
- 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**(23):7537-41.
- SCHOCH C. L., SEIFERT K. A., HUHNDORF S., ROBERT V., SPOUGE J. L., LEVESQUE C. A., CHEN W., FUNGAL BARCODING CONSORTIUM, 2012: Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker of Fungi. *PNAS*. vol.109 no.**16**. 6241-6246.
- SERESS D., KOVÁCS G. M., 2010: Tájidegen ektomikorrhiza képző gombák a Fülöpházi homokpusztagyepen. *Mikológiai Közlemények Clusiana* Vol. **49** No. 1/2 pp. 129-137.
- SMITH S.E., READ D. J., 2008: Mycorrhizal symbioses. 3rd edition. Kiadó: Elsevier. ISBN: 978-0-12-370526-6.
- SOUTHWORTH D., FRANK J. L., 2011: Linking mycorrhizas to sporocarps: a new species, *Geopora cercocarpi*, on *Cercocarpus ledifolius* (Rosaceae). *Mycologia*. **103**(6) pp. 1194–1200.
- TAMURA K., PETERSON D., PETERSON N., STECHER G., NEI M., és KUMAR S., 2011: MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* **28**: 2731-2739.

- TRAPPE J. M., 1996: What is a mycorrhiza? In: Azcon-Aguilar C, Barea J-M (szerk.)
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.
- WHITE T.J., BRUNS T.D., LEE S.B., TAYLOR J.W., 1990: Amplification and direct
sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. 315–322, In: MA Innis
et al. (szerk.): PCR protocols: a guide to methods and applications. Kiadó: San Diego,
Academic Press.

10. Hivatkozott Internet oldalak:

www.ams-samplers.com

unite.ut.ee/

blast.ncbi.nlm.nih.gov/

www.graphpad.com

www.ebi.ac.uk

knp.nemzetipark.gov.hu

www.met.hu

11. Szerzői hozzájárulás

Munkám során a következő pontokban leírtakat egyedül végeztem el:

- 1, A *Salix rosmarinifolia* EM mintáinak teljes feldolgozását a 12-44 mintavételi furatok esetében a mintavételtől a kész PCR termékek szekvenálásra elküldéséig. Az elektroferogramok ellenőrzését, javítását.
- 2, A dolgozatban található diagramok, diverzitás számolások, táblázatok, filogenetikai fa, Venn-diagram elkészítését, a *Cadophora* tesztek elvégzését (PCR) és értékelését.
- 3, A dolgozatban megjelölt programokból számított eredmények mindegyikét, amely jelen munkában szerepel.
- 4, Jelen OTDK dolgozat írását.