

**DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI**

*KÜLÖNBÖZŐ STRESSZTŰRŐKÉPESSÉGŰ  
NAGYGOMBANEMZETSÉGEK KÁRPÁT-MEDENCEI  
LELETANYAGÁNAK MOLEKULÁRIS AZONOSÍTÁSA ÉS  
RENDSZEREZÉSE*

HALÁSZ KRISZTIÁN

ELTE BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

VEZETŐJE: ERDEI ANNA DSC., MTA LEV. TAG, EGYETEMI TANÁR

KÍSÉRLETES NÖVÉNYBIOLÓGIA PROGRAM

PROGRAMVEZETŐ: SZIGETI ZOLTÁN DSC., EGYETEMI TANÁR

TÉMAVEZETŐK:

RÁCZ ILONA CSC., EGYETEMI DOCENS

BRATEK ZOLTÁN PHD., EGYETEMI ADJUNKTUS

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM

NÖVÉNYÉLETTANI ÉS MOLEKULÁRIS NÖVÉNYBIOLÓGIAI TANSZÉK

BUDAPEST, 2008.

## BEVEZETÉS ÉS CÉLKITÚZÉSEK

A szélsőséges környezeti adottságú élőhelyek mezőgazdasági célú hasznosítása sok esetben igen költséges, és a növénytermesztés feltételeinek megteremtéséhez leggyakrabban alkalmazott öntözés, vagy talajjavítás nem jelent megtérülő befektetést. Ezeket a területeket gyakran erdősítik, ám a fatelepítés sikerességét jelentősen befolyásolhatja a csemeték mennyiségi és minőségi mikorrhizáltsága.

Az erdőtelepítéseket – a megfelelő fafajok kiválasztása mellett – a lehető legnagyobb siker érdekében az adott területre jellemző, az adott stressztényezőkhez alkalmazkodott, vagy alkalmazkodni képes mikorrhizagomba fajokkal ésszerű megvalósítani, ami nemcsak gazdaságilag, hanem természetvédelmi szempontból is kívánatos. Ehhez feltétlenül szükséges az élőhelyek mikorrhiza-populációit alkotó gombafajok feltérképezése, a gomba és a gazdanövény kapcsolatának, valamint stressztűrő-képességük fiziológiai alapjainak és okainak megismerése.

A szélsőséges környezeti adottságú természetes élőhelyek mikorrhizagombáinak megismerésére Magyarországon jelentős sikereket felmutató eredményes vizsgálatok napjainkban is folynak több kutatócsoport részvételével, ám a feladat megoldása – volumenéből következően – még további kitartó kutatómunkát igényel.

Jelen munka során három, a változatos élőhelyekhez különböző mértékben alkalmazkodni képes nagygombanemzetség (illetve egy esetben csoport) túlnyomórészt Kárpát-medencei előfordulásainak összehasonlítását és az ITS régió szekvenciaanalízisén alapuló molekuláris azonosítását és rendszerezését végeztük el, abban a reményben, hogy eredményeinkkel elősegíthetjük megfelelően mikorrhizált, ökológiailag stabil telepített erdők kialakítását és a mezőgazdaságilag más módon nem hasznosítható területek természetes környezetbe történő beillesztését, továbbá hozzájáruljunk egyes veszélyeztetett és törékeny egyensúlyú életközösségek mikótájának molekuláris adatokat is felhasználó felméréséhez.

Három gombacsoportot vizsgáltunk:

**Tuber** Az egyik leggyakoribbnak tartott mikorrhizás gombanemzetség morfológiailag hasonló karakterű, a Kárpát-medencében is honos fajainak morfológiai bélyegekre, illetve az ITS szekvenciákon alapuló filogenetikai adatokra épülő rokonsági szálainak felderítése volt a célunk. Választ kerestünk arra a két évszázados kérdésre is, mely mikroszkopikus tulajdonságokat tekinthetjük relevánsnak a határozásnál, illetve elkülöníthetőek-e földrajzilag

egy taxonok. Különös figyelmet kapott a *Tuber rapaeodorum* Tul. & C. Tul., vagyis a mustárszagú szarvasgomba, az a faj, amely talán a legtöbb vitát váltotta ki a gombataxonómusok közt.

**Melanogaster** Ennél a mikorrhizás, ám a *Tuber*-nél ritkább nemzetségnél igyekeztünk a hozzáférhető valamennyi (mintegy 240) Kárpát-medencei herbáriumi anyagról mikroszkópos jellemzést készíteni, és lehetőség szerint eldönteni, hogy az irodalomban általánosan előforduló spóraméreten és -alakon alapuló fajkonceptiók helytállóak-e vagy sem. A karakterisztikus és kétes anyagok ITS szekvenciáinak összehasonlítását is elvégeztük abból a célból, hogy kimutathatóak-e kriptikus fajok, netán a Botanikai Nevezéktan Nemzetközi Kódexében szereplő taxonok egy része is csak morfológiai fajnak tekinthető, tehát csak morfológiai különbséget mutatnak-e.

**Hygrocybe** A szaprobionta életmódot folytató, élénk színekavalkádú nedűgomba nemzetség legtöbb fajának élőhelyei veszélyeztetettek, mivel a talajtani jellemzők összetételének változásaira igen érzékenyen reagálnak. Fő célunk a nehezen határozható fajok, fajcsoportok ITS szekvenciákon alapuló elkülöníthetőségének felderítése volt, elsősorban a Kárpát-medencei fajokra koncentrálva. Választ vártunk arra a kérdésre is, vajon a *Hygrocybe* fajok rendkívüli változatossága mögött meghúzódik-e valamilyen genetikai motívum, vagy a feltűnő morfológiai jegyek alapján történt határozás esetleg félrevezető lehet.

## ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

A morfológiai és molekuláris vizsgálatokat mindhárom nagygombanemzetség esetében Kárpát-medencei gyűjtőterületről származó herbáriumi példányok mintáin folytattuk le. A nemzetségtől függően eltérő, érdemi morfológiai határozóbélyegek mikroszkópi analíziséhez Nikon Optiphot-2 és Nikon Eclipse 800 kutatómikroszkópokat Nomarski DIC feltétellel illetve Nikon SMZ-U sztereomikroszkópot alkalmaztunk, a szárított minták vízben történő rehidratálását követően.

A rokonsági viszonyok feltárása érdekében az ITS régiót szekvenáltuk 48 *Hygrocybe*, 31 *Tuber* illetve 26 *Melanogaster* mintánál. A gombaszárítmányból történő DNS kinyerésében néhány módosítással az erre kifejlesztett metodikát követtük. Az ITS szekvenciák amplifikációját specifikus primerek használatával végeztük el. Az alacsony DNS tartalmú vagy igen fragmentált DNS-mintázatú minták esetében nested és semi-nested PCR-t is alkalmaztunk. A szekvenáló reakciót követően a szekvenálás forward és reverse irányban is megtörtént.

Az ITS régiók szekvenciaanalízisébe kulcsoportként *Tuber* esetében *Tuber excavatum*, *Melanogaster* esetében *Alpova diplophloeus* és *Paxillus involutus*, az igen szétagolt *Hygrocybe* nemzetség esetében pedig három *Lactarius* faj teljes ITS szekvenciáját alkalmaztuk. Ehhez a CLUSTALW2 és MEGA4 programokat vettük igénybe, a filogenetikai fák szomszédcsatolásos (neighbor-joining, NJ) illetve legnagyobb takarékoság (Maximum Parsimony, MP) eljárással készültek. Az egyes ágak „valóságossága” 1000 ismétléses bootstrap analízissel lett megbecsülve. Elvégeztük az egyes nemzetségek mintáinak fajsintű elválásának térképezését, az ITS szekvenciák páronkénti illesztésen alapuló összehasonlító analízisének segítségével.

## ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

### ***Tuber:***

- Elsőként végeztünk alapos, morfológiai és genetikai tulajdonságokra épülő elemzést az adott csoporton;
- Kimutattunk hat genetikailag elváló, de morfológiailag igen hasonló fajt;
- Mind a hat fajt sikerült megbízható morfológiai bélyegek alapján is elkülönítenünk;
- Bizonyítottuk egyes morfológiai bélyegek megbízhatóságát, mint a perídium szerkezete, míg más, relevánsnak tartott jellemzőkről, mint az aszkuszonkénti spóraszám eloszlásról a korlátozott használhatóságot igazoltuk;
- Igazoltuk a *T. rapaeodorum* elkülöníthetőségét a hasonló fajoktól;
- Megállapítottuk, hogy a *T. maculatum* elterjedése a Tisza vízgyűjtőjére szorítkozik.

### ***Melanogaster:***

- Elsőként végeztünk a génuszra fajsztintű molekuláris filogenetikai kutatást;
- 240 Kárpát-medencei herbárium anyag alapján elkészítettük a nemzetség spóramorfológiai grafikonját;
- 26 minta ITS szekvenciájának összehasonlításával három fajra bontottuk a génuszt, melyek egyeznek a morfológiai alapon felállított fajkonceptiókkal;
- Több taxonról bizonyítottuk morfológiai faj voltát;
- Új határozókulcsot dolgoztunk ki a hazai fajokra.

### ***Hygrocybe:***

- 48 minta ITS szekvenciája alapján két, genetikailag szeparálódó nagy csoportra bontottuk a *Hygrocybe* nemzetséget, ezzel megerősítve az irodalomból ismert muszkaflavin tartalom szerinti felosztást;
- A szokatlanul változékony ITS régió nyomán rámutattunk a *Hygrocybe* nemzetség polifiletikus eredetére;
- Az elfogadott rendszertani kategóriák jelentős részét cáfoltuk, például az alszekciók többségét;
- Egyes fajcsoportok közeli rokonságát vagy azonosságát igazoltuk.

## KÖVETKEZTETÉSEK

A három, eltérő élőhelyspektrumhoz adaptálódott gombacsoport ITS régiói összehasonlítása alapján meghúzott fajhatárok és mikromorfológiai jellemzői egyeztetésének elvégzése után lehetőség nyílt az eddiginél jóval megbízhatóbb és egyszerűbb határozásra. A *Tuber* nemzetség gyakran összetévesztett, apró termőtestű tagjait ezentúl néhány valóban differenciáló mikroszkópos bélyeg alapján lehet azonosítani. Azoknál az adatoknál, ahol termőtest nem érhető el, például mikorrhizált gyökérvégeknél, az ITS szekvenciák alapján biztosan azonosítható lesz a minta. 2005-ben megjelent cikkünk is jelentősen hozzájárult a Nemzetközi Nukleotidszekvencia Adatbázisban elérhető *Tuber* ITS szekvenciák számának ugrásszerű növekedéséhez. Jelen vizsgálatok több lábon álló, megalapozott eredményeket biztosítanak a *Tuber* fajok későbbi monográfiáinak megszerkesztéséhez is. A *Melanogaster* nemzetség a mikorrhiza-felmérések tanúsága szerint ritkábban fordul elő az előző csoportnál. Bár a hazai fajok száma a különböző felfogások szerint is tíz alatt maradt, részletes felmérésük és egyértelmű válaszadás a valóban különböző taxonok számát illetően ezidáig nem történt. A Kárpát-medence összes hozzáférhető herbáriumi adatának feldolgozása után ezeket a kérdéseket világosan megválaszoltuk, utat nyitva az ökológiai felmérés előtt. A *Hygrocybe* nemzetség nagyszámú fajának betudhatóan nem került az előzőek szintjéhez foghatóan részletes feldolgozásra, azonban néhány kérdésben így is meglepő eredményre jutottunk. A speciális élőhelyekre jellemző *Hygrocybe* fajok általában élesen elváló csoportokat alkotnak, rendkívül nagy, akár nemzetséghatárokon is túlnyúló genetikai eltérésekkel, mely épp a fordítottja a több, közelrokon fajra osztható *Tuber* csoportnál tapasztalt eredményekkel.

## A TÉMÁHOZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK

### Dolgozatok referált tudományos folyóiratokban:

1. **K. Halász**, Z. Bratek, D. Szegő, S. Rudnóy, I. Rácz, D. Lásztity, J.M. Trappe (2005): Tests of species concepts of the small, white, European group of *Tuber* spp. based on morphology and rDNA ITS sequences with special reference to *Tuber rapaeodorum*. *Mycological Progress* 4(4): 281-290.
2. Zagyva T., **K. Halász**, L. Albert, Z. Bratek (2003): Taxonomische Probleme innerhalb der Gattung *Hygrocybe*. *Fritschiana* 42: 71-73.
3. **Halász K.**, Bene F., Babos M., Bratek Z. (2007): A hazai föld alatti gombafajok magyar elnevezése. *Mikológiai Közlemények, Clusiana* 46(1): 33-56.

### Teljes közlemények konferencia-kiadványokban:

1. Bratek Z., L. Albert, I. Bagi, B. Pálffy, T. Takács, Sz. Rudnóy and **K. Halász**: New and rare hypogeous fungi of Carpathian basin. Actes du V<sup>e</sup> Congrès International, Science et Culture de la Truffe et des autres Champignons Hypogés Comestibles. 4 au 6 mars 1999, Aix-en-Provence, France, Federation Française des Trufficulteurs, pp. 55-56.
2. Bratek Z., **Halász K.** (2001): A Kárpát-medence földalatti gombái. In II. Kárpát-medencei Biológiai Szimpózium. Magyar Biológiai Társaság & Magyar Természettudományi Múzeum. Budapest, 2001. november 20-22. Előadások összefoglalói, pp. 51-55.
3. **Halász K.**, Zagyva T., Bratek Z., Albert L., Finy P., Zöld-Balogh Á. (2003): A *Hygrocybe* nemzetség rendszertani problémái. In: Háromoldalú botanikai és mikológiai konferencia: Szentgotthárd 2003. június/szeptember. Kiadta: Clusius Kutatóhely a hármashatáron. Szentgotthárd. 2003. pp. 136-145.

### Összefoglalók konferencia-kiadványokban:

1. Bratek Z., L. Albert, I. Bagi, B. Pálffy, T. Takács, Sz. Rudnóy, **K. Halász** (1999): New and rare hypogeous fungi of Carpathian Basin. I. Magyar Mikológiai Konferencia, május 26-28., Budapest. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 46, 310
2. Bratek Z., Parádi I., **Halász K.**, Rudnóy Sz. (2000): A Kárpát-medence szarvasgombáinak élőhely-preferenciái. V. Magyar Ökológus Kongresszus, Debrecen 2000. október 25-27. *Acta Biologica Debrecina Oecologica Hungarica suppl.* 11(1): 46.
3. Rudnóy Sz., Bratek Z., Lásztity D., **Halász K.**, Berecz B. (2000): Ektomikorrhizát képző gombák azonosítása molekuláris alapon. V. Magyar Ökológus Kongresszus, Debrecen 2000. október 25-27. *Acta Biologica Debrecina Oecologica Hungarica suppl.* 11(1): 134.
4. Berecz B., Bratek Z., **Halász K.**, Rudnóy Sz., Parádi I. (2000): A gánti bauxitmeddőhányó mikorrhizagombái. V. Magyar Ökológus Kongresszus, Debrecen

2000. október 25-27. Acta Biologica Debrecina Oecologica Hungarica suppl. 11(1): 197.
5. **Halász K.**, Bratek Z., Albert L., Takács T. (2000): Az Eupannonicum földalatti gombái. V. Magyar Ökológus Kongresszus, Debrecen 2000. október 25-27. Acta Biologica Debrecina Oecologica Hungarica suppl. 11(1): 230.
  6. Parádi I., **Halász K.**, Rudnóy Sz., Bratek Z. (2000): Hazai szikes élőhelyeken előforduló mikorrhizagombák. V. Magyar Ökológus Kongresszus, Debrecen 2000. október 25-27. Acta Biologica Debrecina Oecologica Hungarica suppl. 11(1): 290.
  7. **Halász K.**, Z. Bratek, L. Albert and T. Takács (2002): Hypogeous fungi of the Eupannonicum. Acta Microbiol. Immunol. Hung. 49(2-3): 378.
  8. Pintér Zs., **Halász K.**, Rudnóy Sz., Bathó A., Bratek Z. (2003): A Bükk-hegység földalatti gombái és élőhelyeik ökológiai jellemzése. 6. Magyar Ökológus Kongresszus. Gödöllő, 2003. augusztus 27-29. Előadások és poszterek összefoglalói: 210.
  9. Bratek Z., A., Gógán, **K., Halász, I.** Bagi, V. Erdei, G. Bujáki (2004): The Northeast habitats of *Tuber magnatum* known from Hungary. La Premier Symposium sur les Champignons Hypogés du Bassin Méditerranéen, Rabat, 6-8 avril 2004., Résumé
  10. Orczán Á. K., Pintér Zs., **Halász K.**, Bratek Z. (2006): Conservation contra utilization perspectives of truffles in Carpathian region. 1st European Congress of Conservation Biology (ECCB) 22-26 August, 2006 Eger – Hungary Book of Abstracts: 119.

#### **Tudományos könyvek részletei:**

1. Bratek Z., **Halász K.**, Soós V.: A *Tuber aestivum* Kárpát-medencei élőhelyei (in G. Chevalier, H. Frochot, Bratek Z.: Az európai fekete szarvasgomba. Első Magyar Szarvasgombász Egyesület, Budapest, 2005). pp. 228-238.
2. Bratek Z., **Halász K.**: Kiegészítések a második kiadáshoz (in: Szemere L.: Földalatti gombavilág. Első Magyar Szarvasgombász Egyesület, Budapest, 2005). pp. 176-180.

#### **Tudományos fórumon tartott előadások:**

1. **Halász K.**, Bratek Z.: Földalatti gombák az Alföldről. A TIT Gombász szakcsoport 2000. szeptember 25-i szakülése, Budapest.
2. **Halász K.**: *Melanogaster*-ek a Kárpát-medencében. A TIT Gombász szakcsoport 2002. május 13-i szakülése, Budapest.
3. **Halász K.**: A nedűgomba nemzetség vizsgálata molekuláris módszerekkel. Magyar Mikológiai Társaság 2003. december 10-i szakülése, Budapest.
4. **Halász K.**, Pintér Zs., Bratek Z.: Reporting of hypogeous fungi from Őrség National Park. Trilaterale Biologische Tagung vom 26. 06. bis 29. 06. 2003. Clusius Forschungsstation im Dreilaendereck, Szentgotthárd.