

Válasz Prof. Posta Katalin opponensi véleményére

Mindenek előtt szeretném megköszönni Dr. Posta Katalin professzorasszonynak doktori értekezésem bírálatát, fontos észrevételeit, dicsérő szavait és a dolgozat nyilvános vitára bocsátásának támogatását.

A felmerült kérdésekre és megjegyzésekre az alábbiakban szeretnék válaszolni.

Az idegen szavak használatát próbáltam kerülni. Törekedtem arra, hogy csak akkor használjak ilyen kifejezéseket, ha azok szabatos magyar megfelelővel nem válthatók ki. Opponensem észrevétele jogos, mert így is maradt a dolgozatban olyan megfogalmazás, ahol ez nem sikerült maradéktalanul.

Egyetértek opponensem általános észrevételével az anyag és módszer fejezettel kapcsolatosan; szerencsésnek tartottam, hogy nem követelmény a doktori disszertációban a módszertani folyamatok részletes bemutatása. A törzsek fenntartásával kapcsolatban az izolálás módját fontosnak tartottam megemlíteni, de jogos az észrevétel, hogy arra lehetett volna utalni az eredményeket bemutató részben is. A „lásd”itt és itt utalást például a táptalajok felsorolása után azért használtam, mert az adott cikk a módszerrel kapcsolatban további irodalmakra is hivatkozik, igaz, hogy kevésbé félreérthető lett volna, ha hozzáírom, „és hivatkozott anyagaik”.

Egyetértek opponensem észrevételével, hogy a leírások idejében, az adott publikációk megjelenésekor érvényes taxonnevek használata *mellett* segített volna, ha feltüntettem a dolgozat megírásakor érvényes neveket. Ezen magam is gondolkoztam, végül két ok miatt döntöttem úgy, hogy nem írom ki azokat. Amennyiben nemcsak az első említéskor teszem meg a kiírást, az nagyon „megtörte” volna a szöveget, a taxonómiai blokkokat pedig különösen zavarta volna. Ezen túl a saját munkánk időbeli haladása, és korábbi, általunk leírt taxonok revideálása is kevésbé jelent volna meg „időbeliségében”, ha azonnal kiírom az új nevet. A másik ok pedig az volt, hogy a dolgozat írása közben is tudtam már olyan taxonról, aminek rövidesen meg fog változni a neve. Az opponensem által javasolt mellékletben való felsorolás jó megoldás lehetett volna, sajnos, ez a lehetőség nem jutott eszembe.

Opponensem észrevétele a taxonómiai bemutatásokban használt ábramegnevezések dolgozatba való „bevezetésének” hiányával kapcsolatban jogos. Ez azonban nem mulasztás, hanem tudatos döntés eredménye. Azonban a megjelenítési mód okának, a lábjegyzetben történt megmagyarázása nem lett teljes. A nevezett taxonómiai részek egy-egy publikációban, akár a diagnózissal együtt azok a szövegek, ahol a taxon és annak neve „megszületik” – nevezéktani értelemben ebből nem lehet több, és nem lehet több változat, ezért nem ültettem őket át magyar nyelvre. Ezeknek taxonómiai szempontból fontos, hivatalos részeit adják a taxon leírásához tartozó, hivatkozott ábrák az eredeti publikációkban. Nem szerettem volna törölni ezek helyét, ami utalhatott volna arra, hogy ábra nélkül történt az adott taxonok leírása. Viszont az összes ilyen ábrát nem mutattam be a doktori dolgozatomban, és így az átszámozás, beolvasztás és tényleges hivatkozás nem lett volna megoldható.

Opponensem egyes ábrákkal kapcsolatos észrevételeivel egyetértek; a méretezésük lehetett volna más, színes ábrákat viszont csak ott használtam, ahol az eredeti publikációban is tudtunk színes ábrákat közölni. A tartalomjegyzékben valóban az egyik fejezet címének egy korábbi változata szerepel.

Ahogy opponensem észrevételezte, akár besorolható lett volna a DNS-vonalkód rövid fejezete a sivatagi szarvasgombákról szóló részbe, hiszen valóban annak a csoportnak a taxonómiai feldolgozásában addig elért eredményeim miatt vált lehetővé csatlakozásunk a munkákhoz. Viszont ez egy általános módszerfejlesztési kezdeményezés volt, és az sem véletlen, hogy a dolgozatban az nrDNS ITS heterogenitás szerepel hangsúlyozottabban, mert ez az a rész, ahol korábbi eredményeink miatt és saját érdeklődés okán is hozzá tudtam járulni a módszer korlátainak taglalásához is.

Opponensem által megfogalmazott kérdés volt, hogy mit javasolnék az arbuszkuláris mikorrhizaképző gombák közösségeinek, diverzitásának vizsgálataiban alkalmazandó módszereknek.

Ha valaki hosszabb távon tervezi egy AM-gombaközösség vizsgálatát, mindenképpen fontosnak gondolnám, hogy próbáljon spóra alapú vizsgálatokat is végezni. Ez nem egyszerű, a csoport obligát biotróf életmódja és morfológiai kihívásai miatt. Úgy tűnik, hogy hosszú távon az ilyen vizsgálatok jól egészíthetők ki, tehetik teljesebbé a molekuláris diverzitási módszereken alapuló eredményeket.

A molekuláris diverzitási kutatásokban szerencsés lenne, ha létezne egy nemzetközi konszenzuson alapuló eljárás, hiszen ez lehetővé tenné az eredmények jobb összevethetőségét. Ez – ahogy opponensem kiemeli és a dolgozatban is szerepel – különösen problematikus, mikor olyan primerrendszereket használnak/használnak, melyek nem, vagy nem elég hosszan fednek át ahhoz, hogy összevethetők legyenek a kapott eredmények. A korai, REDECKER- (2000) majd WUBET-féle (WUBET és mtsai. 2006) primerrendszerek, bár voltak előnyeik, nehézkesen alkalmazhatók. „Semi-nested” illetve „nested” PCR-rendszerek viszont túl sok különböző kombinációval, PCR-reakcióval próbálják lefedni az AM-képző gombák csoportját. Az NS31-AM1 (SIMON és mtsai. 1992, HELGASON és mtsai. 1998) kombináció relatíve jó specificitású, az ampikon hossza akár NGS-technikák alkalmazását is lehetővé teszi, viszont az nrDNS SSU gén egy kevésbé variábilis szakaszát célozza; ezt a problémát a továbbfejlesztett primer-változatok sem oldják meg. Ennek a szakasznak egy hatalmas előnye, hogy az ezen alapuló eredményeket a MaarjaAM adatbázis (ÖPIK és mtsai. 2010) „virtuális taxonjaival” könnyen össze lehet hasonlítani. Hasonló előnyök és hátrányok jellemzik az egyébként jól használható LEE-féle primereket (LEE és mtsai. 2008), mely ugyanezen génszakasz egy hosszabb régióját célozzák. Egy közösség diverzitásának jellemzéséhez mindenféleképpen az nrDNS LSU egyes variábilis „loop” régióit is fedő DA SILVA-féle (DA SILVA és mtsai. 2006) primereket javasolnám használni. Egy mesterséges AM-gomba-közösségen végzett módszertani tesztünk során, négy primerpár torzítását és hatékonyságát vizsgáltuk (KOVÁCS és mtsai, nem publikált eredmények) és ez a primerrendszer bizonyult a leghatékonyabbnak. Ezen túlmenően az amplifikált szakasz szekvenciája jól használható filogenetikai elemzésekre, a szakasz jól szekvenálható NGS-technikákkal is. Taxonómiai azonosításokhoz az immáron teljes körben elfogadott KRÜGER-

féle (KRÜGER és mtsai 2009) „nested” primerrendszer használatát lehet javasolni (ennek, az SSU 3’, teljes ITS régió és LSU 5’ szakaszt is lefedő régió „magába foglalja” a DA SILVA-féle primerrel felszaporított szakaszt is). A legtöbb taxonról elérhető már ezzel a primerrel nyert megbízható adatok. A primerrendszert próbálták alkalmazni molekuláris diverzitási munkákban is, de nem gondolom, hogy ez felhasználóbarát, és hordozna olyan hozzáadott értéket, ami ellensúlyozná például a túl hosszú amplikon, és „nested” rendszer okozta problémákat. Az AM-gombák vizsgálataiban is megjelentek nem nrDNS lókuszok, ezek használatai azonban nem terjedtek el általánosan.

Az opponensem által feltett AM-képző gombákra vonatkozó további kérdésére azt tudom válaszolni, hogy ezen gombák körében is nagy jelentőséggel bír a funkcionális heterogenitás, és ezt minden esetben érdemes szem előtt tartani, mikor a gombacsoport szerepét próbáljuk megérteni.

Egyes elképzelések szerint, valójában a leírt, elfogadott, jelen módszereinkkel azonosítható AM-gomba fajokon belüli funkcionális heterogenitás állhat a háttérben annak, hogy ez a nagyon alacsony taxondiverzitású csoport (~230–240 a leírt fajok száma) ilyen nagyszámú gazdával épít ki kapcsolatot, ennyi élőhelyen előfordul. Tehát létezhet az AM-kapcsolatokban is specificitás, csak az nem a jelenleg használt fajkonceptiók mentén értelmezhető. Az interspecifikus funkcionális heterogenitást és annak természetes közösségekben is fontos szerepét már a VAN DER HEIJDEN és mtsai (1998) által bemutatott mérföldkönek tekinthető kutatások eredményei jelezték. Például annál jobb volt a talajból történő forráskihasználás, minél nagyobb volt a rendszerben az AM-képző gombák taxon (és ezáltal funkcionális) diverzitása. Később például az is igazolást nyert, hogy minél távolabbi rokonságban álló taxonok képeznek egy AM-gombaközösséget, minél több távoli leszármazási vonal képviselteti magát a társulásban, az annál jobban „teljesít” az adott közösségben (MAHELARI és KLIRONOMOS 2007). Nagyon fontos eredményeket hoztak azok az alapmunkák is, melyek az inter- és intraspecifikus funkcionális heterogenitás vizsgálatát tűzték ki célul – mint például MUNKVOLD és mtsai. (2004), akik négy AM-gombafaj több mint 20 izolátumán igazolták azok jelentős funkcionális különbségeit. Hasonlóan jelentős funkcionális különbségeket mutattak ki például MENSAH és mtsai. (2015) négy különböző rendbe tartozó AM-gombafajok izolátumait használva. Mivel az AM-gombák esetében fajokhoz nem lehet jól tápanyagáramlással összefüggésbe hozható „jellegeket” („trait”) kötni azok jelentős intraspecifikus heterogenitása miatt. BEHM és KIERS (2014) például javaslatot is tettek bizonyos „jellegek” („trait”) figyelembe vételére, melyekkel vizsgálhatóvá válna ezek fajokon belüli heterogenitása, és értelmezhetővé ennek ökoszisztémákban betöltött szerepe. A funkcionális heterogenitás pontos vizsgálatát azonban nehezíti, az AM-gombák sok sejtmagvas szerveződésű, cönocitikus hifái, és az, hogy a megbízható monospóras izolátumok eleve egy drasztikus genetikai beszűkülésen mennek keresztül már az izoláláskor. Ezután, a fenntartás „átoltásai” során, olyan genetikai különbségek alakulhatnak ki, melyek garantáltan műtermékek az adott AM-gomba természetes állományaihoz képest.

Az enzimtesztekkel kapcsolatban vetette fel opponensem, hogy mi lehet az oka egyes enzimek (például savas foszfatáz és valamilyen glükózidáz) általános, míg mások (cisztein-arilamidáz, α -fukozidáz és β -glükuronidáz) ritkán tapasztalt aktivitásának. Az adott szubsztárok, reakciók gyakorisága, jelentősége ezen gombák életében bizonyosan

meghatározza ezen eredményeinket. Feltételezhetően a savas foszfatázok sejtműködésben betöltött általános szerepe miatt volt minden gomba esetében erős aktivitásuk kimutatható az APIZYM teszt konstitutív enzimaktivitást mérő rendszerével, és a glükózidázok aktív jelenléte is általános lehet gombák esetében. Viszont jelentkezhettek aktivitásukban diagnosztikai értékű különbségek egyes baktériumoknál, melyek diagnosztikájához a tesztet kidolgozták. Hasonlóan diagnosztikai jelentőséggel bírhat baktériumoknál a három nevezett, DSE gombákban ritkán detektált aktivitású enzim. Ezek a ritkán kimutatott enzimaktivitások ebben az esetben nem feltétlenül jelentik a bontókéesség hiányát. Elképzelhető, valójában csak detektálási szint a probléma, vagy esetleg indukálva jelentkezik az adott enzim aktivitása. Nemrég publikáltuk két DSE gombának a teljes genom elemzéseit (KNAPP és mtsai 2018). Mind a *Cadophora* sp. mind a *Periconia macrospinosa* genomjában a szénhidrát-aktív enzimek (carbohydrate active enzymes, CAZymes) génjeinek annotálásakor a glikozid-hidrolázok 29-es (GH29) családjába tartozó α -L-fukozidáz gén is azonosításra került. A fukozidáz enzim által katalizált hidrolízis terméke, az L-fukóz például szénforrásként is szerepel a BioLOG teszten, ahol nyolc DSE esetében kimutatható volt ezen szénforrás hasznosítása az enzimeszt inkubációs ideje alatt.

Opponensem kérdése a *Periconia macrospinosa* jelentős szénforrás hasznosítására is vonatkozott. Ez az eredmény különösen érdekes annak tükrében, hogy ugyanezen tesztben a *Cadophora* sp. DSE bizonyult a legkevesebb szénforrást hasznosító gombának, miközben, mint ahogy ezt az előbb említett genomikai munkánkban nemrégiben közöltük, az utóbbi DSE genomjában sokkal nagyobb számban fordulnak elő szénhidrát-aktív enzimeket, ezen belül pedig a növényi sejtfalbontókat (plant cell wall degrading enzymes, PCWDEs) kódoló gének (KNAPP és mtsai 2018). Azt fontos hozzátenni, hogy bár kevesebb ilyen enzim kódolt a *P. macrospinosa* genomjában, de az még így is jóval magasabb, mint az összehasonlító elemzésünkben vizsgált egyéb tömlősgombákra jellemző szám. Az biztos, hogy a *Periconia macrospinosa* izolátumként is gyorsan nő, ezért elképzelhető, gyorsabban indukálódnak ezek a diverz enzimeik, és ennek is köszönhető a kimagasló szénforrás-hasznosító képesség. Azt azonban nem szabad elfelejteni, hogy mindkét általunk használt izolátumot a vizsgálatok előtt már évek óta mesterséges táptalajon tartottuk fenn, 2–3 hónapos átoltásokkal. Ez biztos, hogy jelentős hatást gyakorolt enzimműködésükre.

Végezetül szeretném még egyszer megköszönni opponensem részletes bírálatát, fontos észrevételeit és kérdéseit, és eddigi munkám pozitív értékelését.

Mosonmagyaróvár, 2018. április 30.

Kovács M. Gábor

HIVATKOZOTT IRODALMAK

- Behm JE, Kiers TE 2014. A phenotypic plasticity framework for assessing intraspecific variation in arbuscular mycorrhizal fungal traits. *J Ecol* 102: 315–327
- da Silva GA, Lumini E, Maia LC, Bonfante P, Bianciotto V 2006. Phylogenetic analysis of Glomeromycota by partial LSU rDNA sequences. *Mycorrhiza* 16: 183–189

- Helgason T, Daniell TJ, Husband R, Fitter AH, Young JPW 1998. Ploughing up the wood-wide Web? *Nature* 394: 431
- Knapp DG, Németh JB, Barry K, Hainaut M, Henrissat B, Johnson J, Kuo A, Lim JHP, Lipzen A, Nolan M, Ohm RA, Tamás L, Grigoriev IV, Spatafora JW, Nagy LG, Kovács GM 2018. Comparative genomics provides insights into the lifestyle and reveals functional heterogeneity of dark septate endophytic fungi. *Scientific Reports* 8: 6321
- Krüger M, Stockinger H, Krüger C, Schüssler A 2009. DNA-based species level detection of Glomeromycota: one PCR primer set for all arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol* 183: 212–223
- Lee J, Lee S, Young JPW 2008. Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiol Ecol* 65: 339–349
- Maherali H, Klironomos N 2007. Influence of phylogeny on fungal community assembly and ecosystem functioning. *Science* 316: 1746–1748
- Mensah JA, Koch AM, Antunes PM, Kiers ET, Hart M, Bücking H 2015. High functional diversity within species of arbuscular mycorrhizal fungi is associated with differences in phosphate and nitrogen uptake and fungal phosphate metabolism. *Mycorrhiza* 25:533–46.
- Munkvold L, Kjølner R, Vestberg M, Rosendahl S, Jakobsen I 2014. High functional diversity within species of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol* 164: 357–364
- Öpik M, Vanatoa A, Vanatoa E, Moora M, Davison J és mtsai. 2010. The online database MaarjAM reveals global and ecosystemic distribution patterns in arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *New Phytol* 188: 223–241
- Redecker D 2000. Specific PCR primers to identify arbuscular mycorrhizal fungi within colonized roots. *Mycorrhiza* 10: 73–80
- Simon L, Lalonde M, Bruns TD 1992. Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. *Appl Environ Microbiol* 58: 291–293
- van der Heijden MGA, Klironomos JN, Ursic M, Moutoglou P, Streitwolf-Engel R és mtsai. 1998. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* 396: 72–75
- Wubet T, Weiss M, Kottke I, Teketay D, Oberwinkler F 2006. Phylogenetic analysis of nuclear small subunit rDNA sequences suggests that the endangered African Pencil Cedar, *Juniperus procera*, is associated with distinct members of *Glomeraceae*. *Mycol Res* 110: 1059–69