



Eötvös Loránd Tudományegyetem
Biológiai Intézet
Növényélettani és Molekuláris Növénybiológiai Tanszék

Molekuláris biológiai és ökológiai vizsgálatok hipogeikus gombákon

PhD értekezés

Készítette:

Merényi Zsolt

ELTE Biológia Doktori Iskola (Prof. Dr. Erdei Anna)

Kísérletes Növénybiológia Doktori Program (Prof. Dr. Szigeti Zoltán)

Témavezető:

Dr. Bratek Zoltán

egyetemi adjunktus

2014

Budapest

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	4
2. Irodalmi áttekintés	7
2.1 A föld alatti gombák és evolúciójuk.....	7
2.2 <i>Tuber</i> nemzetség jellemzése	9
2.2.1 <i>Tuber brumale</i> - téli szarvasgomba.....	12
2.2.2 <i>Tuber regianum</i> -szerű fajok	14
2.2.3 <i>Rufum</i> -fajcsoport.....	14
2.3 A <i>Genea</i> nemzetség jellemzése.....	15
2.4 Hipogeák kutatásának története és térképezésük.....	16
2.5 Fajkonceptiók, kriptikus, pszeudokriptikus fajok a gombák körében.....	18
2.6 Kriptikus, pszeudokriptikus fajok problémája.....	21
2.7 A Morfológiai és a molekuláris filogenetikai módszerek ellentmondásai	22
2.8 Molekuláris filogenetika.....	24
2.9 Filogeográfia	27
3. Célkitűzések	29
4. Anyagok és módszerek	30
4.1 Föld alatti gombák gyűjtése.....	30
4.2 Adatbázis létrehozása	31
4.3 Hipogeák gyakoriságának változása	31
4.4 Vizsgálatba vont taxonok	32
4.4.1 Kevés adattal rendelkező, adott területre újonnan megtalált hipogeák.....	32
4.4.2. Revízióra váró hipogeák.....	34
4.4.3 Nagy adatgyarapodást mutató téli szarvasgomba.....	34
4.5 DNS izolálás, PCR és szekvenálás.....	35
4.6 Filogenetikai vizsgálatok.....	37
4.6.1 Szekvencia adatok előkészítése	37
4.6.2 Modell-választás, Filogenetikai analízis előkészítés	37
4.6.3 Filogenetikai fakészítő eljárások beállítása.....	38
4.7 A téli szarvasgomba minták haplotípus szintű vizsgálata	39
4.8 Molekuláris óra elemzések	40
4.9 Automata Barcoding Gap Elemzés	41
4.10 Elterjedési terület predikció	42
4.11 Morfológiai vizsgálatok.....	43
4.11.1 A <i>Genea</i> fajok morfológiai vizsgálata	44
4.11.2 A <i>T. regianum</i> szerű minták morfológiai vizsgálata.....	44
4.11.3 <i>T. brumale</i> aggr. minták morfológiai vizsgálata.....	44
4.11.4 A <i>T. brumale</i> aggr. morfológiai és talaj adatainak elemzése	45
4.11.5 A <i>T. brumale</i> aggr. morfológiai mérésein végzett szimulációk.....	46
5. Eredmények.....	48

5.1 Adatbázis létrehozása	48
5.2 Gyűjtési eredmények értékelése	50
5.3 Kevés adattal rendelkező hipogeák	52
5.3.1 <i>Tuber foetidum</i> - bűdös szarvasgomba	52
5.3.2 <i>Elaphomyces personii</i> - kékelű álszarvasgomba	53
5.3.3 <i>Gymnomyces</i> sp.	54
5.3.4 A <i>T. regianum</i> -szerű minták	55
5.4 Revízióra váró taxonok	64
5.4.1 A <i>Genea</i> nemzetség	64
5.4.2 Rufum-fajcsoport	66
5.5 <i>Tuber brumale</i> aggr.	68
5.5.1. Molekuláris filogenetikai elemzések	68
5.5.2. Filogeográfia és haplotípus elemzések	73
5.5.3. Molekuláris óra elemzés	76
5.5.4. <i>T. brumale</i> aggr. morfológiai vizsgálata	77
5.5.5. A <i>T. brumale</i> aggr. morfológiai adatain végzett szimulációk	80
5.5.6 A <i>T. brumale</i> aggr. környezeti igényei	83
5.5.7 Potenciális área rekonstrukció	84
6. Az eredmények megvitatása	87
6.1 Kevés adattal rendelkező fajok	88
6.2 Revízióra váró taxonok	89
6.3 Megváltozott adatgyakoriságú taxonok	89
6.4 Vizsgálatba vont taxonok:	90
6.4.1 <i>Tuber foetidum</i>	90
6.4.2 <i>Gymnomyces</i> sp.	91
6.4.3 <i>Elaphomyces personii</i>	91
6.4.4 Regianum-fajcsoport	92
6.4.5 <i>Genea</i> nemzetség	93
6.4.6 Rufum-fajcsoport	93
6.4.7. <i>Tuber brumale</i> aggr.	94
6.5 Molekuláris filogenetikai módszerek hatása a föld alatti gombák kutatására	99
6.5.1 Morfológiai alapú osztályozás változása	99
6.5.2 Ökológiai, elterjedési eredmények változása	102
7. Összefoglalás	104
8. Summary	105
9. Köszönetnyilvánítás	106
10. Irodalomjegyzék	107
11. Mellékletek	131

Rövidítésjegyzék

ABGD	<i>Automatic Barcode Gap Discovery</i> – Automata barcoding gap elemzés
ASDSF	<i>Average standard deviations of split frequencies</i> (MrBayes)
AUC	<i>Area Under the Curve</i> – Görbe alatti terület (ROC elemzésben)
bp	<i>Base pair</i> - bázispár
BSC	<i>Biological Species Concept</i> – Biológiai Fajkonceptió
BSR	<i>Biological Species Recognition</i> – Biológiai fajazonosítás
CIC	Colour Identification Chart (Royal Botanical Garden of Edinburgh, 1969) – színatlasz
CMN	<i>Common Mycelial Network</i> – Közös hifa-hálózat
CV	<i>Cross validated</i> – Kölcsönösen validált (LDA, MaxEnt)
D	Diszkriminancia-érték (LDA)
DPH	<i>Dog Preferred Hypogeous fungi</i> – Kutya által preferált hipogeák
EEMM	<i>Edible Ectomycorrhizal Mushrooms</i> – Ehető ektomikorrhiza-képző gombák
EM	<i>Ectomycorrhiza</i> - Ektomikorrhiza
EMSZE	Első Magyar Szarvasgombász Egyesület
ESC	<i>Evolution Species Concept</i> – Evolúciós fajkonceptió
ESS	<i>Effective Sample Size</i> – Effektív mintaméret
GTR	<i>General Time Reversible</i> nukleotid szubsztitúciós modell
HKY	Hasegawa Kishino és Yano nukleotid szubsztitúciós modell
HPD 95%	<i>95% High Posterior Density</i> – 95 %-os <i>a posteriori</i> sűrűség eloszlás
Indel	Inzerció, deléción mutációk
ITS	<i>Internal transcribed spacer</i> – Belső átíródó elválasztószekvenciák
LSU	<i>Large subunit</i> – a riboszóma nagy alegységét kódoló szakasz (28S)
MC	<i>Molecular Clock</i> – Molekuláris óra
MCC	<i>Maximum Clade Credibility</i>
MCMC	Monte Carlo Markov-Chain – Markov-lánc Monte Carlo
ML	<i>Maximum Likelihood</i> – Legnagyobb valószínűségi érték módszere
MOTU	<i>Molecular Operational Taxonomic Unit</i> – Molekuláris operatív rendszertani egységek
MP	<i>Maximum Parsimony</i> – Maximális takarékoság módszere
MRCA	<i>Most Recent Common Ancestor</i> – Legutóbbi közös ő
MSC	<i>Morphological Species Concept</i> – Morfológiai fajkonceptió
MSR	<i>Morphological Species Recognition</i> – Morfológiai fajazonosítás
NJ	<i>Neighbor Joining</i> – Szomszéd-összevonó módszer
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> – Polimeráz-lánreakció
PHT	<i>Partition homogeneity test</i>
PKC	Proteinkináz-C
PP	<i>Posterior probability</i> – Posterior valószínűségi értékek (MrBayes elemzésben)
PSC	<i>Phylogenetic Species Concept</i> – Filogenetikai fajkonceptió
PSC	<i>Phylogenetic Species Recognition</i> – Filogenetikai fajazonosítás
PSI	<i>Parsimony Informative Site</i> – Parszimónia informatív hely
PVA	Poli-vinil-alkohol
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> – Restrikción fragmentum-hossz polimorfizmus
SC	<i>Species Criterion</i> – Faj-kritérium
SD	<i>Species Delimitation</i> – Faj-lehatárolás
SYM	<i>Symmetrical model</i> – Szimmetrikus nukleotid szubsztitúciós modell
TAE	Trisz-Acetát-EDTA
TBR	<i>Tree-Bisection-Reconnection</i>
+G	Γ eloszlás alakparaméterének becslése (szubsztitúciós modellekhez)
+I	Változatlan (invariáns) pozíciókra vonatkozó becslés (szubsztitúciós modellekhez)

1. Bevezetés

A nagygombák étkezési célú termesztése már közel 2,5 ezer éve folyik (Stamets, 1993), ugyanakkor az ehető ektomikorrhiza-képző (EEMM) gombák közül elsőként a francia vagy périgordi szarvasgombát (*Tuber melanosporum* Vittad.), alig 230 évvel ezelőtt sikerült először termesztésbe vonni (Olivier *et al.* 2012). A késői időpont háttérében egyértelműen a fajok jellegzetes, szimbiota életmódja áll, melynek köszönhetően csak a gazdanövényükkel ektomikorrhiza- (EM-) kapcsolatot kialakítva, speciális ültetvényeken képesek termőtestképzésre. Így a nagy értékű ektomikorrhiza-gombák termesztése érdekében napjainkban kiterjedt kutatások folynak életciklusuk, ökológiai-környezeti igényeik és szimbiotikus kapcsolataik jobb megértése céljából. A több mint húszezer fajt számláló EM gombacsoportból ezernél is több faj bír étkezési értékkel, melyek közül egészen a fejlődő országok tömegeinek fehérje forrását kiszolgáló fajoktól (Zambonelli & Bonito 2012), az egészséges táplálkozást biztosító fajokon keresztül, az exkluzív gasztronómiában kicsúcsosodókig találhatunk példákat. Ültetvényes termesztésük humán gazdasági és szociális problémák enyhítésére a fent említettek mellett a természeti hátrányokkal érintett területek könnyebb erdősítésével, kihasználásával is megoldást nyújthat (Harms *et al.* 2011).

Ökológiai szempontból az EM gombák elsősorban az erdei ökoszisztémák stabilitásának és diverzitásának fenntartásában játszanak fontos szerepet. Ezt az erdei növények között kialakuló közös hifahálózat (CMN) kialakításával, és az azon folyó tápanyagtranszport segítségével érik el (Taylor, 2006). Az EM gombák egyedi növényre gyakorolt sokrétű hatásukat is kimutatták már, mind víz és ásványi anyagok felvételében, mind különböző stresszekkel szembeni védő-hatásban (Smith & Read 2008; Ludmerszki & Rudnóy 2012). A mikorrhizás élőhelyek elterjedtségét figyelembe véve az EM gombák, és gazdanövényeik evolúciós sikere megkérdőjelezhetetlen (Trappe & Claridge 2005).

Az EEMM gombák közül gasztronómiai és kereskedelmi szempontból is kiemelkednek a hipogeikus, vagy föld alatti gombák, melyek többsége jellegzetes illat és aroma anyagokat tartalmaz. Különösen igaz ez a föld alatti aszkuszos gombákra, így a valódi szarvasgombákra (*Tuber*), melyek közül kettő, a francia szarvasgomba és a nyári vagy burgundi szarvasgomba (*Tuber aestivum* Vittad.) termesztése, a mikorrhiza-gombák között egyedülálló módon, széles körben és sikeresen folyik. Ennek köszönhetően igen fontos „modellszervezetnek” számítanak a mikorrhiza-kutatás körében. Nem véletlen hogy a *T. melanosporum* volt a második EM gomba melynek elvégezték a teljes genom szekvenálását (Martin *et al.* 2010), és hogy a még ültetvényes módszerrel sem termesztethető isztriai szarvasgombát (*T. magnatum*

Pico) számos vonatkozásban intenzíven kutatják (Vita *et al.* 2013; Salerni *et al.* 2014; Zampieri *et al.* 2014). Ezek mellett, a legértékesebb szarvasgomba fajok biológiájának sokrétű és egyre intenzívebb kutatását számos új konferencia is jelzi (Águeda *et al.* 2014; Urban, 2010).

Noha az első ültetvények megjelenése óta már közel százötven év eltelt (Olivier *et al.* 2012), és napjainkban világszerte több tízezer hektáron telepített szarvasgomba-ültetvényről történik valamelyik szarvasgombafaj évről évre történő begyűjtése, még mindig sok kérdés van a legjobban kutatott fajoknál is. Ilyenek a szarvasgombák életciklusával kapcsolatos szaporodási, és mikorrhiza-képzési stratégia kérdései mellett a sok, nem eléggé ismert biotikus és abiotikus környezeti tényező, melyek megválaszolására legkönnyebben a természetes élőhelyek kutatásával kaphatunk választ. Életfeltételeik mind jobb megismerését követően, egyre nagyobb és biztosabb termést hozó ültetvényeken termeszthetjük e fajokat, akár a jelenlegi elterjedési területükön kívüli, de nekik megfelelő körülmények között is. Ezzel kapcsolatosak az idegenhonos, esetlegesen invázióssá váló fajok, bio- és vagy filotípusok, valamint kontamináló ágensek behurcolásával okozott problémák, melyek felderítésére, és kezelésére is megoldást nyújthat a fajok terjedésének mind jobb megismerése.

A fentiekkel ellentétben, még sokkal kevesebbet tudunk a gazdasági szempontból kevésbé értékes, ezért kevésbé is kutatott föld alatti gombafajok taxonómiájáról, ökológiai, és környezeti igényeikről, valamint elterjedési mintázataikról. A legtöbb föld alatti gomba megismerése, még csak rendszertani besorolásuk, és élőhelyeik felkutatásánál tart, mivel tudományos megismerésükhöz elsőként a fajok lehatárolását, elkülönítését, majd leírását célszerű elvégezni. Ezek után nyílik mód elterjedési mintázatukat, élőhelyi igényeiket, ökológiai szerepüket, és más élőlényekkel alkotott interakciójukat vizsgálni. Ezen ismeretek megszerzése fontos lehet a gazdaságilag értékesebb fajok termesztéstechnológiájának tökéletesítéséhez, például a leggyakoribb kontamináló ágensek megismerésén keresztül. Ugyanakkor az eredmények hozzájárulhatnak a fajok védelmi státuszának megítéléséhez, esetleges védelmi stratégiájuk kidolgozásához is.

Nagy változásokkal jár a nagygombák körében is jelentkező taxonómiai revíziós hullám, melyhez alapot az egyre olcsóbb, megbízhatóbb és elterjedtebb nukleinsav-szekvenáláson alapuló molekuláris filogenetika eszköztára biztosít. Ennek köszönhető, hogy ugyan a nagygombákra sokáig úgy tekintettek, mint kozmopolita fajokra, ma már több, jól ismert gombáról kiderült, hogy eddig hitt őshonos elterjedése csak egy jóval kisebb területre korlátozódik (Lumbsch *et al.* 2008). Ennek fő oka, hogy morfológiai bélyegek alapján leírt

fajok esetében, azok különböző, vagy akár egy azon földrajzi területről származó egyedeiről molekuláris vizsgálatok alapján, vagy a faj revidálása révén gyakran bebizonyosodott, hogy több különböző fajhoz tartoznak (Taylor *et al.* 2000). Nincs ez másképp a föld alatti gombák körében sem, ahol számos, fajcsoportokat, nemzetségeket revidáló munka jelenik meg, melyben klasszikus taxonómiai módszerekkel leírt fajokat molekuláris filogenetikai módszerek segítségével vonnak egybe, választanak szét, vagy javasolják kriptikus/pszeudokriptikus fajként kezelésüket (pl.: Bonito *et al.* 2010a, Stielow *et al.* 2011). Habár a kriptikus és pszeudokriptikus fajok taxonómiai kezelése még nem kiforrott, a föld alatti gombáknál alig használt. A fentiek alapján érthető, hogy a föld alatti gombák elterjedésének, környezeti igényeiknek, és ökológiájuk vizsgálatához is fontos a valós fajok ismerete, melyek elkülönítéséhez elengedhetetlenek a nagy földrajzi távolságokból származó, nagy mintaszámú molekuláris módszereken alapuló filogenetikai vizsgálatok.

2. Irodalmi áttekintés

2.1 A föld alatti gombák és evolúciójuk

A gombák körében, a föld alatti vagy hipogeikus (angol/ógörög: hypogeous, hypogaeous, hypogaeal) kifejezést csak a viszonylagosan nagy, termőtestet képző - nagygomba - fajokra értjük, melyek termőtest képzése részben vagy teljesen a föld, vagy avar felszín alatt történik meg (Hawker, 1954). A termőtestek fajtól, és talajtól, környezettől függően közel gömbölyűtől az egészen lebenyesig, néhány milliméteres nagyságtól egészen több tíz centiméteres mérettartományig előfordulhatnak.

A hipogeák törzsfán való elhelyezkedésének, azok alaktani, strukturális (perídium, spóra) és életmódbeli jellegzetességeinek megértéséhez, ezek által elterjedési mintázatuk, rövid és hosszú távú terjedésük vizsgálatához elengedhetetlen evolúciós múltjuk ismerete, és áttekintése. Evolúciójuk megértésében fontos mérföldkőnek számított leszármazási kapcsolataik feltárása, melyet molekuláris filogenetikai vizsgálatok segítségével sikerült megbízhatóan alátámasztani. Ennek eredményei alapján a föld alatti termőtest konvergens evolúció eredménye, mely megjelent mind az aszkuszos és bazidiumos gombák körében számos, egymástól független leszármazási vonalon. Mégis történetileg, illetve módszertani megfontolásból, érdemes őket együtt kezelni.

A jellemzően szél általi spóraterjesztésre evolválódott epigeikus (föld feletti) gombák termőtesteit, így a spóra produkciót, nagymértékben befolyásolja az időjárás. A fagy, vagy szárazság azelőtt degradálhatja a termőtesteket, mielőtt a spóráképzés beindulhatna. Ennek kivédésére számos leszármazási vonalon (pl. agarikoid és boletoid csoportokban) kialakultak ún. „sequesterate”, zárt termőtest típusok (Thiers, 1984), melynek többek között előnye a lecsökkentett külső felület miatti kisebb vízvesztés kedvezőtlen körülmények között. A zárt formák közül a „gasteroid” teljesen zárt, melynek belsejében a spórákat tartalmazó gleba található. Az ehhez vezető úton számos, különböző lépcsőfokon megrekedt alakkal lehet találkozni, melyeket „secotoid” névvel illetnek. Így az „sequestrization” folyamatról más és más stádiumokat képviselő taxonok árulkodnak, melyek különböznek a tönk, vagy maradványának meglétében, a kalap kiterülésének mértékében, és a tráma felismerhetőségében.

A föld alatti gombafajok is mind a fent említett kényszerek és evolúciós folyamat révén gömbölyödhetnek le, és kerültek a föld alá. Tedersoo *et al.* (2010) szerint az EM gombák körében legalább 30 független leszármazási vonalon (37 aszkuszos, és 57 bazidiumos

nemzetségben) jelentek meg zárt termőtestformák. A kedvezőtlen klimatikus hatások miatt (pl.: extrém fagy, meleg, szárazság) azok a kezdetben eredetileg epigeikus termőtestformák terjedtek el, melyek kevésbé emelkedtek ki a földből, míg egészen földfelszín alatti termőtest alakult ki (Trappe *et al.* 2001). Az egyes leszármazási vonalakon kialakult első föld alatti formák után elindulhatott a hipogea fajok adaptív radiációja. Ugyanis a megváltozott életkörülményekhez több téren adaptálódni kellett. A termőtestek közel gömb alakú, kompakt tömör, de levegős állományt képezve alakulnak ki, melyet a legtöbb taxonban jellegzetes, erős perídium vesz körül, ezzel is adaptálódva az új környezeti viszonyokhoz. Továbbá, csak akkor van értelme a spórák kedvezőtlen környezeti hatások elleni védelmének, ha közben a hatékony terjesztés is kialakul. A szél útján történő spóraterjesztés lehetőségének elvesztését más módszerrel kellett helyettesíteni. Így a hipogeaák többségének különleges illata, vagy színe alakult ki melyekkel magukra vonják a figyelmet a legkülönbözőbb állatsoportok egyedei közül is. A feltűnő szín elsősorban madarakat (Trappe & Claridge 2010), míg az aroma anyagokkal való csalogatás kis- és nagy emlősöket, illetve rovarokat használja terjesztő vektorként (Luoma *et al.* 2003). Az állatok a termőtestek elfogyasztása révén terjesztik a spórákat, melyek a bélcsatornán átjutva csírázó-képesek maradnak, vagy még inkább azzá válnak (Lamont *et al.* 1985; Trappe & Claridge 2005). Az évenkénti újra kolonizációt is biztosító helyi spórabank fennmaradását a termőhelyén elrothadó termőtestek biztosítják, amelyek spóráit rövidtávon a talajfauna tagjai (giliszták, csigák, ugróvillások, stb.) terjeszthetnek. Közepes távú terjedést tesznek lehetővé a kisemlősök, melyek pár hektáros körzetben képesek a spórák terjesztésére (Trappe & Claridge 2005). Hosszú távú terjedésre elsősorban a nagy emlősök (vaddisznó, őz stb., Piattoni *et al.* 2013) és a rovarok képesek. A rovarok kiemelten fontos szerepet kapnak a föld alatti gombák terjesztésében, mivel csak köztük találhatunk erre specializálódott fajokat, mint az *Agaricophagus*, *Bolbelasmus*, *Colenis*, *Hydnobius*, és *Leoides* nemzetség tagjait, melyek, mind az emésztőrendszerükben, mind a felületükre tapadva képesek spórákat szállítani (Bratek *et al.* 2001b; Bratek *et al.* 2010).

Fontos kiemelni, hogy a föld alatti gombafajok döntő többsége ektomikorrhiza-képző faj, mely alapján Tedersoo *et al.* (2006) úgy gondolta, hogy a Pezizales renden belül az ektomikorrhiza-képzés a föld alattivá válás előfeltétele. Jóval alaposabb irodalmi áttekintés alapján ez nem feltétlenül igaz minden leszármazási vonalra (Tedersoo *et al.* 2010). Mégis a legtöbb, gazdaságilag, így kutatás szempontjából is fontos hipogea faj ektomikorrhiza-képző, így a gazdanövényük megléte és szüksége nem elhanyagolható tényező. Ennek szép példája a Tuberaceae család, mely radiációja feltehetően a korai zárvatermő, kétszikű növényekével

együtt történhetett (Bonito *et al.* 2013). A fentiekből következően, a föld alatti gombák elterjedési mintázatainak, tér és időbeni terjedésük értelmezéséhez figyelembe kell venni mind a terjesztő vektorok, mind a gazdanövények terjedését.

2.2 *Tuber* nemzetség jellemzése

A föld alatti gombák, de még a nagygombák közül is kiemelkedő jelentőséggel bírnak a *Tuber* nemzetség fajtái, az úgynevezett valódi szarvasgombák. Népszerűségüket a nemzetségben található néhány rendkívüli organoleptikus tulajdonságokkal rendelkező, ezáltal gasztronómiaailag, és gazdaságilag is fontos fajnak köszönhetik (Hall *et al.* 2007). A gazdasági jelentőség érthető, ha csak a legkeresettebb fajok piaci árát tekintjük. Például a francia szarvasgomba ára a kétezres évek elején 700-1500 €/kg körül mozgott, ami egyes becslések szerint összességében 66,6 millió € forgalommal járt csak Franciaországban a 2000-2001-es szezon alatt (Murat, 2004). Az isztriai szarvasgomba 2012. évi átlagos ára Olaszországban 2800-3800 €/kg. Míg a gyűjtésben nem szereplő Amerikai Egyesült Államok 2009. évi piaci árai a legdrágább három fajra nézve a következők voltak: *T. brumale*: 660 \$/kg, *T. melanosporum*: 1760 \$/kg és *T. magnatum*: 5060 \$/kg Bonito *et al.* (2010b).

A csak föld alatti termőtestet képző fajokat tartalmazó *Tuber* nemzetség az Ascomycota törzs Pezizales rendjébe tartozó Tuberaceae (Hibbett *et al.* 2007) legdiverzebb nemzetsége, melyet Micheli 1729-ben írt le. A nemzetség fajgazdagságáról eltérő becslések, adatok léteznek. Az Index Fungorum adatbázis alapján Jeandroz *et al.* (2008) 227, míg Bonito *et al.* (2010b) 256 *Tuber* fajt, alfajt vagy változatot (*varietas*) találtak. A Mycobank 2014.04.24-ei állapota alapján 262 legitim *Tuber* faj, vagy az alatti kategória van megkülönböztetve. Wang *et al.* (2007) szerint 140 faj és 65 alfaj létezik, melyek közül hozzávetőlegesen 70-75 lehet érvényes (Hawksworth 1996; Bougher & Lebel 2001). Ceruti *et al.* (2003) rendkívül alapos munkája 35 érvényes fajleírást említ Európából. Bonito *et al.* (2010b) egész világra kiterjedő saját és GenBankból (Benson *et al.* 2012.) származó szekvenciák alapján 123 ITS filotípust talált, annak ellenére, hogy az ismert fajoknak csak kb. 70 %-a szerepelt az elemzésben. A becslés módszerétől függően minimum 180-230-ra tehető a teljes *Tuber* nemzetség fajszáma (Bonito *et al.* 2010b), melyet igazol a korábban kevésbé kutatott területeken elkezdődő fajleírási hullám. Míg 1980-ig nem is kutatták a szarvasgombákat Kínában, mostanra legalább 31 fajt írtak le, melyből néhány helyessége megkérdőjelezhető (García-Montero *et al.* 2010; Wang *et al.* 2007). Japánban 20 új

filogenetikai szarvasgomba fajt találtak, fajszám becslésekkel pedig 29-40 faj meglétét prediktálták a szigetvilágról (Kinoshita *et al.* 2011).

A *Tuber* nemzetségen belüli csoportosításokkal kapcsolatban is számos morfológiai, újabban molekuláris filogenetikai megközelítés látott napvilágot. Kezdetben Fischer (1897) bontotta két alnemzetségre, melyet Achionnak és Eutubernek nevezett. Később Knapp (1950), Gross (1987), Rioussat *et al.* (2001) morfológiai bélyegekre támaszkodva módosították a csoportok számát 2 és 6 között. Ezt követően már nukleinsav adatokra támaszkodva Wang *et al.* (2006) hét, majd Jeandroz *et al.* (2008) nyolc nemzetség alatti csoportot különít el. Megbízható több génes, és kellően széleskörű mintázással jelenleg 11 fő leszármazási vonalat lehet elkülöníteni a nemzetségen belül (Bonito *et al.* 2013).

A valódi szarvasgombák jellemzően a Föld északi féltekén őshonosak. Legszélesebb körben elterjedt a *Puberulum*-fajcsoport, melynek képviselőit ma már szinte minden kontinensen megtalálhatjuk. Vannak olyan fajcsoportok, melyek a három északi kontinensen fordulnak elő (*Rufum*, *Melanosporum*, *Maculatum* és *Macrosporum*), és olyanok is melyek csak Európában és Ázsiában fordulnak elő természetesen, mint az *Aestivum* és *Excavatum* csoportok. Ezek mellett számos fajcsoport csak 1-1 kontinensre endemikus, így a *Japonicum* (Ázsia) *Gennadii*, *Multimaculatum* (Európa), és *Gibbosum* (Amerika) (Bonito *et al.* 2013). Ugyanakkor 16 *Tuber*-fajról sikerült kimutatni, hogy természetes elterjedési területén kívüli kontinenseken, szigeteken megtelepedett, mint adventív faj (Bonito *et al.* 2010b).

Jelenlegi elterjedési mintázatuk minél teljesebb ismeretében és molekuláris filogenetikai vizsgálatokra alapozott molekuláris óra becslésekkel lehet a legjobban megérteni, és következtetni a nemzetség történeti biogeográfiájával kapcsolatos eseményekre. Molekuláris óra becslés alapján, korábbi cikkek a *Tuber* nemzetség kialakulását 271-140 millió évre teszik (Jeandroz *et al.* 2008), ezzel szemben Padovan *et al.* (2005) a *Discomycetes* I. klád létrejöttét, mely megfeleltethető a *Tuber/Peziza* elválásnak minimum 529 millió évre becsli. Több lókuszt és mintát felhasználó becslés alapján a *Tuberaceae* család közös őse feltehetően 156 millió évvel ezelőtt a késő Jurában élt, melyet kb. 141 millió évvel ezelőtt a valódi szarvasgombák közös ősének leválása követett (Bonito *et al.* 2013). A divergencia idő becslések alapján a *Tuberaceae* és a *Tuber* nemzetség kialakulása Laurázsia és Gondwana szétválása után történhetett, amely jól magyarázza a széleskörű, elsősorban Északi földrészen tapasztalható elterjedésüket. Ezt követte a *Tuberek* fő leszármazási vonalainak kialakulása, mely 65 millió évvel ezelőttre befejeződött, de radiációjuk főként csak a Paleogénben következett be (Bonito *et al.* 2013).

A *Tuber*-fajok radiációjában nem csak a kontinens-vándorlások, de a gazdanövényeik evolúciós fejlődése és migrációja is fontos tényező volt, ugyanis az EM gombák teljes életciklusának lezajlásához nélkülözhetetlen a gazdanövény jelenléte. Ősi karakterállapot-rekonstrukció alapján úgy tűnik, hogy a Tuberaceae család őse is már mikorrhiza-képző volt, mely nagy valószínűséggel, zárwatermő növényvel képezett szimbionta kapcsolatot. Ráadásul a zárwatermők korai radiációjával egybeesik a Tuberaceae család megjelenésével is. Emellett a legfőbb EM képző gazda leszármazási vonal és a *Tuber*-fajok radiációja is közel együtt történhetett (Bonito *et al.* 2013). A valódi szarvasgombákra néhány kivételtől eltekintve nem jellemző gazdaspecifitás. Eddig egyedül a Gibbosum-fajcsoport esetén sikerült nyitwatermőkre irányuló gazdaspecifitást kimutatni (Bonito *et al.* 2010ab). Széleskörű mikorrhiza-képzésre példa a *Tuber aestivum*, mely leggyakrabban a Fagaceae és a Betulaceae növény család fajaival képez ektomikorrhizát (Hall *et al.* 2007), de Pinaceae család *Picea*, *Pinus* és *Cedrus* nemzetségek egyes fajaival is bizonyítottan együtt tud élni (Chevalier *et al.* 2005). Továbbá *Tuber* mikorrhiza-képzés kísérletesen is bizonyítva lett már a Juglandaceae családba tartozó *Carya illinoensis*, Pekán dió (Benucci *et al.* 2012b) és a Cistaceae családba tartozó *Cistus incanus*, bodorrózsával is (Bustan *et al.* 2006). Emellett több alkalommal sikerült molekuláris biológiai módszerekkel erdei orchidea gyökerekből (pl. *Epipactis* spp.) *Tuber* jelenlétét kimutatni (Bidartondo & Read 2008; Ouanphanivanh *et al.* 2008).

Fontos megemlíteni néhány, már régóta használt *Tuber* nemzetségen belüli csoportosító karaktert, mint a spórák ornamentáltsága, az aszkuszonkénti spóraszám eloszlás, és a pikkelyek megléte, a termőtest színe (RiOUSset *et al.* 2001). A spóra ornamentika, lehet tüskés, hálózatos, vagy a kettő közti átmenet (spino-retikulált). A fajok döntő többsége retikulált ornamentikájú, nem meglepő, hogy az ősi karakter rekonstrukció alapján is a hálózatos spóra díszítettséget lehet ősiabbnak tekinteni. Ugyanakkor a tüskés (vagy spinoretikulált) spóraornamentika is legalább két leágazási vonalon, egymástól függetlenül kialakult, a *Rufum-Melanosporum* és a *Tuber panniferum* Tul. & C. Tul. vonalon (Bonito *et al.* 2013).

A következőkben bemutatásra kerülnek azok a valódi szarvasgomba fajok melyekkel részletesebben foglalkoztunk, többek között kitérve azok jelentőségére, rendszertani helyzetére, morfológiai sajátosságaira.

2.2.1 *Tuber brumale* – téli szarvasgomba

A téli szarvasgomba (*Tuber brumale* Vittad.) gasztronómiai és gazdasági szempontból is az egyik legjelentősebb szarvasgomba faj. Ezt bizonyítja, hogy francia piacokon csak a *T. melanosporum* és *T. brumale* fajokat illetik a “szarvasgomba” jelzővel (Douet *et al.* 2004). Ugyancsak gasztronómiai megbecsültségét mutatja kiváló organoleptikus tulajdonsága, melyben szintén közel áll a *T. melanosporum*hoz (Kiss *et al.* 2011). Nem véletlen, hiszen valóban viszonylag közeli rokona a francia szarvasgombának. A *T. brumale* is ektomikorrhiza-képző (Giomaso *et al.* 2002), de a nemzetség legtöbb fajához hasonlóan nem gazdaspecifikus faj (Hall *et al.* 2007; Chevalier *et al.* 2005). Egyike azon *Tuber*-fajoknak melyek adventíven, eredeti élőhelyüktől távol is megtelepedtek (Bonito *et al.* 2010b), valamint gyakran jelennek meg ember által létrehozott szarvasgomba ültetvényekben (Olivier *et al.* 2012; Chevalier *et al.* 2005; Benucci *et al.* 2012a; Guerin-Laguette *et al.* 2012; Belfiori *et al.* 2012). Számos cikk foglalkozott már a *T. brumale* más fajokra való hatásának vizsgálatával, míg egyértelműen negatív, kiszorító hatását elsősorban szakkönyvek emelik ki (Chevalier *et al.* 2005; Olivier *et al.* 2012; Chevalier & Sourzat 2012; Sourzat, 2011). Mamoun & Olivier (1993) vizsgálatai alapján látszik, hogy a *Tuber brumale* negatív hatása az öntözési stratégiától, így a környezeti tényezőktől nagyban függ. A gazdaságilag fontos *Tuber* fajok kompetitív képessége más ektomikorrhizás fajokkal szemben különböző, amit az egyes fajok mikorrhiza-közösségeinek mennyiségi és faj-összetételbeli különbségei is mutathatnak (Belfiori *et al.* 2012).

A téli szarvasgomba a *Melanosporum* leszármazási vonal tagja, mely további két főágra bontható (Jeandroz *et al.* 2008). Az egyik a *Tuber melanosporum*, *T. regiomontanum* Guevara, Bonito, & Rodríguez (Guevara *et al.* 2008; Bonito *et al.* 2013) és *T. indicum* Cooke & Masee fajkomplexet tartalmazza, a másik a *T. pseudoexcavatum* Y. Wang, G. Moreno, L. J. Rioussset, J. L. Manjón & G. Rioussset és *T. brumale* fajokat tartalmazza. A *T. brumale* és *T. pseudoexcavatum* közös eredetére utal az ITS1 régióban történt háromszáz bp-os inzerció is (Wang *et al.* 2006). Wang *et al.* (2006) szerint a *melanosporum* klád MRCA-ja Európa és Kína között élhetett. Elsőként a *T. pseudoexcavatum* / *T. brumale* vonal vált szét, amely során a *T. brumale* őse Európa felé, míg a *T. pseudoexcavatum*é Kína felé kezdett el migrálni. Hasonló útvonalon vándoroltak, de későbbi szétválást mutatnak a *T. melanosporum* és *T. indicum* ősei, ezáltal szintén vikariáns fajpárokat alkotva. Ezzel ellentétben Bonito *et al.* (2013) szerint a *melanosporum* klád radiációja É-Amerikából, 79 millió évvel ezelőtt a Pinaceae gazdanövényekkel kapcsolatban kezdődhetett meg, amit Ázsiába és Európába való migrációjuk követett. Az európai fajok esetén észlelt alacsony nukleotid variabilitás az ázsiai

fajokkal szemben, egy erős palacknyak effektus bekövetkeztére utal, az európai fajok történetében (Wang *et al.* 2006; Murat *et al.* 2004).

A *T. brumale* a boreális, és arktikus biogeográfiai régiói kivételével szinte egész Európában elterjedt faj (Montecchi & Sarasini 2000; Ławrynowicz, 1992; Hollós, 1911). Az ember-mediált behurcolás eredményeként 1995-ben Új-Zéland szigetén is megjelent (Ho *et al.* 2008). Megítélése kettős, míg egyes országokban hiányzik, vagy ritkának tartják (Anglia, Németország, Lengyelország, és Skandinávia; Benjamin Stielow, Christina Wéden, Maria Ławrynowicz és Marie-Anne French szóbeli közlése alapján), addig más országokban gyakori, közönséges fajnak számít (Francia-, Olasz-, Magyarország, Szerbia, Románia, Szlovénia; Grebenc, 2008; Marjanović, 2008; Bratek *et al.* 2013; Alessandra Zambonelli és Gérard Chevalier szóbeli közlése alapján).

Dr. Hollós László franciaországi gyűjtések anyagai alapján ismerte a téli szarvasgombát, ennek ellenére ő maga soha nem talált. Hollós korában a faj első és egyszeri Kárpát-medencei adata, Vágújhelyről (Nyitra megye, mai Szlovákia) származik (Hollós, 1911). Később Szemere László foglalkozott hazánkban a föld alatti gombavilággal. Sok dr. Hollós László által leírt föld alatti gomba lelőhelyet felkutatott, és számtalan új termőhelyet talált, de a *T. brumale* fajt egyedül Szentgálról (1959), valamint a budapesti Hűvösvölgyből (1962) említi (Szemere, 1970). Ausztriában Anna és Kurt Mader 1968 óta tartó folyamatos gyűjtés ellenére (365 mikotéka adat) sem talált *T. brumale*-t. Urban (2008) cikke alapján csak 2000-ben találták meg először Rosaliengebirge környékén. Értékes adataink vannak még Erdélyből, ahol Misky Mihály, Pap Géza és Pázmány Dénes 1971-től kezdődő, viszonylag kis területen (2-3 település) zajló, alapos gyűjtési munkájuk ellenére (hozzávetőlegesen 360 adat) is csak 1982-ben találták először (Pázmány, 1990/1991). Ezután folyamatosan előkerült, mostanában pedig mindenhol előforduló, közönséges gombának tartják Erdélyben is (Fekete Attila szarvasgomba-kereskedő szóbeli közlése).

Vittadini a *T. brumale* leírását 1831-ben egy Milánó környékéről származó anyagon végezte el. Az 1800-as évek végén a téli szarvasgombához hasonló, de attól illatában eltérő (pézsma), fajt írtak le, a *Tuber moschatum* Bonnet fajt. Chatin (1892) szerint ez a faj csak egy változata a *T. melanosporum*-nak. Fischer (1897) szerint a *T. moschatum* a *T. brumale*-nek csak egy formája. Mattiolo 1933-as munkájában még elfogadja a *T. moschatum*-ot autonóm fajként, és mindenhol elterjedt, közönséges fajnak tartja Olaszországban (lásd Rioussset *et al.* 2001). Az izoenzim- és aminosav-polimorfizmus vizsgálatok alapján a *T. moschatum* minták egyezést mutatnak a *T. brumale* mintákkal, amely alapján felvetődött, hogy ugyanazon fajhoz

tartoznak (Gandeboeuf *et al.* 1994, 1997). A téli szarvasgomba morfológiailag igen változatos faj, amit az bizonyít, hogy számos fajleírás történt róla, pl *T. cibarium*, *T. hiemalbum*, *T. renati*, *T. moschatum*, *T. montanum*, *Oogaster brumalis* lásd Ceruti *et al.* (2003), ugyanakkor mára már a legtöbb összefoglaló munka egy fajnak tekinti a téli szarvasgombát.

2.2.2 *Tuber regianum*-szerű fajok

A *Tuber* nemzetség legkésőbb leírt európai fajai közé tartozik a *Tuber regianum* Montecchi & Lazzari (1987) és *Tuber bernardinii* Gori (Gori, 2003). Mindkét faj legbiztosabb, a többi fajtól elkülönítő jellegzetessége, a 6-8 kicsi, hálózatos díszítettségű spórákat tartalmazó aszkuszok nagy aránya. A nemzetségen belül magasnak számító spóraszám csak másik két európai fajra jellemző, a tüskés spórás *T. panniferumra*, a jóval nagyobb spórájú *T. malenconii* Donadini, Rioussset, G. Rioussset & G. Chev. fajra. A *T. regianumot*, és *T. bernardinii*t egymástól az különíti el, hogy az utóbbinak nagyobb háló szemekkel díszített a spórája, a perídiumán moniliform (lánc-szerűen egymást követő duzzanatokból álló) hifa kinövések találhatóak, a domináns aszkuszonkénti spóraszám pedig csak hét (Gori, 2003). A *T. regianum* Montecchi & Lazzari (1987) szerint rendkívül ritka, a hegyekben (1300 m tszf. magasságban), laza, gyengén savas talajokon, lombhullató fák alatt előforduló faj. Olaszországon kívüli előfordulásáról (Erdélyi-medence) Bratek *et al.* (2001) publikáltak elsőként. Az ezredforduló körüli *T. regianum* adatainak többsége alacsonyabb területekről (300-500 m tszf. magasságban) származnak (Montecchi & Sarasini 2000). Pomarico *et al.* (2007) a Basilicata régió (Dél-Olaszország) *Tuber* fajainak részletes vizsgálata során, a nem ehető fajokat összehasonlítva, lokálisan elterjedt faj kategóriába sorolják. A fajról nemzetközi adatbázisokban nincs elérhető szekvencia. Rioussset *et al.* (2001) a Macrosporium-fajcsoportba sorolja a perídium jellegzetességei miatt.

A *T. bernardinii* irodalmi adatok alapján eddig csak Olaszországban fordult elő 800-1100 m tszfm. magasságban, *Betula pendula* és *Castanea sativa* alatt. A leírása óta összesen egy helyen említik, a Velencei herbárium genotipizálása során egy *T. bernardinii*nak határozott minta ITS szekvenciája került fel a GenBank adatbázisába JF908739 számmal (Osmundson *et al.* 2013).

2.2.3 Rufum-fajcsoport

A Rufum-fajcsoport tagjai mindenhol közönségesek, gyakoriak, de kis méretük és szúrós szaguk miatt piaci értékük elhanyagolható (Iotti *et al.* 2007). Elterjedtségük ökológiai

szerepükre hívja fel a figyelmet, míg a *T. aestivum* természetes élőhelyein és ültetvényein tapasztalt gyakori megjelenése miatt nagyobb odafigyelést igényel (Iotti *et al.* 2007; Merényi *et al.* 2010b). A fajcsoport közös morfológiai jellegzetessége a kicsi, többnyire barnás-vöröses (egészen halvány sárgától feketéig) sima felszínű termőtest, mely többnyire 1-5 tüskés spóraszuszokot tartalmaz (Montecchi & Sarassini 2000). A fajcsoport tagjait a Föld északi féltékén mindenhol megtalálják, egészen Észak-Afrikáig (Jeandroz *et al.* 2008) ráadásul Új-Zéland szigetén is sikerült kimutani (Bulman *et al.* 2009).

A klád névadó fajtát, a *Tuber rufum*ot Pico 1788-ban írta le elsőként. Azóta számos, ebbe a csoportba tartozó fajleírás készült, melyet Ceruti *et al.* (2003) *T. rufum*, *T. ferrugineum* Vittad. és *T. nitidum* Vittad. autonóm fajkként foglalnak össze, melyekhez rendre 23, 2 és 9 szinonímet gyűjtöttek össze. A gyakorlatban a *T. rufum*ot spóra alapján két változattal (var. *rufum* és var. *apiculatum*), valamint a termőtest szín alapján három formával (f. *ferrugineum*, f. *lucidum*, f. *nitidum*) különítik el (Montecchi & Sarassini 2000). Ezek mellett néhány Amerikai fajt is leírtak, mint a *T. candidum* Harkn., *T. quercicola* J. L. Frank, Southworth & Trappe és a *T. texense* Heimsch (Wang *et al.* 2007). Illetve Kínában is írtak le három fajt, így a *T. huidongense* Y. Wang, *T. liaotongense* Y. Wang és *T. taiyuanense* B. Liu (lásd Wang *et al.* 2007). Molekuláris taxonómiai vizsgálatok alapján a *Tuber* nemzetség egyik leginkább fajgazdagabb kládjá, melyben még legalább huszonöt leíratlan faj tartozik, amik közül tizenháromat csak mikorrhizából mutattak ki (Bonito *et al.* 2010b).

2.3 A *Genea* nemzetség jellemzése

Carlo Vittadini (1831) által leírt lyukas szarvasgombák, vagy likastriflák (Halász *et al.* 2007) nemzetsége a *Genea* Vittad. a valódi szarvasgombák mellett az egyik leggyakoribb, bár étkezési szempontból jelentéktelen aszkuszos föld alatti gomba csoport. Több lókuszos filogenetikai elemzés alapján a *Genea* nemzetség a Pyrenomataceae család tagja (Hansen *et al.* 2013). A termőtestek általában kicsik, barnák-feketék, melyekben egy vagy több belső üreg található. Az aszkuszok általában nyolc, egymás mellett egy sorban elhelyezkedő (uniseriate), papillákkal ornamentált spórákat tartalmaznak (Montecchi & Sarassini 2000).

A nemzetségben hozzávetőlegesen 35 érvényes fajleírás létezik. A Mycobank adatbázisa (2014. június 10-ei állapotában) 39 legitim fajleírást, és még 13 faj alatti kategóriát különít el. Ezzel szemben Montecchi & Sarassini (2000) Európa hipogeáit összefoglaló munkájában mindössze hét fajt említ. Smith *et al.* (2006) pedig hat *Genea*-faj meglétéről ír

Észak-Amerikában. Ázsiából mindössze három fajról van publikált adat (Zhang, 1991). Az egész nemzetségre kiterjedő molekuláris taxonómia revíziót még nem végeztek.

2.4 Hipogeák kutatásának története és térképezésük

Egyes források szerint már a Bibliában is találhatunk föld alatti gombákra való utalásokat (Hollós, 1911; lásd Shavit, 2014), de az ókori görögök és rómaiak már biztosan foglalkoztak, és számos elméletet hoztak létre e furcsa lények eredetével kapcsolatban (Renowden, 2005). Ugyanakkor hipogeikus gombákról az első tudományosnak tekinthető strukturális leírásokat John Ray végezte, amit 1682-ben megjelenő művében közölt. Nagyobb fellendülést a XVIII-XIX. század néhány kiváló természettudósa hozott, úgymint C. H. Persoon, E. M. Fries, C. Vittadini, A. J. C. Corda és L. R. & C. Tulasne. Ők fektették le a föld alatti gombákról akkoriban rendelkezésre álló ismeretanyag alapjait, melyet a számos, azóta is érvényes fajleírás is bizonyít. A föld alatti gombák kutatása egyre népszerűbbé vált a XX. század során, melyről többek között A. Knapp, F. Bucholtz, és L. Hollós munkássága tanúskodik. De más kontinenseken is elindultak a hipogea kutatások, így É-Amerikában H.W. Harkness, H. M. Gilkey, C. W. Dodge és S. M. Zeller munkájának köszönhetően (Hawker, 1954).

A Kárpát-medence föld alatti gombáinak első világhírű magyar kutatója dr. Hollós László, aki szinte a Kárpát-medence egész területét bejárta, gyűjtött és kapott is számos föld alatti gombát. Hollós (1911) összegzi korának ismert föld alatti gombaadatait, az élőhelyek részletes leírásával. Összesen 52 fajról gyűjtött közel 460 adatot. A *Tuber aestivum* és *Choiromyces meandriformis* Vittad. addig ismert lelőhelyeit egy Magyarország térképen ábrázolta, mely térképet a világ első gombatérképei között tartják számon. Szemere László, már 86-ra emelte a hazánkban megtalálható hipogea fajok számát. Saját gyűjtéseinek és megfigyeléseinek eredményeit dr. Hollós László korábbi adataival együtt, azt összegezve közölte (Szemere, 1965, 1970). A környező országok közül Ausztriában történt komolyabb gyűjtő munka Kurt Mader és Anna Mader részéről. Gyűjtőmunkájuk alatt, 1950-től 1999-ig 365 mikotéka adatot deponáltak. Erdély területén, elsősorban Székelykeresztúr, Rugonfalva és Kolozsvár környékén 1969-től 1988-ig, közel 360 föld alatti gombagyűjtést regisztráltak Misky Mihály, Pap Géza és Pázmány Dénes (Pázmány, 1990/1991).

A múlt század viszontagságai után, az 1990-es évektől kezdődően a kárpát-pannon régió több országában is felélénkült a gombák, így a szarvasgombák iránti érdeklődés is, melyet több, gombákkal foglalkozó közhasznú egyesület létrejötte is jelez. Hazánkban,

kezdetben az 1992-ben megalakult Magyar Mikológiai Társaság (MMT) fogta össze a szakmai és amatőr szarvasgomba iránt érdeklődőket. Az egyre növekvő érdeklődésnek köszönhetően 1997-ben megalakult az Első Magyar Szarvasgombász Egyesület (EMSZE), melyet számos kisebb szarvasgombákkal foglalkozó egyesület megalakulása követett. A létrejövő szakmai szervezetek, egyesületek vezetésével a hipogeikus gombák térképezése, az anyagok herbáriumi deponálása is sokat haladt előre. Az egyre népszerűbbé váló, kutyával történő szarvasgomba-vadászatnak köszönhetően a föld alatti gombák gyűjteményekben deponált anyagainak száma az évek során egyre inkább nőtt. Ami nagyban hozzájárult az egyik legnagyobb hipogea gyűjtemény (mikotéka) az 1990 óta folyamatosan bővülő, dr. Bratek Zoltán kezelésében lévő EMSZE-mikotéka létrejöttéhez és bővüléséhez.

A természetrajzi táruk (herbáriumok, mikotékák) ezres, milliós nagyságrendben tartalmazzak különféle módszerekkel tartósított élőlényeket későbbi vizsgálat, összehasonlíthatóság céljából, mely nem csak az élőlények rendszerezéséhez, de azok elterjedési, ökológiai stb. vizsgálataihoz is nagymértékben hozzájárulnak. Ráadásul a formálisan leírt fajok típusanyagait is ilyen gyűjteményekben deponálják. A természetrajzi táruk kezelése rendkívül idő- és energia igényes, melyet nagymértékben megkönnyíthet, és gyorsíthat a kapszulák (herbáriumi/mikotéka anyag) adatainak adatbázisba rendezése. Ehhez nagy segítséget jelentenek a már mindenki számára elérhető számítógépek, szerverek, melyek lehetővé teszik, hogy nagy mennyiségű, azonos minőségű adatot strukturáltan adatbázisokba rendezzünk, könnyebb kezelhetőség, lekérdezés vagy szerkesztés érdekében. Tovább növeli a herbáriumok felhasználhatóságát a herbáriumi ívek digitalizálása, és internetes közzététele, mely nagyban segíti akár külföldi kooperációkban megvalósuló biogeográfiai, taxonómiai, florisztikai/fungisztikai munkákat (Barkworth & Murrell 2012; Takács *et al.* 2014). Egy következő lépés lehet, a gyűjtemények anyagainak nagy léptékű genotipizálása is, melyet például a Velencei Természettudományi Múzeum (Museo di Storia Naturale di Venezia, Olaszország) mikotékájával végeztek. Közel 5000 nagygomba anyagból próbáltak ITS szekvenciát nyerni, melyből több mint 1100 szekvenciát sikerült a GenBankba is feltölteniük (Osmundson *et al.* 2013). Egy másik példa, az angliai Royal Botanic Gardens (Kew), gombatár egy kis részének (279 minta) ITS szekvenálása rávilágított, hogy a szekvencia alapú fajhatározás korában milyen szerepe van ezen gyűjteményeknek. A kapott szekvencia minták ~70%-a faji szinten nem szerepelt a GenBank adatbázisában, míg a minták ~12%-a csak környezeti mintavételből származó szekvenciához illeszkedett 97%-os hasonlósági határ mellett. A gyűjtemények legnagyobb szerepe abban áll, hogy a nemzetközi adatbázisokba termőtestekkel is alátámasztott referencia szekvenciákat szolgáltatson, hogy a rengeteg új,

akár környezeti mintavételből származó szekvenciát legyen mihez hasonlítani (Brock *et al.* 2008).

2.5 Fajkonceptiók, kriptikus, pszeudokriptikus fajok a gombák körében

Fajdiverzitásukból adódóan, feltehetően a gombák alkotják a második legnagyobb, leginkább fajgazdagabb országot (*regnum*) az eukarióta szervezetek közül (Blackwell, 2011; Mora *et al.* 2011; Schoch *et al.* 2012). A Dictionary of Fungi első kötete 1943-ban megközelítőleg 38000 “jól” leírt faj meglétéről ír, míg ez a szám, az utolsó, 2008-as kötetre már 97330-ra duzzadt (Kirk *et al.* 2008). A kutatókat mindig is érdekelte, hogy összesen hány faj élhet a Földön, amely megbecsléséhez, az addig megismert fajok számát, a kutatottságuk intenzitását, vagy más csoportok fajszerkezetét stb. használták fel (Mora *et al.* 2011). A múlt század közepe felé 100-250 ezerre (Ainsworth & Bisby 1943), míg a vége felé már 1,5 millióra (Hawksworth, 1991) becsülték a gombák fajszerkezetét. Ugyanakkor a már DNS adatokat (környezeti mintavétel) is felhasználó becslés alapján 3,5 és 5,1 millió közé tehető a *regnum* fajszerkezetének száma (O’Brien *et al.* 2005). A teljes fajdiverzitás megismerésén, becslésén túl a fajok egymástól való elkülönítése elengedhetetlen a biogeográfiai, ökológiai, makroevolúciós, és konzerváció biológiai kutatásokhoz (lásd Sites & Marshall 2003). A hibás fajhatárok és ezáltal téves diverzitás-becslések teljesen félrevezető eredményeket adhatnak diverzifikációs, ökoszisztéma, és fajképződési folyamatok megértésében, vagy akár faj és élőhely védelmi prioritások, ezáltal a kezelések megválasztásában is (Dayrat, 2005).

Hogyan dönthetjük el, hogy mely élőlények tartoznak külön fajokhoz, és melyek még ugyanahhoz a fajhoz? A kérdés megválaszolása korántsem egyszerű, melyet már Darwin véleményéből is sejthetünk: “Azzal a számos meghatározással sem foglalkozom, amelyeket a faj fogalmára korábban adtak. Egyik meghatározás sem elégítette ki az összes természetkutatót, de azért minden természetkutató homályosan tudja, hogy mire gondol, ha fajokról beszél.” (Darwin, 1859) Továbbá erről tanúskodik a nagyszámú, fajkonceptiók témakörében megjelent írás is (lásd Sites & Marshall 2003). Mayden (1997) 24 fajkonceptiót mutat be, melyeket elsődleges, és másodlagos fajkonceptiókra különít el. A legelfogadottabb elméleti koncepciónak az evolúciós fajkonceptiót (ESC) tartják, melyet úgy definiálnak, hogy “egy populáció leszármazottai, melyek fenntartják identitásukat a többi populáció leszármazottjaitól, és melyek saját evolúciós történettel és tendenciával rendelkeznek” (Wiley, 1978). Ahogyan az elsődleges fajkonceptiókra jellemző, az ESC sem tesztelhető, nem lehet a definíció alapján fajokat azonosítani. Ezért szükség van másodlagos, gyakorlati

fajkonceptiókra, melyek mind az ESC-t próbálják felismerni. Ezek közül a gombák körében leggyakoribbak a morfológiai fajkonceptió (MSC), a biológiai fajkonceptió (BSC) és a filogenetikai fajkonceptió (PSC). A három másodlagos fajkonceptióhoz három gyakorlati (*operational*) fajfelismerés tartozik, melyeket sorban morfológiai, biológiai és filogenetikai faj észlelésnek nevezhetünk (MSR, BSR, PSR) (Taylor *et al.* 2000).

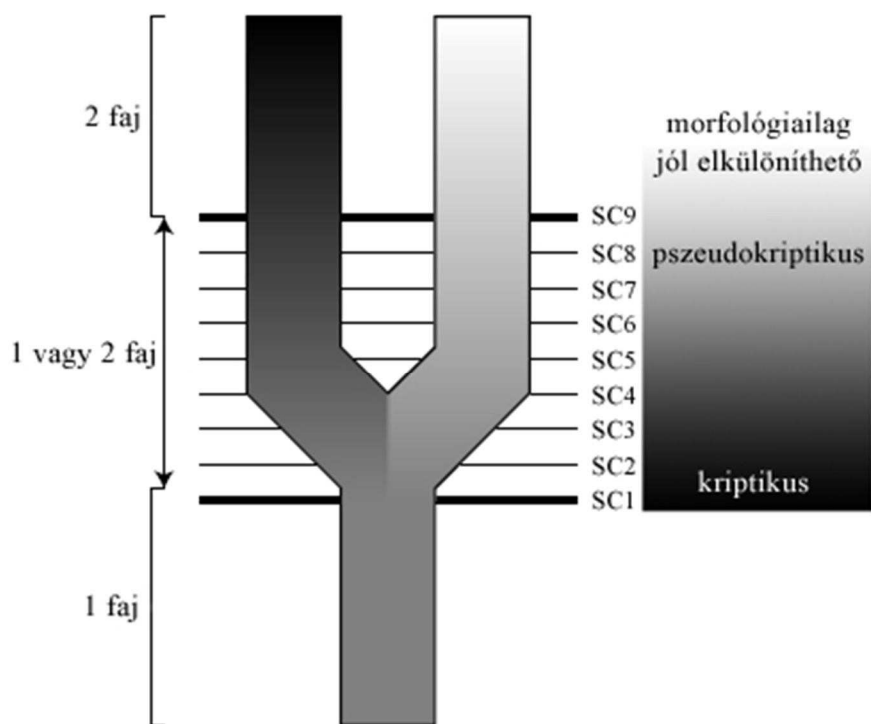
A gombák körében is a klasszikus morfológián alapuló faj észlelés (MSR) a leginkább elterjedt módszer. Szinte minden leírt gombafaj e kritériumok alapján lett leválasztva fajtársairól (Hawksworth *et al.* 1996) és még napjainkban is a leírt fajok döntő többségét csak fenotípusos jellegek alapján különítik el (Hibbet *et al.* 2011). A módszer előnye elterjedtségében és látszólagos egyszerűségében rejlik, hiszen a korábban leírt fajok anyagai, leírásai összevethetőek a potenciálisan új fajok mintáival. Az MSR hátránya hogy sokszor jóval kevesebb faj mutatható ki vele, mint a BSR vagy PSR módszerekkel (Taylor *et al.* 2000).

A mikológiában szintén népszerű, mivel egyes esetekben könnyen tesztelhető a biológiai fajkonceptió. Biológiai faj alatt “potenciálisan vagy ténylegesen egymás közt szaporodó természetes populációk csoportját értjük, melyek reprodukciójukban izolálódtak más hasonló csoportoktól” (Mayr, 1942). Egzaktsága ellenére számos hibával terhelt, a homotallikus gombák problémakörétől kezdve, az ivartalan alakokon át egészen az aktuális, potenciális génáramlás közötti különbség okozta problémákig. A föld alatti, még inkább a valódi szarvasgombák esetében a BSR legnagyobb hátránya, hogy ektomikorrhiza-képző fajok lévén rendkívül nehezen izolálhatók, és tarthatók fenn *in vitro* tenyészetekben, így párosodási tesztek végzése szinte lehetetlen.

Filogenetikai fajkonceptióból is számos verzió született már (Mayden, 1997), de mindegyik meghatározásban közös a monofiletikusság fontossága, melyet a közös leszármaztatott karakterek meglétével vagy hiányával lehet megállapítani. Napjainkban leginkább molekuláris adatokon, nukleinsav szekvenciákon alapuló filogenetikai elemzéseket készítenek, melyen alkalmazni lehet a PSR-t. A fixálódott gén különbségek, és reciprok monofília amellyel diagnosztizálható a PSC. Egy vagy több lókuszon tapasztalt közös allélek hiánya, a populációk között már régóta megszűnt génáramlásra utalnak, ezáltal elégséges kritériumnak tűnik, hogy segítségével csoportokat diagnosztizáljunk (Frankham *et al.* 2012). A PSR hátránya, hogy nem tudhatjuk hol, mely klasztereknél húzzuk meg a faj határokat, mivel nem tudhatjuk, hogy a tapasztalt variabilitás az intraspecifikus, vagy interspecifikus. A szubjektivitás elkerülhető, ha egyszerre több lókuszt konkordanciáját vizsgáljuk, melyet gén-

genealógiai konkordanciának neveznek (Baum & Shaw 1995). Ennek lényege, hogy a több, nem kapcsolt lókuszt alapján elkészített fatopológiák azon szakaszai, amelyek egybevágnak (konkordálnak) még fajok közötti szakaszt takarnak, míg ahol ez a hasonlóság már nem áll fenn, ott fajon belüli géncsere történhetett, tehát fajon belüli variabilitást látunk. Több lókuszt használata azért is indokolt, mert több esetben bebizonyosodott, hogy egy lókuszt alapján készített génfa nem egyezik meg a valóságnak feltételezett fajfával, mely probléma több lókuszt együttes használatával kiküszöbölhető (Degnan & Rosenberg 2009).

A különböző fajkonceptiók használatából adódó eltéréseket legjobban az az összegzés szemlélteti, mely szerint a gombák körében 300%-os, míg a zuzmók esetén 259% fajszám növekedést lehetett megfigyelni, különböző fajkonceptiók használata miatt. A többi élőlénycsoporthoz képest a változás ennél a két csoportnál a legszámtöbb, mely a nehézkes, rendezetlen taxonómiájuknak is köszönhető (Agapow *et al.* 2004). Elsősorban a molekuláris filogenetikai vizsgálatok, és filogenetikai fajkonceptió alkalmazásával sikerült számos új fajt felfedezni. Ugyanis a génekben (vagy neutrális lókusztokon) a mutációs változások jóval előbb észlelhetőek, mint a fajok párosodásában vagy fenotípusos jellegeiben megmutatózó valós különbségek. Bár sokszor ez okozhatja, hogy az egy lókuszt alapuló elemzések a valóstól eltérő, félrevezető topológiát mutatnak (lásd fajfa, génfa probléma). Ráadásul az ősi polimorfizmusok több millió generációval a speciáció után is fennmaradhatnak (Mallet & Willmott 2003). A BSR és MSR-el az elválaszthatóság időbelisége sem egyértelmű, ugyanis elképzelhető olyan eset, amikor a reprodukív izoláció már megtörtént, de ezt nem követte külső morfológiai vagy anatómiai bélyegeken megnyilvánuló változás. Ellenkező eset is előfordulhat, amikor például egy barrier meggátolja a populációk közti génáramlást, ezáltal morfológiai változások történnek közöttük, de a potenciális párosodási képesség még nem szűnik meg közöttük. Mindebből kitűnik De Queiroz (2007) által felvázolt séma és elképzelés igazsága, miszerint az egyes fajkonceptiók, és hozzájuk tartozó fajkritériumok idő és esemény függően más és más lépéseit képesek észlelni a fajképződésnek. Van olyan eset, amely előtt még minden fajkonceptió egy fajnak gondolja, és van olyan, amikor már mindegyik két szeparálódott leszármazási vonalnak, két fajnak tartja (1. ábra). A köztes zónában az egyes fajkonceptiók és kritériumok eredményei gyakran ellentmondhatnak egymásnak, melyet fajkonceptió problémának nevez (De Queiroz, 2007).



1. ábra: A fajképződés sematikus folyamata, ahol a vízszintes vonalak (SC1-SC9) jelölik a különböző faj kritériumokat (*Species Criterion*). A vízszintes vonalak elhelyezkedése szimbolizálja, hogy a fajképződés más-más lépését tudják észlelni a faj kritériumok (morfológiailag megkülönböztethetőek, reciprok monofília áll fenn, reprodukciósan inkompatibilisek, ökológiailag különbözőek stb.). Az SC1 előtt mindegyik faj kritérium egy fajnak gondolja, míg az SC9 után már mindegyik két fajnak, a kettő közötti zónában van a konfliktus a kritériumok között. Az ábra jobb oldalán található fekete-fehér átmenetes rész a morfológiai megkülönböztethetőséget szimbolizálja, amiből látható, hogy a kriptikus/pszeudokriptikus, és morfológiai bélyegek alapján jól elkülöníthető fajok a fajképződéssel egy időben, folytonosan alakulhatnak át. Az ábra de Quieroz (2007) cikkében található ábra alapján készült kisebb módosításokkal.

Az újabbnál újabb tapasztalati faj lehatároló módszerek (SD) kifejlesztése 2006-2008 óta rohamosan fejlődik (Camargo & Sites 2013) elsősorban, a koaleszcencia és filogenetika tárházán alapuló szofisztikált, számítógépes szoftverek fejlődése révén. Többek között ilyen a barcoding alapú módszer (ABGD: *Automatic Barcode Gap Discovery*; Puillandre *et al.* 2012), mely a párosított nukleotid különbségek kialakította eloszláson keres hiátusokat, mely az intra és interspecifikus variabilitás határát jelölheti. Ezután a detektált értékek szerint csoportosítja a mintákat.

2.6 Kriptikus, pszeudokriptikus fajok problémája

A morfológiai és molekuláris filogenetikai fajlehatároló módszerek együttes alkalmazhatóságának meghiúsulására egyre több példa van, melyet elsősorban az úgynevezett

kriptikus (rejtett) fajok problémája okoz. Erre jó példa a tudományos közlemények címében szereplő „kriptikus faj” szókapcsolat megléte, mely 2000 és 2011 között konstans módon növekszik, a 20 cikk/évtől a 90 cikk/évig (Camargo & Sites 2013). Kriptikus fajnak nevezzük azokat a fajokat (kettő vagy több), melyek tévesen egy fajnév alá lettek osztályozva (Bickford *et al.* 2007). Jelen gyakorlatban ez azt jelenti, hogy a molekuláris módszerekkel egyértelműen támogatott, egymással nem keveredő filogenetikai fajok morfológiai bélyegeken semmilyen elkülönítést nem mutatnak. A jelenségre már jóval korábban fény derült, melyet Mayr (1942) „testvérfajoknak” (sibling species) nevezett el (Sáez & Lozano 2005). Etimológiailag a sibling fajok fogalma inkább utal közeli rokonságukra, mint a kriptikus fajok, mely terminus csak morfológiai hasonlóságukra összpontosított (Knowlton, 1986).

Kriptikus fajokat leggyakrabban trópusi esőerdőkben, vagy tengeri élőhelyeken fedeznek fel, továbbá van néhány élőlény csoport, mint a kétéltűek, ízeltlábúak vagy gombák, melyek közt nagy számban bukkannak rájuk (Bickford *et al.* 2007). Nem meglepő hogy már jó néhány nagygomba, és valódi szarvasgomba faj esetén is mutattak ki kriptikus fajokat (Bonuso *et al.* 2009; Chen *et al.* 2011). Azonban számos esetben kiderült, hogy kriptikusnak vélt fajok nem, vagy csak részben kriptikusak (Sáez *et al.* 2003; Van de Putte 2010; Cornils & Held 2014). Ezen fajok már pszeudokriptikussá válnak, mivel részletes, mélyre menő vizsgálódás (pontosabb mérések, újabb karakterek bevonása) révén sikerült morfológiai különbségeket találni a filogenetikai fajok között (Knowlton, 1993; Sáez *et al.* 2003). Habár sok esetben ezek a bélyegek nem könnyen észrevehető, elektronmikroszkópos vizsgálódást igénylő (Sáez *et al.* 2003; Orive *et al.* 2013) vagy speciális szoftverek segítségével igénybe vevő karakterek (Arribas *et al.* 2013).

2.7 A Morfológiai és a molekuláris filogenetikai módszerek ellentmondásai

Mint láttuk, a DNS alapú, molekuláris faj lehatárolási módszerek sok esetben jelentősen átírták a klasszikus, morfológiai bélyegeken alapuló osztályozást. Ennek megfelelően számos fajcsoport, nemzetség leszármazási viszonyait revideáló, filogenetikai fajokat tucatjával elkülönítő, nem ritkán több lókuszon alapuló molekuláris filogenetikai munka születik. Ugyanakkor Carstens *et al.* (2013) alapján, e megbízható munkáknak kevesebb mint 30%-a ad taxonómiai ajánlást, vagy fajleírást, melynek oka lehet a SD módszerekben való bizalom hiánya, vagy a módszerek okozta ellentétek feloldásának nehézsége, melyet tovább erősít a fajleírások szakmai alábecsültsége is.

A nagy átteresztőképességű szekvenátoroknak, és az ezeket felhasználó molekuláris ökológiai munkáknak köszönhetően a környezeti mintákból származó molekuláris operatív rendszertani egységek (MOTU) rutinszerű detektálása rendkívüli mértékben megnövekedett, melyet jól mutat, hogy a 2010-ben a GenBankban elérhető szekvenciák már 33%-a környezeti mintavételből származott. Néhány, környezeti mintavételre alapuló munka tanulságai alapján a vizsgált MOTUk 32-85%-a feltehetően még leíratlan, tudomány számára új faj. Ennek megfelelően szükség mutatkozik a MOTUk elnevezésére, és formálisan leírására, vagy legalább taxonómiai adatbázisokba elhelyezésére. Ezért Hibbett *et al.* (2011) azt javasolják, hogy a MOTU-kat is el lehessen nevezni, mivel így sokkal könnyebb lenne a kezelésük, és számos ökológiai, biogeográfiai, filogenetikai vizsgálatba lehetne bevonni azokat. Az elnevezésük legfőbb akadálya, hogy nem lehetne típusanyagot deponálni. Reynolds & Taylor (1991) jóval korábbi javaslata szerint erre megoldást nyújthatna, ha egy DNS kivonat lenne a típusanyag. A molekuláris alapú határozást szorgalmazza a DNS vonalkód (DNA barcode) rendszer is (Hebert *et al.* 2003), melynek célja hogy egy előre meghatározott DNS szakasz segítségével minden fajt be lehessen azonosítani. A módszer alapelve, hogy a használt lókuszt minden fajban eltérő, és csak rá jellemző, diagnosztikus szekvencia legyen.

A fent említettek mellett, morfológiai bélyegek alapján, formálisan leírt gombafajok száma átlagosan évente ~1200-ra tehető. Ha változatlanul fennáll ez a fajleírási ütem a gombák teljes fajszáma vonatkozó becslések alapján, az összes faj leírásához legalább 1-4 ezer évre lenne szükség (Hibbett *et al.* 2011). Ráadásul az újonnan leírt fajok 74,4%-át még tisztán morfológiai bélyegek alapján különítik el, amely számos hibalehetőséget rejt. A konvergens evolúció során létrejövő analóg bélyegek, a hibridizáció, és pleomorfizmus jelensége, melyek mind félrevezető osztályozáshoz vezethetnek (Hibbett *et al.* 2011). További nehézségeket okoz a kellően nagy mintaszám biztosítása (ritka fajok, munkaerő-, időhiány), a mérés szubjektivitása, a nagy intra- és interspecifikus morfológiai variabilitás, valamint a folytonos karakterek kezelése (Padial *et al.* 2010). Ennek ellenére számos szerző úgy véli, hogy a morfológiai leírást még nem szoríthatják ki a molekuláris fajlehatároló módszerek, melyek inkább csak eszköztárként szolgálhatnak taxonómiai döntésekhez (Mallet & Willmott 2003; Steele & Pires 2011). A morfológiai fajleírások melletti fő érvek, hogy csak ez érhető el az emberek nagytöbbségének (Wiens, 2007; Marie-Stephane, 2013), emellett olcsó és gyorsabb határozást tesz lehetővé (Dayrat, 2005). Ráadásul a látható külső jellegek sokkal érdekfeszítőbbek, mint szekvenciákat olvasni (Mallet & Willmott 2003). Végeredményben ez oda vezet, hogy habár egyre több a molekuláris módszerekkel felismert új filogenetikai faj,

arányaiban egyre kevesebb a formálisan leírt faj, melyhez morfológiai elkülönítés is tartozik (Hutsemékers *et al.* 2012; Oliver & Lee 2010).

A morfológiai és molekuláris alapokon nyugvó faj elkülönítés közti konfliktus hozta létre az integratív taxonómiát is. Integratív taxonómia alatt az élet diverzitási egységeinek számos, egymást kiegészítő módszer (filogeográfia, összehasonlító morfológia, populációgenetika, ökológia, fejlődésbiológia, viselkedésbiológia) segítségével való elkülönítést értik (Dayrat, 2005). A fajleírások lassú üteme nem csak a gombák körében észlelhető, ugyanakkor a taxonómusok túlzott sürgetésével csak a helytelen, használhatatlan fajleírások számát gyarapítanánk. Így az integratív taxonómia célja nem elsősorban a fajleírás, mint inkább a faj lehatárolás, számos kritérium vizsgálatával és diszciplína alkalmazásával, mellyel reményeik szerint, elérhető időn belül fel tudják majd térképezni a földi diverzitást (Padial *et al.* 2010). Schlick-Steiner *et al.* (2010) három pontban foglalja össze az integratív taxonómia feladatát, szükségességét: (i) mivel a tisztán morfológiai alapú fajlehatárolás számos esetben félrevezető eredményt hozott, szükség van más módszerekre is; (ii) ha a morfológia megbízható is, más megközelítések jelentősen segíthetik és gyorsíthatják a fajleírást; (iii) különböző megközelítési módok a tisztán fajleíráson túl más ökológiai, evolúciós folyamat feltárására is lehetőséget nyújtanak. Ezáltal az integratív taxonómia nem kizorítani szeretné a klasszikus morfológiai bélyegeken alapuló rendszertant, csak annak lassú haladását felgyorsítani számos, különböző módszer ötvözése révén, egy szigorúbb leválasztási eljárást létrehozva.

2.8 Molekuláris filogenetika

A filogenetika lényege evolúciós kapcsolatokra történő következtetés, melyre a különböző organizmusok közötti jellegek összevetése által juthatunk. Zuckerkandl és Pauling (1965) világított rá, hogy a nukleinsavak és fehérjék szekvenciája gazdagon szolgáltatnak információt az evolúciós események feltárásához. Ugyanis ortológ (azonos evolúciós eredetű és funkciójú) szekvenciák minden egyes építőköve egy karakternek fogható fel, mely külön leszármazási vonalakon megegyezhet, vagy eltérhet (informatív hely, lásd PIS). Az összevetéshez szükséges, hogy a homológ nukleotid helyeket egymás alá rendezzük, ami az illesztés (*alignment*) folyamata. Könnyen belátható, ha az illesztés hibás, és nem homológ nukleotid helyek kerülnek egymás alá, a későbbi elemzések eredménye teljesen félrevezető lesz. Ebből az információ tömegeből, mely jóval kiterjedtebb a morfológiai karakterekkel nyerhetőnél, lehet következtetni a rokonsági kapcsolatokra. A kép sajnos nem ennyire

egyszerű. Számos olyan mutáció léphet fel, mely nem, vagy helyesen észlelhető, például a többszörös, koincidens, parallel, konvergens, és back mutáció (lásd Ari, 2012). Ezen jelenségek hosszú távon mutációs telítéshez, ezáltal a filogenetikai jel gyengüléséhez vezetnek (Moreira & Hervé 2010). A probléma részbeni kiküszöbölésére nyújtanak segítséget a nukleotid szubsztitúciós modellek, melyek becslése a szekvencia adatainkból történik, és leírja, hogy mely nukleotidok milyen valószínűséggel alakultak át egy másikká, ezáltal ki lehet számolni, hogy milyen valószínűséggel alakulhatott át a teljes szekvencia egy másikba.

A filogenetikai rekonstrukció következő lépése a fa-készítő algoritmus(ok) kiválasztása, melyeket két fő csoportját szokták emlegetni, úgymint távolság alapú, és karakter alapú fakészítő módszerek. Az előbbi lényege a szekvenciák alapján kiszámolt távolságmátrix ábrázolása (pl. Neighbor Joining), míg az utóbbiak a konkrét karakterek alapján számolják ki a legvalószínűbb fatopológiát (Maximum Parsimónia: MP, Maximum Likelihood: ML és Bayes-féle módszer). Ezt követően, vagy inkább ezzel egyidejűleg a filogenetikai fa elágazásainak megbízhatóságát szokták tesztelni melyre számos módszer áll rendelkezésre.

A módszerek és azon belüli választási lehetőségek számából is sejthetjük, hogy nem létezik olyan filogenetikai eljárás, amely minden szempontból, az összes fajra és lókuszra tökéletes lenne, ezért egy adatsoron több eljárást is érdemes kipróbálni (Ari, 2012). Továbbá belátható, hogy a valós evolúciós eseményeket tükröző fa megismerése lehetetlen, hisz már csak recens fajok részleges, sok esetben „felülírt” szekvenciáiból próbálunk következtetéseket levonni, mely így csak feltételezett (*inferred*) fát eredményezhet (Pevsner, 2009).

A teljes filogenetikai rekonstrukció döntő, egyben kezdő lépése is a vizsgálandó lókusz kiválasztása. Mindenképpen csak olyan génszakaszok alkalmasak, melyek egy kópiában vannak jelen, vagy úgy viselkednek, és közös őstől származnak, így a köztük felhalmozódó különbségek fajképződési (speciációs) folyamatokat tükröznek, azaz ortológok (Doyle & Gaut 2000; Avise, 2004). Továbbá, annak függvényében kell megválasztani a megfelelő „felbontású” lókuszt, hogy korábbi (nemzetségek, rendek stb.) evolúciós folyamatok vagy fajok, esetleg intraspecifikus kapcsolatok szintjén szeretnénk megbízható eredményeket kapni. Előnyt jelenthetnek a neutrális öröklődés alatt álló szakaszok is, melyekre nem vagy csak kevésbé hat a szelekció (Doyle & Gaut 2000). Nem elhanyagolható szempont a lókusz felsokszorozhatóságának egyszerűsége és sikeressége, vagy népszerűsége sem.

Gombák körében minden szempontból az egyik legjobbnak tartott régió a nukleólusz organizációs központban lokalizálódó, riboszómális géneket kódoló génszakasz, melyből egy sejtben akár több ezer fej-farok tandem ismétlődés is előfordulhat. A nagy kópiaszám ellenére paralógia csak ritkán mutatkozik, mivel egymással összehangoltan evolválódnak, ún. „*concerted evolution*” révén (Naidoo *et al.* 2013). A nagy kópiaszám miatt a régió felszaporíthatósága (amplifikálhatósága) jóval könnyebb. Az rRNS gének szerveződése az eukariótákon belül jellegzetes és konzervatív: a 18S, 5,8S és 28S rRNS-ek génjeiről a transzkripció során egyetlen RNS molekula íródik át, mely tartalmazza a gének közötti nem kódoló régiók másolatát is. A splicing során kivágódó, a három fent említett exont egymástól elválasztó szakaszokat „*internal transcribed spacer*” (ITS) nevezik. Az 5.8S gén előttit ITS1 míg az az utánit ITS2-nek, együttesen a hármat pedig röviden ITS régiónak rövidítik. Az ITS1 és 2 közel neutrális öröklődésmenetűnek tekinthető, ezért jóval variábilisabb, mint a kódoló régiók, melyek funkciójukból adódóan igen konzervatívak. Egyes szerzők szerint *Tuber* fajokban intraspecifikus kapcsolatok feltérképezéséhez is kellően variábilis (Gandeboeuf *et al.* 1997), melyet jól mutat a teljes ITS régió hossz diverzitása is, ami ~400-860 bp között változik a nemzetségen belül (Bonito *et al.* 2010b). A 28S gént kódoló nagy alegység-régió (*large subunit*, LSU-nak is szokták rövidíteni), mely konzervatív jellegénél fogva kiválóan alkalmas távolabbi rokonsági viszonyok feltárására, ahol az ITS régió már nem is illeszthető biztonsággal. A két régió (ITS és LSU) egymással erősen kapcsolatos, így nem számítanak független lókusznak a gén geneológiák vizsgálata szempontjából sem. A már korábban említett barcoding gap törekvés a potenciálisan használható lókuszek közötti különbségtételben, és összevetésben is fontos eredményekkel szolgált, mely alapján szintén az ITS és LSU szekvenciák a legalkalmasabbak a gombák molekuláris alapú határozására (Schoch *et al.* 2012).

A multigénes filogenetikai vizsgálatokhoz számos fehérje kódoló, sokszor egy kópiában jelen levő háztartási (housekeeping) gén áll rendelkezésre, így az RNS-polimeráz II legnagyobb alegysége (RPB2), a minikromoszóma-hibajavító protein (MCM7), a β -tubulin (tub), a proteinkináz-C (PKC) az elongációs faktor (EF-1) stb., melyek taxontól függően eltérő hatékonysággal felszaporíthatók. A valódi szarvasgombák körében a leggyakrabban használt nem riboszómális, de nukleáris genomi lókuszek az RPB2, Ef-1, β -tubulin, és PKC.

A molekuláris filogenetika születésével szorosan összefügg a molekuláris óra néven emlegetett hipotézis létrejötte is, amely szerint minden génnek, vagy fehérjének van egy konstans molekuláris evolúciós rátája (Zuckerlandl & Pauling 1965; Margoliash, 1963). Az elméletre alapozva, adott lókuszt mutációs rátájának ismeretében, két faj ezen lókuszában

történt mutációk alapján következtetni lehet a szétválásuk óta eltelt időre. Gyakorlatban, egy kalibrációs pont (fosszília, földtörténeti, vagy filogeográfiai esemény) idejének ismeretéből, melyet szolgáltathat például paleontológiai kormeghatározás, viszonyítani lehet a kérdéses szétválási időre. Számos elemzés után rájöttek, hogy az eredetileg felvázolt ún. “*strict molecular clock*”- hipotézis sok esetben sérül, így jelentősen torzul a becslés. Ilyen faktorok a fajok közötti eltérő generációs idő, populáció méret, természetes szelekció intenzitása, vagy egyszerűen fajspecifikus különbségek, mint ökológiai, molekuláris vagy evolúciós történeti eltérések (Ayala, 1999). Ezért kifejlesztették az ún. relaxált molekuláris órát (*relaxed molecular clock*) (Sanderson, 1997; Drummond *et al.* 2006), mely statisztikai megközelítésének köszönhetően figyelembe veszi az evolúciós ráta variabilitását az eltérő leszármazási vonalakon, így jóval pontosabb időbecslést tesz lehetővé.

A gombák köréből, a rossz fosszilizálódási esélyeik miatt, rendkívül kevés ősmaradványt ismerünk. A fossziliák hiánya miatt evolúciójukra csak pontatlan, és bizonytalan időbecslés tehető. Ezért a gombák divergencia-idejét külső, állati fosszilis leletek alapján próbálták kalibrálni (Berbee & Taylor 2010; Heckman *et al.* 2001) Föld alatti gomba-fosszília sem maradt fenn, és rendszertani értelemben polifiletikus csoport lévén, evolúciós történetük, fossziliák és molekuláris divergencia időbecslés terén is elsősorban az aszkuszos és bazídiumos gombáknál tapasztaltakra támaszkodhatunk. Például a Pyronemataceae családról semmilyen maradvány, vagy korábbi idő kalibrált filogenetikai munka sem áll rendelkezésre. Szerencsésebb a helyzet a valódi szarvasgombák körében, ahol már komoly, több génen is alapuló molekuláris óra becslések történtek (Jeandroz *et al.* 2008; Bonito *et al.* 2013; lásd fentebb).

2.9 Filogeográfia

A filogeográfia számos diszciplína (a molekuláris biológia, genetika és az ökológia) ismereteit ötvöző tudomány, melynek célja hogy a populációk szerkezetében létrejövő térbeli és időbeli változásokat vizsgáljon molekuláris biológiai módszerek felhasználásával, és olyan történeti eseményeket tárjon fel, melyeknek szerepe lehet az egyes leszármazási vonalak jelenleg tapasztalt földrajzi elterjedésében (Avice, 2000). Módszertanából kifolyólag alig húsz évvel ezelőtt publikálták az első filogeográfiai cikkeket, és csak az elmúlt évtizedben vált igazán népszerű tudománnyá (Beheregaray, 2008). Az európai fajok jelenlegi elterjedés mintázatának kialakításában a legutolsó jégkorszaknak lehetett a legfontosabb szerepe. Ismert jelenség, hogy a jégkorszakok ideje alatt az egyes élőlények refúgiumokba szorulnak vissza.

Az utolsó jégkorszak leghidegebb periódusában (16.000-10.000 évvel ezelőtt) feltehetően három jelentősebb refúgium (Balkán, É-Olaszország, Spanyolország) lehetett Dél-Európában ahová az élőlények visszahúzódhattak (Hewitt, 1996; Taberlet *et al.* 1998; Hewitt, 1999; Hewitt, 2000; Petit *et al.* 2003; Murat *et al.* 2004).

Filogeográfiai módszereket csak nagyon kevesen használtak a mikológia területén (Lumbsch *et al.* 2008), ezt bizonyítja, hogy amíg 1987-től 2006-ig filogeográfia témakörben 3049 cikk született, addig gombák filogeográfiájával csak 13 cikk foglalkozott (Beheregaray, 2008). Föld alatti gombák közül elsősorban a valódi szarvasgombákról készültek ilyen elemzések, melyek az egész nemzetséggel (Bonito *et al.* 2013) vagy csak egy-egy fajjal, sokszor csak kis területen foglalkoznak (Sica *et al.* 2007; Rubini *et al.* 2005, Murat *et al.* 2004). Eltérően a növényektől és állatoktól, a gombáknál szinte kizárólag sejtmagi genom szakaszt használnak filogeográfiai vizsgálatokhoz, ahogy ez Martin *et al.* (2002), Chapela & Garbelotto (2004), Nilsson *et al.* (2003), Geml *et al.* (2006) munkájában is látható.

3. Célkitűzések

Az eddigiekből is kitűnik, hogy más gomba taxonokhoz hasonlóan, a föld alatti gombák taxonómiai, ökológiai, és filogeográfiai ismerete is jelentős hiányosságokkal terhelt, melynek felszámolását nagymértékben nehezíti a fajkonceptiós probléma. A felsorolt hiányosságok csökkentését nagyban segítik a hosszú ideje gyűlő gombatárak, mikotékák, melyek anyagot, és adatot szolgáltatnak a molekuláris biológiai, morfológiai, és ökológiai munkákhoz is.

Így elsődleges célunk volt az EMSZE mikotéka-anyagokhoz tartozó, különböző típusú adatokból egy könnyen kezelhető és frissíthető, komplex módon lekérdezhető adatbázis létrehozása. Emellett folytattuk az adatgyűjtést, monitorozást a ritka, vagy egy-egy területre újonnan megjelenő föld alatti gombafajok észlelése végett is. Az újonnan megtalált fajok közül a *T. regianum* aff. mintáknál tapasztalt nagy morfológiai variabilitás okára szerettünk volna rájönni részletes morfológiai és filogenetikai vizsgálatokkal.

Az elmúlt cca. 25 évben deponált hipogeák adatai alapján értékelni szerettük volna az adatbázist területi és taxonómiai feldolgozottság alapján. A molekuláris taxonómiai revidiálást igénylő taxonok közül külföldi kooperációkban, párhuzamosan többnek is elkezdődött a filogenetikai, morfológiai feldolgozása, melyből jelen dolgozatban csak a *Genea* nemzetség és *Rufum*-fajcsoport eddigi eredményei kerülnek bemutatásra.

A jelenlegi állapotok, és a XX. század első felében végzett megfigyelések tükrében hipogea taxonok adatgyakorosság változásának vizsgálatát is célul tűztük ki. A jelentős adatgyarapodással rendelkező téli szarvasgomba földrajzilag minél szélesebb körű mintázása révén részletes filogenetikai elemzését hajtottuk végre. Vizsgáltuk a fajkomplex genetikai és földrajzi mintázata közötti összefüggéseket, mellyel részben Kárpát-medencei eredetére kerestük a választ. A jelentős számú genotipizált minta lehetőséget nyújtott arra, hogy ennek példáján vizsgáljuk a pszeudokriptikus fajok morfológiai karaktereinek jellegét, használhatóságát, azok mintaszám függő viselkedését. A már letisztázódott fajhatárokkal rendelkező, vizsgálatainkban szereplő taxonoknál számos ökológiai, környezeti igény vizsgálatát és összevetését is elvégeztük.

4. Anyagok és módszerek

4.1 Föld alatti gombák gyűjtése

Jelen munka elkészítéséhez dr. Bratek Zoltán gondozásában lévő EMSZE hipogea gyűjteményében deponált föld alatti gomba termőtestek, és azok gyűjtési adatai szolgáltattak alapot, melyet több esetben más európai gyűjteményből származó anyag, vagy nemzetközi adatbázisokban elérhető szekvencia egészített ki. A tematikus, egy-egy taxonra, területre irányuló gyűjtések mellett minden megtalált, vagy EMSZE tagok által behozott hipogea deponálásra került, annak érdekében, hogy teljesebb képet kaphassunk a Kárpát-medence föld alatti gombavilágáról. A hipogea termőtestek begyűjtése betanított triflászkyuták segítségével történt.

Munkacsoportunk gyűjtőútjai során a lelőhelyek GPS (*Global Positioning System*) koordinátáit feljegyeztük, emellett a termőfoltokon talajmintavétel, és botanikai felvételezés is történt. A talajmintát a termőtest 10-20 cm-es környezetéből az A-talajrétegből (a felső, egyenletesen humuszosodott szint) vettük, melyet a Fejér Megyei Kormányhivatal Növény- és Talajvédelmi Igazgatóság laborjaiban elemeztek. A legtöbb esetben az alábbi paraméterek mérése történt meg: pH(H₂O), pH(KCl), KA (Arany-féle kötöttség), só, CaCO₃, humusz, NO₃-NO₂-N, P₂O₅, K₂O, Ca, Mg, Mn, Na, Zn, Cu, SO₄-S. A frissen gyűjtött talajok pH-meghatározását Bohus (1984) szerint végeztük Orion model 420 (Orion Research Inc., USA) vagy WTW InoLab pH Level 2 (WTW, Németország) laboratóriumi pH-mérőkészülékkel.

A botanikai felvételezéseket dr. Tóth Sándor és dr. Bratek Zoltán végezték, mely során feljegyzésre kerültek a gombafészek központtal kijelölt 10 m × 10 m-es kvadrátokon előforduló növénytaxonok és azok borítás adatai. A gypszint növényfajainak borításadatai kívül minden szint összes borítás adata és a lombkorona és cserjeszint magasság adatai is szerepelnek az adatok között. Prof. dr. Simon Tibor elvégezte a cönológiai adatok alapján az egyes felvételek szüntaxonómiai besorolását Borhidi (2003), Soó (1981), Simon (2000) és az erdélyiek esetében Donita *et al.* (1992) alapján.

A begyűjtött gomba termőtestek pontos vagy provizórikus határozását részletes makromorfológiai jellemzés egészítette ki, ahol az alábbi paraméterek felvétele történt meg: termőtestek mérete, alakja és illata, perídium és gleba jellegzetességei és színei a Colour Identification Chart (Royal Botanical Garden of Edinburgh, 1969) alapján. Ahol szükséges, a spórák és a perídium mikroszkópos jellemzőivel is kiegészítettük a morfológiai jellemzést.

A legtöbb hipogea határozását Montecchi & Sarasini (2000) alapján végeztük, azonban néhány nemzetség esetén újabb határozókulcsokat vettünk figyelembe (Stielow *et al.* 2011; Knudsen & Vesterholt 2012). A latin gombanevek esetén az Index Fungorum (CABI 2014) adatbázisában szereplő neveket, míg a magyar gombanevek esetén Halász *et al.* (2007) munkáját követtük.

Mind a mikotéka anyagok morfológiai vagy molekuláris összevetéséhez, mind pedig a mintázott terület kiterjesztéséhez szükséges volt, hogy külföldről is rendelkezünk termőtestekkel, ami munkától függően többféleképpen történt. Számos országot összefogó kooperáció esetén a morfológiai vizsgálatokat mindenki a saját mintáján végezte el, így csak az adatok és szekvenciák cseréje történt meg (pl. *Genea* nemzetség), míg más esetekben a termőtesteket küldték el teljes vizsgálatra (*T. foetidum*, *T. regianum*, *T. bernardinii*, *T. brumale*). A külföldről származó termőtesteket Alessandra Zambonelli, Amer Montecchi, Benjamin Stielow, Chriss Chrysopoulos, Diamandis Stephanos, Gérard Chevalier, Joseph Maria Vidal, Lamberto Gori, Salem Shamekh és Stanislav Glejdura bocsátották rendelkezésünkre.

4.2 Adatbázis létrehozása

A Kárpát-medence, de elsősorban Magyarország területéről az elmúlt, közel 25 év alatt összegyűjtött föld alatti gomba gyűjtemény adataiból egy Microsoft Access alapú adatbázist hoztunk létre. Az adatbázis kialakításánál figyelembe vettük, hogy ne csak az integrált, komplex lekérdezéseket lehessen egyszerűen elvégezni, hanem a folyamatosan gyűlő adatok felvitel is bárki számára könnyen kivitelezhető legyen. Ezek érdekében számos tábla van összekötve egyedi azonosító kódok alapján, így a gombák gyűjtési adatait, földrajzi koordinátákat, szintenként a növény cönológiai felvételek adatait, a Flóra Adatbázis 1.2 (Horváth *et al.* 1995), és a talajanalitikai mérések adatait tartalmazó táblák. A hibák elkerülése végett a gomba és növény fajneveket, valamint a növény cönológiai társulások neveit az adatbázisba felvitel során csak egy előre megadott listából lehet kiválasztani. A cönológiai felvételekben szereplő növényfajok a hipogea adatbázisba a Flóra Adatbázis 1.2 (Horváth *et al.* 1995) nevezéktana alapján kerültek be.

4.3 Hipogeák gyakoriságának változása

A föld alatti gomba taxonok gyakoriság változásának értékeléséhez dr. Hollós László (1911) és Szemere László (1970) publikált adatai, valamint a hipogea adatbázis lekérdezései

lettek felhasználva. A statisztikai elemzések esetén csak azokat a taxonokat vettük figyelembe, melyekből az elmúlt száz évben legalább hét találat volt. Továbbá ki lett zárva néhány taxonómiaiilag rendezetlen, problémás taxon (*Rhizopogon*, *Hysterangium*, *Gautieria*, föld alatti *Russulales*-ek stb.), míg mások csak fajcsoport (*Excavatum*, *Rufum*), aggregátum (*T. brumale* aggr., *Tuber borchii* aggr.) vagy nemzetség szintű (*Genea* spp., *Pachyphloeus* spp.) összevonással szerepeltek. A kizárások és összevonások után 33 taxon maradt, melyek előfordulási adatai le lettek kérdezve az adatbázis 2014. 06. 05-i állapotában. A dr. Hollós László és Szemere László által feljegyzett föld alatti gomba adatokat összevonva kezeltük, ezzel elérve nagyobb mintaszámot, ami reprezentálja a XX. század elején és közepén gyűjtött hipogéák találati arányát. A korábbi és az elmúlt 24 évben tapasztalt föld alatti gomba gyakoriságok közti eltérés mértékét χ^2 - és Fisher-féle egzakt próbával teszteltük, melyeket az R 3.0.2 programcsomag segítségével végeztünk el (R Core Team 2014). A különböző módszereken alapuló próbák a most tapasztalt gyakoriság, és a várt gyakoriság eltérését vizsgálják. Azért lett mindkét teszt elvégezve, mert kis mintaszám esetén az erre korrigált Fisher-féle egzakt próba ad pontosabb eredményt.

4.4 Vizsgálatba vont taxonok

4.4.1 Kevés adattal rendelkező, adott területre újonnan megtalált hipogéák

Egy adott területről újonnan előkerülő, illetve a kevés adattal rendelkező hipogéák, ugyan gyakoriság szempontjából statisztikailag nem vizsgálhatók, adataik mégis több szempontból fontosak (terjedés, konzervációbiológia). Az újonnan megtalált fajok észlelése nem csak természetvédelmi szempontból fontos, esetleges adventív, invazív hatások feltérképezése szempontjából, hanem egy-egy területen megtalálható teljes fajszámot is a „ritkán előkerült” fajok mennyiségéből lehet becsülni (Burnham & Overton 1978; Chao, 1984). Bratek *et al.* (2001a) ritka, Kárpát-medencére új hipogéáit összefoglaló publikációja óta, újonnan, vagy nagyobb mennyiségben előkerült és már vizsgálatba vont mintákat/fajokat részletezzük, kiegészítve egy Finnország mikótájára új, ám kutatócsoportunk által vizsgált mintával.

- *Tuber foetidum* Vittad.: 2006. 11. 26-án Finnországban, Lahti közelében egy *T. foetidum*ra emlékeztető gombát találtak, melynek vizsgálatát, morfológiai, és molekuláris azonosítását kutatócsoportunk végezte el. A minta ZB3454-es számmal került deponálásra a hipogea adatbázisba, ITS szekvenciája pedig FN568055 szerepel a GenBank adatbázisában.

- *Gymnomyces* sp.: 2013. 10. 29-én Tiszaszőlős közelében (GPS koordináták: 47.53053°, 20.69425°), egy ültetett nyarasban (*Populus x. euramericana*) talált hazánkban eddig ismeretlen föld alatti gomba (ZB4998).
- *Tuber regianum*-szerű minták: Az igen ritka *T. regianum* és *T. bernardinii* fajok Magyarországról eddig nem kerültek elő, legközelebbi ismert lelőhelyük Erdélyben, valamint Olaszországban volt. Egy magyarországi gyűjtőút során, 2011. 07. 06-án négy különböző élőhelyen is begyűjtésre került elsőként *T. regianum*nak határozott termőtest. A lelőhelyek mind a Szigetköz kistájon belül találhatóak, ami a Duna egy szakasza mentén 110-126 m tszf. magasságban húzódik.

Újabb *T. regianum*-szerű termőtestet sikerült begyűjtenünk 2012. 07. 07-én a Mecsek-hegység északkeleti lábánál, Kárászon (ZB4559). A begyűjtött mintákhoz cönológiai és pedológiai adatok is kapcsolhatók. A morfológiai és molekuláris összevetéshez, azonosításhoz számos, más országból származó *T. regianum* és *T. bernardinii* termőtestet vontunk a vizsgálatokba, így a 2005-ben kutatócsoportunk tagjai által az Északnyugati-Kárpátok belső vonulatainál (Szlovákiában) gyűjtött (ZB3044, ZB3081), a már részben publikált Romániából származó (ZB1303, ZB3657) (Bratek *et al.* 2001a), valamint a Spanyolországból, és Olaszországból, a fajok leírótól származó termőtesteket (6. táblázat).

A GenBank adatbázisában elérhető egy *T. bernardini*inek határozott minta (JF908739), mely feltehetően a *Melanosporum*-fajcsoportba tartozik (itt nem bemutatott BLAST, és filogenetikai elemzések), az általunk talált, és a leírók által küldött *T. regianum* és *T. bernardinii* mintáinkkal csak kismértékű egyezést mutat (85,4-86,4%). Továbbá a szekvencia rossz illeszthetősége, és rövidege miatt a további elemzésekben nem szerepeltettük.

- *Elaphomyces personii*: A 2006-ban védetté nyilvánított *Elaphomyces personii*nak Magyarországról egy adata volt ismert a Bakonyvidékről. A Hegyközi-dombságban (Zemplén) 2009. 07. 04-én Hegyessy Gábor, Hegyessy Sándor és Podlussány Attila újabb *E. personii* aff. anyagokat gyűjtött. Útmutatásának köszönhetően 2010., 2011. és 2013. nyarán újabb termőtesteket és zempléni lelőhelyeket sikerült találni. A termőtestek határozása Montecchi & Sarassini (2000) alapján történt. A ZB4866-os mintából ITS régió szekvenálás történt, mellyel a morfológiai határozást kívántuk ellenőrizni.

4.4.2. Revízióra váró hipogeák

Számos föld alatti gomba taxon vár molekuláris alapokon nyugvó revízióra, melyek közül csak kettő taxon bemutatására kerül sor. Az itt bemutatott munkák közel sem tekinthetők teljesnek, vagy befejezettnek, sokkal inkább az első megtett lépéseknek.

Genea nemzetség: A *Genea* nemzetség revíziója dr. Pablo Alvarado (Alvalab, Spanyolország) vezetésével spanyol, francia, olasz, görög, magyar, amerikai kooperációban zajlik, melyben munkacsoportunknak feladata volt a közel 30 magyarországi anyag ITS szekvenciájának előkészítése, két új faj leírásához a morfológiai mérések elvégzése, és az LSU szekvenciákból molekuláris óra becslés elkészítése. Ezért elsősorban csak e munkák eredményei kerülnek bemutatásra.

Rufum-fajcsoport: A Rufum-fajcsoport revízióját dr. Benjamin Stielow-al (CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, Hollandia) közös kooperációban kezdtük el. Így itt csak az eddigi sikeres ITS szekvenálások, és a nemzetközi szekvencia adatbázisokból letöltött minták alapján készült előzetes farekonstrukciók kerülnek bemutatásra, melynek célja mindössze az automata barcoding gap elemzéssel (ABGD) kapott eredmények igazolása.

4.4.3 Nagy adatgyarapodást mutató téli szarvasgomba

A téli szarvasgomba részletes filogenetikai vizsgálatához széleskörű, az eddig ismert elterjedési területét legnagyobb mértékben lefedő mintázást próbáltunk megvalósítani, melyhez a „Föld alatti gombák gyűjtése“ című fejezetben említett külföldi kutatók nagy segítséget nyújtottak. Európa-szerte összesen 196 helymegjelöléssel rendelkező mintával dolgoztunk, melynek kisebb részét (58 minta) nemzetközi szekvencia adatbázisokból töltöttünk le, nagyobb részét mi genotipizáltuk. Az európai mintákon kívül egy új-zélandi és két iráni szekvenciát is bevontunk az elemzésekbe.

A filogenetikai vizsgálatokhoz három sejtmagban kódolt lókuszt lett bevonva, az ITS régió, az ezzel szorosan kapcsolt LSU régió, valamint az előzőekkel nem kapcsolt PKC variábilis régiója. A 108 legalább egy lókuszt megszekvenált, és 28 RFLP-vel meghatározott saját mintát 58 db GenBankból származó minta egészítette ki, így a filogenetikai elemzésekhez összesen 152 minta ITS régiója, 31 minta LSU régiója és 24 minta PKC régiója lett bevonva, míg az egyes típusok földrajzi ábrázolását, és az area-rekonstrukciót 196 mintával végeztük el.

4.5 DNS izolálás, PCR és szekvenálás

A DNS kinyerését száraz vagy friss termőtestből, a QIAGEN cég DNeasy plant mini kit, vagy a Geneaid cég Genomic DNA Mini Kit (Plant) használatával vittük véghez, a gyártó utasításait követve, az alábbi módosításokkal: a gyufahegynyi termőtest darabokat és a kezdő puffert tartalmazó Eppendorf-csöveket folyékony nitrogénbe merítettük, teljes átfagyásig, majd a 65°C-ra állított MixingBlock MB-102 (Bioer) termosztátjába tettük 2-3 percig. Ezt a folyamatot háromszor ismételtük, majd mikro-mozsárral a termőtest darabokat mechanikailag roncsoltuk.

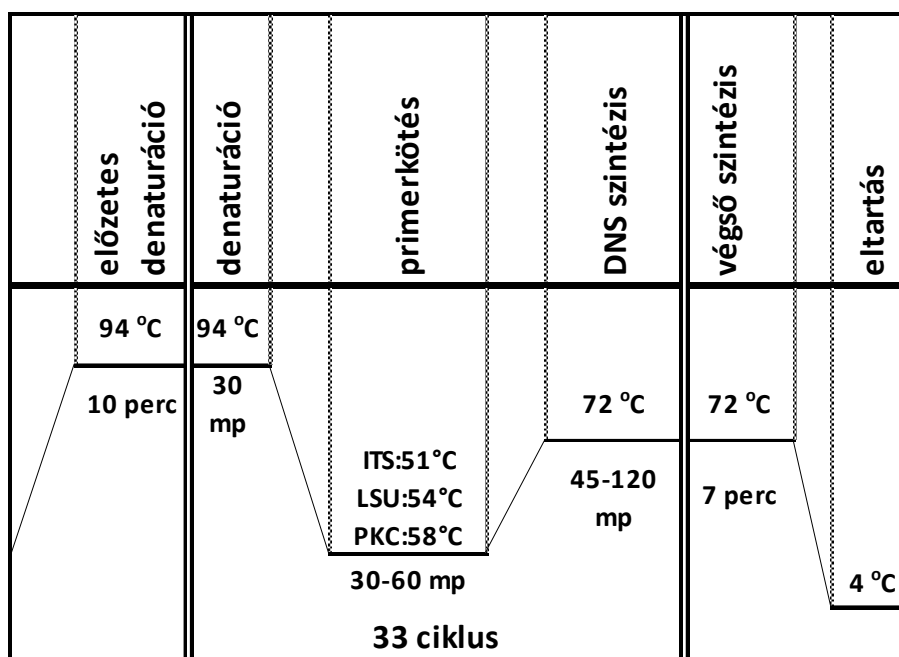
A molekuláris vizsgálatra kiválasztott taxonok esetében a riboszómális RNS kódoló DNS szakaszból az internal transcribed spacer (ITS) régióját minden esetben vizsgáltuk. További filogenetikai vizsgálatokhoz a konzervatívabb 28S RNS gén (Large Subunit, LSU) és/vagy a Proteinkináz-C (PKC) alegységét is használtuk. Az ITS régió leggyakrabban ITS1F, ITS4 (Gardes & Bruns 1993; White *et al.* 1990) ritkábban ITS5, ITS6, ITS7 (Bertini *et al.* 1999) primerek; az LSU régió LROR, LR3 (Vilgalys & Hester 1990) primerek; a PKC régió pedig PKC1F, PKC1R primerek (Ambra & Macino 2000) segítségével lett felszaporítva. Az amplifikációhoz a Bioer cég Little Genius TC-25/H típusú készülékét, vagy a Techne cég TC-312 típusú PCR (polimer-láncreakció) készülékét alkalmaztuk. A PCR elegy végső térfogata 50 µl vagy 25 µl volt az 1. táblázatban leírt összetétellel.

1. táblázat: A leggyakrabban alkalmazott PCR elegy összetétele. A csillag a PKC1F és PKC1R primerekből használt koncentrációkat jelöli.

	Kiindulási koncentráció	Térfogat 1 mintára (50 µl)
Fermentas DreamTaq Green reakciópuffer	(20 mM MgCl ₂)	5,0 µl
Fermentas dNTP mix	2-2-2-2 mM	5,0 µl
Primer 1	0,01 mM (0,05mM*)	1,0 µl
Primer 2	0,01 mM (0,05mM*)	1,0 µl
steril Milli-Q víz		12,75 µl
Fermentas-DreamTaq polimeráz		0,25 µl
templát DNS +steril Milli-Q víz		25,0 µl

Az általánosan alkalmazott hőprogram az 2. ábrán látható. A primerkötés hőmérséklete elsősorban az alkalmazott primerektől, a DNS szintézis ideje pedig az amplifikálandó régió hosszától függött. Egyes esetekben, főleg a *T. regionum* minták esetén *nested* vagy *semi-nested* PCR technikát alkalmaztunk (több egymást követő PCR reakció, melyekben egymáshoz egyre közelebb kötődő primerpárokat alkalmaznak), azok ITS

régiójának nehéz amplifikálhatósága miatt. A PCR reakció sikerességét TAE (Trisz-acetát-EDTA pH:8,2-8,4) pufferből készült, 1%-os agaróz gélen megfuttatva etidium-bromidos festést alkalmazva teszteltük. A sikeres PCR termékeket GenElute™ PCR Clean-Up kit (Sigma) segítségével tisztítottuk. A szekvenáláshoz ABI Prism BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit 3.1 (Applied Biosystems) lett felhasználva. A kapilláris elektroforézis ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) műszeren történt, a leíró utasításainak megfelelően, melyet Gödöllőn a Biomi Kft. végzett.



2. ábra: A leggyakrabban alkalmazott PCR hőprogram sémája

Az egyes leszármazási vonalak gyorsabb, egyszerűbb és olcsóbb meghatározásához RFLP (restriction fragment length polymorphism) módszert használtunk, elsősorban a *T. brumale* aggr. minták esetén. A már ismert ITS szekvenciákon SnapGene® software (GSL Biotech; www.atnapgene.com) segítségével *in silico* emésztést végrehajtva lettek kiválasztva a HinfI (Fermentas, 10u/μl 2000 units) és MboI (Fermentas, 10u/μl 1500 units) restriktációs endonukleázok. Tesztelés után, a következő protokollt követtük: 2 μl ITS PCR termék 37 °C egy éjszakán át lett emésztve 0,125 μl MboI vagy HinfI endonukleázokat, 0,375 μl enzimhez tartozó puffert és 1,25 μl steril Milli-Q vizet tartalmazó eppendorf csövekben. A restriktációs fragmentumok 3%-os agaróz gélen lettek szétválasztva, és detektálva a WinView/32 kameravezérlő és képfeldolgozó program segítségével.

4.6 Filogenetikai vizsgálatok

4.6.1 Szekvencia adatok előkészítése

A szekvenált minták futtatása során kapott elektroferogramokat FinchTV 1.4.0 (Geospiza, Inc., Seattle, WA, USA; <http://www.geospiza.com>) programmal vágtuk meg, és ellenőriztük le. Legtöbb esetben rendelkezésre állt az adott lókus 3' és 5' irányú szekvenálása is, melyeket a FinchTV 1.4.0 és MEGA 5 (Tamura *et al.* 2011) programokkal vágtunk össze. A különböző mintákhoz tartozó szekvenciákat taxononként Microsoft Access adatbázisokban tároltuk könnyebb kezelésük érdekében. A szekvenciák illesztése MAFFT (Katoh & Toh 2008) program auto beállításával történt, mely esetben a program maga választja ki egy, a szerinte megfelelő illesztési algoritmust a következők közül: L-INS-i, FFT-NS-i vagy FFT-NS-2. Egyes esetekben az E-INS-I módszert alkalmaztuk a nagyobb mértékű inzerció és delécio (indel) mutációk helyes kezelése érdekében. A Rufum-fajcsoporton belül tapasztalt nagy ITS variabilitás miatt, összevetésképpen azok illesztésére az online elérhető PRANK (<http://wasabiapp.org/>) szoftvert is alkalmaztuk. Ha szükséges volt, az illesztések manuálisan ellenőrizve és javítva lettek MEGA 5 programban. A filogenetikai programok különböző fájlformátum és kiterjesztés igényei miatt a szekvenciákat az ALTER (Glez-Pena *et al.* 2010) online programmal konvertáltuk a megfelelő formátumúvá. Az ITS intra- és interspecifikus variabilitás megbecsléséhez, a szekvenciák közti párosított „*P-distance*” nukleotid távolságot is kiszámoltuk a PAUP*4.0b (Swofford, 2003) programmal.

4.6.2 Modell-választás, Filogenetikai analízis előkészítés

Több filogenetikai fakészítő algoritmushoz szükség van evolúciós modellre, mely segítségével ki lehet számítani, hogy mekkora valószínűséggel alakulhatott az egyik szekvencia a másikba. Ezt a szubsztitúciós modellek kiszámításával érhetjük el, melyet a jModelTest 0.1.1 (Posada, 2008) és MrMODELTEST 2.3 (Nylander, 2004) programokkal hajtottunk végre. A 88 különböző szubsztitúciós modell alapján kiszámolt szekvencia '*likelihood*' érték alapján Akaike információ kritérium (AIC; Akaike, 1974) segítségével választottuk ki az adatainkhoz legjobban illeszkedő modelleket (2. táblázat)

2. táblázat: Az egyes szekvencia adatsorokra becsült szubsztitúciós modellek. Zárójelesen a fákban belcsoportként szereplő taxonok lettek feltüntetve.

Adatsor	Szekvenciák száma	lókusz	Szubsztitúciós modell
<i>T. brumale</i> aggr. (faj aggregátum)	140	ITS	HKY+G
<i>T. brumale</i> aggr. (Melanosporum-fajcsoport)	90	LSU	GTR+G
<i>T. brumale</i> aggr. (faj aggregátum)	28	PKC	GTR
Regianum-fajcsoport (<i>Tuber</i> nemzetség) összefűzött	73	5.8S ITS2 és LSU	SYM+I GTR+I+G
Regianum-fajcsoport (<i>Tuber</i> nemzetség)	110	LSU	SYM+G
Rufum-fajcsoport MAFFT (fajcsoport)	332	ITS	GTR+I+G
Rufum-fajcsoport PRANK (fajcsoport)	332	ITS	GTR+I+G

4.6.3 Filogenetikai fakészítő eljárások beállítása

A filogenetikai elemzések során különböző törzsfakészítő eljárásokat és programokat használtunk. A Maximum Parszimónia (MP) módszerhez PAUP*4.0b (Swofford, 2003), a Maximum Likelihood (ML) módszerhez RaxMLGUI 0.95 (Silvestro & Michalak 2011), míg a Bayes statisztikán alapuló eljáráshoz (Bayes-féle) a MrBayes 3.1.2. (Huelsenbeck & Ronquist 2001) programot használtuk. A különböző elemzések eredmény fáit FigTree v1.3.1 (Rambaut, 2009) programmal ábráztuk. Az egyes beállításokat a következőekben taxononként részletezzük.

A téli szarvasgomba szekvenciákból mindhárom lókuszra (ITS, LSU, PKC) külön Maximum Parszimónia- (MP) és Bayes-módszerekkel számoltunk filogenetikai fákat. Az MP módszer esetén kétféle gap kezelési eljárást is alkalmaztunk, melyekben a *gap*-ek hiányzó adatként, és amelyekben ötödik karakterként lettek figyelembe véve. A heurisztikus keresés „*branc-swapping*” módszerrel történt, *Tree-Bisection-Reconnection* (TBR) újrendezési algoritmussal, 100 *bootstrap* ismétléssel. A Bayesian elemzéshez lókuszonként a megfelelő szubsztitúciós modell (lásd fentebb) beállítása megtörtént. Az elemzés alatt 1 „*cold*” és 3 „*heated-chain*” robot működött két független futásban. A Markov-lánc Monte Carlo (MCMC) futtatás generáció száma 12 millió volt az ITS, és 10 millió az LSU és PKC lókuszok esetén, melyből minden 100. generáció lett megmintázva. Az „*Average standard deviations of split frequencies*” (ASDSF) értékek ellenőrzésével döntöttük el hogy a beállított generációs szám elegendő volt-e az állapottér feltérképezéséhez. A gén geneológiák egyezőségének tesztelésére ún. „*partition homogeneity test*” (PHT, Farris *et al.* 1995) alkalmaztunk, mely a PAUP programmal lett kiszámolva.

A *T. regianum* szerű mintákból kapott ITS szekvenciák nemzetközi adatbázisokban (GenBank) való szekvencia hasonlósági keresése BLASTn program (Altschul *et al.* 1990) segítségével lett elvégezve. Szekvencia hasonlósági alapú keresést a Unite (Koljalg *et al.* 2005) adatbázisában is elvégeztük. Mivel kérdéses volt a *T. regianum* *Tuber* nemzetségen belüli elhelyezkedése is, így a nemzetség minden ismert leszármazási vonalából több szekvenciát is választottunk a törzsfá készítéshez, melyet a RaxML és MrBayes programokkal vittünk véghez. A csak LSU régiót összevető elemzésekhez 110, az 5.8S-ITS2-LSU kombinált összevetéshez 73 szekvenciát használtunk fel, melyekből 6-6 minta tartozott a kérdéses csoporthoz. A RaxML programban az ML futtatáshoz 1000× elvégzett gyors *bootstrap* és GTR+G+I model lett kiválasztva. A Bayesian analízis az előzőekben leírtakhoz hasonlóan, az LSU és 5.8S-ITS2-LSU esetén 10 millió generációval, a kombinált adatsor esetén régióként külön definiált szubsztitúciós modellel futtattuk (2. táblázat).

A Rufum-fajcsoportba tartozó 78 magyarországi és 25 külföldről származó szekvenált minta mellé 224 nemzetközi szekvencia adatbázisokból származó mintát használtunk az elemzésekhez. Előzetes, saját mintákon alapuló filogenetikai fa készítés alapján az eltérő kládok mintáit felhasználva BLASTn hasonlósági keresést végeztünk, aminek révén elérhetővé vált az adatbázisokban fellelhető legtöbb fajcsoportbeli minta, függetlenül a taxonómiai megnevezésétől. Az ITS régió nagyfokú variabilitása miatt elvégzett MAFFT E-INS-I és PRANK illesztésekkel is elvégeztük a fa rekonstrukciókat és az ABGD elemzést is. A RaxML programban az ML futtatáshoz 1000× elvégzett gyors *bootstrap* és GTR+G+I modell lett kiválasztva. Kulcsoportnak a nemzetségen belüli Excavatum-fajcsoport néhány mintáját használtunk.

4.7 A téli szarvasgomba minták haplotípus szintű vizsgálata

A nagy területről származó, jelentős mennyiségű ITS régióra megszekvenált *T. brumale* s. l. minta lehetővé tette, hogy a fajokat intraspecifikus szinten is vizsgálni tudjuk. A haplotípusok meghatározása ITS szekvenciák alapján Collapse (Posada, 2011) illetve SNAP Map (Aylor *et al.* 2006) programmal történt. A haplotípus diverzitás értékeket DNAsp szoftver (Librado & Rozas 2009) segítségével számoltuk ki. A haplotípus háló kiszámítását TCS programmal (Clement *et al.* 2000) végeztük, mely eredményét a Cytoscape hálózat ábrázoló programmal (Shannon *et al.* 2003) rajzoltunk meg. A haplotípusok térbeli eloszlásának és a rövid idejű populációs változások jobb megértése végett Tajima's D

(Tajima, 1989), Fu's F_s (Fu, 1997) és Fu és Li's D^* (Fu & Li 1993) neutralitás tesztet végeztünk 1000 koaleszcens szimulációval DNAsp programban.

Az I. és II. haplocsoport elválásának vizsgálatára dr. Geml József koaleszcencia elemzéseket is készített, melyek eredményei a SNAP Map-os haplotípus osztályozás kivételével itt nem kerülnek bemutatásra. Az elemzések részleteit és eredményeit Merényi *et al.* (2014) munkája tartalmazza.

4.8 Molekuláris óra elemzések

Az egyes leszármazási vonalainak divergencia idejét molekuláris óra elemzéssel lehet megbecsülni, melyet BEAST 1.8 (Drummond *et al.* 2012) programmal végeztünk. Vizsgálataink során a *Genea* nemzetségre, és a téli szarvasgomba faj aggregátumot magába foglaló *Melanosporum*-fajcsoportra végeztünk molekuláris időbecslést:

A *T. brumale* aggr. két fajának elválását az egész *Melanosporum*-fajcsoportra végzett molekuláris óra elemzéssel becsültük. Mivel sem a *Melanosporum*-fajcsoportra, sem a valódi szarvasgombákra nincs ismert fosszília, így Bonito *et al.* (2013) *Tuberaceae* családra végzett több génen alapuló molekuláris óra becsléseit használtuk fel, másodlagos referencia pontnak. A saját elemzéseinkhez a riboszómális lókuszok közül az 5.8S, ITS2 és LSU régiókat használtuk fel, míg az ITS1 régiót, túlzott variabilitása miatt, kizártuk ezekből az elemzésekből. Az óra és szubsztitúciós modelleket szétkapcsoltuk (*unlinked*), hogy lókuszonként lehessen meghatározni azokat, eltérő konzerváltsági fokuk miatt. A különböző régiókra a jModeltest segítségével határoztuk meg a legjobban illeszkedő szubsztitúciós modelleket, melyek a következők voltak: 5.8S: HKY; ITS2: N93+G; LSU: GTR+I. A kalibrációs pontok beállítása végett két monofiletikus taxon listát hoztunk létre, melyből az első tartalmazta a teljes *Melanosporum*-fajcsoportot, míg a második csak a *Tuber brumale* aggr. és *T. pseudoexcavatum* szekvenciákat foglalja magában. Az elemzést születés-halálozás (*Birth-Death*) speciációs eljárást (Kendall, 1984) alkalmazva „nem-korreláló lognormál relaxált molekuláris óra” (*uncorrelated lognormal relaxed*) beállítással futtattuk, mivel egy taxont egy szekvencia reprezentált. Ahogyan másodlagos kalibrációs pont használatánál javasolt, mi is normális eloszlást állítottunk be, a *Melanosporum* klád kialakulásánál átlag 79,7 millió év (SD = 5 millió év). A mutációs ráta prior (*clock rate*) az egyes lókuszokra külön-külön lett beállítva a következők szerint: 5.8S: $3,02^{-4}$, ITS2: $2,07^{-3}$ & LSU: $6,5^{-4}$ szubsztitúció/bázis/millió év (Bonito *et al.* 2013). Az MCMC analízis 50 millió generációval futott, melyben minden 5000. fa lett megmintázva. A különböző paraméterek poszterior

effektív minta méretét (*effective sample size*, ESS) Tracer 1.5 (Rambaut & Drummond 2009) programmal ellenőriztük. A megmintázott fák kezdeti 10%-ának elhagyása után (*burn-in*) a *Maximum Clade Credibility* (MCC) kronogrammot Tree Annotator 1.8 verziójával (BEAST programcsomag része) készítettük.

Az egész Pyronemataceae családon belül nem ismert fosszilis lelet, vagy korábbi idő kalibrált filogenetikai elemzés, ezért a *Genea* nemzetség idő becsléséhez is másodlagos, távoli elágazási pontokra készített időbecsléseket használtuk kalibrációs pontként (Prieto & Wedin 2013; Bonito *et al.* 2013). Az MC elemzésben csak az LSU szekvenciákat használtuk fel az ITS túlzott variabilitása miatt. A jModeltest GTR+G szubsztitúciós modellt javasolta az adatainkra legjobban illeszkedőnek. Az adatsorból szintén két monofiletikus taxon listát készítettünk, az egyik tartalmazta az *Orbilina* sp. kivételével az összes taxont (Pezizomycetes), míg a második csak a *T. aestivum* és *Choiromyces* sp. szekvenciákat foglalta magába. Az elemzést „nem-korreláló lognormál relaxált molekuláris óra” beállítással, és születés-halálozás (*Birth-Death*) speciációs eljárással futtattuk. A Pezizomycetes-csoport közös csomópontjára 317 millió évet (SD=37,0 millió év), a Tuberaceae közös pontjára pedig 156,9 millió évet (SD=9,0 millió év) állítottunk be. Az idő kalibrált MCC fa 10 millió generációt követően, minden 1000. generációban végzett mintázás során kialakuló adathalmaz második felével (50%) lett elkészítve.

4.9 Automata barcoding gap elemzés

Az automata barcoding gap elemzés, angol rövidítéssel az ABGD (Puillandre *et al.* 2012) egy viszonylag új, DNS szekvencia adatokon nyugvó fajhatár-kereső, és az alapján osztályozó módszer. A módszer lényege, hogy megkeresi a szekvenciák párosított nukleotid távolság eloszlásában létrejövő töréseket, “gap”-eket, amely küszöbértékeket a szekvenciák csoportosítására fogja felhasználni, ezáltal lehetséges fajokat kijelölve. A módszer elmélete hogy a fajokon belüli minták genetikai variabilitása kisebb, mint a más fajokkal alkotott összehasonlításokból kapott távolság értékek. Az ABGD elemzést, melyet a <http://www.wabi.snv.jussieu.fr/public/abgd/abgdweb.html> online alkalmazással értünk el, a *Rufum*-fajcsoport mintáin alkalmaztuk. Az alapbeállításokat a finomabb felbontás érdekében következőképpen módosítottuk: lépésszámot 30-ra emeltük, az Nb értéket 40-re, az X értéket pedig lecsökkentettük 0,5-re a részletesebb eredmény végett.

4.10 Elterjedési terület predikció

Az eddig ismert elterjedési áréájának legtágabb körű mintázását végrehajtva a téli szarvasgombáról gyűjtött elterjedési adataink szolgáltak annyi információval, hogy érdemben elterjedési terület predikciót lehessen végezni. Erre a célra a MaxEnt ver. 3.3.3k (Phillips *et al.* 2006) maximum entrópia módszerét használó elterjedési modell prediktáló program nyújtott lehetőséget. Az elemzéshez mindössze faj elterjedési adatokra (koordináták) és georeferált környezeti változókra van szükség, ahhoz hogy prediktáljuk különböző taxonok elterjedési valószínűségét. A predikcióhoz 196 *T. brumale* aggr. elterjedési adat (161 A és 35 B faj) mellett tizenkilenc 2.5 arcmin (cca. 4 km) pontosságú bioklimatikai változó lett felhasználva (3. táblázat), melyeket a WorldClim adatbázisából (www.worldclim.org)

3. táblázat: Az área predikcióban felhasznált 19 georeferált bioklimatikai változó. Letöltve: 2014.03.19. 2.5 arcmin pontossággal a WorldClim adatbázisából (www.worldclim.org).

Rövidítés	Leírás
BIO1	Évi középhőmérséklet (°C)
BIO2	Havi átlagos középhőmérséklet (°C)
BIO3	Izotermalitás (BIO2/BIO7) (* 100)
BIO4	Hőmérsékleti szezonális (szórás*100)
BIO5	Legmelegebb hónap hőmérsékleti maximuma (°C)
BIO6	Leghidegebb hónap hőmérsékleti minimuma (°C)
BIO7	Évi hőingás mértéke (BIO5-BIO6) (°C)
BIO8	Legcsapadékosabb negyedév átlaghőmérséklete (°C)
BIO9	Legszárazabb negyedév átlaghőmérséklete (°C)
BIO10	Legmelegebb negyedév átlaghőmérséklete (°C)
BIO11	Leghidegebb negyedév átlaghőmérséklete (°C)
BIO12	Évi csapadékmennyiség (mm)
BIO13	Legcsapadékosabb hónap csapadék mennyisége (mm)
BIO14	Legszárazabb hónap csapadékmennyisége (mm)
BIO15	Csapadékmennyiség szezonális (szórás*100)
BIO16	Legcsapadékosabb negyedév csapadékmennyisége (mm)
BIO17	Legszárazabb negyedév csapadékmennyisége (mm)
BIO18	Legmelegebb negyedév csapadékmennyisége (mm)
BIO19	Leghidegebb negyedév csapadékmennyisége (mm)

töltöttünk le. A grid fájlokat Quantum GIS Wroclaw 1.7.3 programmal (<http://qgis.org>) konvertáltuk a MaxEnt program számára használható formátummá. A futtatást a program alap beállításával végeztük, a random visszatesztelés az adatok 25%-án történt. A faj elterjedési modell (SDM) sikeressége az AUC (*area under receiver operating characteristic* (ROC)

curve) értékkel lett kifejezve, melyből 0,5 a véletlen szintnek felel meg, 0,7 elválasztási hatékonyság már jónak számít (Fielding & Bell 1997). A prediktált área térképet, és a föld alatti gombák lelőhelyeit minden esetben a Quantum GIS programmal ábráztuk.

4.11 Morfológiai vizsgálatok

A határozáshoz szükséges friss termőtesteken történt rövid morfológiai leírások mellett az aktuálisan vizsgált taxonok anyagai részletes mikroszkópos vizsgálatba lettek vonva, melyet Nikon SMZ-U sztereomikroszkóppal és Nikon Optiphot-2 fénymikroszkóppal (Nikon Co, Japán) végeztünk. A fotó dokumentáció leggyakrabban az erre szerelt Nikon D70 DSLR kamerával történt. A friss termőtestekből legtöbbször vizes, esetleg 10%-os KOH-s kaparéék preparátum készült, taxontól függően, de adott vizsgálatban egységesen. Az általánosan vizsgált karakterek a spórák ornamentika nélküli hossza, szélessége, ebből származtatott Q érték ($Q = \text{spóra hossz} / \text{szélesség}$) és térfogat ($\text{Vol} = \text{spóra hossz} \times 0,523 \times \text{szélesség}^2$). Mintánként tíz darab, általában négy-spórás aszkuszban található spóra mérése történt meg. Az ornamentikától függően az elemek magassága, sűrűsége, vagy a hálószemek átlagos átmérője is mérésre kerültek, amelyet az ornamentika alaktani leírása követett. Aszkuszos gombák vizsgálta esetén az aszkuszok spóraszám szerinti eloszlása is meghatározásra került, legalább 100 aszkusz átvizsgálásával. A perídium jellemzésénél leírtuk a különböző perídium rétegek szerkezetét, és mértük ezek vastagságát legalább három-négy különböző helyen. A pszeudoparenchima jellegű perídium szerkezet esetén az izodiametrikus sejtek hossz és szélesség adatait is rögzítettük. A kiágazó elemek (hifák, cisztidiumok) hossz, alapi szélesség, felület elágazási típus feljegyzése is a perídium metszeteken történt meg. A perídium vizsgálatához száraz termőtestekből, a felületre merőleges irányú kézi metszéssel készült néhány sejtsor vastag metszetekből készítettünk preparátumot. Elsőként vízcsepp felületére lettek helyezve a metszetek a könnyebb kiterülésük, mozgathatóságuk végett. A víz teljes elpárolgása után a fedőlemezt felemelve poli-vinil-alkoholba (PVA) ágyasztuk a mintákat (Omar *et al.* 1979). Két-három napi állás után, termosztátban 60 °C-on megszilárdítottuk a preparátumokat. A PVA-ban a perídium áttetszővé vált, így könnyen vizsgálható, mérhető lett. Ugyanakkor a tartós metszetnek köszönhetően többször is ugyanazt a mintát újra tudtuk mérni. Ezen tulajdonságainak köszönhetően egyes taxonok esetén (pl. *T. brumale*, *T. regianum*) a spórák mérése PVA-ban történt. Az itt felsorolt általános mérési séma mellett taxontól függően egyéb mérési módszerek, karakterek is szerepeltek, melyek a következőkben lesznek felsorolva.

4.11.1 A *Genea* fajok morfológiai vizsgálata

A *Genea* fajok morfológiai vizsgálata is külföldi kooperációban történt, melyet dr. Pablo Alvarado fogott össze. Ennek megfelelően mi csak a Kárpát-medencéből származó, laborunk által genotípezált minták morfológiai vizsgálatát végeztük el. A fentebb ismertetteken túl, a *Genea* mintákon vizsgáltuk a termőtest alakját, a falak termőtest belsejébe történő betüremkedésének mértékét, a kiágazó hifa elemek méreteit, felületét, az epithécium (belső perídium) vastagságát, és a spórák díszítettségét.

4.11.2 A *T. regianum* szerű minták morfológiai vizsgálata

Az előzetes morfológiai méréseket a filogenetikai vizsgálatok alapján kialakított három csoporton végeztük. Mivel egyes morfológiai karakterek jól elkülönítették a három filogenetikai fajt, a sikertelenül szekvenált mintákat morfológia alapján egyértelműen be tudtuk sorolni az egyes csoportokba. Így a három faj morfológiai összehasonlítását az elérhető összes mintán elvégeztük, de a minták meghatározásának módját minden esetben feltüntettük. A fenti általános morfológiai mérésektől csak annyiban tértünk el, hogy a spórákat négy helyett nyolc-spórák aszkuszkokban mértük, annak gyakorisága és jellegzetessége folytán. Továbbá nagyobb hangsúlyt fektettünk a termőtestek külső morfológiájának leírására, így a színek, perídium felszín, kiágazó elemek vizsgálatára. A viszonylag kevés minta, és a könnyű elválaszthatóságot biztosító, nem átfedő, diszkrét karakterek miatt statisztikai vizsgálatokra nem volt szükség.

4.11.3 *T. brumale* aggr. minták morfológiai vizsgálata

A téli szarvasgomba morfológiai vizsgálatába néhány nyugat- és délkelet-európai minta mellett elsősorban Kárpát-medencei minták lettek bevonva, mivel csak itt található meg mindhárom ITS alapon elválasztott csoport (A/I, A/II és B klád), ezzel csökkentve a földrajzi távolságok okozta klimatikus hatásokat a fenotípusos jellegekre. Az előzetes méréseket a föld alatti gombáknál szokásosan vizsgálandó karakterek mérésével kezdtük, makromorfológia karakterekkel és a spórák jellemzésével (fent részletezve). Kiemelendő, hogy a pikkelyek mérete háromfokozatú skálán, becsléssel történt (kicsi, közepes, nagy). A további mérések során a mintaszámok növelése mellett, újabb karakterek, vagy pontosabb mérési módszerek lettek bevonva a vizsgálatba, mint a külső perídium sejtek mérete, pikkely átmérők számítógépes mérése, a termőtestek száraz tömege, a spóraszám eloszlás részletesebb vizsgálata:

- A perídium sejtek esetén néhány előzetes mérés után a következő mérési protokollt követtük: a külső pszeudoparenchimás perídium rétegből mindig a 15 legnagyobb izodiametrikus perídiumsejtet mértük le (min. 2-4 mm-t átnézve). A sejtek hossz és szélesség adatait összeszorozva megkapott átlagos „terület” értékével jellemeztünk egy mintát.
- A száraz termőtesteket fekete, matt háttér előtt makró objektívvel (Canon EF 100mm f/2.8 Macro), állványról befényképeztük. A perídium fotókról mintánként tíz db pikkelyt mértünk le. Pikkelyenként csak egy legnagyobb „átmérőt” mértünk. A fényképek méret kalibrálásához egy befotózott tolómérő skáláját használtunk. *In silico* az IrfanView (<http://www.irfanview.com/>) programmal a tolómérő alapján meghatároztuk, hogy a pixelek hogyan feleltethetők meg millimétereknek.
- A légszáraz herbáriumi mintákat analitikai mérleggen mértük, legalább két tizedesjegy pontossággal. A mérési eredményeket nagyban torzította az, hogy bizonyos esetekben, amikor csak termőtest töredék állt rendelkezésre, a gombarészlet méretéből becsültük, hogy mekkora lenne a teljes tömege.
- Az előzetes mérések során is felvett spóraszám eloszlásból nem csak a domináns spóraszámú aszkuszt vettük figyelembe, hanem minden spóraszámú aszkusz relatív arányát az összeshez képest: R1-R8. Ezen túl, képeztünk két származtatott mennyiséget, az 5 spórás aszkuszok aránya a 3 spórás aszkuszokhoz képest (R53) és az 5+6 spórás aszkuszok aránya a 2+3 spórás aszkuszok számához képest (R56p23).

4.11.4 A *T. brumale* aggr. morfológiai és talaj adatainak elemzése

A direkt vagy származtatott karaktereken kétféleképpen határoztuk meg a külön fajokhoz tartozó minták átfedését. Az első esetben érték szerint sorba rendeztük a mintákat, majd megszámoztuk a legkisebb és legnagyobb értéktől, hány minta tartozik ugyanabba a fajba (A vagy B). A két szélső, tiszta rész közöttit neveztük átfedőnek, melyet a teljes mintaszámmal osztottunk. Ha a legkisebb és legnagyobb érték is ugyanazon fajhoz tartozott 100%-ig átfedőnek vettük (Db módszer). A másik módszer lényege, hogy adott karakterre nagyobb átlaggal rendelkező faj minimum értékét kivontuk a kisebb átlaggal rendelkező faj maximum értékéből. Ezt az értéket az össz adatsor legkisebb és legnagyobb értéke közötti különbséggel osztottuk (interv. módszer).

A statisztikai vizsgálatok az R 3.0.2 programcsomaggal (R Core Team 2014) az alábbiakban részletezettek alapján történtek. A morfológiai változók normalitás vizsgálatát

Shapiro-Wilks teszttel végeztük. Ha nem állt fenn normális eloszlás akkor a nem paraméteres, eltérő varianciák esetén is megbízható Brunel-Munzel teszttel hasonlítottuk össze a két fajhoz tartozó mintapopulációkat. A minták varianciáját F-teszttel (var.test) vizsgáltuk. Normalitás megléte, és azonos variancia esetén kétmintás T-próbát, ellenkező esetben pedig Welch féle T-próbát végeztünk. A fent említett statisztikákat a talajváltozókkal is elvégeztük.

A karakterek korrelációját cor.test() funkció Pearson módszerével vizsgáltuk, melynek eredményeként az összevetett adatsorokat az $|r| > 0,5$ esetében egymással erősen, $0,5 > |r| > 0,3$ esetében egymással gyengén korrelálnak vettük. Korreláció esetén, és ha homogén volt a pontok eloszlása a két változó közti korrelációs plotton, a karaktereket nem vizsgáltuk egy modellben. A fenti statisztikák alapján az A és B faj között szignifikáns eltérést mutató karakterek lettek kiválasztva a további többváltozós matematikai elemzésekhez, mint a Lineáris Diszkriminancia-analízis (LDA). Az LDA lényege, hogy a változók olyan lineáris kombinációját megtalálja, amelyre igaz, hogy a csoportok közötti külső négyzetösszeg és a csoportokon belüli négyzetösszeg hányadosa maximális. Ehhez egy, vagy több diszkrimináló függvényt hoz létre mely(ek) segítségével az *a priori* csoportok egymástól való elkülönítése a leghatékonyabban megoldható. Az LDA-kat az R 3.0.2 program MASS programcsomagjával (Venables & Ripley 2002) végeztük. Nyolcvanhárom morfológizált termőtest adataiból több karakterkombinációval, és kétféle *a priori* csoportosítással (csak A, B fajra vagy A/I, A/II és B csoportokra) is végeztünk futtatásokat. Egy másik adatsorral csak morfológiai, csak talajtani és egyesített modellt is készítettünk. Ez esetben a talajanalitikai mérések harminckilenc herbárium mintához tartoztak, de mintánként 1-4 talaj is rendelkezésre állt, így egy külön hetvenkét mintát tartalmazó adat készletet használtunk, ahol a talajmérések adatai különböztek, viszont a gomba morfológia megegyezett, az ugyanazon mintákhoz tartozó talajok esetén.

4.11.5 A *T. brumale* aggr. morfológiai mérésein végzett szimulációk

A szimulációk során különböző folytonos morfológiai karakterek, változó mintaszám melletti viselkedését mértük. A futtatások saját készítésű python (<https://www.python.org/>) szkript segítségével történtek. A vizsgált karakterekből egyenlő nagyságú, egyesével növekvő mintaszám mellett vizsgáltuk a következőket: adott karakter A, B mintákra (1) keveredik-e, (2) statisztikailag elválasztható-e (3) mekkora az átfedő rész mértéke a mintaszámhoz viszonyítva. Mindhárom módszer esetén az összes eltérő számú mintavételt 10.000 ismétlésben végeztünk, és ábrázoltuk, hogy ebből mennyi esetben teljesül az adott kritérium.

1. Minták keveredésének vizsgálata: a két mintapopulációt (A és B faj) külön-külön növekvő sorba rendezzük, majd a két listát egyesítve is növekvő sorba rendezzük. Ha megváltozik a lista első vagy második tagján a sorrend, az annak köszönhető, hogy a két külön lista keveredett. A mintaszámonkénti 10.000 ismétlésből az lett ábrázolva, hogy mennyi esetben nem történt keveredés.
2. A statisztikai próbák: normális esetben két mintapopuláció átlagának statisztikai összevetéséhez az adatsoroktól függően (Normális eloszlású-e? Variánciák egyeznek-e?) kell megválasztani a megfelelő statisztikát, ebben az esetben fontos volt hogy különböző statisztikák eredményei ne keveredjenek. Így az egyes mintázásokon minden esetben el lett végezve a nem-paraméteres Wilcoxon rank-sum teszt és a kétmintás T-próba is. A szignifikancia szintet 0,05-nek választottuk. Egy adott mintaszám mellett 10.000 mintázást végezve megkapjuk, hogy hány esetben sikerült a fent leírt eljárás alapján szignifikáns különbséget kapnunk.
3. Az 1. ponthoz hasonlóan, az A és B faj mintapopulációit egyesíti, majd sorba rendezi a program. Amennyiben az első és utolsó minta is ugyanazon fajhoz tartozik, úgy veszi hogy 100%-ban átfedő, ellenben megszámlolja hogy mennyi minta fed át. Ezt az értéket az éppen aktuális összes mintaszámmal osztva megkaptuk, hogy relatív milyen arányban fed át, a mintázás nagyságától függően. Minden mintázás esetén 10.000 ismétlés átlaga és ehhez tartozó szórás lett ábrázolva.

5. Eredmények

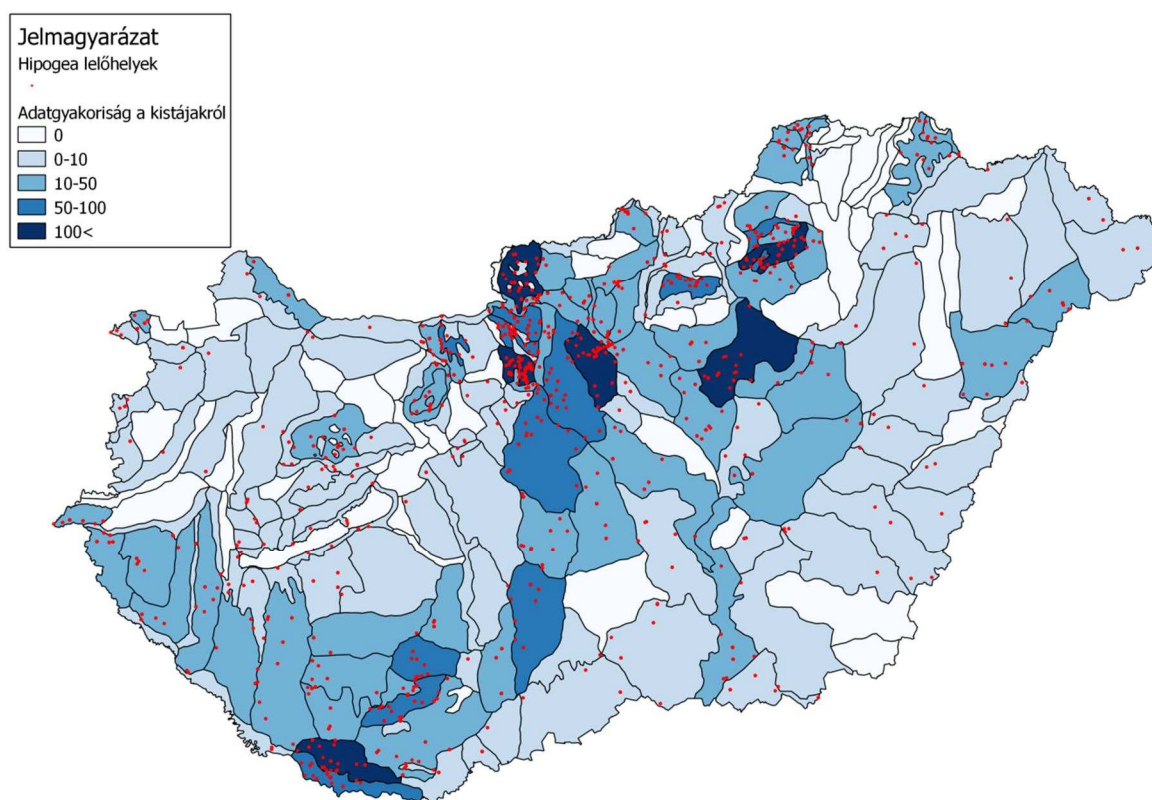
5.1 Adatbázis létrehozása

Az ismertetett számítógépes adatbázis jelenleg (2014. 06. 23-ai állapotában) 4591 gombaanyag adatait tartalmazza, mely közel 130 föld alatti gombafajhoz, és 28 nemzetségbe sorolható be. Ám az adatbázis rendszertani feldolgozottsága, és annak megbízhatósága erősen függ a használható hipogea taxonómiai munkák meglététől, melyet a 3. melléklet hivatott összefoglalni. A Magyarországon eddig megtalált, aszkuszos és bazídiumos hipogea nemzetségek közül néhányról még egyáltalán nincs, vagy nagyon kevés nukleinsav szekvencia áll rendelkezésre, így az *Elasmomyces*, *Phlyctospora*, *Wakefieldia*, *Stephensia* és *Gastrosporium* nemzetségekről, melyekhez a Unite adatbázisában sem találtunk szekvencia adatot. Jóval több nemzetség esetén már állnak rendelkezésre szekvenciák, de azok vagy publikálatlan munkákhoz tartoznak, vagy a hozzájuk kapcsolható munka nem taxonómiai jellegű. Szintén gyakori, hogy a munkákban csak egy-egy faj leírásával foglalkoztak, és nem az egész nemzetség helyzetével. Ezáltal a valódi szarvasgombákon kívüli hipogeaák közt csak néhány olyan nemzetség van, amihez nagy mintaszámú, megbízható filogenetikai elemzés, és részletes taxonómiai ajánlás is tartozik (Stielow *et al.* 2010; Stielow *et al.* 2011; Kovács & Trappe 2014) ugyanakkor ezek közül is van, amely csak egy-egy kisebb terület gombáit dolgozza fel, mint Japán sziget *Octaviania*it (Orihara *et al.* 2012) vagy néhány egyesült államokbeli megye *Rhizopogon*jait (Grubisha *et al.* 2002). A *Tuber* nemzetségen belül számos egyedi fajokkal kapcsolatos, vagy az egész nemzetséget összefoglaló filogenetikai munka született már, de a fajcsoportok szintjén, a fajok taxonómiai helyzetét tisztázó munka még igen kevés (Halász *et al.* 2005; Bonito *et al.* 2010a; Chen *et al.* 2011). A hipogea adatbázis elsősorban a *Tuber* nemzetség egyes fajcsoportjait revideáló munkákhoz szolgált, vagy szolgáltatott nagy mennyiségű mintát, ezeken kívül a *Hymenogaster*, *Gautieria*, *Melanogaster* és *Pachyphloeus* és a dolgozatban is bemutatásra kerülő *Genea* nemzetség molekuláris taxonómiai revideálásához járul hozzá.

A vizsgálni kívánt kérdéstől függően az egyes termőtestekről rögzített adatok részletességének, és pontosságának jelentősége változhat. Ugyanakkor egy évtizedekig tartó gyűjtőmunka során nem tudhatjuk előre az összes kérdést, ráadásul a technika is fejlődik. Ezáltal az egyes adatok rögzítésének pontossága is időben eltérő lehet. Például a térképezés egyik feltétele a gyűjtési helyszín minél pontosabb megadása, ami 4588 rekord esetén geo koordinátákkal van ellátva, melyek vagy GPS készülék segítségével, vagy a leírás alapján

utólagos helymegjelöléssel került kitűzésre. Így az adatok körülbelül fele (51,3%) 0-3 km, míg a másik fele (48,7%) 3-10 km pontos helymegjelöléssel rendelkezik (3. ábra).

Magyarország föld alatti fungáját kistáji léptékben vizsgáljuk (Varga *et al.* 2013), mivel a közigazgatási határokkal szemben a kistáji felosztás helytállóbb, biológiai földrajzi szempontból homogén területeket takar (Marosi & Somogyi 1990). Magyarország kistájainak alig több, mint egynegyedéről (27,3%) egy hipogea adattal sem rendelkezünk. A kistájak 41,3%-ról tíznél kevesebb adat áll rendelkezésre, míg a kistájak közel egyharmadáról (31,4%) több mint 10 rekorddal rendelkezünk. A kistájak 7,9%-ról pedig több mint 50 adat áll rendelkezésre.



3. ábra: A Hipogea adatbázisban deponált anyagok előfordulási adatai (piros pont). Magyarország kistájainak különböző színei az adott kistáj térképezettségét, az onnan származó adatgyakoriságot szimbolizálja.

Az adatbázis talajanalitikai tábláiban összesen 2038 talajanalízis adatai szerepelnek, melyek a különböző fajok együttes előfordulásai miatt összesen 2462 gombaadathoz rendelhetők. Emellett, összesen 1146 gombához rendelhető 1092 cönológiai felvétel készült, melynek során közel 24.000 növénytani adat (taxon és borítás) került rögzítésre a vizsgált élőhelyeken. A felvételezések túlnyomó többségben Magyarország területén készültek, de sok adat származik határainkon túl, Szlovákiából és Erdélyből (Románia) is. A cönológiai felvételeket prof. dr. Simon Tibor 59 társulásba, vagy ezek átmeneteibe sorolta be.

Az adatbázis egyes részei között egyedi azonosító „kulcsértékek” alapján lehet hivatkozni egymásra. Bizonyos esetekben köztes táblákra is szükség volt, mivel több a többhöz kapcsolat nem lehetséges, ugyanakkor gyakran előfordul, hogy egy mikotéka adathoz több talajminta tartozik, és tartozhat egy talajminta több hipogeához is, ha azok egy gombafészekből kerültek elő. A cönológiai felvételeknél ugyanígy egy mikotéka kód alá több felvétel is tartozhat, ha azok egy erdőn belül voltak és mindegyiken előfordult ugyanaz a faj, ugyanakkor természetes, hogy egy felvételen belül is számos földalatti gombafaj előkerülhet.

5.2 Gyűjtési eredmények értékelése

A kiválasztott 32 taxon közül dr. Hollós László 365, míg Szemere László 138 adatot közölt, így összesen 503 előfordulási adat van a Kárpát-medencéből az 1970 előtti időkből. Ugyanennek a 32 taxonnak 3701 előfordulási adata származott az elmúlt 24 évből. A taxonok korábbi és jelenlegi találati számát, valamint az ehhez tartozó statisztikák értékeit a 4. táblázat tartalmazza. A taxonok 45,5%-ának megfigyelt előfordulási gyakoriság adata nem változott szignifikáns mértékben. Azok közül, amelyek adatai szignifikáns mértékben változtak, tíz taxon esetében az adatok csökkenését, nyolc taxon esetén pedig növekedését lehet megfigyelni. Fontos ismételt kiemelni az adatok és statisztikai eredmények óvatos kezelését, mivel a két kor között mind módszertani, mind gyűjtési intenzitásbeli eltérések lehetnek. A legmarkánsabb csökkenést a *Choiromyces meandriiformis* esetén tapasztaltuk, amely történeti, és kulturális változásokkal magyarázható legkézenfekvőbben, ugyanis a Felvidéken nagy mennyiségben és előszeretettel gyűjtött gomba mára szinte teljesen feledésbe merült. Ugyancsak a felvidéki területek (Északi-Kárpátok) kutatásának jelentős hanyatlása magyarázza a *Hydnotrya tulasnei* adatcsökkenését is. Emellett nagy adatgyakoriság csökkenés figyelhető meg több *Elaphomyces* faj esetén is, mely elsősorban a kapás-, kutatói gyűjtés visszaszorulásával magyarázható. Ezekon túl néhány faj rendszertani változása, és az adatbázis ilyen szempontú frissítésének hiánya, is hozzájárulhat az adatok szignifikáns mértékű változásához, mint a *Melanogasterek*, *Hymenogasterek*, vagy a *Balsamiak* esetén.

A nyolc adatgyarapodással jellemezhető taxonból öt a valódi szarvasgombák közé tartozik, mely szintén a gyűjtési módszer megváltozásával, a kutyás gyűjtés elterjedésével magyarázható, mivel mind a *Tuber*-fajok intenzív illata, mind a gyűjtési területek preferenciája nekik kedvez. A legnagyobb adatgyarapodást a téli szarvasgomba esetén lehet megfigyelni, ami a többi *Tuber*-fajhoz képest is kiemelkedő mértékű. A környékbeli országokban XX. század végéig tapasztalt ritkasága (lásd bevezető) inváziós mértékű terjedését sejtette, amiért részletesebb filogenetikai, filogeográfiai vizsgálatát tűztük ki.

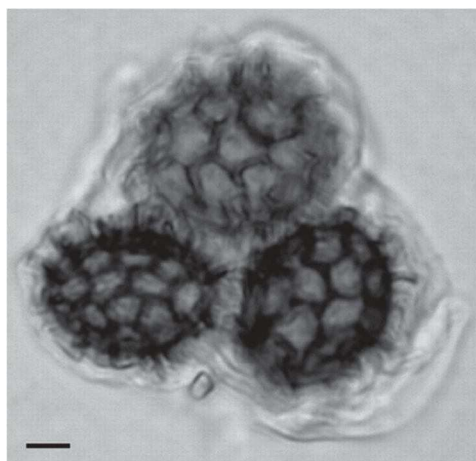
4. táblázat: A kiválasztott 32 taxon adatgyakoriság változása a Hollós-Szemere publikált adatok, és a hipogea adatbázis között. Akkor csoportosítottuk a taxonokat az adat „gyarapodás” vagy „csökkenés” kategóriába, ha a χ^2 - és Fisher-teszt p-értéke szignifikáns különbséget mutatott. Ellenkező esetben a „nem változott” csoportba kerültek a taxonok.

Tendencia	Taxon	χ^2 -próba	Fisher-teszt	Hollós-Szemere	Hipogea adatbázis	Ennyi lenne most
Adat csökkenés	<i>Choiromyces meandriformis</i>	$2,4 \times 10^{-48}$	$8,9 \times 10^{-33}$	84	86	574
	<i>Melanogaster variegatus</i>	$2,2 \times 10^{-22}$	$6,2 \times 10^{-14}$	24	12	164
	<i>Elaphomyces maculatus</i>	$2,9 \times 10^{-22}$	$4,0 \times 10^{-13}$	17	3	116
	<i>Elaphomyces asperulus</i>	$1,0 \times 10^{-09}$	$1,6 \times 10^{-06}$	12	9	82
	<i>Elaphomyces anthracinus</i>	$2,4 \times 10^{-09}$	$7,8 \times 10^{-06}$	8	3	55
	<i>Balsamia polysperma</i>	$3,1 \times 10^{-07}$	$2,9 \times 10^{-05}$	12	14	82
	<i>Hymenogaster arenarius</i>	$2,1 \times 10^{-06}$	$1,4 \times 10^{-04}$	9	9	62
	<i>Hydnotrya tulasnei</i>	$8,8 \times 10^{-04}$	$4,2 \times 10^{-03}$	8	14	55
	<i>Balsamia vulgaris</i>	$3,1 \times 10^{-03}$	$7,9 \times 10^{-03}$	9	20	62
	<i>Elaphomyces aculeatus</i>	$9,0 \times 10^{-03}$	$2,1 \times 10^{-02}$	10	27	68
Adat gyarapodás	<i>Tuber brumale</i>	$4,3 \times 10^{-12}$	$5,8 \times 10^{-18}$	2	331	14
	Excavatum-fajcsoport	$7,9 \times 10^{-10}$	$1,1 \times 10^{-11}$	24	512	164
	<i>Tuber mesentericum</i>	$1,6 \times 10^{-05}$	$1,7 \times 10^{-07}$	1	137	7
	<i>Tuber macrosporum</i>	$1,7 \times 10^{-05}$	$3,5 \times 10^{-07}$	2	150	14
	<i>Genea</i> spp.	$4,9 \times 10^{-05}$	$1,1 \times 10^{-05}$	15	278	103
	<i>Hymenogaster luteus</i>	$1,7 \times 10^{-04}$	$7,6 \times 10^{-06}$	1	108	7
	<i>Stephensia bombycina</i>	$1,7 \times 10^{-03}$	$3,1 \times 10^{-04}$	1	80	7
	Rufum-fajcsoport	$2,5 \times 10^{-03}$	$2,0 \times 10^{-03}$	48	501	328
Nem változott	<i>Gastrosporium simplex</i>	$4,0 \times 10^{-01}$	$3,2 \times 10^{-01}$	2	7	14
	<i>Phlyctospora fusca</i>	$2,8 \times 10^{-01}$	$2,9 \times 10^{-01}$	4	15	27
	<i>Hydnobolites cerebriformis</i>	$2,4 \times 10^{-01}$	$2,2 \times 10^{-01}$	5	19	34
	<i>Tuber nitidum</i>	$5,6 \times 10^{-02}$	$6,9 \times 10^{-02}$	5	13	34
	<i>Octavianina asterosperma</i>	$9,5 \times 10^{-01}$	$1,0 \times 10^{+00}$	6	40	41
	<i>Mattiolomyces terfezioides</i>	$6,1 \times 10^{-01}$	$5,4 \times 10^{-01}$	8	45	55
	<i>Elaphomyces granulatus</i>	$1,1 \times 10^{-01}$	$1,1 \times 10^{-01}$	9	34	62
	<i>Hymenogaster citrinus</i>	$8,4 \times 10^{-01}$	$1,0 \times 10^{+00}$	10	73	68
	<i>Pachyphloeus</i> sp.	$7,1 \times 10^{-01}$	$6,7 \times 10^{-01}$	16	99	109
	<i>Melanogaster ambiguus</i>	$1,5 \times 10^{-01}$	$1,8 \times 10^{-01}$	18	85	123
	<i>Hymenogaster griseus</i>	$6,4 \times 10^{-01}$	$6,2 \times 10^{-01}$	21	129	144
	<i>Tuber borchii</i> fajkomplex	$4,4 \times 10^{-01}$	$4,8 \times 10^{-01}$	26	208	178
	<i>Elaphomyces muricatus</i>	$2,4 \times 10^{-01}$	$2,6 \times 10^{-01}$	29	157	198
	<i>Tuber aestivum</i>	$1,0 \times 10^{-01}$	$1,1 \times 10^{-01}$	57	483	390

5.3 Kevés adattal rendelkező hipogeák

5.3.1 *Tuber foetidum* - bűdös szarvasgomba

A Finnországban megtalált „kis fehér” szarvasgomba minta 9 mm átmérőjű; narancsos barnás, aprón pikkelyezett, ritkán erezett glebájú, kellemetlen szagú termőtest volt. Perídiuma pszeudoparenchimatikus 330-380 μm vastag, mely lekerekített poligonális vagy kerek 15-19 μm átmérőjű sejteket tartalmazott. Jellemzően 1-5 spóras hialin ellipszoid aszkuszokat tartalmazott, melyek közül a domináns spóraszámú aszkuszok a 2 (35,8%) és 3 (33,9%) spórárt tartalmazóak voltak. Az egy-spóras aszkuszokban az askospórák $43,7\text{--}36,5 \times 38,9\text{--}25,5 \mu\text{m}$, átlagosan: $40,9 \times 31,1 \mu\text{m}$ ($n=10$). A spórák szabályos, főleg hatszögletű $2,4\text{--}8,5 \times 3,6\text{--}12,2 \mu\text{m}$ nagyságú hálószemekkel díszítettek (4. ábra).



4. ábra: A finn *Tuber foetidum* spórái. A mérce 10 μm -t jelöl

A termőtestből nyert ITS szekvencia (FN568055) 560 bp hosszúságú volt, mely a BLAST keresés alapján két *T. foetidum* (AJ557543, AJ557544, Halász *et al.* 2005) és egy Észtországból izolált *Tuber* sp. (AJ534706 Tedersoo *et al.* 2006) mutatott nagyfokú hasonlóságot (2010. december előtti lekérdezéssel). A BLAST által talált szekvenciáktól mindössze hét bázispárban tért el (1,25% különbség) mely intraspecifikus variabilitásnak tudható be. Az eredményeket jónéhány *Tuber* taxon bevonásával készült K2P szubsztitúciós mátrixszal készült Neighbor-joining (NJ) filogenetikai fán (Orczán *et al.* 2010) tapasztalható, előbbiekkkel monofiletikus elhelyezkedése is megerősíti. Újabb BLAST kereséssel (2014. 06. 23-ai lekérdezés) már 13 szekvenciát találtunk mely legalább 99%-ban lefedte a ZB3454-es minta szekvenciáját, és 98%-nál nagyobb hasonlóságot mutatott, mindegyik *Tuber*, vagy *Tuber foetidum* taxonómiai megjelöléssel.

5.3.2 *Elaphomyces personii* - kékelű álszarvasgomba

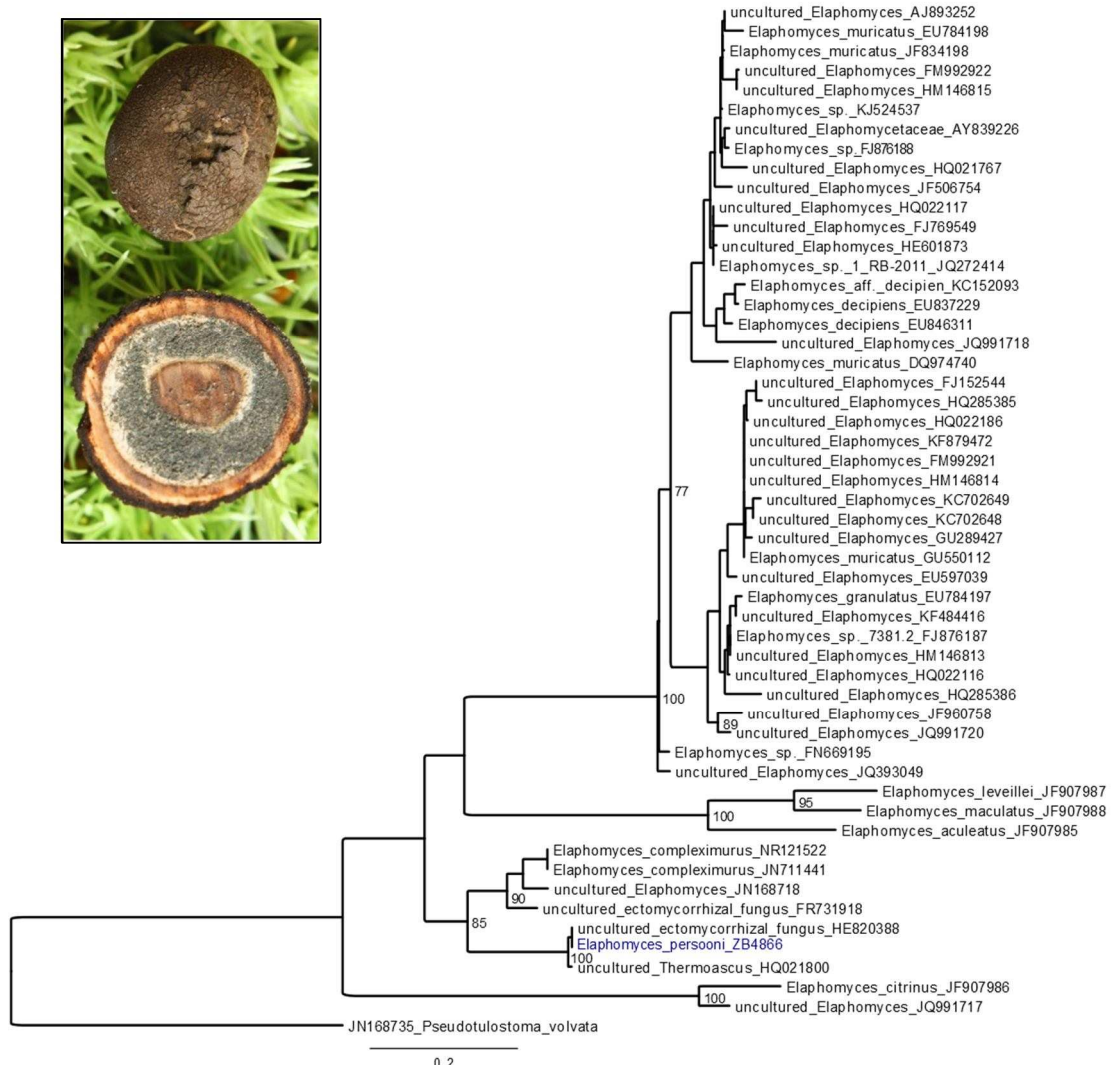
A Tokaj-Zempléni-hegyvidéken végzett célzott gyűjtő kutatómunkának és a helyi gombászok segítségével köszönhetően az *Elaphomyces personii* faj hat új élőhelyét és számos adatát – 12, mikotékában deponált, előfordulás - sikerült összegyűjtenünk (5. táblázat). Ami alapján úgy tűnik, az Európa szerte rendkívül ritka faj a Zempléni-hegységben lokálisan közepes gyakoriságúnak számít (Varga *et al.* 2013).

5. táblázat: A Tokaj-Zempléni-hegyvidéken megtalált *Elaphomyces personii* anyagok adatai. A táblázatban szereplő rövidítések: BZ =Bratek Zoltán, CsI = Csatlós István, HG = Hegyessy Gábor, HJE = Hegyessyné Jáger Erika, HR = Hegyessy Réka, HS = Hegyessy Sándor, KTJ = Kőszeginé Tóth Judit, MI = Merényi István, MZs = Merényi Zsolt, PG = Pelles Gábor, PA = Podlussány Attila, SzZ = Szaller Zoltán, SzZs = Szegedi Zsolt, VT = Varga Torda.

Lelőhely	Herb. szám	Leg.	Gyűjtés dátuma	Det.
<u>Hegyalja:</u>				
Sárospatak (Szava-hegy):	ZB 4901	HG, HS	2010.09.14	HG
Sárospatak (Szava-hegy):	ZB 4866	BZ, MI, MZs, VT, Paca	2013.07.29	MZs, VT
Rudabányácska (Lőtér)	ZB 4201	MZs, VT	2010.08.03	BZ
Rudabányácska (Lőtér)	ZB 4897	HG, HS, KTJ, SzZ, VT	2010.08.28	HG
Rudabányácska (Lőtér)	N.A.	HG, PG, SzZs	2010.09.10	HG
Rudabányácska (Lőtér)	N.A.	CsI, HG	2011.08.27	HG
Rudabányácska (Lőtér)	ZB 4894	HG, HS	2011.09.18	HG
<u>Hegyközi-dombság:</u>				
Bózsva (Kőember):	ZB 4912	HG, HS, PA	2009.07.04	BZ, HG, MZs
Bózsva (Kőember):	ZB 4910	HG, HJE, HR	2009.08.08	HG, VT
Bózsva (Kőember):	ZB 4911	HG, HS, VT	2010.07.29	HG, VT
Bózsva (Kőember):	ZB 4203	MZs, VT	2010.08.05	BZ
<u>Központi-Zemplén:</u>				
Bózsva (Balázs-völgy):	ZB 4898	SzZs	2011.10.26	HG, VT
Bózsva (Dzedó-völgy):	ZB 4899	SzZs	2011.10.26	HG
Bózsva (Egres-tag, Egres-völgy):	ZB 4900	SzZs	2011.10.26	HG

Nemzetközi szekvencia adatbázisokban még nincs *E. personii*nak határozott gombából származó szekvencia adat, így a ZB4866-os mintánkból felszaporított és szekvenált ITS régió BLAST eredmény alapján az *Elaphomyces compleximurus* (JN711441) szekvenciára hasonlít 99%-os lefedettséggel és 88%-os hasonlósággal legjobban az *Elaphomyces*ek közül. A szekvenciánkhoz nagyobb hasonlósággal (99%) csak két, talajmintából környezeti mintavételekkel gyűjtött minta illeszkedett, egy ismeretlen EM gomba (HE820388) és egy *Thermoascus*nak azonosított szekvencia (HQ021800). A GenBankból származó *Elaphomyces*ként feltöltött szekvenciák, és a BLAST alapján leghasonlóbbnak talált szekvenciákból készített ML filogenetikai fa alapján az *Elaphomyces* nemzetségen belül, az *E. compleximurus*al monofiletikus kládot alkotva, de mindegyik fajtól elkülönülten található (5. ábra). A faj molekuláris taxonómiai tisztázásához más területekről

(esetleg a típusanyagból) származó szekvenciákra, és a nemzetség teljes revíziójára lenne szükség.



5. ábra: A ZB4866-os *Elaphomyces personii* (kékkel kiemelve) rokonsági helyzetét bemutató ITS régió alapján készített ML filogenetikai fa. Az egyes ágakon a ML *bootstrap* értékek (> 70%) lettek feltüntetve. A taxon nevek után a szekvenciák azonosítója (*Accession number*) látható. Az ábra bal felső sarkában ZB4866-os termőtestekről készült kép látható.

5.3.3. *Gymnomyces* sp.

A ZB4998-as tiszaszőlősi ültetett nyarasban (*Populus x euramericana*) talált minta, egy 1,5 cm átmérőjű világos krémszínű, sima perídiumú gomba (6. ábra). Spórái kicsik 12,4 × 13,3 μm (Vol=1064 μm³) közel gömb alakúak (Q=1,08), melyek aprón tüskézett (maximum 0,5-1 μm) amyloid ornamentikával rendelkeznek. A perídium hifás, plektenchimatikus

szerkezetű, 140 μm vastag, melynek a felső 25-50 μm -e sötétebben pigmentált. A termőtestből még nem sikerült egy DNS szakaszt sem felszaporítani. Morfológiai bélyegek alapján *Gymnomyces* nemzetségbe tartozik (határozás: Funga Nordica). Leírása megfelel a Törökországban szintén újonnan megtalált *Gymnomyces xanthosporus*-nak határozott anyagokénak (Türkoglu & Castellano 2013). *Gymnomyces* nemzetséghez tartozó fajokat korábban Amerikából, Ázsiából és Nyugat Európából is kimutattak, de Magyarországról eddig még nem jeleztek.



6. ábra: A ZB4998 *Gymnomyces* sp. termőtestek

5.3.4 A *T. regianum*-szerű minták

A *T. regianum* és *T. bernardinii*-szerű minták ITS szekvenciái három jól elkülöníthető csoportot hoztak létre (6. táblázat). Ezek közül az A szekvenciákat a BLASTn programmal illesztve a legnagyobb lefedettségű (57-65%) és a legnagyobb hasonlóságot mutató (83-86%) szekvenciára is *T. excavatum* és *T. fulgens* szekvenciákat kaptunk. A B mintákra legnagyobb lefedettséggel (73-85%) *Choiromyces* szekvenciákat kaptunk 80% körüli hasonlósággal. Míg a C mintákra legnagyobb lefedettséggel (97-98%), 76-78% hasonlósággal rendelkező *Choiromyces* szekvenciák jöttek ki. A GenBank és Unite adatbázisokban *T. regianum*-nak határozott ITS szekvenciát nem találtunk, ez indokolja, hogy a BLAST során minden esetben *Excavatum*-fajcsoport belüli, vagy *Choiromyces* fajokkal kaptuk a legnagyobb egyezést.

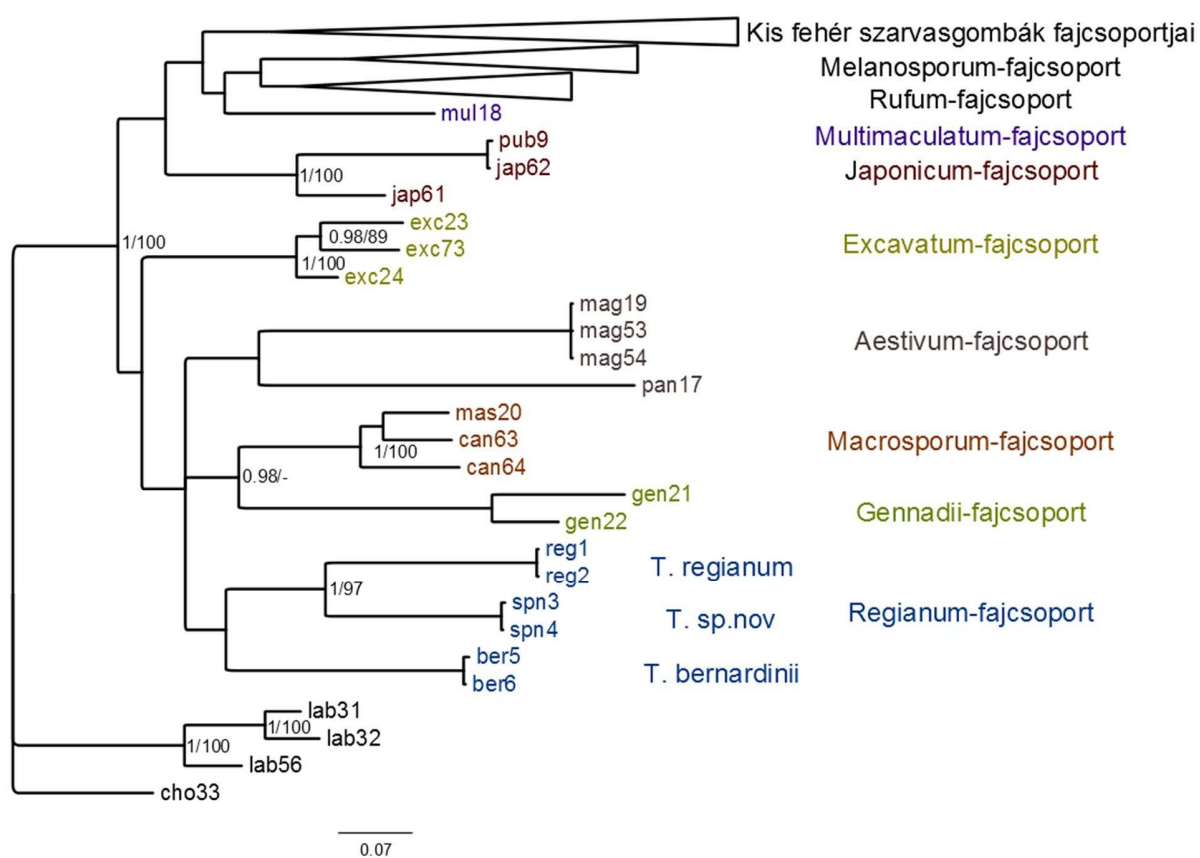
Mindhárom klád mintái között tapasztalt átlagos ITS régió „P-distance” távolság 23,5-27,4%, amely a leszármazási vonalak viszonylag korai elválására utal, és mindenképpen interspecifikus variabilitásnak tudható be (7. táblázat). A kládokon belüli variabilitás a B klád esetén 0-0,5% között mozog, a C klád két mintája között 0,3% míg az A klád mintái között 0,2-3,5%. Az A kládon belüli nagyobb eltérések oka ZB3081 és M43-as minta, melyek egymással 0,2% míg a többi, csoporton belüli szekvenciával 2,1-3,5% különbséget mutatnak. A nukleotid távolságoknál természetesen informatívabbak a választott szubsztitúciós mátrixon alapuló filogenetikai elemzések.

6. táblázat: A *T. regianum* szerű anyagok gyűjtési és élőhelyi adatai. Kód alapján a gyűjtők felsorolása: M22: E. Rubio, P. Juste, F. Gracia; M41: I.Paz; M40: L. Gori; M39: A. Montecchi; ZB3081: Szakács J. Bratek Z. M. Mikó, J. Gazo, A. Gógán; M38: J.Cabero, L Barrio; M43: L. Gori; M3: E. Rubio, P. Juste, F. Gracia; ZB4299: Erdei V., Nagy I. Bratek Z. Baski B.; M35: M. Marco; M36: A. Montecchi; ZB1303: Pálffy B.; ZB3044: Szakács J., Bratek Z.; ZB3657B: Szabó L.; ZB4290: Erdei V., Nagy I., Bratek Z., Baski B.; ZB4297: Erdei V., Nagy I., Bratek Z., Baski B.; ZB4559: Merényiné Bordás É., Merényi Zs.; ZB4293: Erdei V., Nagy I., Bratek Z., Baski B.; ZB3657C: Szabó L.; M23: Ormen; M45: G. Turricchia; M44: G. Turricchia; M42: B. Giampaolo; M37: L. Gori; M34: L. Lanconelli;

Klád	Kód	Herb. szám	Eredeti fajhatározás	Ország	Meghatározás	Tszf. (m)	Év	Hónap	Nap	Potenciális gazdanövények	pH
A	M22	JMV20011012-4	<i>Tuber regianum</i>	Spanyolo.	ITS	1300	2001	10	14	<i>Fagus sylvatica</i>	
A	M41	IC13080704	<i>Tuber regianum</i>	Spanyolo.	Morfológia	850	2007	8	13	<i>F. sylvatica, Corylus avellana</i>	
A	M40	JMV980925-1	<i>Tuber regianum</i>	Olaszo.	Morfológia	1300	1998	9	25	<i>F. sylvatica</i>	
A	M39	AM408	<i>Tuber regianum</i>	Olaszo.	Morfológia	1300	1986	12	30	<i>F. sylvatica</i>	
A	3081	ZB3081	<i>Tuber regianum</i>	Szlovákia	ITS, LSU	250-500	2005	9	22		5,8
A	M38	IC13071106	<i>Tuber regianum</i>	Spanyolo.	ITS	920	2011	7	31	<i>F. sylvatica, C. avellana</i>	
A	M43	IGM235	<i>Tuber regianum</i>	Olaszo.	ITS, LSU	1300	1998	9	25	<i>F. sylvatica</i>	
A	M3	erd-2590	<i>Tuber regianum</i>	Spanyolo.	ITS	1300	2001	10	14	<i>F. sylvatica</i>	
B	4299	ZB4299	<i>Tuber regianum</i>	Magyaró.	ITS	120	2011	7	6	<i>Quercus robur</i>	7,6
B	M35	793	<i>Tuber regianum</i>	Olaszo.	ITS	200				<i>Ostrya carpinifolia</i>	
B	M36	689	<i>Tuber regianum</i>	Olaszo.	ITS	900	1995	2	15	<i>O. carpinifolia</i>	
B	1303	ZB1303	<i>Tuber regianum</i>	Románia	ITS	600-700	1997	10	11		
B	3044	ZB3044	<i>Tuber regianum</i>	Slovakia	ITS	300-700	2005	8	22	<i>C. avellana, C. betulus, Q. petraea</i>	7,5
B	3657B	ZB3657B	<i>Tuber regianum</i>	Románia	ITS	400-700	2001	7			
B	4290	ZB4290	<i>Tuber regianum</i>	Magyaró.	ITS	130	2011	7	6	<i>C. avellana, Populus x canescens</i>	7,7
B	4297	ZB4297	<i>Tuber regianum</i>	Magyaró.	ITS	120	2011	7	6	<i>Picea abies</i>	7,6
B	4559	ZB4559	<i>Tuber sp.</i>	Magyaró.	ITS, PKC, LSU	250	2012	7	7	<i>F. sylvatica, C. betulus</i>	7,6
B	4293	ZB4293	<i>Tuber regianum</i>	Magyaró.	ITS, PKC, LSU	120	2011	7	6	<i>Corylus colurna, Tilia tomentosa</i>	7,6
C	3657C	ZB3657C	<i>Tuber regianum</i>	Románia	Morfológia	400-700	2001	7			
C	M23	2172	<i>Tuber regianum</i>	Olaszo.	ITS	1000	2000	8	7	<i>F. sylvatica</i>	
C	M45	NA	<i>Tuber regianum</i>	Olaszo.	ITS, PKC, LSU	900	2010	7	16	<i>F. sylvatica</i>	
C	M44	NA	<i>Tuber regianum</i>	Olaszo.	LSU	900	2013	8	1	<i>F. sylvatica</i>	
C	M42	B17	<i>Tuber bernardinii</i>	Olaszo.	Morfológia	800	1996	12	21	<i>Castanea sativa, Betula pendula</i>	
C	M37	2542	<i>Tuber bernardinii</i>	Olaszo.	Morfológia	900	1996	12	21	<i>C. sativa, B. pendula</i>	
C	M34	2318	<i>Tuber regianum</i>	Olaszo.	Morfológia	500	1990	12	15	Lomblevelű	

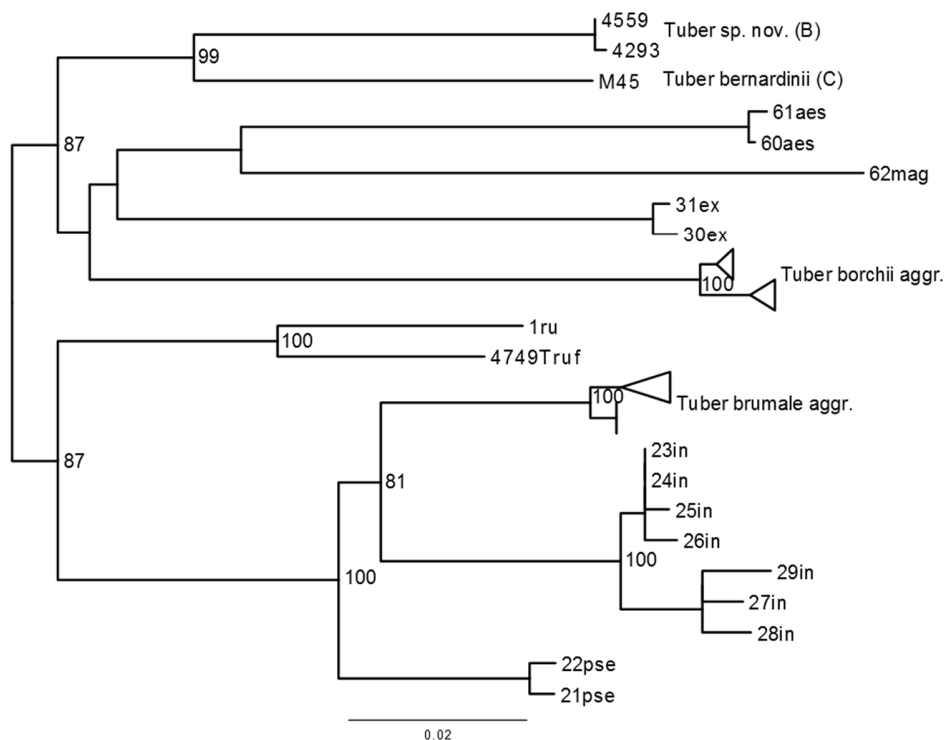
7. táblázat: Az ITS szekvenciákból számolt “*P-distance*” nukleotid távolságok a *Regianum*-fajcsoport kládjain belül és azok között.

Összehasonlítás	Klád	Átlag	Szórás	Min.	Max.
Kládokon belüli	A A	1,7%	1,3%	0,2%	3,5%
	B B	0,2%	0,2%	0,0%	0,5%
	C C	0,3%	-	0,3%	0,3%
Kládok közötti	C A	25,8%	0,5%	25,0%	26,5%
	C B	27,4%	0,2%	27,1%	27,7%
	A B	23,5%	0,3%	23,1%	24,2%



7. ábra: A *Tuberales* nemzetség főbb fajcsoportjainak viszonyát bemutató 5.8S-ITS2-LSU összekapcsolt régiók alapján készített Bayesian filogenetikai fa. A „kis fehér szarvasgombák fajcsoportjai” tartalmazza a *Puberulum*-, *Maculatum*- és *Gibbosum*-fajcsoportokat. Az egyes ágakon a Bayesian poszterior valószínűségi (PP) és *Maximum Likelihood* (ML) *bootstrap* értékek lettek feltüntetve a törtvonal „/” két oldalán. Az értékek csak abban az esetben lettek feltüntetve, ha PP > 0,95 vagy az ML *bootstrap* érték > 70%. A minta kódok az 5. mellékletben lettek feloldva. A mérce 100 bázispáronként 7 nukleotid változásnak megfelelő ághosszat jelöl.

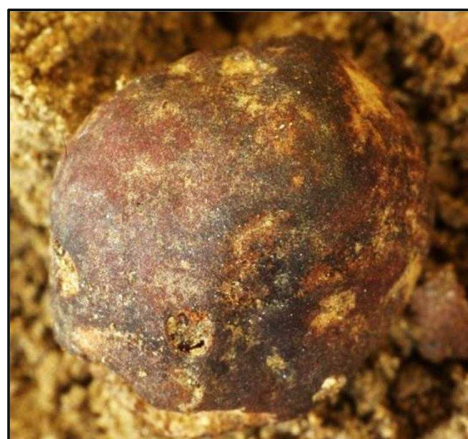
A külföldi mikotékák kámforos tartósítási eljárása miatt, azon minták amplifikálhatósága nagyon gyenge volt, így összesen 17 ITS 6 LSU és 3 PKC régióhoz tartozó *Regianum*-fajcsoport belüli szekvenciát sikerült nyernünk. A filogenetikai vizsgálatok (MrBayes, RaxML) során készült LSU, PKC és kombinált 5.8S-ITS2-LSU farekonstrukció is. A MrBayes MCMC futás során az ASDSF érték a kombinált régiókra 0,00549, míg a bővített taxonszámú, de csak LSU régiót tartalmazó adatsorra 0,00756 lett. Bemutatásra csak a kombinált (7. ábra) és PKC régió alapuló (8. ábra) fa kerül, mivel az egy régióra különböző eljárással készített törzsfák topológiája megegyezett, az eltérő mintákat és lókusztokat felhasználó törzsfá rekonstrukciókban is a nemzetség fajcsoportjai megegyeztek, de azok egymáshoz viszonyított helyzete némileg módosult. Szintén ezt a bizonytalanságot tükrözi az alapi elágazások gyakran alacsony megbízhatósági értékei (*Bootstrap* és PP). Ennek ellenére a *T. regianum*-szerű minták A és B kládjai minden esetben egymás testvércsoportjainak adódtak. A C klád mindig az A-B klád közelében vált le, de monofiletikus csoportosulásukat egyik módszer sem támogatta kellő



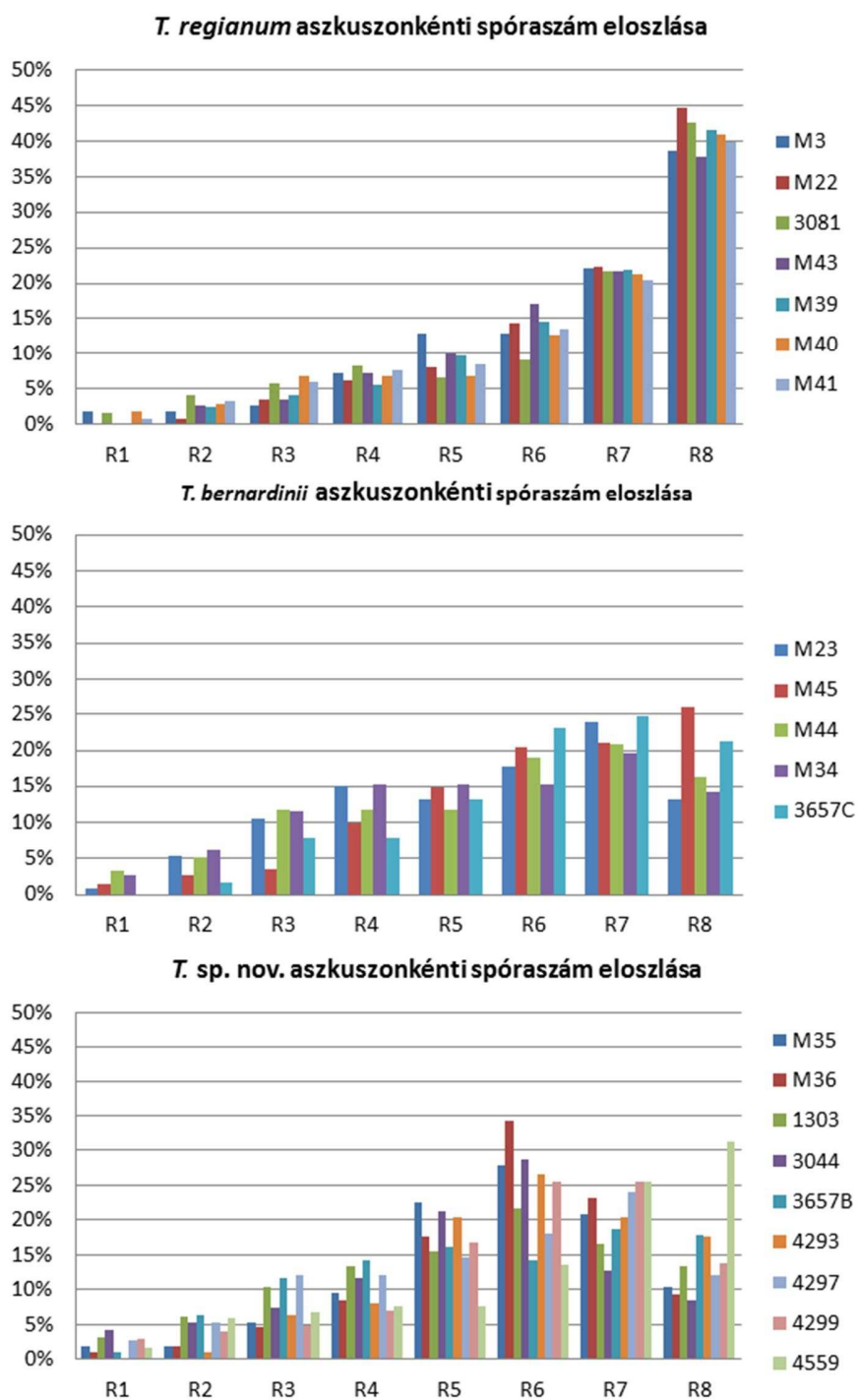
8. ábra: PKC régió alapján készített Maximum Likelihood filogenetikai fa. Az egyes ágakon az ML bootstrap értékek lettek feltüntetve, de csak abban az esetben, ha ML *bootstrap* érték > 70%. Megfelelő klárcsoport hiányában a *Rufum*- és *Melanosporum*-fajcsoportokkal lett legyökereztetve, amely az 5.8S-ITS2-LSU fa alapján a legmegfelelőbb. A minta kódok az 5. mellékletben lettek feloldva. A mérce 100 bázispáronként 2 nukleotid változásnak megfelelő ághosszat jelöl.

mértékben. A *T. regianum*-szerű minták mindhárom kládja minden esetben az Aestivum-, Gennadii-fajcsoportok közelében ágaztak el, megfelelő támogatottsággal, azokkal testvércsoportot képezve. A PKC lókuszt alapján készített fa a B és C csoport mintáit egy jól támogatott kládba rendezi. Habár a pontos topológia felrajzolásához több független konzervatív lókuszt bevonására lenne szükség, az eddigi filogenetikai eredmények alapján az A és B klád biztosan, akár a C kláddal együtt egy új, eddig nem vizsgált *Tuber* fajcsoportot képez.

Mindhárom fajhoz tartozó termőtestekről elmondható hogy kicsik, legfeljebb 1-2 cm átmérőjű közel gömb alakúak, melyeken alapi bemélyedés nem található. A *T. bernardinii* felszíne minden esetben teljesen sima, míg a B faj (*T. sp. nov.*) esetén jelenhetnek meg pikkelyek, addig a *T. regianum* mintákon szinte mindig láthatóak kisebb nagyobb pikkelykék, táblaszerű felrepedezések, mely sokszor a *T. macrosporum* perídiumára emlékeztet sztereomikroszkóp alatt vizsgálva. Míg a *T. bernardinii* kiszáradt termőteste világos, krémszínű barna (CIC:16,17,19,21,24), addig a *T. regianum* sötétebb (CIC:19,24,26,36) gyakran vöröses, lilás foltokkal. A *T. sp. nov.* mintákon is gyakran látható vöröses-lilás foltozottság (9. ábra), mely megszáradva szinte feketévé válik (CIC:19,21,26,36,38). Továbbá a *T. bernardinii* minták egy részén jól kivehető aranysárga kiágazó hifa pamacsok, melyek a többi két fajnál egy esetben sem jelennek meg. A kiágazó elemek 5-10 µm vastag, 15-45 µm hosszúak. A *T. regianum* minták esetében egyértelműen a nyolc spórás aszkuszok dominálnak, minden esetben 35% feletti részesedéssel. A másik két faj esetén a nyolc spórás aszkuszok aránya egyszer sem éri el a 35%-ot, de itt is minden esetben a 6-8 spórás aszkuszok dominálnak jóval nagyobb csoporton belüli változatosságot mutatva (10. ábra).



9. ábra: A ZB4559, B kládból származó, *Tuber* sp. nov. termőtest külső felszíne

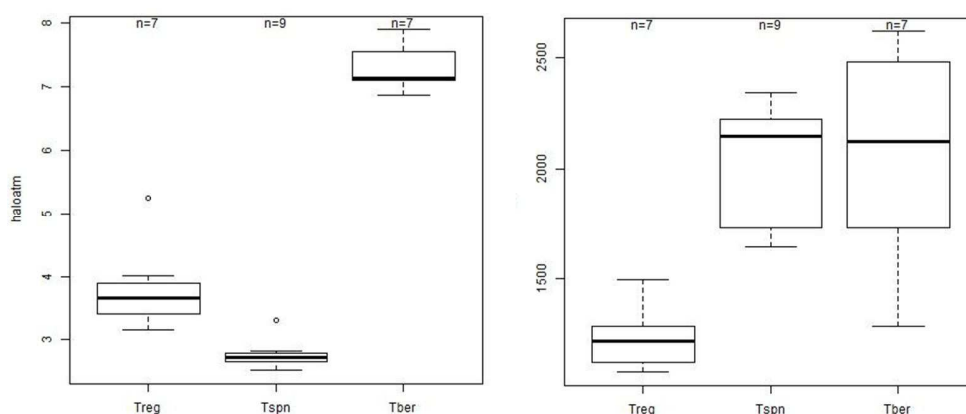


10. ábra: A *Regianum*-fajcsoport mintáinak aszkuszonkénti spóraszám eloszlása R1-R8-ig (x tengely) az 1-8 spórási aszkuszok összeshez viszonyított arányát (y tengely) jelöli.

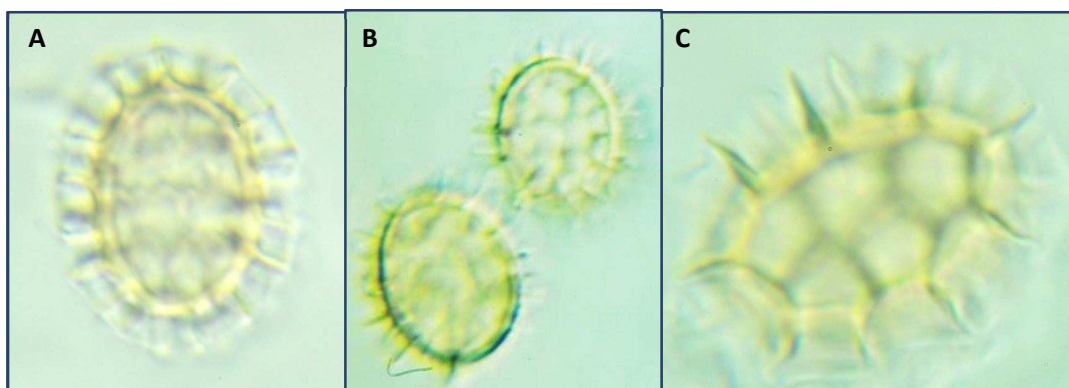
A nyolc-spórás aszkuszkokban mért spóra és ornamentika méretek az 8. táblázatban vannak összefoglalva. A *T. regianum*nak vannak a legkisebb spórái, mely legjobban a spóra térfogat értékeken látható (11. ábra, 8. táblázat). Emellett a legkönnyebb elkülöníthetőséget a spóra ornamentika alakja adja, mely a *T. regianum* esetén közepes méretű hálószemekből áll, melyben az összeköttetési pontok vége bunkószerűen megvastagszik, lekerekített. A *T. bernardinii* mintáknak hatalmas méretű hálószemei vannak, melyek összekötő része hegyesen végződik, ezáltal az egész spórának buzogány alakot adva. Az *T. sp. nov.* spórái szabályos 5-6 szögletű apró hálószemekkel díszítettek, melyek magassága nem haladja meg a 2 μm -t (11. ábra; 12. ábra).

8. táblázat: A Regianum-fajcsoport mintáinak spóra jellemzői. Az egyes cellákban felül az átlagok, alatta zárójelben a szórások lettek feltüntetve.

Mintaszám	Klád	Sp. Szélesség (μm)	Sp. Hossz (μm)	Q (sp. Hossz / szélesség)	Térfogat (μm^3)	hálószem magasság (μm)	hálószem szélesség (μm)	hálószem átmérő (μm)
7	A (<i>T. regianum</i>)	11,79 (0,86)	16,66 (1,12)	1,42 (0,12)	1220 (218)	2,44 (0,80)	3,62 (0,94)	3,79 (0,99)
9	B (<i>T. sp. nov.</i>)	14,52 (1,55)	18,05 (1,88)	1,26 (0,19)	2006 (453)	1,43 (0,53)	2,40 (0,50)	2,76 (0,55)
7	C (<i>T. bernardinii</i>)	14,06 (1,58)	19,69 (1,97)	1,41 (0,13)	2085 (599)	3,43 (0,90)	6,04 (0,82)	7,31 (0,96)



11. ábra: bal: Az átlagos hálóátmérő (μm); jobb: Spóra térfogat (μm^3) adatok alapján készült boxplotok. Rövidítések: Treg: *T. regianum*; Tspn: *T. sp. nov.*; Tber: *T. bernardinii*



12. ábra: A Regianum-fajcsoportba tartozó fajok spóratípusai. (A) *T. regianum* (B) *T. sp. nov.* (C) *T. bernardinii*

A perídium két rétegre bontható, melyből a külső izodiametrikus sejtekből álló pszeudoparenchima, aminek a legfelső része erősebben pigmentált lehet, míg a belső réteg többnyire kompakt, hifás szerkezetű plektenchimatikus. Az egyes rétegek vastagsága az 9. táblázatban lett összefoglalva. A perídium vastagsága az *T. sp. nov.* mintáinak jóval kisebb, mint a másik két fajnak.

9. táblázat: A karakterek alapján egy határozókulcsot lehet létrehozni a Regianum-fajcsoport fajaira, melyhez az értékek természetesenként legalább 10 mérés átlagra lettek megadva:

	Mintaszám	Klád	teljes perídium vastagsága (µm)	külső réteg vastagsága (µm)	belső réteg vastagsága (µm)	pigmentált rész vastagsága (µm)
Átlag	7	<i>A (T. regianum)</i>	275	127	150	49
	10	<i>B (T. sp. nov.)</i>	193	105	96	51
	5	<i>C (T. bernardinii)</i>	320	162	158	39
Szórás	7	<i>A (T. regianum)</i>	99	56	59	28
	10	<i>B (T. sp. nov.)</i>	59	40	50	24
	5	<i>C (T. bernardinii)</i>	118	61	78	76

A karakterek alapján egy határozókulcsot lehet létrehozni a Regianum-fajcsoport fajaira, melyhez az értékek természetesenként legalább 10 mérés átlagára lettek megadva:

- 1) Az átlagos spóra térfogat $1500 \mu\text{m}^3$ feletti. 2
 Az átlagos spóra térfogat $1500 \mu\text{m}^3$ alatti 3
- 2) A hálószemek átlagos magassága $2 \mu\text{m}$ alatti, és átmérője $3,5 \mu\text{m}$ alatti *T. sp. nov.*
 A hálószemek nagyobbak ennél 3
- 3) A termőtest bamás, lilás/vöröses foltokkal, apró pikkelyekkel fedett, néhol sima. A nyolc spórás aszkuszok aránya 35% feletti. A hálószemek összeköttetése bunkó alakú, a hálószemek átlagosan legfejlebb $5,5 \mu\text{m}$ nagyok *T. regianum*
 A termőtest krémszínű, teljesen sima, melyen aransárga szőrpamacsok lehetnek. Hat-nyolc spórás aszkuszok dominálnak, de a 8 spórás aszkuszok aránya 35% alatti. A hálószemek összeköttetése hosszan kihúzott, hegyes. A hálószemek átlagos átmérője nagyobb, mint $5,5 \mu\text{m}$ *T. bernardinii*

A fajcsoportba tartozó minták rendszertani revideálása révén a fajok elterjedését is értékelní lehet. Rendkívül ritka fajok lévén mindössze öt országból kerültek eddig elő (Montecchi & Sarasini 2000; Bratek *et al.* 2001a; Gori, 2003). A *T. regianum* minták közül Olaszországból és Spanyolországból több, míg Szlovákiából egy minta állt rendelkezésre. A *T. bernardinii*t eddig csak Olaszországban találták, ugyanakkor a fajok tisztázása rávilágított, hogy a ZB3657, Romániából gyűjtött kevert anyag egy része is ide tartozhat. A Pannonicum flóratartományra nézve elsőként megtalált „*T. regianum*”-ról (Orczán *et al.* 2012) pedig kiderült, hogy egy új leírandó fajhoz tarozik, melynek tíz meglévő mintájából munkacsoportunk ötöt Magyarországon, kettőt Romániában, egyet Szlovákiában talált. Emellett két olaszországi minta is ebbe a fajba tartozik.

A potenciális gazdanövények listájából (6. táblázat) jól kitűnik, hogy a valóban *T. regianum* fajhoz tartozó termőtesteket élőhelyein minden esetben megtalálható volt a *Fagus sylvatica*, legtöbbször csak az. Így felmerül annak a lehetősége, hogy a *T. regianum* gazdanövény specialista a legtöbb valódi szarvasgombával ellentétben. A másik két faj gazdanövény spektruma jóval tágabbnak bizonyul, melyhez a zárwatermők mellett még egy nyitwatermő fajt (*Picea abies*) is találtunk.

A *T. regianum*ot tipikus hegységi gombaként írták le, és valóban a legtöbb mintája 1000 méteres tengerszint feletti magasságból került elő. Egyetlen kivétel a Szlovákiában 250-500 m magasságban megtalált élőhelye. A *T. bernardinii* mintái már alacsonyabb térszínekről, 400-1000 m körüli magasságból gyűltek, míg az új fajnak egészen alacsony, tengerszint feletti 100-300 m-ről van a legtöbb adata, habár Olaszországban 900 m magasságban is megtalálták. Nem szabad megfeledkezni, hogy délebbre (Olaszország) magasabb térszíneken lehet ugyanolyan időjárás, mint északabbra (Szlovákia) alacsonyabb térszíneken, mely magyarázhatja az egy-egy magasság értékben kilógó *T. regianum* és *T. sp. nov.* előfordulási adatát.

5.4 Revízióra váró taxonok.

5.4.1 A *Genea* nemzetség

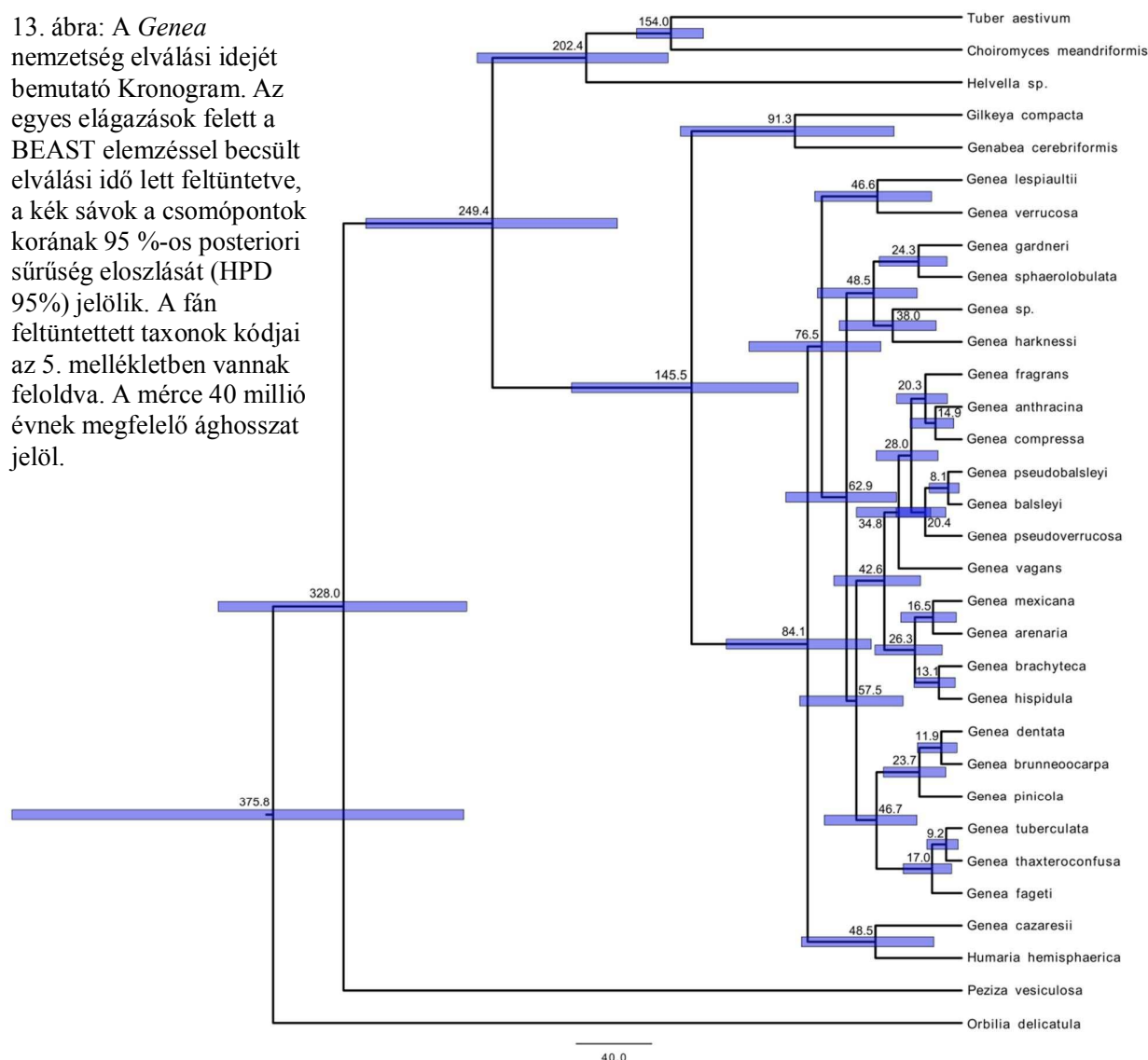
Az ITS és LSU-Tefl kombinált filogenetikai elemzések kilenc új faj lehatárolását tették lehetővé (Alvarado P, Cabero J, Moreno G, Bratek Z, Van Vooren N, Kaounas V, Konstantinidis G, Agnello C, Merényi Zs, Smith EM nem publikált adatok; Alvarado *et al.* 2014). Adatbázisunk három új faj leírásához járult hozzá, így a *Genea pseudobalsleyi* Agnello, Bratek & J. Cabero (MB809079), *Genea pseudoverrucosa* Bratek, Konstant. & Van Vooren (MB809080), és a *Genea compressa* Z. Merényi, J. Cabero & G. Moreno (MB809072) leírásához. A Magyarországról származó közel harminc szekvenált mintát összesen hét *Genea* fajhoz lehetett besorolni, melyek közül a korábban leírt fajok mellett három tudomány számára új fajt is ki lehetett mutatni, melyek közül az alábbiakban a *G. compressa* rövid morfológiai jellemzése kerül bemutatásra.

A *G. compressa* fajnevét az aszkokarpium belsejébe türemkedő perídium falak sűrű, összenyomott jellegéről kapta. A termőtest 8-14 mm átmérőjű, mely fekete apró szabálytalan pikkelyekkel fedett. A termőtesten apikális nyílás, és bazális hifacsomó is található. A perídium egy külső pszeudoparenchimatikus, 38–47,5 × 29–36 µm nagyságú izodiametrikus sejtekből álló, 230-250 µm vastag rétegből, és egy belső hifákból lazán összefonódó, 120-240 µm rétegből áll. Az epithécium 90-130 µm vastag, mely felszíne hasonló a külső perídiuméhoz. A himénium 200–280 × 25–38 (–42) µm méretű aszkuszokat, és 310–380 × 3–5 µm nagyságú parafiziseket tartalmaz. Az egy sorban elhelyezkedő aszkospórák (23,5–) 24,0–26,5 (–30,5) × (18,0–) 19,0–21,0 (–25,5) µm méretűek, $Q = 1,26$. A spórákon (2,3–) 3,3 (–5,3) × (2,0–) 3,3 (–5,8) µm

nagyságú kúp alakú papillák figyelhetőek meg. A fajt eddig Magyarországon, Spanyolországban és Marokkóban sikerült kimutatni.

A filogenetikai elemzések kiegészítéseként elkészült a *Genea* nemzetség divergencia időit becslő molekulári óraelemzés is. Az MCMC futtatás során kapott *posterior* effektív minta méret (ESS) minden fontos paraméter esetén meghaladta a kritikus 200-as értéket. Az MCC fa (13. ábra) topológiája megegyezett az LSU-Tef1 kombinált fa topológiájával. A *Genea/Humaria* leszármazási vonal legkorábbi közös őse 145,5 millió évvel ezelőtt (HPD 95%: 86,7-206,8 millió

13. ábra: A *Genea* nemzetség elválási idejét bemutató Kronogram. Az egyes elágazások felett a BEAST elemzéssel becsült elválási idő lett feltüntetve, a kék sávok a csomópontok korának 95 %-os posteriori sűrűség eloszlását (HPD 95%) jelölik. A fán feltüntetett taxonok kódjai az 5. mellékletben vannak feloldva. A mérce 40 millió évnek megfelelő ághosszat jelöl.



év) válhatott el a *Gilkeya* leszármazási vonal őseitől. Érdekes, hogy a *Genea cazaresii* a *Humaria* fajokkal, és nem a *Geneákkal* képez monofiletikus csoportot, ahogyan azt korábbi, ITS szekvenciákon alapuló munkák is kimutatták (Erős-Honti *et al.* 2008; Guevara-Guerrero *et al.*

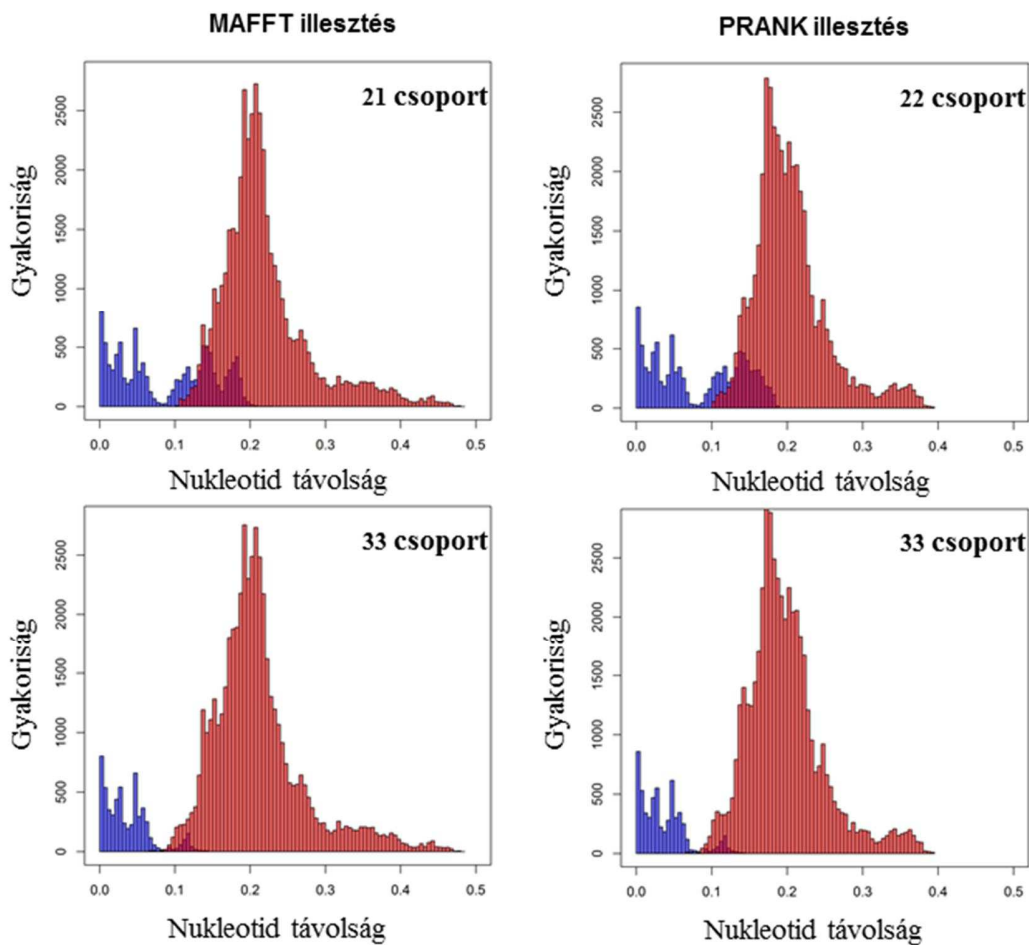
2012). A *Genea cazaresii-Humaria* és a többi *Genea* faj feltehetően 84,1 millió évvel ezelőtt (HPD 95%: 47,9-124,8) váltak el egymástól. A *Genea* nemzetségen belüli első elágazás a földtörténeti kréta korban kb. 76,5 millió évvel ezelőtt (HPD 95%: 42,9-112,7) következett be, melyet a többi elágazás követett (13. ábra).

5.4.2 Rufum-fajcsoport

A Rufum-fajcsoport vizsgálatához 327 ITS szekvenciát használtunk fel, mely szekvenciák közel egyharmada a kutatócsoportunk eredménye. Az ITS régióra sikeresen szekvenált 104 minta olasz, francia és spanyol anyagok mellett, 78 adatbázisunkban szereplő, Magyarország területéről származó anyagot is tartalmazott (5. melléklet). Az alkalmazott két illesztés között jelentős különbség volt a *gap*-ek kiosztásában, míg a MAFFT illesztésben a teljes hosszhoz viszonyítva 56% volt a *gap*-ek aránya, addig a PRANK illesztés esetén ez az érték 80% volt, ami a teljes illesztett hosszban is megnyilvánult: 1630 bp, szemben a MAFFT illesztés 804 bp-os hosszával. A variábilis helyek számában nem volt jelentős eltérés, viszont a MAFFT illesztés során ennek 87% parszimónia informatív hely (PIS) volt, szemben a PRANK illesztés 80%-os PIS/variábilis hely arányával. A bayesian analízis öt millió generáció után az ASDSF érték 0,010351 a PRANK és 0,010685 a MAFFT illesztés esetén. A Bayes-féle filogenetikai fákön látható kládok száma megegyezett a RaxML futtatásokkal kapott fákön láthatókkal (4. melléklet). Az elemzések korántsem tekinthető kielégítőnek, olyan szempontból, hogy a fajcsoporton belüli számos elágazás rendelkezik alacsony megbízhatósági értékkel. Ennek ellenére a törzsfán is látható, hogy számos, egymástól elkülönült monofiletikus leszármazási vonal különül el.

A Rufum-fajcsoportra elvégzett ABGD elsődleges faj lehatároló módszer a MAFFT illesztéshez 30 a PRANK illesztéshez 28 különböző csoportosítást hozott létre. Ezekből csak a gombáknál általánosan elfogadott 3%-os nukleotid távolság határ körüli (2,4-5,3%) értékekkel rendelkező 5-5 csoportosítást vizsgáltuk. A csoportok száma, és a küszöb értékek az 10. táblázatban lettek összefoglalva, míg az egyes csoportosítások. 4. és 5. mellékletekben láthatóak. Ha a legkevesebb 21 és 22 csoportot létrehozó osztályozásokat nézzük, észrevehető, hogy az ABGD MAFFT-os 1. és PRANK-os 6. csoportja a filogenetikai fákön polifiletikus, és 7-7 olyan leszármazási vonalat fog össze, melyek a 33 csoportot létrehozókban külön-külön csoportok lennének. Vagyis nukleotid távolságban az 5,3%-nál hasonlóbbak számos egymástól eltérő vonalon megtalálhatóak, így ez a “konzervatív” osztályozás mindenképpen hibás. Ugyanerre

lehet következtetni a hisztogramok (13. ábra) alapján is, ahol a kevesebb számú csoportot létrehozó osztályozásoknál nagyobb a csoportok közötti és csoporton belüli távolságok átfedése, mint a nagyobb számú csoportok esetén. Az eredmények alapján a Rufum-fajcsoporton belüli akár 33 potenciális filogenetikai faj lehet, amit szintén csak jóval alaposabb, több független lókuszon alapuló vizsgálattal lehetne igazolni.



13. ábra: párosított nukleotid távolság hisztogramok. A kék szín a csoportokon belüli párosításokat, míg a piros szín a csoportok közötti párosításokból adódó távolságot jelöli. Látható hogy nagyobb számú csoport kialakításával a két eloszlás közti átfedő rész csökkent.

10. táblázat: A Rufum-fajcsoport mintáin végrehajtott ABGD elemzés kétféle illesztéssel kapott 5-5 osztályozási eredményének összehasonlítása.

Illesztés	Rufum csoportok száma	Küszöb nuk.táv.	küszöb feletti csoport átlagok	3% feletti csoport átlagok	Magyar minták csoport száma
MAFFT	33	2,8%	7	0	8
	32	3,3%	7	0	8
	28	3,9%	6	2	8
	27	4,5%	5	3	7
	21	5,3%	5	3	6
PRANK	33	2,4%	7	0	8
	32	2,8%	6	0	8
	31	3,3%	7	0	8
	29	3,9%	5	3	8
	22	4,5%	6	2	6

A vizsgálatba vont minták $\frac{3}{4}$ -éhez tartozott földrajzi megjelölés, ami a 33 csoportot létrehozó osztályozásból 29 csoportról szolgáltat információt. Ez alapján Ázsiában legalább 4, míg Európában és Amerikában egyaránt 14-14 fajjal számolhatunk. A Kárpát-medencéből származó 78 minta, a legkevesebb csoportot létrehozó osztályozások alapján 6-6, míg a többi osztályozás alapján inkább 8 feltételezett fajhoz tartozik. Ezáltal az Európában fellelhető 14 potenciális fajból a Kárpát-medencében 8 előfordul.

5.5 *Tuber brumale* aggr.

5.5.1. Molekuláris filogenetikai elemzések

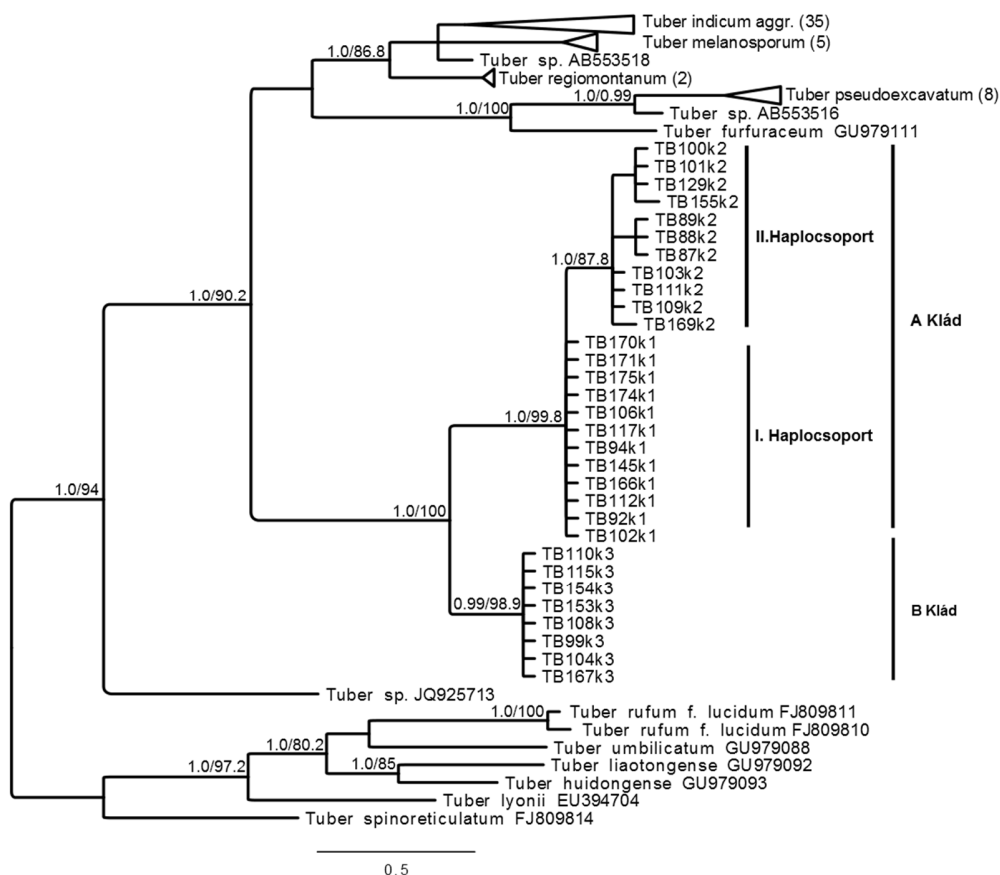
A filogenetikai vizsgálatokhoz összesen 108 mintát sikeresen szekvenáltunk, melyhez még 58 *T. brumale* vagy *T. brumale* f. *moschatum* és 69 közel rokon faj szekvenciáját töltöttük le nemzetközi adatbázisokból. Így összesen 140 ITS, 90 LSU, és 28 PKC szekvenciát vontunk be a filogenetikai elemzésekbe. Az ITS, LSU és PKC régiókból készült MP fák adatai az 11. táblázatban lettek feltüntetve. Az azonos lókusszal készített filogenetikai fák az alkalmazott fakészítő módszertől (Bayes-féle, MP alapú) és különböző *gap* kezeléstől függetlenül egy kivételt leszámítva megegyező topológiát eredményeztek. Ez a kivétel az ITS alapú MP fa esetén jelentkezett, ahol a *gap*-eket 5. Karakterként kezeltük, melynek oka a bevezetőben említett,

T. brumale ITS-ben megtalálható kb. 300 bp-os inzerció lehet. Az LSU alapú filogenetikai fán (14. ábra) a *T. brumale* minták a *Melanosporum*-fajcsoporton belül egységes, külön leszármazási vonalat képviselnek, melyen belül további két monofiletikus klád (A és B klád) különíthető el, magas támogatottsággal. Az A kládon belül további két csoport különíthető el (I. és II.), melyek külön-külön nem tekinthetők monofiletikus egységeknek. Az ITS és PKC fák (15. és 16. ábrák) alapján szintén magas támogatottsággal két monofiletikus kládra (A és B) szeparálódnak a *T. brumale* minták. Viszont, amíg az ITS és LSU alapú fákon megfigyelhető az A kládon belüli két csoport (I. és II.), addig a PKC fa nem mutatja ezt a struktúrát. Emiatt nem ajánlott több lókuszt összekapcsolásával (*concatenated*) fát készíteni, amit a PHT teszt szignifikáns eredménye ($p=0,0004$) is megerősít.

11. ábra: A Maximum Parszimónia (MP) eljárással készült filogenetikai fák adatai. CI: Konzisztencia index, RI: Retenciós index, RC: Újraskálázott konzisztencia index. Továbbá fel lettek sorolva a fák hossza, a teljes karakterek száma, a parszimónia informatív karakterek száma (PIS), a kül-, és belcsoportban lévő minták száma, valamint az, hogy ezekből mennyi a *T. brumale* aggr. minta.

Régió	Gap kezelés	Hossz	CI	RI	RC	Külcsoport (db)	Belcsoport (db)	<i>T. brumale</i>	PIS	Teljes karakterek száma
ITS	Hiányzó	215	0,926	0,992	0,918	4	136	136	176	762
	5. karakter	722	0,910	0,981	0,892	4	136	136	507	762
LSU	Hiányzó	301	0,631	0,942	0,595	7	85	31	121	523
	5. karakter	310	0,639	0,942	0,601	7	85	31	126	523
PKC	Hiányzó	77	0,987	0,994	0,981	4	24	24	65	735
	5. karakter	86	0,988	0,994	0,983	4	24	24	73	735

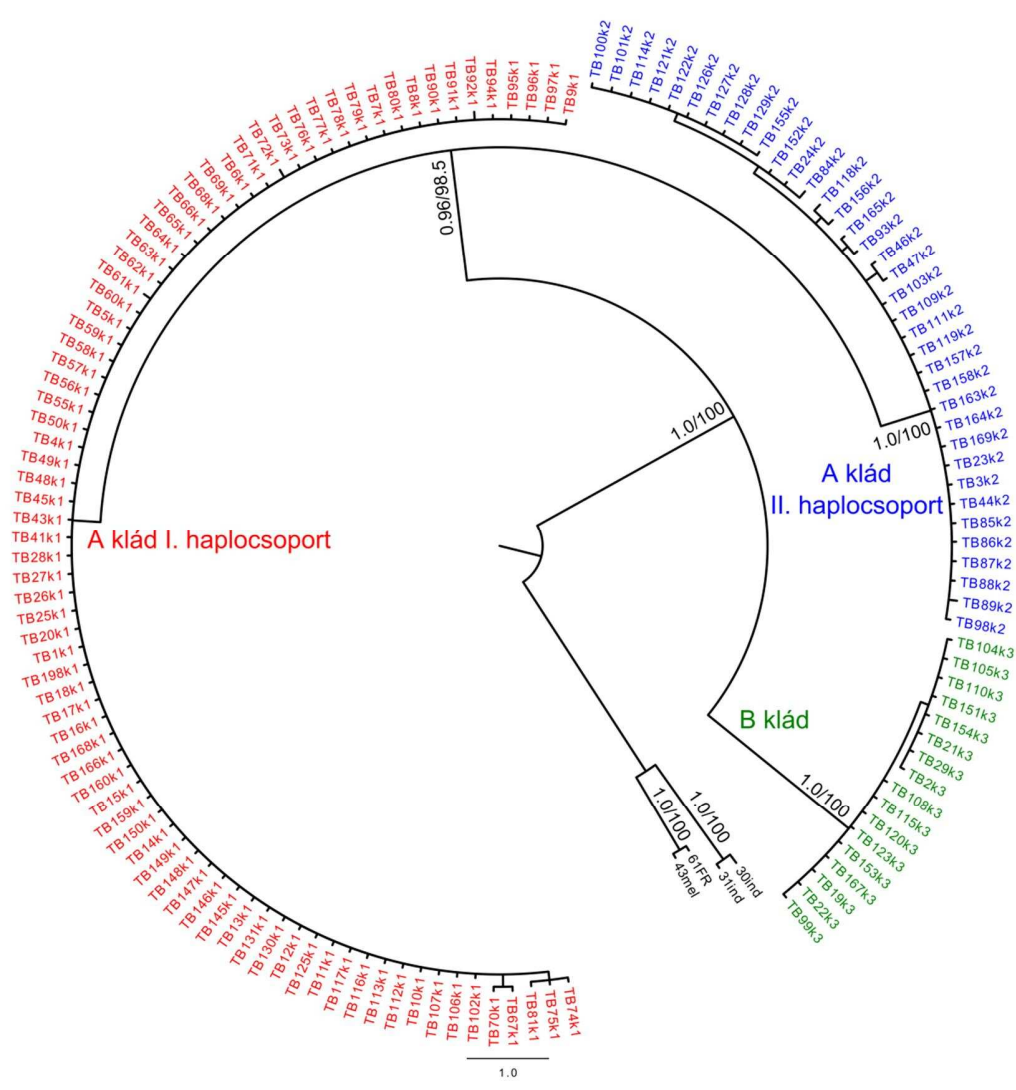
A „P-distance” módszerrel kiszámított csoportok közötti nukleotid távolságok alapján és az általánosan használt 3%-os határ mellett (Nilsson *et al.* 2008; Bonito *et al.* 2010b), az A klád I.-es és II.-es csoportja közötti távolság (2,02%) még intraspecifikus különbségnek vehető, míg az A és B kládok közötti távolság (9,32%) már interspecifikus variabilitásnak tudható be (12. táblázat).



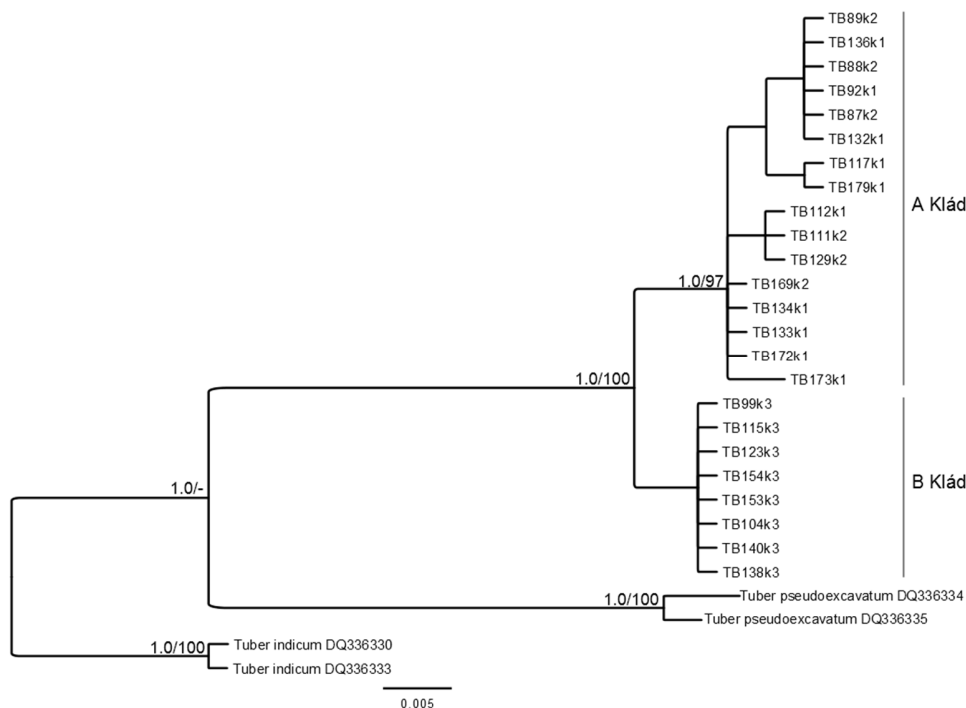
14. ábra: Melanosporum-fajcsoport LSU régiója alapján készített Bayesian filogenetikai fa. Az egyes ágakon a Bayesian poszterior valószínűségi (PP) és Maximum Parszimónia (MP) *bootstrap* értékek lettek feltüntetve a törtvonal „/” két oldalán. Az értékek csak abban az esetben lettek feltüntetve, ha PP>0,95 és az MP *bootstrap* érték > 70%. Az összevont (*collapsed*) ágakon a fajnév után zárójelben a bevont szekvenciák száma látható, melyek az 6. mellékletben vannak kifejtve. A *Tuber brumale* aggr. A és B kládjai, valamint az I. és II. haplocsoport jelölve van, a kódok szintén az 6.mellékletben lettek feloldva.

12. táblázat: Az ITS szekvenciákból számolt távolság mátrix. Egy sor és egy oszlop metszetében lévő felső értékek a köztük lévő párosított nukleotid távolság (P-distance) átlagát, az alsó értékek a szórását jelölik.

Klád/Haplocsoport	I.	II.	B	A
I. Haplocsoport	0,032%	2,024%	9,258%	
	0,073%	0,094%	0,085%	
II. Haplocsoport		0,201%	9,450%	
		0,166%	0,254%	
B Klád			0,070%	9,317%
			0,067%	0,181%
A Klád				0,909%
				0,979%

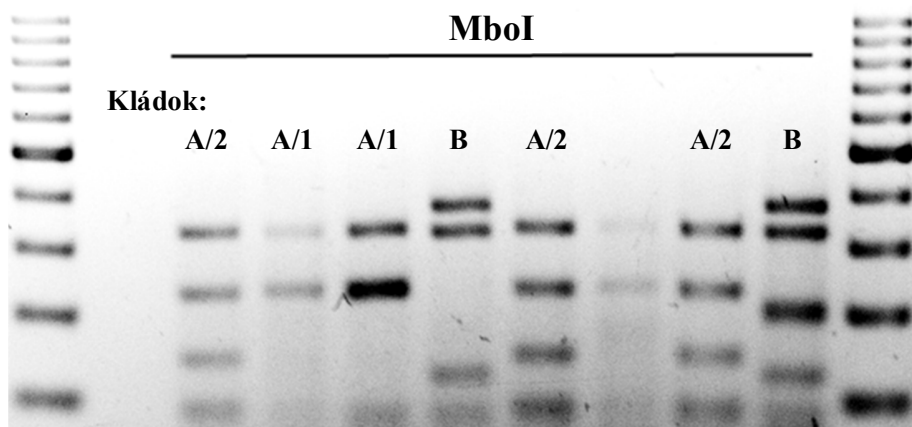


15. ábra: Az ITS régió alapján készített *T. brumale* aggr. kládjait bemutató Bayesian filogenetikai fa. Az egyes ágakon a Bayesian poszterior valószínűségi (PP) és Maximum Parszimónia (MP) bootsrap értékek lettek feltüntetve a törtvonal „/” két oldalán. Az értékek csak abban az esetben lettek feltüntetve, ha PP>0,95 és az MP bootsrap érték>70%. A minta kódok az 6. mellékletben lettek feloldva.



16. ábra: A *T. brumale* aggr. PKC régiója alapján készített Bayesian filogenetikai fa. Az egyes ágakon a Bayesian poszterior valószínűségi (PP) és Maximum Parszimónia (MP) bootstrap értékek lettek feltüntetve a törtvonal „/” két oldalán. Az értékek csak abban az esetben lettek feltüntetve, ha $PP > 0,95$ és az MP bootstrap érték $> 70\%$. A *Tuber brumale* aggr. A és B kládjai jelölve vannak, a kódok a 6. mellékletben lettek feloldva.

Mind az A és B klád, mind az A klád I. és II. haplocsoportja szétválasztható az MboI és HinfI restriktions endonukleázokkal emésztett ITS régióból kapott fragmentum-mintázattal (RFLP). Mindkét enzimnek 3-5 hasító helye van az ITS szakaszban. A 100-550 bp-os fragmentek hordoznak használható információt, mivel 3%-os agaróz gélen a 100 bázispárosnál kisebb fragmenteket nem lehet jól elválasztani. MboI enzim esetén a jól detektálható fragmentek: B klád: 121 bp, 303 bp, 368 bp; A klád I. haplocsoport: 227 bp, 231 bp, 306 bp; A klád II. haplocsoport: 142 bp, 225 bp, 231 bp, 307 bp (17. ábra). A HinfI enzim fragment mintázata: B klád: 223 bp, 528 bp; A klád I. haplocsoport: 140 bp, 226 bp, 402 bp; A klád II. haplocsoport: 227 bp, 540 bp. Az A és B kládot az MboI enzim különíti el, amit az B kládban 368 bp magasságban megjelenő egyedi fragment tesz lehetővé. Az A kládon belüli két haplocsoportot pedig a HinfI enzim különíti el az I. haplocsoportban 140 bp és 402 bp magasságban megjelenő egyedi fragmentumok által.

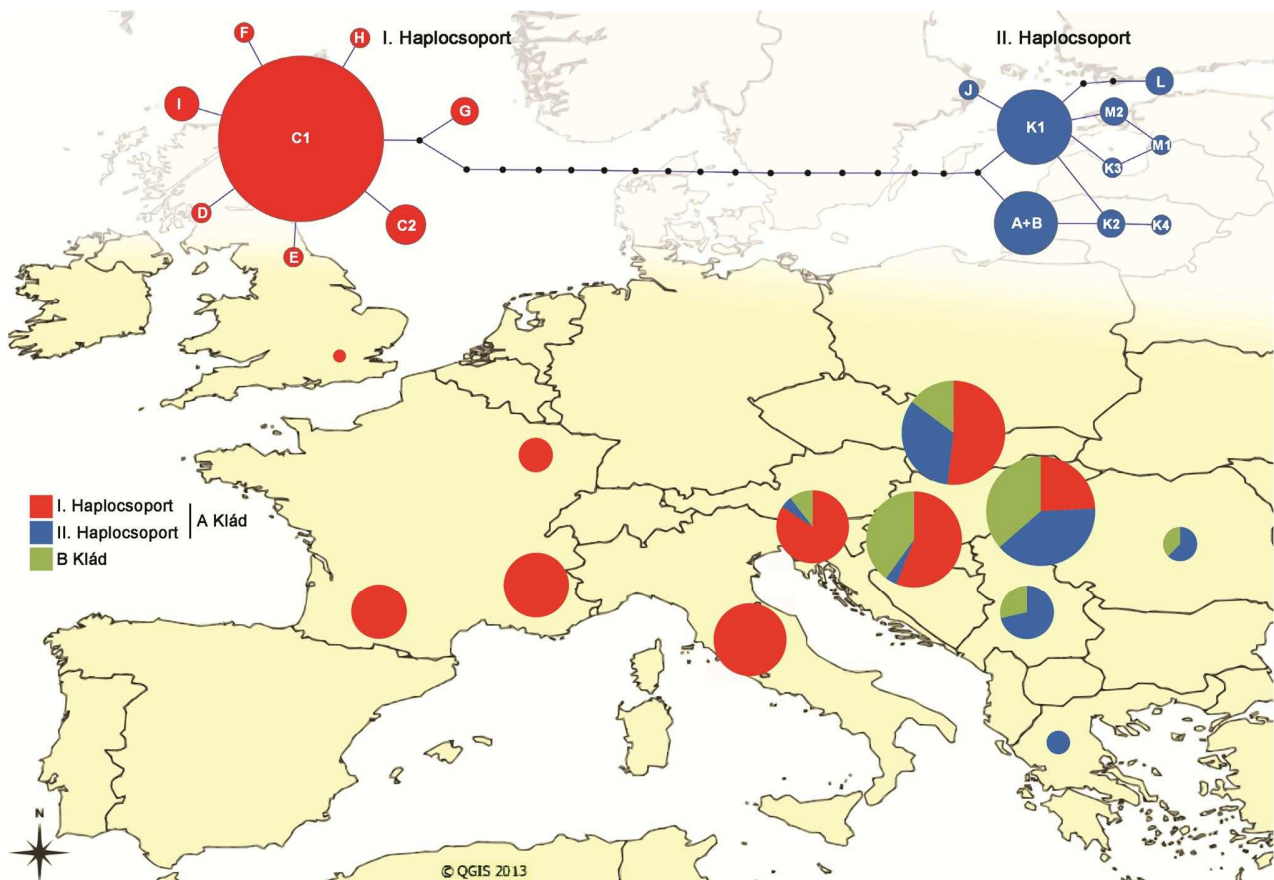


17. ábra: Az MBoI. restrikciós endonukleázzal emésztett *T. brumale* aggr. kládok ITS régiójának fragmentum mintázata. A két oldalon látható DNS súlymarker 100-1000bp 100 bázispáronként.

5.5.2. Filogeográfia és haplotípus elemzések

Az ITS haplotípus elemzéshez 136 szekvencia lett bevonva, melyből 119 db az A kládból és 17 db a B kládból külön-külön lett elemezve (18. ábra). Az A kládban összesen 17 haplotípus, míg a B kládban csak két haplotípus került elő. Csakúgy, mint az ITS és LSU filogenetikai fák, az A klád haplotípus hálóján is két egymástól nagy távolságra, összesen 16 mutációs lépésre lévő haplotípus csoportot láthatunk. Az I. haplocsoportban a leggyakoribb haplotípus (C1) előfordulási aránya 84,1%, és ebből csillag struktúra-szerűen 1-2 mutációs távolságra található a többi ide tartozó haplotípus. Ennek a haplocsoportnak a haplotípus diverzitása $H_d = 0,29$. Ezzel ellentétben II. haplocsoport haplotípus diverzitása $H_d = 0,72$ és a leggyakoribb haplotípusának (K1) frekvenciája mindössze 43,2%, tehát jóval egyenletesebb a haplotípusok eloszlása. A B kládban a minták mindössze két haplotípuson, közel egyenlő arányban osztoznak, így a haplotípus diverzitás $H_d = 0,53$.

Faj és haplocsoport szintű filogeográfiát 196 minta alapján készítettünk, melyben a filogenetikában felhasznált szekvenciákon túl RFLP módszerrel meghatározott minták, valamint a részleges szekvencia adatok is be lettek vonva. Az A klád egész Európában elterjedtnek számít míg B klád csak a kárpát-pannon régióra korlátozódik (18. ábra). Ebből adódik, hogy a két klád szimpatikus elterjedésű. Az A klád I. haplocsoport mintáit Nyugat-Európától egészen Magyarország keleti és déli részéig sikerült kimutatni. Ezzel szemben II. haplocsoport mintái csak az Alpoktól keletre fordultak elő. Így az A kládon belüli két haplotípus csoport elterjedése parapatikusnak tekinthető, egy kontakt-zónával a Kárpát-medencében, ahol együtt is előfordulnak.



18. ábra: A *T. brumale* agr. európai elterjedése, és a *T. brumale* s. s. (A klád) haplotípus hálójája, mely 17 collapse program által kijelölt haplotípust jelöl. A haplotípusok megnevezésénél a csak betűjellel ellátottak esetén a collapse és a koaleszcens elemzéshez használt SNAP Map is ugyanazokat a mintákat jelölte ki. Ez alól kivétel az A és B haplotípus, melyeket a collapse program egybe vett. Amennyiben betű és szám is jelöl egy haplotípust, azt csak a collapse program választotta le. A körök mérete minden esetben arányos a mintaszámmal. A térkép a Quantum GIS (<http://qgis.org>) szoftver segítségével, az APRS™ Föld térképét (<http://aprsworld.net/gisdata/world/>) felhasználva készült.

Az A kládon belül több érdekes haplotípust is kimutattunk. Ilyen a gyökerekből kimutatott új-zélandi *T. brumale* minta (EU753268), ami C1 leggyakoribb haplotípusba tartozik, mely feltehetően a Nyugat-Európából származó mikorrhizált csemete anyaggal került oda. Továbbá a Kárpát-medencében előforduló összes (33 minta) I. haplocsoport belüli minta szintén csak a C1 haplotípusba tartozik. Érdekesség még, hogy csak Olaszországban található a C2 haplotípus, melynek ITS1 régiójában egy 33 bp deléción található. A II. haplocsoportba tartozó két, gyökerekből kimutatott iráni minta, egyedi, csak itt előforduló L haplotípust képez.

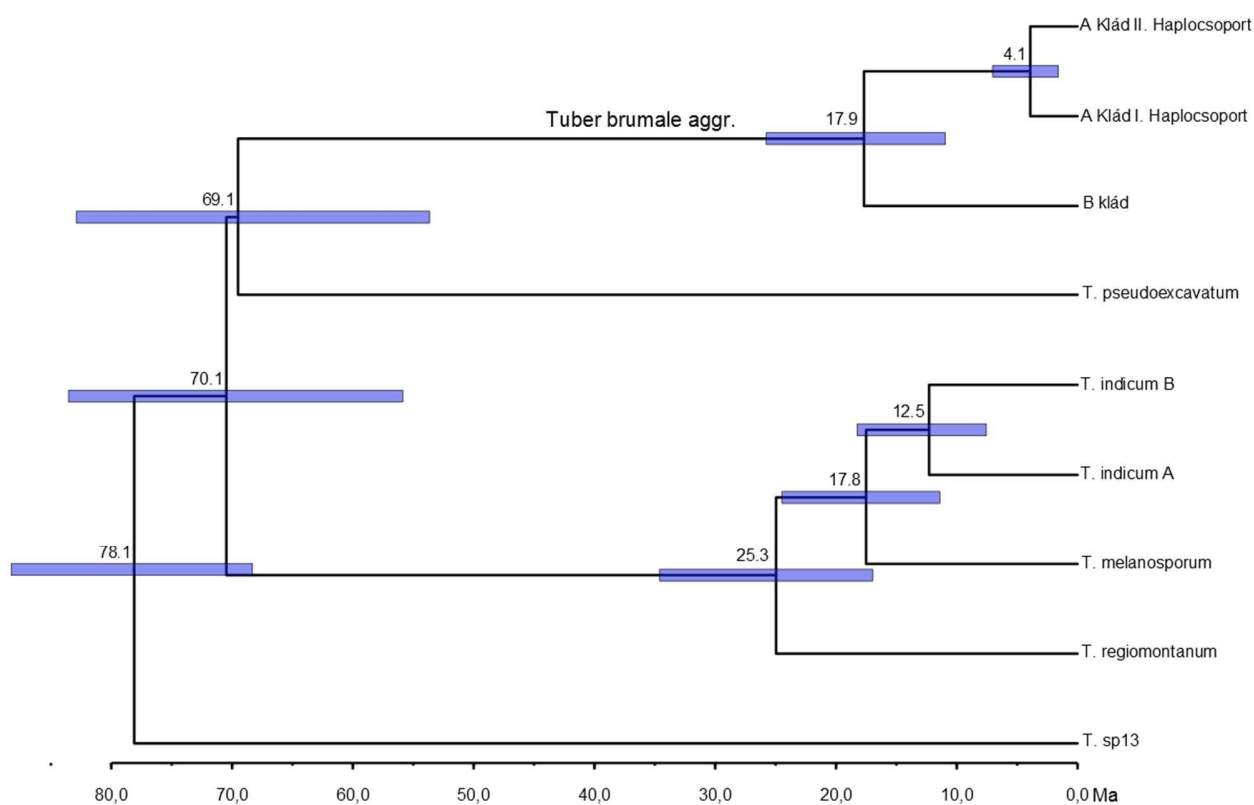
13. táblázat: A *Tuber brumale* s. s. ITS haplotípusaiban megtalálható polimorfizmusok. A haplotípusok SNAP map programmal történő képzésénél, a problémás helyek el lettek távolítva, az indel mutációk pedig le lettek kódolva. A táblázatban szerepelnek a polimorfizmusok pozíciói, típusai, és a konszenzus szekvencia, az attól való eltérések a haplotípusok kódjával és gyakoriságával együtt. Rövidítések: tranzíció (t), transzverzió (v) deléció(-). A SNAP Map programmal történő haplotípus elemzést dr. Geml József készítette

Pozíció	1111222233344556666777
	1236602241469056004837789013
	7361901219053057126583513640
Mutáció típusa	-vtttvtvtvt-ttv--tttt-vvtv
Konszenzus:	1AGAGACGTTAAC1ATT21ACTA2TATT
Haplotípusok	
A (9)	.T...TT.ACG...GC.1..T.G1.CC.
B (1)	2T...TT.ACG...GC.1..T.G1.CC.
C (73)C.....
D (4)C.....C.....
E (1)T.....C.....
F (1)2.....C.....
G (2)G.....
H (1)C..A...
I (3)C.....
J (1)	.TAG.TT.ACG...GC.1..T.G1.CC.
K (21)	.T.G.TT.ACG...GC.1..T.G1.CC.
L (2)	.T.GATT.ACG...GCG12.T.G1.CC.
M (3)	.T.G.TTAACG...GC.1..T.G1.CC.

Tajima's D, Fu's Fs, Fu & Li's D* és Fu & Li's F* tesztek 95% konfidencia intervallum mellett, nem mutatnak szignifikáns eltérést a II. Haplocsoport valamint az A és B faj esetén. Ami azt jelzi, hogy az ITS lókuszon megfigyelt és a várható változatosság hasonló, így szelekció nem bizonyítható, neutrális evolúció és mutációs egyensúly áll fenn. Ugyanakkor az I. Haplocsoport esetében három teszt is szignifikáns eredményt hozott (D=-0,07, p=0,003; F*=-0,17, p=0,03; Fs=-0,17, p=0,02). A Tajima's D teszt alapján a lókuszon sok, alacsony gyakoriságú ritka allél van jelen, ami arra utalhat, hogy negatív szelekció áll fenn vagy a populáció expandál egy lecsökkent populációméret után (palacknyak-effektus), amit a Fu's Fs teszt szignifikáns eredménye is megerősít.

5.5.3. Molekuláris óra elemzés

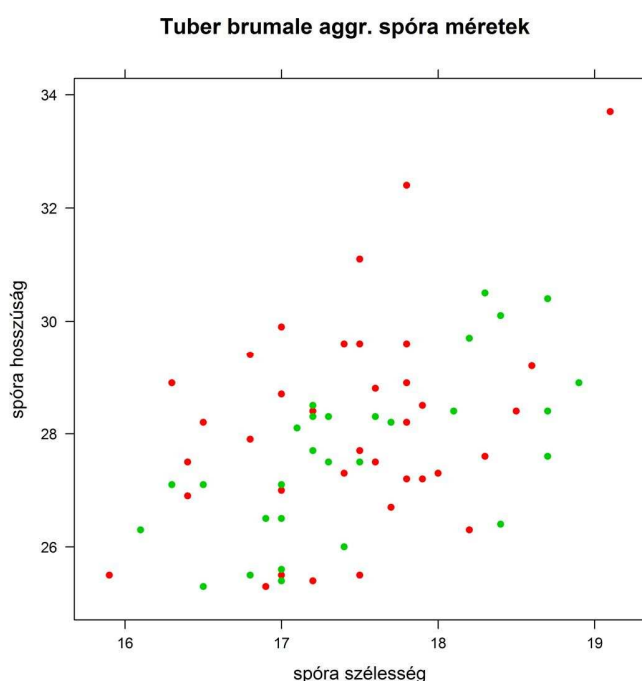
A *Melanosporum*-klád ismert fajainak divergencia idejét bemutató kronogram az 19. ábrán látható. A fajcsoport legutóbbi közös őseiből történő elválás becült poszterior értéke 78,1 millió év lett. A szétkapcsolt mutációs ráták poszterior értéke a következőképpen alakult: $5.8S=1,97^{-4}$, $ITS2=4,56^{-3}$ és $LSU=8,51^{-4}$. Ezek az értékek nagyfokú hasonlóságot mutatnak Bonito *et al.* (2013) munkájában tapasztaltakkal, így a molekuláris óra elemzést megbízhatónak vehetjük. A *T. brumale* A és B kládja közti elválás körülbelül 17,9 millió évvel ezelőtt történhetett (HPD 95%: 10,9-25,7 millió év).



19. ábra: A *Melanosporum*-fajcsoport tagjainak elválási idejét bemutató MCC kronogram. Az egyes elágazásokon a kék sávok a csomópontok korának 95 %-os poszterior sűrűség eloszlását (HPD 95%) jelölik, a felette feltüntetett szám pedig a becült elválási idő. A fán feltüntetett taxonok kódjai az 6. mellékletben vannak feloldva.

5.5.4. *T. brumale* aggr. morfológiai vizsgálata

Az európa-szerte begyűjtött, genotipizált termőtestek közül összesen 118 makromorfológiai, organoleptikus bélyegeit, és 92 valamely mikromorfológiai bélyegét vizsgáltuk meg (14. táblázat). A termőtestekhez tartozó leírások alapján az A és B faj közt nem mutatható ki makromorfológiai vagy illatbeli eltérés. A spóra méretében, díszítettségében sem mutatható ki szignifikáns eltérés (20. ábra, 15. táblázat). Enyhe eltérés mutatható ki a domináns spóraszámú aszkusz eloszlásban, míg az A faj 2-5-ös a B fajnál csak 3-4-es dominancia figyelhető meg.

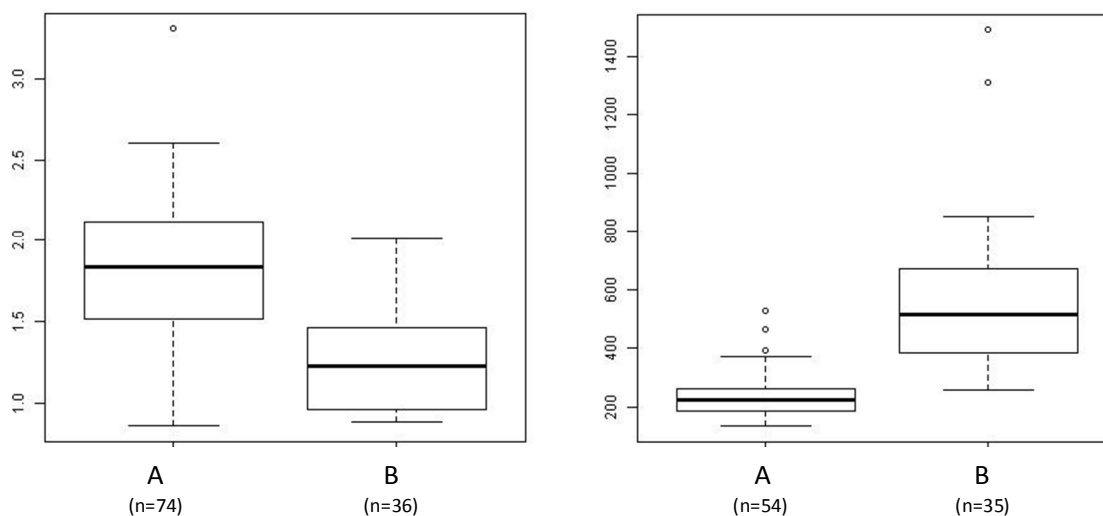


20. ábra: Hatvannyolc *T. brumale* aggr. átlagos spóra hossz és szélesség (ornamentika nélkül) adatai. A piros pontok az A fajhoz, míg a zöld pontok B fajhoz tartozó minták átlagait jelölik.

További karakterek bevonásával jónéhány olyan karaktert sikerült találni melyek erős szignifikáns eltérést mutatnak a két faj között, így a perídium sejtek, pikkelyek, tömeg (21. ábra). Habár a 19 direkt vagy származtatott karakter közül egy sincs, amely átfedés nélkül elkülönítené az A és B fajt. Érdekes az aszkuszonkénti spóraszám eloszlás, melyet felbontva nyolc külön karakterre több használható, bár egymással erősen korreláló folytonos változót kaptunk (2. melléklet) szemben a domináns aszkusz értékkel, mely ordinális skálájú, és kevésbé informatív karakter volt.

14. táblázat: A *T. brumale* aggr. morfológiai vizsgálata során bevont karakterek listája. Az R1-R8 értékeket legalább 100 aszkuszt leszámolva kaptuk meg. A „Db” és „interv.” oszlopok az adott karakterre kiszámolt átfedés mértékét mutatják az A és B faj mintái között. A 68, 83 és össz minta oszlopokban az A és B fajokra elvégzett megfelelő statisztikával (lásd Anyagok és módszerek fejezet) kapott eredményt jelölik. ns=nem szignifikáns, 1 = p-érték < 0,05; 2 = p-érték < 0,01; 3 = p-érték < 0,001.

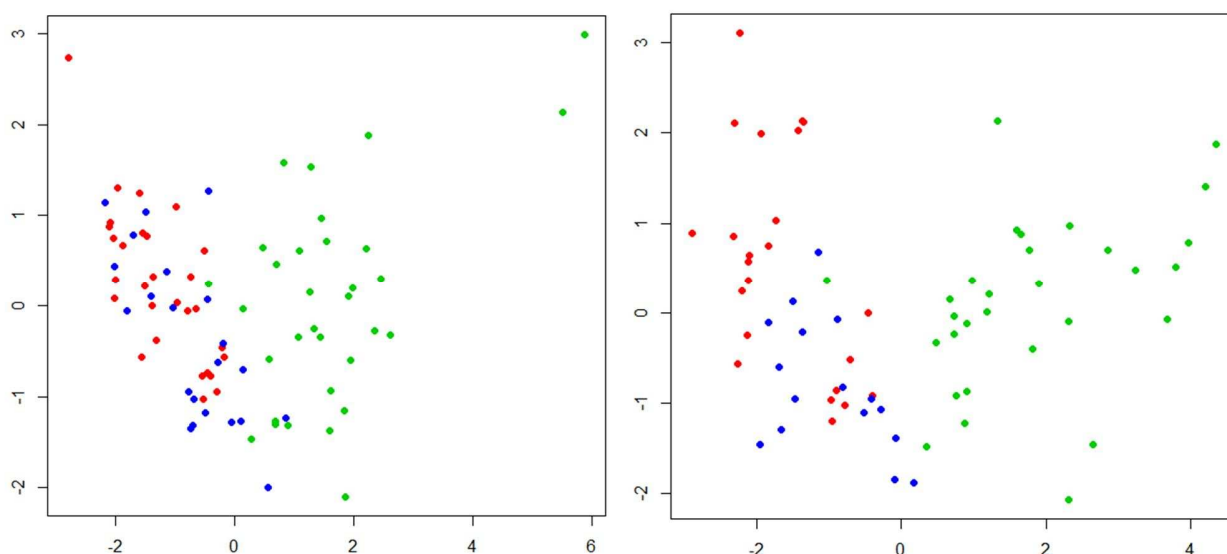
Karakter rövidítés	Karakter leírása	Lemért (db)	Átfedés (%)		Statisztikai próbák		
			Db	Interv	68 minta	83 minta	Össz. minta
Perídium	15 legnagyobb perídium sejt hossz szélesség szorzata átlagolva	89	29%	15%	3	3	3
Pikkely	10 pikkely átlagos átmérője	110	56%	41%	3	3	3
Tömeg	légszáraz termőtest tömege	107	82%	40%	3	3	3
Spsz	10 spóra szélesség átlagolva	71	100%	94%	ns	-	-
Sph	10 spóra hosszúság átlagolva	71	100%	61%	ns	-	-
Tüske	10 spórán 1-1 tüske hossza	71	100%	52%	ns	-	-
Q	10 spóra hossz/szélessége átlagolva	71	100%	68%	ns	-	-
Vol	10 spóra térfogata (szélesség ² ×hossz×0,523)	71	100%	72%	ns	-	-
R1	1 spórás aszkuszok aránya	86	100%	93%	ns	-	-
R2	2 spórás aszkuszok aránya	86	94%	100%	2	2	2
R3	3 spórás aszkuszok aránya	86	76%	67%	3	3	3
R4	4 spórás aszkuszok aránya	86	100%	66%	ns	-	-
R5	5 spórás aszkuszok aránya	86	76%	61%	3	3	3
R6	6 spórás aszkuszok aránya	86	100%	67%	ns	-	-
R7	7 spórás aszkuszok aránya	86	NA	NA	ns	-	-
R8	8 spórás aszkuszok aránya	86	NA	NA	ns	-	-
R53	az 5 és 3 spórás aszkuszok számának hányadosa	86	78%	33%	3	3	3
R56p23	az 5+6 és 2+3 spórás aszkuszok számának hányadosa	86	85%	35%	3	3	3
Aszk	a domináns spóraszámú aszkusz	86	NA	67%	1	-	-



21. ábra: bal: A *T. brumale* aggr. A és B kládhoz tartozó termőtestek átlagos pikkelyátmérő (mm); jobb: Perídium sejt terület (μm^2) adatok alapján készült boxplotok.

A két faj közt szignifikáns eltérést mutató és egymással nem korreláló karaktereket használtuk fel a többváltozós matematikai eljárásokban, így a perídium, pikkely és tömeg. Emellett az eloszlást jellemző karakterek (R3, R5, R53, R56p23) közül mindig egy szerepelt a modelben, azok erős egymás közti korrelációja miatt (2. melléklet). A különböző beállítású LDA eredmények közül a legjobb, csak morfológiai karaktereken alapuló elkülönítést a pikkely, perídium és R3-al kaptuk. Ez alapján a minták 95,2% (CV: 92,8%) elkülöníthető egymástól (22. ábra). Ugyanakkor az A fajon belüli két haplocsoport mindössze 66,7% tudná elkülöníteni, jelezve azt, hogy itt nincs valós tendencia a morfológiai karakterek elválásában. Ha a D (Diszkriminancia érték) érték kisebb egy adott értéknél, (esetünkben 0,45) akkor az A fajhoz, ha nagyobb akkor B fajhoz tartozik a minta. A D érték az alábbi diszkrimináló függvény segítségével határozható meg:

$$D = -1,15823 \times \text{pikkely} + 0,00459 \times \text{perídium} + 0,556605 \times R3 - 0,7345$$



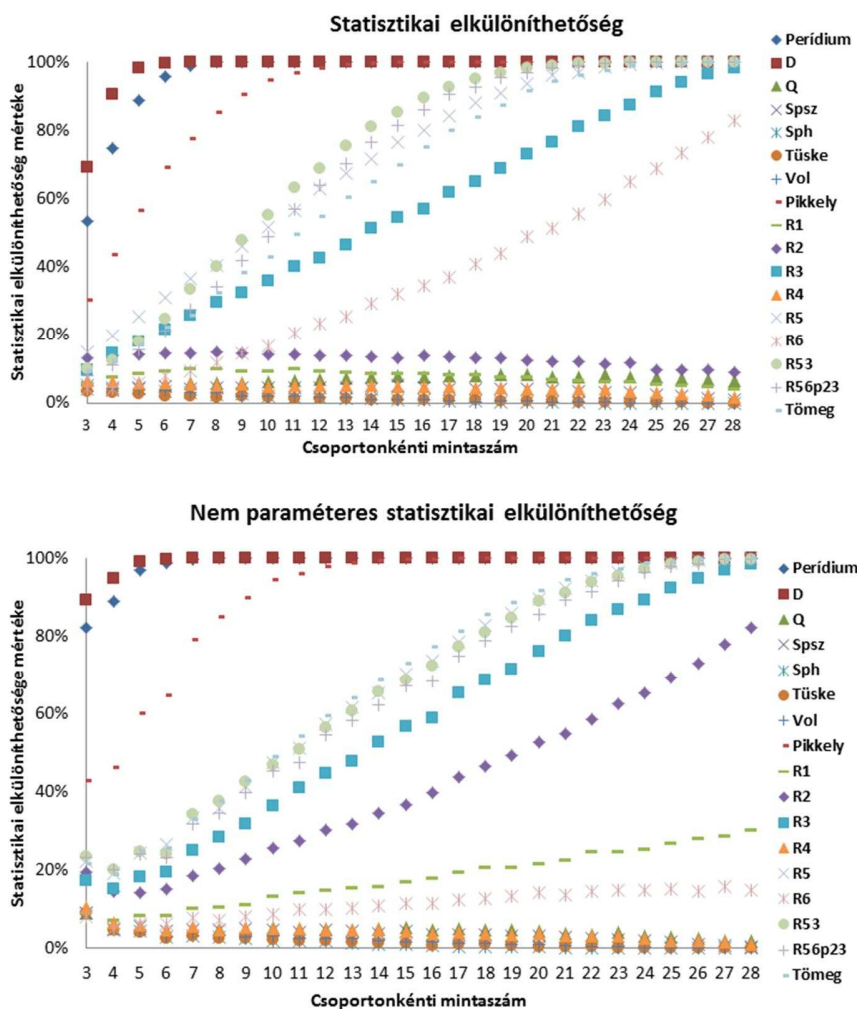
22. ábra: Bal: A 86 morfológiai változót tartalmazó LDA eredménye; Jobb: A 72 talaj és morfológiai változót tartalmazó LDA eredménye. Piros: A/I, kék: A/II haplocsoport, zöld: B klád mintái.

A másik, 72 mintát tartalmazó adatkészlet esetén, ha csak talajváltozókat (Mn, Mg, Cu) használtunk a modellbe, akkor 76,4% (CV: 75%) hatékonysággal volt elkülöníthető az A és B faj. Ugyanezen a mintasoron a csak morfológiai karakterek (perídium, pikkely, R3) 94,4% (CV 93,1%) különítik el. Ellenben ha a legjobb morfológiai és a talaj változókat egy modellbe egyesítjük, már 97,2% (CV: 97,2%) elválasztási hatékonyságot lehetett elérni (22. ábra). Ez az eredmény rámutat, hogy a morfológiai, és ökológiai (pedológiai) változók együttes használatával még hatékonyabb elválasztás hozható létre, mint ugyanazon minták használatával, de a két változócsoport külön kezelése esetén.

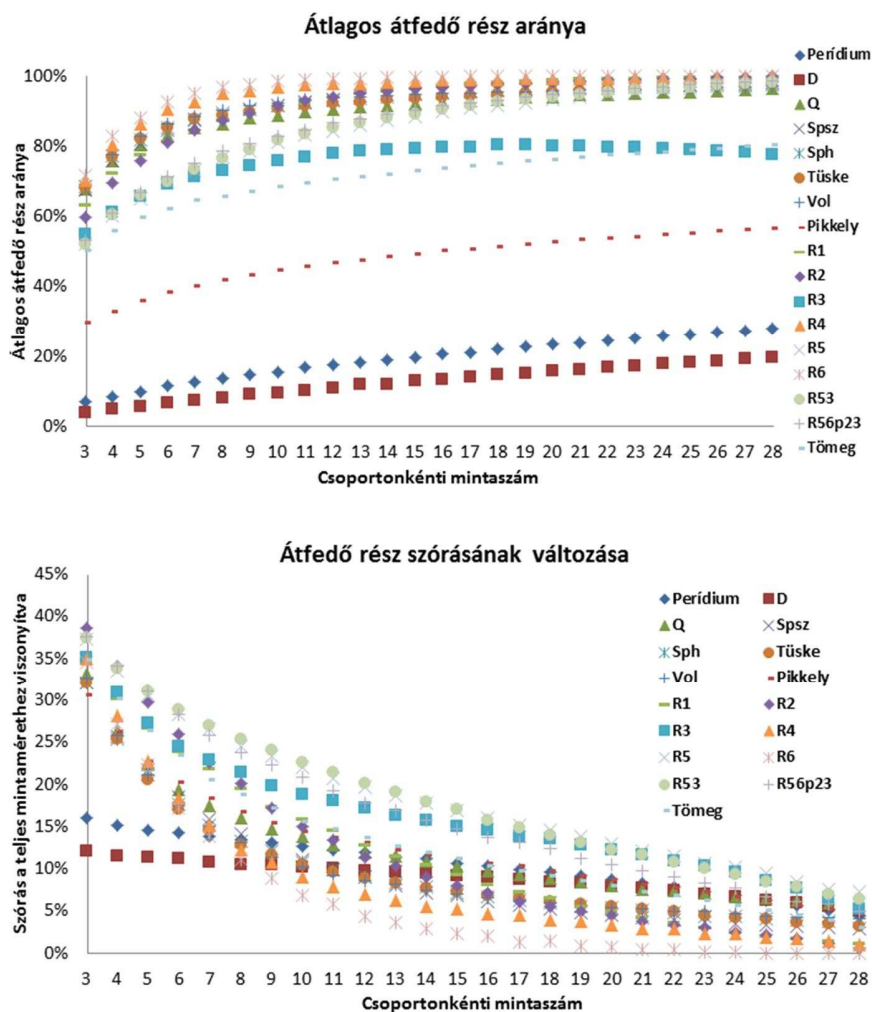
5.5.5. A *T. brumale* aggr. morfológiai adatain végzett szimulációk

A növekvő mintaszám függvényében a különböző folytonos, és minden esetben átfedést mutató karakterek másképp reagáltak az egyes szimulációkban. Azok a karakterek, melyek nem mutattak szignifikáns eltérést a két faj között 68, 83 vagy összes mintát vizsgálva (Spsz, Sph, Tüske, Q, Vol, R1, R4, R6, lásd 14. táblázat), a statisztikai próbákat végző szimulációban is hasonló képet mutattak (23. ábra). A szignifikáns eltérések aránya kis és nagy mintaszám mellett sem haladta meg a 10%-ot. De ez a gyakoriság sem elhanyagolható, ahhoz képest, hogy ezek faj elválasztás szempontjából használhatatlan karakterek. Az előzetesen szignifikáns eltérést mutató karakterek már kisebb mintaszámok esetén is, nagy arányú szignifikáns mértékű elválást

mutatnak, annak ellenére, hogy a keveredés ezen karaktereknél is jelentkeznek. A Student féle kétmintás t-próba és a nem paraméteres Wilcoxon-teszt eredményei lényegében nem különböztek egymástól (23. ábra). Az átlagos átfedő rész mértékét a növekvő mintaszám függvényében az 24. ábra mutatja be. Látható hogy az átlagos átfedés mértéke a nagyarányú átfedést mutató karakterek esetén – melyek értéke feltehetően független a fajtól - nem egyenesen arányos a mintaszám növelésével. Ennek oka pusztán mintavételből fakadhat, mely miatt az alacsony mintaszámnál erősen alulbecsüljük az átfedés mértékét. Ugyanakkor kis mintaszámnál az átfedő rész mértékének jóval nagyobb szórása tapasztalható, mint nagy mintaszámoknál (24. ábra). Ez nem meglepő, de azt jelzi, hogy egyes kis mintaszámú esetekben az átfedő rész megállapítása az egyébként is alábecsültnél még jelentősen alacsonyabb lehet.



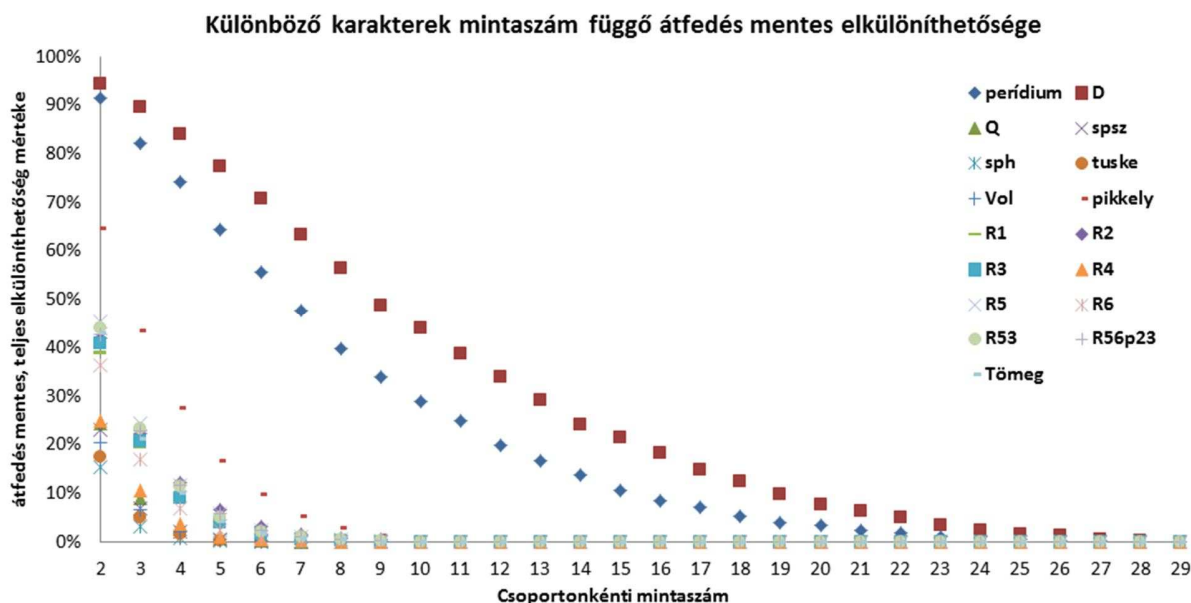
23. ábra: Adott karakterre nézve 10.000 mintavételezésből az A és B faj minta értékeit hányszor lehetett elkülöníteni a Student féle kétmintás t-próbával (felső) a nem paraméteres Wilcoxon-próbával (alsó) 0,05-ös szignifikancia szint mellett.



24. ábra: Adott karakterre nézve 10.000 mintavételezésből az A és B faj minta értékei átlagosan milyen mértékben keveredtek (felső), és keveredés mértékének szórása (alsó) a teljes mintázási számhoz viszonyítva.

Az eddigi szimulációk csak a karakterek két mintacsoport közti átfedését, vagy statisztikai elválaszthatóságának mértékét mutatták be, de a fajok morfológiai elkülönítéséhez előfeltétel az egymással átfedést nem mutató karakterek jelenléte. Így a harmadik szimuláció azt hivatott bemutatni, hogy hány esetben van az, hogy egyáltalán nem tapasztalható keveredés a két faj adatai között (25. ábra). Mivel minden vizsgált karakterünk adatsora átfedést mutatott, nem meglepő, hogy a legnagyobb mintaszámoknál a keveredés mentes elválások aránya nulla. Ugyanakkor egyértelmű az is, hogy kis mintaszám mellett jóval nagyobb gyakorisággal futhatunk bele olyan mintavételezésbe amely nem mutat átfedést. Ebből már jól látszik, hogy az egyébként faj elválasztásra teljesen használhatatlan, még tendenciát sem mutató karakterek kellően kis mintaszám mellett (3-8) is mutathatnak nem nulla (0,1-42,0%) valószínűséget a teljes

elkülönülésre. Jelen esetben a faji besorolást molekuláris adatok támasztják alá, ugyanakkor belátható, ha ez nincs, csak morfológiai bélyegek akkor még könnyebb használhatatlan karakterekkel is átfedés nélküli elkülönítést létrehozni. A szimulációkból látható, hogy az LDA diszkrimináló függvényével kapott D érték, minden esetben (statisztikai, rangsorolós próbák) felülmúlja hatékonyságában az összes többi karaktert.



25. ábra: Adott karakterre nézve 10.000 mintavételezésből az A és B faj minta értékeit hányszor lehetett elkülöníteni átfedés nélkül.

5.5.6 A *T. brumale* aggr. környezeti igényei

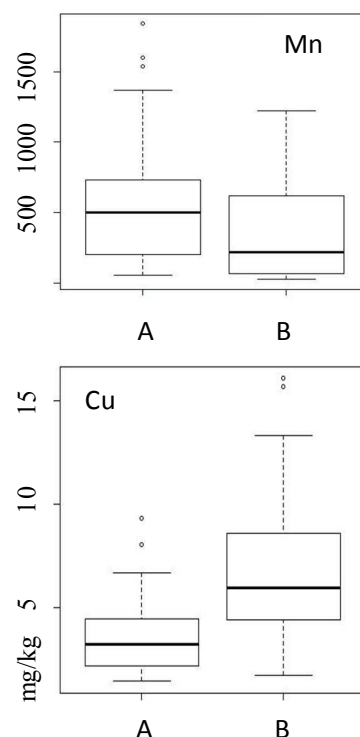
A téli szarvasgomba fajaggregátumból összesen 84 talajmintát vizsgáltunk, melyből 52 az A és 31 a B fajhoz tartozott. A sokszor hiányos adatstruktúra miatt 14 talajváltozót sikerült összehasonlítani (15. táblázat), melyből hét mutatott szignifikáns eltérést az A és B faj között 0,05 szignifikancia szint mellett. A K_2O és Cu értékek 0,001 szignifikancia szintnél is még különbséget mutattak a megfelelő statisztika mellett.

A megvizsgált 22 B és 34 A fajhoz tartozó cönológiai felvétel alapján, mindkét faj gyakran (A: 46%; B: 30%) fordult elő a hegyvidéki gyertyános-tölgyesek (*Carici-pilosae carpinetum*) társulásban. De amíg az A fajnál ez dominált, addig a B fajt legalább ilyen gyakran az alföldi gyertyános-tölgyesek (*Circaeo-Carpinetum*) társulásban is gyűjtöttük. A társulásoknak megfelelően, a leggyakoribb felvételeken előforduló fafaj a *Carpinus betulus* volt (A: 70%; B:

86%), melyet az ektomikorrhiza-képző fajok közül a *Quercus robur*, és *Quercus cerris* követett 27-36%-os gyakoriságokkal. Az A és B faj termésidejének eloszlása nem különbözött egymástól szignifikánsan (Kolmogorov-Smirnov-teszt p-érték: 0,901 (n=74)).

15. táblázat: A *Tuber brumale* aggr. A és B faja közti statisztikai különbségek a talajváltozók tekintetében. Az utolsó oszlopban a Brunnel-Munzel próba statisztikái mellett, a kétmintás T-próba szignifikancia szintje lett megjelölve csillaggal. Mintaszám = 84. Jobb oldalt az egyes fajok Mn és Cu adatsoraira (mg/kg) készített boxplotok láthatóak.

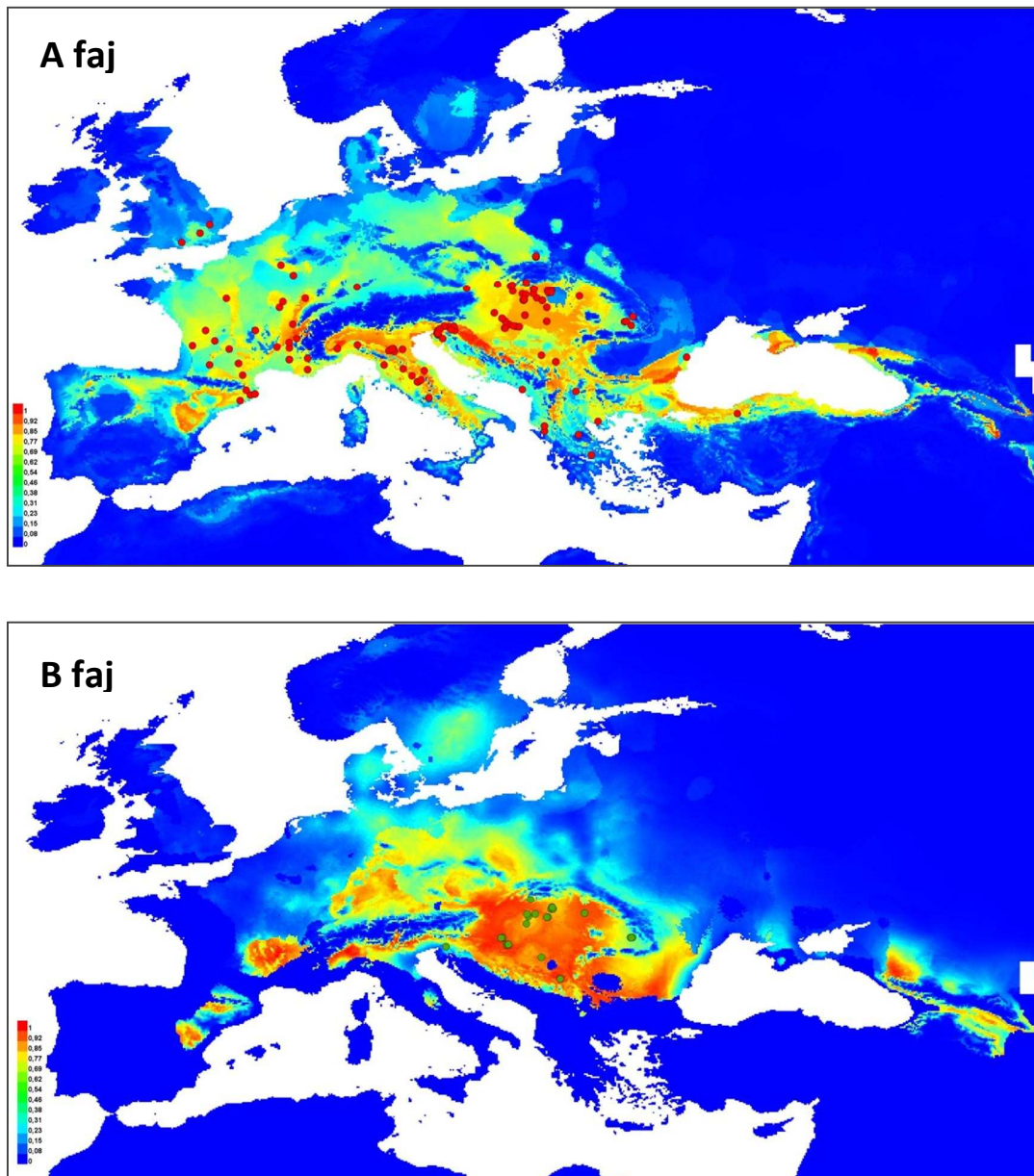
Talaj változók	Shapiro-Wilks teszt A faj	Shapiro-Wilks teszt B faj	Variancia teszt	T-próba * Brunnel-Munzel teszt
PH(H ₂ O)	3,8E-01	2,3E-01	3,6E-01	3,4E-01*
KA	4,6E-01	7,3E-01	9,0E-01	3,5E-02*
PHKCL	3,0E-04	8,6E-02	1,5E-02	4,1E-02
CaCO ₃	6,6E-10	2,0E-09	2,7E-02	1,4E-01
HUMUSZ	1,3E-01	2,3E-02	8,2E-02	1,5E-01
NO ₃ NO ₂ N	4,3E-07	3,8E-04	4,2E-02	7,9E-02
K ₂ O	4,3E-07	1,2E-03	3,3E-04	4,1E-06
P ₂ O ₅	1,6E-04	5,0E-08	1,0E-02	4,0E-02
Mg	3,1E-05	1,5E-01	9,8E-02	2,7E-02
Mn	2,4E-04	2,7E-04	2,2E-01	1,8E-02
Na	5,9E-05	4,9E-06	9,1E-06	7,7E-01
Cu	2,8E-04	1,1E-02	1,0E-07	1,3E-05
Zn	3,0E-04	7,0E-06	8,1E-01	1,3E-01
SO ₄ S	3,0E-04	2,7E-02	5,6E-01	2,6E-01



5.5.7 Potenciális área rekonstrukció

A *T. brumale* A faj modellépítéshez 81 élőhelyi pontot használtunk fel, és 26 lelőhely maradt a tesztelésre. Az A faj modelljének AUC értéke 0,989, míg a tesztpontok AUC értéke 0,991, melyek igen jó értékeknek számítanak, és a modell hatékonyságát tükrözik. A modell elkészítéséhez a legjobb három magyarázó változó a BIO1 éves középhőmérséklet 17,9%, BIO4 Hőmérséklet szezonaritása 13,2%, és a BIO3 izotermalitás 12,9%-os részesedéssel. A változók fontosságára végzett Jackknife teszt alapján a BIO11 a leghidegebb negyedév középhőmérséklete változó hordozza egymagában a legtöbb információt, ugyanakkor az előbb említett BIO4 változó

kihagyása csökkenti legjobban a teljes modell magyarázó erejét. A *T. brumale* A és B fajára, a kölcsönösen-validált MaxEnt modell által prediktált, valószínűségeken alapuló térkép 26. ábrán látható. Az A faj számára Európa nagy részén található megfelelő klimatikai viszonyokkal rendelkező élőhely, kivéve talán Észak-Európát, Skandináviát, ahogyan ezt eddig is feltételezték (Lawrinowitz 1992). A modell Dél-Spanyolországra is minimális valószínűséggel prediktál megfelelő élőhelyet, melyet bizonyít Joseph Maria Vidal szóbeli közlése is, miszerint ott ritkán



26. ábra: A *T. brumale* aggr. A és B fajára készített MaxEnt modell. Az álszínes hőtérképen a melegebb színek a faj számára jobb feltételekkel rendelkező prediktált területeket jelzik. A piros (A faj) és zöld (B faj) pontok a valós találati helyeket jelölik, melyek egy része (75%) alapján készült a modell.

találnak téli szarvasgombát. Továbbá a csekély valószínűséggel rendelkező területek közt jól kirajzolódnak a magashegységek (Pireneusok, Alpok, és Kárpátok vonulatai) amelyekben szintén nem gyűjtik a fajt. Nagy valószínűségi értékkel rendelkező területek vannak a Fekete-tenger körül, ahonnan csupán szórványosan állnak rendelkezésre adatok.

A jóval ritkábban megtalált *T. brumale* B faj mintáiból mindössze 15 élőhelyi lokalitást használtunk a modell építésére, és öt pontot a tesztelésre. Ennek ellenére a modell AUC értéke 0,997 a modellépítő és a tesztpontokra egyaránt. A B faj modelljének elkészítéséhez a legjobb három magyarázó változó a BIO9 a legszárazabb negyedév középhőmérséklete 37,5%, BIO14 legszárazabb hónap csapadékmennyisége 25,5%, és a BIO3 izotermalitás 12,1%-os részesedéssel. A változók fontosságára végzett Jackknife-teszt alapján a BIO9 a legszárazabb negyedév középhőmérséklete változó hordozza egymagában a legtöbb információt. Szintén a BIO9 változó kihagyása csökkenti legjobban a teljes modell magyarázó erejét. A B faj mind valós megtalálási helyekre, mind a prediktált áréában kisebb területre korlátozódik, mint az A faj, és elsősorban Közép-Kelet-Európára, azon belül is a Kárpát-medencére (26. ábra). A B faj számára megfelelő klimatikus viszonyokkal rendelkező prediktált áréa jóval kiterjedtebb, mint ahonnan valóban előkerültek adatai, amely arra utalhat, hogy nem feltétlenül klimatikai, mint inkább történeti (jégkorszak) okai lehetnek a jelenleg tapasztalt elterjedésének.

6. Az eredmények megvitatása

A föld alatti, különösen a szarvasgombák ökológiai és gazdasági szempontból kiemelt jelentőségűek a gombák között. Annak ellenére, hogy Európában van a legnagyobb hagyománya a föld alatti gombák taxonómiai, és ökológiai szempontú kutatásának, a fajok teljes elterjedési területének vizsgálatáról igen kevés összefoglaló munka született (Ławrynowicz, 1989, 1990, 1992; Montecchi & Sarasini, 2000; Rioussset *et al.* 2001). Az egyes fajok elterjedéséről kapott képet, azok rendszertani helyzetével, vagy populáció genetikájával foglalkozó munkák egészítik ki, melyek törekedtek számos országból történő mintagyűjtésre (Sicca *et al.* 2007; Murat *et al.* 2004; Wedén *et al.* 2005; Stielow *et al.* 2011; Molinier *et al.* 2013). Az elterjedési terület vizsgálatához, így az említett munkákhoz is nagy segítséget nyújtottak és nyújtanak a mikotékákból származó anyagok, és adataik. Az EMSZE hipogea gyűjteménye, Európa egyik legnagyobb mikotékája több mint 5000 földalatti gomba mintával rendelkezik, melyből jelenleg közel 4600 rekordot tartalmaz a hipogea adatbázis. Az elkészített Microsoft Access rendszerű adatbázis ekkora adatmennyiségre megfelelően működik, emellett, a kezelhetősége könnyű, például az egyes táblák egymáshoz rendelésekor. Ráadásul az adatbázis hamar felhasználóbaráttá tehető az adatok pontos bővítése érdekében. A mikotéka, és az adatait tartalmazó adatbázis segítségével már számos publikáció született (Siller *et al.* 2005; Bratek, 2006; Gógán *et al.* 2008; Ouanphanivanh *et al.* 2008; Merényi *et al.* 2010a, 2010b; Bratek *et al.* 2013; Varga *et al.* 2013). A mikotékában deponált hipogeaák pedig számos nemzetséget, fajcsoportot revideáló molekuláris taxonómiai munkához nyújtottak (Halász *et al.* 2005; Stielow *et al.* 2011; Urban *et al.* 2013; Merényi *et al.* 2014, Alvarado *et al.* 2014) vagy nyújtanak (a *Tuber* nemzetség *Rufum*-, *Excavatum*-, *Regianum*-fajcsoportjai, *Gautieria*, *Melanogaster*, *Pachyphloeus* nemzetségek) háttéranyagot. Ennek ellenére a legtöbb hazánkban is előforduló hipogea nemzetségről még nem áll rendelkezésre széleskörű, nagy mintamennyiséget feldolgozó és egész nemzetségeket molekuláris és morfológiai módszerekkel revideáló munka, amely alapján biztos lenne a fajok határozása.

A koordinátákkal rendelkező minták térbeli eloszlása alapján Magyarország kistáji feltérképezettségére erősen heterogén, amely elsősorban a helyi gyűjtők/kutatók jelenlététől (Budai-hegyek, Gödöllői-dombság) valamint a gazdaságilag értékes fajok (*T. magnatum* és *T. aestivum*) legjobb élőhelyeinek (Délnyugat-Magyarország, Jászság) magasfokú

térképezettségétől is függ. Utóbbi a kereskedelmi célú gyűjtés általánossá válásának köszönhető, mely miatt a kutatási gyűjtő utak is egyre inkább ezen erdőtípusokra és tájegységekre koncentráálódtak.

A kárpát-medencei hipogea-funga értékelése szempontjából az adatbázis felhasználhatósága nem csak az adatmennyiségtől, és a hozzá tartozó annotációktól függ, hanem azok megbízhatóságától is. Ezért a revideálandó taxonok és a megfigyelt gyakoriságok alapján három kategóriába csoportosítva vizsgáltunk hipogea taxonokat: (1) kevés adattal rendelkező/ritka fajok; (2) molekuláris taxonómiai revíziót igénylő fajok, melyekről bebizonyosodott, hogy a használatban lévő határozókulcsok nem korrelálnak a filogenetikai faj határokkal; (3) a megváltozott adatgyakorisággal rendelkező fajok.

6.1 Kevés adattal rendelkező fajok

Fontos kiemelni a különbséget az adatgyakoriságban tapasztalt (kevés adat) és a valós helyzet (ritka faj) között. Ugyanis, kevés adattal rendelkezhet egy faj a kutatás hiánya miatt is. Erre jó példa a *T. foetidum* faj Finnországból való előkerülése, vagy a Törökországból (Türkoğlu & Castellano 2013, 2014), Görögországból (Diamandis & Perlerou 2013) és Szerbiából (Marjanović, 2008) jelentett, Európa többi részén előforduló, közönséges, de azon országok mikótájára nézve új fajok listája. Szintén ritkának tűnhet egy faj, ha az országban intenzív a földalatti gombakutatás, de egyes területek alulreprezentáltak, vagy a gyűjtési módszer nem kedvez az adott fajnak. Erre jó példa az *Elaphomyces personii*, melyet a kutyák jellemzően nem gyűjtenek, extrém savanyú talajjal rendelkező élőhelye pedig elhanyagolt a gazdasági triflászás szempontjából. Ezáltal néhány irányított gyűjtőút során előfordulási adatait – igaz, csak lokálisan a Zemplénben – többszörösére sikerült növelni. Intenzív feltérképezés mellett kevés adattal rendelkezhetnek, az egy-egy területre nézve újonnan megjelenő fajok (*Gymnomyces* sp.), vagy a feltehetően régóta jelenlévő, ritka fajok, mint a *Regianum*-fajcsoport tagjai. Egy-egy faj ritkaságát tovább fokozhatja, ha kiderül, hogy a morfológiai fajkonceptió alapján egy fajnak gondolt csoport, valójában egymástól reprodukciósan izolálódott, több filogenetikai fajt takart, ahogyan ezt a *T. regianum* faj esetén is sikerült kimutatni.

6.2 Revízióra váró taxonok

Előzetes molekuláris biológiai vizsgálatok alapján, jó néhány nemzetségben az eddig használt morfológiai fajhatárok tarthatatlanok, ezáltal a nemzetségek teljes molekuláris filogenetikai és morfológiai revíziójára lesz szükség. Ilyenek az *Arcangeliella-Zelleromyces*, *Gautieria*, *Genea*, *Glomus*, *Hysterangium*, *Melanogaster*, *Pachyphloeus* és *Sclerogaster* nemzetségek (3. Melléklet). Az elmúlt években néhány nemzetség feldolgozása már megtörtént, mint a *Hymenogastereket* (Stielow *et al.* 2011), vagy folyamatban van, mint a *Geneákat* (Alvarado *et al.* 2014) rendező munkák. A *Gautieria*, *Melanogaster*, és *Pachyphloeus* nemzetségeknél a feldolgozó munkák szintén elkezdődtek, melyek több-kevesebb anyag bevonásával a Kárpát-medencei gyűjteményre is támaszkodnak. A *Tuber* nemzetség molekuláris taxonómiai revízióját néhány, hazai anyagoktól független nagyobb munka foglalta össze (Jeandroz *et al.* 2008; Bonito *et al.* 2010b; Bonito *et al.* 2013), melyek sokkal inkább az alapi elágazások, a fő leszármazási vonalak tisztázását célozták meg, mint a fajok elkülönítését. Ezáltal az egyes fajcsoportokat részleteiben feldolgozó munkákra lenne szükség, melyek közül néhány már megkezdődött, így a *Rufum*-fajcsoportot (Bonito *et al.* 2010b; jelen munka), vagy az *Excavatum*-fajcsoportot (Urban *et al.* 2013) tisztázó törekvések. Jelen munkában bemutatott *Regianum*-fajcsoport, és a *T. brumale* aggr. jó példája annak, hogy az egyébként egységesnek és problémamentesnek gondolt fajok között is található filogenetikailag, esetleg morfológiailag is elkülöníthető fajokat. Ez felhívja a figyelmet minden, eddig nem vizsgált faj, molekuláris módszerekkel történő „ellenőrzésének” szükségességére. Emellett egy-egy taxon genetikai diverzitását is sokszor csak földrajzilag széleskörű mintázás során becsülhetjük meg pontosan.

6.3 Megváltozott adatgyakoriságú taxonok

Csakúgy, mint a kevés adat esetén, az adatok szignifikáns mértékű gyarapodása vagy csökkenése háttérben sem csak egyértelműen biológiai folyamatok állhatnak. Az előfordulási adatok nagyarányú változásának legkézenfekvőbb magyarázata a gyűjtési módszer változása. Míg dr. Hollós László és Szemere László elsősorban kapás gyűjtéssel gyarapította mikotékáját, addig az EMSZE hipogea-tár elsősorban az egyre inkább elterjedő kutyás gyűjtési módszer segítségével jött létre. Az utóbbi ugyan jóval több adatot szolgáltat, de nyilvánvaló, hogy a kutyák által preferált illatú fajok (DPH; Bratek *et al.* 2013) túlreprezentáltak lesznek (pl. *Tuber* spp.), míg a többi alulreprezentált (pl. *Elaphomyces* spp.). Tovább erősíti ezt a hatást, hogy a

gazdák kutyáikat gyakran leszoktatták a nem piaci fajok gyűjtéséről. Így a nem DPH hipogeák elterjedésének pontosabb megítélése további mintavételi és gyűjtéstechnikai problémákat vet fel.

A legnagyobb mértékű adatsökkenés a *Choiromyces meandriiformis* fajnál volt megfigyelhető, mely egyértelműen a múlt században lezajló történelmi, és kulturális változásoknak köszönhető. Magyarország mai területén is sok helyen, akár kutyákkal is szedhető lenne a faj, de a gasztró-kultúra hanyatlásának köszönhetően, és a nyugati felvásárló piac kettősségének és részbeni érdektelenségének köszönhetően egyre inkább feledésbe merült (Gógán *et al.* 2008).

A legnagyobb mértékű adat gyarapodást a téli szarvasgombánál lehetett tapasztalni, melyet irodalmi adatok is alátámasztanak. A Kárpát-medencében 1980-ig összesen három publikált vagy mikotékában deponált előfordulása ismert. Ezzel szemben az elmúlt évtizedek egyik leggyakoribb gombája (Bratek *et al.* 2013; Marjanović, 2007), mely a Kárpát-medencében 331 előfordulási adattal rendelkezik az adatbázis alapján. A *T. brumale* s. l. nyári és francia szarvasgomba ültetvényeken való spontán megjelenése (Olivier *et al.* 2012; Chevalier *et al.* 2005; Benucci *et al.* 2012a; Guerin-Laguette *et al.* 2012; Belfiori *et al.* 2012, Chevalier & Sourzat 2012, Sourzat, 2011), valamint új-zélandi adventív megjelenése (Ho *et al.* 2008) mind inváziós jellegére utaltak, ahogyan azt más nagygombáknál (Pringle *et al.* 2009) és a kínai szarvasgombánál feltételezik (Murat *et al.* 2008). A faj széleskörű mintázása, és részletes filogenetikai vizsgálata során kapott eredmények alapján az inváziós *T. brumale* hipotézist elvethetjük. Sokkal valószínűbb hogy a téli szarvasgomba, mint DPH faj, gyakoriságának megítélésében jelentős szerepet játszott a szarvasgombák kereskedelmi célú gyűjtése. Korábban a faj aggregátum késői, téli termőideje még inkább csökkenthette előkerülésének gyakoriságát.

6.4 Vizsgálatba vont taxonok:

6.4.1 Tuber foetidum

A Finnországban megtalált termőtest mind morfológiai, mind ITS alapú filogenetikai eredményeink alapján a *T. foetidum* fajhoz tartozik. Ezáltal a faj legszakibb ismert elterjedési, és egyben Finnország mikótájára új adatát sikerült kimutatnunk. A magyar anyagoktól tapasztalt intraspecifikus nukleotid különbség (1,07-1,37%) alapján a faj ITS variabilitása jelentős lehet, melyet további széleskörű mintázással lehetne feltérképezni. A Kárpát-medencei kis fehér szarvasgomba minták revíziójával kapcsolatban már születtek eredmények (Halász *et al.* 2005),

de e fajcsoportokban, eddig kevésbé kutatott területekről, számos új faj felfedezésére számíthatunk.

6.4.2 *Gymnomyces* sp.

A *Gymnomyces* a Russulaceae családba tartozó, elsősorban Észak Amerikában elterjedt nemzetség (Whitebeck, 2003). Európában két fajt tartják számon a *Gymnomyces ilicis* és *G. xanthosporus* fajokat, melyek közül az első csak Spanyolországban (Barcelona, Gerona közelében) és Dél Franciaországban került elő. Ezzel szemben a *G. xanthosporus*nak sokáig összesen egy adata volt ismert szintén Gerona (Spanyolország) környékéről, vegyes erdőből (*Acer* sp., *Fraxinus* sp., *Corylus avellana*) és 1100 m tszf. magasságból, (Montecchi & Sarassini 2000). A Funga Nordica szerint csak a *Gymnomyces xanthosporus* fordul elő Észak Európában (Knudsen & Vesterholt 2012). A *Populus x euramericana* ültetvényen általunk talált termőtestek leginkább a Törökországban *Pinus* spp. és *Quercus* spp. alatt megtalált, és *Gymnomyces xanthosporus*nak határozott anyaghoz (Türkoglu & Castellano 2013) hasonlítanak. A pontos fajbesoroláshoz molekuláris vizsgálatok is szükségesek, amit a *Gymnomyces* nemzetségnél szintén észlelt morfológiai és filogenetikai fajhatárok inkongruenciája is indokol (Whitebeck, 2003; Miller *et al.* 2006).

6.4.3 *Elaphomyces personii*

Az álszarvasgombák (*Elaphomyces* spp.) az egész földön elterjedt, változatos gazdanövénytartományú aszkuszos gomba nemzetség (Reynolds, 2011). Ritkaságuknak köszönhetően hazánkban a föld alatti gombák közül egyedül az *Elaphomyces* nemzetség egyes tagjai védettek (Siller *et al.* 2005). A védeltséget élvező *E. personii* egy publikált adatához képest a föld alatti gomba térképezés szempontjából alig ismert Tokaj–Zempléni hegyvidékről hat új lelőhelyen, tizenkét, gyűjteményben is deponált, előfordulási adatát sikerült összegyűjtenünk. Így a Rimóczi *et al.* (1999) által publikált veszélyeztetett (3-as vöröslista-kategória) státuszhoz képest elmondhatjuk, hogy az *E. personii* a Zempléni-hegységben lokálisan elterjedt fajnak tűnik (Varga *et al.* 2013). A faj ritkasága és lokális elterjedése háttérben extrém savanyú (pH 3,5-4,6) talajigénye állhat (Bratek *et al.* 2001a; Varga *et al.* 2013).

6.4.4 Regianum-fajcsoport

A fajcsoport ritkaságát mi sem bizonyítja jobban, mint az, hogy az ide tartozó fajokat csak nemrégiben írták le (Montecchi & Lazzari 1987; Gori, 2003). A *T. regianum*ot elsőként Olaszországon kívül, Romániában 1997-ben (Bratek *et al.* 2001a), míg Spanyolországban csak 2001-ben találták meg (Rubio *et al.* 2006). Vizsgálataink során kiderült, hogy a különböző országokból *T. regianum*nak határozott minták három eltérő fajhoz tartoznak, melyeket morfológiai bélyegekkel is könnyen el lehet egymástól választani. A bemutatott morfológiai különbségek több-lókuszos filogenetikai eredményekkel is egyezést mutatnak. A morfológiai alapon helytelenül *T. regianum*nak határozott minták egy része a *T. bernardinii* fajhoz tartozik, míg másik része egy eddig ismeretlen, új fajhoz (B klád). A revidálás rávilágított, hogy a három faj közül Spanyolországban eddig csak *T. regianum*ot gyűjtöttek, ugyanakkor a *T. bernardinii* Olaszországon kívül Romániában is előfordul. Az új faj mintái legnagyobb része Kelet-Európából, a másik két fajnál alacsonyabb tengerszint feletti magasságokból került elő. Továbbá elképzelhető, hogy a *T. regianum* s. s. monospecifikusan csak a *Fagus sylvaticaval* képez mikorrhizát. A *Tuber* nemzetség tagjai jellemzően több gazdás fajok, mikorrhiza-partner preferenciát eddig csak a Gibbosum-fajcsoport nyitvatermőkhöz kötődésében mutattak ki. (Bonito *et al.* 2010b).

A hipogeák közül vitathatatlanul a *Tuber* nemzetség a legkutatottabb csoport, feltérképezésben pedig (Nyugat) Európa élen jár. Mindezek ellenére az eddigi legteljesebb filogenetikai vizsgálatok is elkerülték a *T. regianum*-szerű mintákat. Az itt bemutatott filogenetikai fákban a három faj egy monofiletikus kládba csoportosulása, valamint a morfológiai bélyegekben (felszín, nagy spóraszámú aszkuszok), és élőhelyekben (dombságok, hegységek) mutatott nagyfokú hasonlóságuk indokolja külön fajcsoportként való kezelésüket. A többi valódi szarvasgomba fajcsoporttól való nukleotid távolság, és morfológiai karakterekben tapasztalt eltérésük alapján is ésszerű a *Tuberek* eddig ismert tizenegy fajcsoportja mellett (Bonito *et al.* 2013) független tizenkettedik fajcsoportként kezelni. Ugyanakkor, a Regianum-fajcsoport *Tuber* nemzetségen belüli pontos helyzetének felderítéséhez, több független konzervatív lókusz bevonására lesz szükség.

6.4.5 *Genea* nemzetség

A lyukas szarvasgombák (*Genea*) körében hozzávetőlegesen 35 érvényes fajleírás létezik. A Mycobank adatbázisa (2014. Június.10-i állapotban) 39 legitim fajleírást, és még 13 faj alatti kategóriát különít el. Ezzel szemben Montecchi & Sarasini (2000) Európa hipogeáit összefoglaló munkájában mindössze hét *Genea* fajról ír. Külföldi kooperációban (Alvarado *et al.* 2014, és publikálatlan eredmények) kilenc, tudomány számára új *Genea* fajt sikerült lehatárolnunk többgénés filogenetikai, valamint mikro- és makromorfológiai bélyegek alapján. Az eredmények alapján Magyarországon legalább hét *Genea* faj fordul elő, melyből három a tudomány számára is új faj.

A *Genea* nemzetség fő leszármazási vonalainak divergencia idejét másodlagos kalibrációs megközelítéssel próbáltuk megbecsülni, melyeket Prieto & Wedin (2013) fosszília alapú Pezizomycetes-re és Bonito *et al.* (2013) Tuberaceae-re végzett becslései alapján kalibráltunk. A nagyfokú bizonytalanság ellenére, úgy tűnik a *Genea* nemzetség divergenciája a késő Kréta korban, a *Tuber* nemzetség fő leszármazási vonalainak divergenciájával (Bonito *et al.* 2013) egyidőben történhetett. Jóval pontosabb és megbízhatóbb becslést lehetne megvalósítani fosszília alapú kalibrációs ponttal, és néhány, nem kapcsolt lókuszt bevonásával. Továbbá, egy jóval széleskörűbb, Ázsiára és Dél Amerikára is kiterjedő molekuláris filogenetikai vizsgálat elegendő adatot szolgáltatna a nemzetség ősi área rekonstrukciójához (AAR=Ancestral Area Reconstruction).

6.4.6 *Rufum*-fajcsoport

A múlt századok morfológiai leírásai alapján Ceruti *et al.* (2003) autonóm fajként megkülönböztet *Tuber rufumot*, *T. ferrugineumot*, *T. nitidumot*, melyek rendre 23, 2 és 9 szinonímáját gyűjtötték össze. A gyakorlatban a *T. rufumot* spóra alapján két változattal (var. *rufum* és var. *apiculatum*), valamint a termőtest szín alapján három formával (f. *ferrugineum*, f. *lucidum*, f. *nitidum*) különítik el (Montecchi & Sarassini 2000). Molekuláris taxonómiai vizsgálatok alapján az egyik legfajgazdagabb *Tuber*-fajcsoport, melyben legalább 25 leíratlan faj, amik közül tizenháromat csak mikorrhizából mutattak ki (Bonito *et al.* 2010b). 327 ITS szekvenciát felhasználva, saját ABGD eredményeink alapján, illesztéstől, és nukleotid távolság alapú faj határtól függően, 21-33 potenciális faj lehet a csoportban. Az általunk molekuláris módszerekkel vizsgált hetvennyolc magyar anyag alapján elmondható, hogy a

fajcsoporton belül legalább 6-8 fajjal számolhatunk Kárpát-medencében is. Hazánkban a *Tuber rufum*, *T. apiculatum*, *T. nitidum*, *T. ferrugineum*, *T. lucidum* taxonok elkülönítése van gyakorlatban (Szemere, 1970; Merényi *et al.* 2008), ám e morfológiai fajok egy része biztosan módosulni fog a részletes molekuláris filogenetikai alapokon nyugvó morfológiai revízió során. A fajcsoport molekuláris eredményekre alapozott morfológiai vizsgálata még nem kezdődött meg, ám az eddigi eredményekből is sejthető, hogy ez csak nemzetközi kooperációban valósulhat meg. A fajhatárok biztosabb kijelölése végett, itt is több független lókuszt bevonásával, a géngeneológiák konkordanciájának vizsgálatával lehetne előre haladni.

6.4.7. *Tuber brumale* aggr.

Munkánk során összesen 196 *T. brumale* vagy *T. brumale* f. *moschatum*-nak határozott mintát vontunk be a faj filogenetikai és filogeográfiai elemzésébe, a faj jelenleg ismert elterjedési áréájának legnagyobb lehetséges lefedése mellett. A három felhasznált filogenetikai marker közül kettő, az ITS és LSU erősen kapcsolt, de - funkciójukból adódóan - igen eltérő mutációs rátával rendelkező szakaszok, míg a PKC lókuszt evolúciója lassú (Wang *et al.* 2006) és nem kapcsolt az rDNS régiókkal. A lókusztok közötti eltérő mutációs ráta és eltérő kapcsoltsági viszony ellenére elmondható, hogy az A és B kládok szétválását mindhárom régió nagy támogatottsággal megerősíti, és a gén geneológiák konkordanciája teljesül (Taylor *et al.* 2000). Ezentúl az ITS és LSU lókusztok az A klád I és II haplocsoportjának elválását is támogatják, míg a PKC lókusznál nem figyelhető meg a két csoport elválása. Ezt az inkongruenciát a PHT teszt szignifikáns eredménye is megerősíti, így a különböző lókusztok közti megegyezés, és nem megegyezés határa jelölheti ki a faji határokat (Taylor *et al.* 2000).

Az I. és II. haplocsoport mintáinak PKC lókusztban tapasztalt keveredését okozhatja jelenlegi rekombináció, vagy recens elkülönülés, mely utóbbi során még fennmaradtak az ősi (ancestral) polimorfikus allélok. A jelenlegi rekombinációnak ellentmond a koaleszcens alapú elemzés eredménye, mely szerint az I. és II. haplocsoport között már régóta megszűnt a génáramlás (Merényi *et al.* 2014). A szétválás elméletét tovább erősíti, hogy a divergencia idő nem nulla (Merényi *et al.* 2014), és az ITS régióban kialakult távolság is jelentős (2,02%).

Jóval tisztább a kép az A és B kládok elválását illetően. Az A és B kládok közti ITS-ben tapasztalt 3%-ot meghaladó, nagy genetikai távolság (9,3%) miatt azokat külön filogenetikai

fajoknak lehet venni (Nilsson *et al.* 2008; Bonito *et al.* 2010b), melyet a három lókuszt egybevető eredménye is megerősít (geneológiai konkordancia). A két klád szimpatrikus elterjedése és több lokuszon is tapasztalt monofiletikusságuk is közvetve mutatja (Bickford *et al.* 2007), hogy nincs géncsere a két klád között. Továbbá, a molekuláris óra becslés alapján az A és B kládok elválása 17,9 millió évvel ezelőtt történhetett (19. ábra), mely a *T. melanosporum* és *T. indicum* fajkomplex elválás idejével közel megegyező (Bonito *et al.* 2013). Ezen eredmények alapján a *T. brumale* A és B kládját két független filogenetikai fajnak lehet venni.

Korábbi munkák a *T. brumale* nagyon alacsony genetikai variabilitását hangsúlyozzák. Gandeboeuf *et al.* (1994, 1997) izoenzim és RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) módszerekkel bizonyította, hogy nem létezik külön *T. moschatum* faj, vagy változat, és a *T. brumale* intraspecifikus variabilitása alacsonyabb a többi *Tuber* fajhoz képest. Giomaro *et al.* (2002) már a faj ITS szekvenciáira alapozva a régió variabilitásának teljes hiányát említi meg, melyet később Pomarico *et al.* (2007) is megerősít. Wang *et al.* (2006) a *Melanosporum* fajcsoport főbb képviselőivel kapcsolatban megállapítja, hogy az európai fajok, jóval kisebb intraspecifikus nukleotid divergenciát mutatnak (*T. melanosporum* 0-0,3%, *T. brumale* 0-0,1%), mint az Ázsiai fajok (*T. indicum* 3,2%, és *T. pseudoexcavatum* 1%). Ennek okát, a faj keletkezési helyétől Európába tartó migráció során fellépő palacknyak effektusban látja. Emellett feltételezhető, hogy az európai *T. melanosporum* populációk a legutolsó jégkorszak során szenvedtek erős palacknyak effektust (Bertault *et al.* 2001; Murat *et al.* 2004). Bonito *et al.* (2010) 0,5%-nál kisebb intraspecifikus variációt talált a téli szarvasgombánál. Jelen munka során sikerült kimutatni, hogy a *T. brumale* nagyobb ITS variabilitással rendelkezik, mint eddig gondoltuk. Az A és B kládokon belül az intraspecifikus ITS variabilitás rendre 0,91% és 0,07%, amiből látszik, hogy a B faj továbbra is alacsony variabilitással rendelkezik, míg az A faj az eddigiektől eltérően magasabb variabilitást mutat. Az A klád I. és II. haplocsoport ITS variabilitásából (rendre 0,032% és 0,201%) kitűnik, hogy az A klád nagy variabilitását a két haplocsoport közötti különbség okozza. A *Tuber* nemzetségen belül másik három fajnak mutattak ki a *T. brumale* B kládjához hasonló ITS variabilitást (kisebbségek mint 0,2%; *Tuber puberulum*, *Tuber castellanoides* és *Tuber oregonense*), míg az A kládhoz hasonló variabilitást csak egy faj esetén (<1%; *Tuber mesentericum*) (Bonito *et al.* 2010b).

Az I. haplocsoportban tapasztalt kis nukleotid és haplotípus variabilitás valamint a haplotípus háló csillag struktúrája, gyors és recens expanzióra utalnak (Slatkin & Hudson 1991).

Emellett a Tajima's D , F_s és F_u & Li's F^* -tesztek szignifikáns negatív eredménye is megerősítette az A klád recens expanszióját. A populáció jelenlegi elterjedése alapján az I. haplocsoport egy Nyugat európai refugiumban vészelhette át az utolsó jégkorszakot. Ha a *T. brumale* potenciális gazdafajainak a filogeográfiai kutatásait megvizsgáljuk, bizonyos egyezéseket vehetünk észre a *T. brumale* és azok haplotípus mintázataiban. Így például a tölgyek (*Quercus* spp.) és a közönséges mogyoró (*Corylus avellana*) esetén Franciaországban egy haplotípus túlsúlyát mutatták ki, ami az Ibériai-félszigetről illetve egy dél-franciaországi refugiumból való rekolonizációra utalhat (Petit *et al.* 2002ab; Palmé & Vendramin 2002). Ezzel szemben a bükk- (*Fagus* spp.) és a gyertyán- (*Carpinus* spp.) fajok esetén, ugyan léteztek refugiumok az Ibériai-félszigeten is, viszont Európa újra kolonizációja főleg az itáliai félszigetről, valamint a balkán régióból történhetett (Taberlet *et al.* 1998; Grivet & Petit *et al.* 2003; Magri, 2008). Az I. haplocsoport két refugiumi eredetének (Itáliai- és Ibériai-félsziget) ellentmond az, hogy nagyobb diverzitást kellene mutatnia, a különböző leszármazási vonalak keveredése miatt (Petit *et al.* 2003), valamint a haplotípus hálózata nem rendelkezhetne csillagstruktúrával.

A II. haplocsoport nukleotid és haplotípus variációjában, valamint a haplotípus háló struktúrájában is diverzebb. Ez, valamint jelenlegi elterjedési területe, Balkáni refugiumára enged következtetni. A Balkán-félszigeten előforduló több refugium, valamint az ezekből való újrakolonizációs útvonalak komplexitása miatt, sokkal nagyobb diverzitás alakulhatott ki és maradhatott fent, mint a nyugat-európai populációkban (Petit *et al.* 2003; Magri, 2008; Hatziskakis *et al.* 2009). A Fekete-tengertől délre is számos refugium lehetett, melynek jelenlétét az Iránból előkerülő egyedi haplotípus is alátámaszthatja.

A B kládot, tehát a másik filogenetikai fajt, a nagyszámú minta ellenére, csak a Kárpát-medence területéről sikerült kimutatni. A faj jelenleg megismert elterjedési területén kívül nyugatra számos, míg dél-keletre is jelentős számú mintával (20 db) rendelkezünk, melyek mind az A fajhoz tartoznak. Ebből arra lehet következtetni, hogy a B faj csak a Kárpát-medence területén fordul elő, ezáltal egy kárpát-pannon endemizmust képviselve. A B faj alacsony haplotípus és nukleotid diverzitása, valamint kárpát-pannon endemizmusa, erős palacknyak effektusra utal; habár a Tajima's D , F_s , F_u & Li's D^* , és Li's F^* -tesztek eredményei nem támogatják ezt a feltételezést. Mindazonáltal a B klád az utolsó jégkorszakot egy Kárpát-medencei refugiumban is átvészelhette, amely létezése több fafaj vizsgálata során is felvetődött már (Bordács *et al.* 2002; Petit *et al.* 2003; Magri 2008). A fentiekből látszik, hogy a Kárpát-

medence, valamint a balkáni régió nem csak növények és állatok esetén, hanem nagygombák és azon belül pedig a *Tuber* nemzetség esetén is egy diverzitási hotspotnak számít (Marjanović *et al.* 2010; Sica *et al.* 2007). Ennek köszönhetően, Európa kevésbé kutatott területei még több, akár endemikus *Tuber*-fajt is tartogathatnak a kutatók számára.

A *T. brumale* ITS régiójának HinfI enzimmel történő emésztését már Giomaro *et al.* (2002) is alkalmazták a *T. brumale* gyors azonosítására, ugyanakkor ez az enzim csak az A klád I. és II. haplotípus csoportjai között képes különbséget tenni. Ezzel szemben az itt alkalmazott MBoI enzimmel az A és B kládok elkülönítésére is lehetséges. Az RFLP módszer segítségével olcsóbban és gyorsabban lehet „határozni” egy-egy területen előforduló *T. brumale* mintákat, ami hozzájárulhatna a még fehér foltot képző Közel-Kelet, Ukrajna, Oroszország és Spanyolország *T. brumale* aggr. populációinak feltérképezéséhez.

Néhány korábbi munka a *T. brumale* és *T. moschatum*, mint külön fajok létezését hangsúlyozza (lásd Rioussset *et al.* 2001). Ezzel ellentétben, sem a mi molekuláris filogenetikai eredményeink, sem Gandeboeuf *et al.* (1994, 1997) korábbi eredményei nem támasztják alá a különbségtétel létjogosultságát. Fontos kiemelni, hogy mind a *T. brumale*, mind a *T. moschatum* (vagy *T. brumale* var. *moschatum*) leírása Nyugat Európában történt, ahol az eredményeink alapján a *T. brumale* s. l. genetikailag homogén (I. haplocsoport). Így valószínűtlen, hogy a *T. moschatum*ot elválasztó feltételezett morfológiai különbség speciációs folyamat eredménye lenne. Korábbi munkák (pl. Montecchi & Sarasini 2000; Ceruti *et al.* 2003) nem ismerték fel, így nem is mutattak morfológiai különbségeket a *T. brumale* A és B kládjá között, annak ellenére, hogy már vizsgálhattak anyagokat olyan helyekről, ahol a két faj áréája átfed. Ezáltal a *T. brumale* aggr.-t kriptikus fajkomplexnek lehetne tekinteni, mely feltétele, hogy olyan filogenetikailag elkülönült fajok legyenek, melyeket korábban egy névvel illettek, morfológiai különbségek hiánya miatt (Bickford *et al.* 2007).

Közel száz genotipizált *T. brumale* aggr. mintán végzett részletes morfológiai mérést végeztünk a filogenetikai fajok kriptikus voltának tisztázása végett. Az előzetes kis mintaszámon és kevés karakterrel történt mérések tovább erősítették a kriptikus faj elképzelést. További, kibővített protokollal a 19 morfológiai karakter közül találtunk néhányat, melyek tendenciát mutattak a két faj elkülönülésében. Ugyanakkor a legjobb elválasztást mutató karakterrel is a mintáknak mindössze 71%-a lett volna elkülöníthető. Ezért többváltozós matematikai elkülönítést alkalmaztunk, amiben több, egyenként átfedést mutató karakter segítségével létrehozható olyan

származtatott karakter amely már nem, vagy csak minimális átfedést mutat a fajok között. Esetünkben a csak morfológiai karaktereket felhasználó modellel a minták kevesebb, mint 5%-a határozódott földre, amely egy része akár atípusos példányokkal is magyarázható. Ugyanez a modell az A fajon belüli két haplocsoportot mindössze 66,7%-osan tudná elkülöníteni, jelezve azt, hogy itt nincs valós tendencia a morfológiai karakterek elválásában, így valóban csak fajon belüli két haplocsoportról lehet szó. Fontos megjegyezni, hogy ekkora mintaszám mellett nem várható az osztályozási hatékonyság jelentős romlása. A meghatározott egyenletből kiszámolható diszkriminancia érték (D) úgy használható, mint egy folytonos, származtatott karakter, ami mintánként kiszámolható, és jelzi, hogy az adott minta mennyire húz A vagy B fajhoz. Verbruggen *et al.* (2005b) lehetőségként említi a LDA alapú határozást, mivel ilyen esetekben a valószínűségi faj besorolás hatékonyabb és megbízhatóbb lenne, mint egy diszkrét kimenetelű határozókulcs. A gyors és sokak számára elérhető morfológiai határozást az LDA diszkrimináló függvénye lehetővé teszi a minták döntő többségénél. Amennyiben fontos, a kétes anyagok (a határhoz közeli D értékek) hiba nélküli meghatározása (pl. ökológiai kutatáshoz) a korábban említett gyors és olcsó ITS RFLP-vel lehetséges.

A talajváltozók alapján, a két faj között ökológiai differenciáció is kimutatható. Önmagában, csak a szignifikáns eltérést mutató talaj változókból készült LDA elemzéssel is a minták több, mint ¾-e szétválogatható volt. Ugyanakkor, a hatékony morfológiai változókkal (önmagukban 94%) kiegészített LDA modellel tudtuk elérni a legjobb hatékonyságot, ahol a program a minták besorolásának mindössze 2,8%-át tévesztette csak el. Ez jó példa arra, hogy pszeudokriptikus, egymáshoz közeli fajok esetén az integratív taxonómia, többváltozós módszerekkel kombinálva, hatékonyabb faj elválasztást tehet lehetővé, mint külön-külön alkalmazva a morfológiai, ökológiai módszereket.

Csakúgy, mint a legtöbb epigeikus nagyomba nemzetségnél, a *Tubereknél* is a leggyakrabban vizsgált identifikáló karakter a spórák mérete, alakja, díszítettsége (Riousset *et al.* 2001; Ceruti *et al.* 2003). Ezzel szemben, a *T. brumale* aggr. fajok elválasztásában úgy tűnik a spóráknak nincs nagy szerepük, mindössze az aszkuszonkénti spóraszám eloszlásnál sikerült különbségeket találnunk. Sokkal hatékonyabb elválasztó karakternek bizonyultak a perídiummal, pikkelyekkel kapcsolatos bélyegek, melynek oka talán a föld alatti élettérrel lehet összefüggésben. Néhány más *Tuber* faj esetén is tapasztalható, hogy a perídiummal kapcsolatos

jellegek fontosak a fajok elkülönítésében (Chen *et al.* 2005; Chen & Liu 2007; Bonito *et al.* 2010b, Halász *et al.* 2005).

A *Melanosporum*-fajcsoport legtöbb faja, így a téli szarvasgomba is nevének megfelelően télen, novembertől márciusig terem (Riousset *et al.* 2001). A többi szarvasgomba fajtól eltérő termőidő niche szeparáció lehet, mely evolúciós előnyt jelenthet a terjedésben. Azonban a *T. brumale* aggr. két faja között termésideben nem mutatható ki különbség. A *T. melanosporum*hoz hasonlóan (Ławrynowicz, 1992), a téli termésideőtől függetlenül a *T. brumale* aggr. is inkább a déli országokban gyakoribb, mint az északiakban, melyet a prediktált área rekonstrukció is megerősít. A B faj potenciális áreaja erősen átfed az A faj áreajával, annak ellenére, hogy eddig azt csak a Kárpát-medencén belül sikerült kimutatni. Erre alapozva a B faj elterjedési mintázata inkább a negyedidőszakban zajló történeti eseményekre vezethető vissza, mint a másik fajtól eltérő környezeti igényeire.

6.5 Molekuláris filogenetikai módszerek hatása a föld alatti gombák kutatására

Az élőlények leszármazási, rokonsági kapcsolatainak feltárásában az örökítőanyaguk változásának vizsgálata rendkívüli mértékben írta át a korábbi morfológiai jellegeken alapuló osztályozásukat. Az új, különböző fajkonceptiók miatti egyik legnagyobb mértékű fajszám gyarapodást a gombák körében lehetett tapasztalni (Agapow *et al.* 2004). A módszertani fejlődés miatti fajhatárok megváltozása nem csak önmagában a fajok osztályozását, vagy rokonsági kapcsolatait írja át, hanem nagy változásokat idéz elő azok elterjedési és ökológiai megítélésében is. A következő két fejezet a földalatti gombáknál tapasztaltak tükrében mutatja be a molekuláris filogenetika és a klasszikus morfológiai fajleírás egyes ellentmondásait, valamint ezek hatását a fajok elterjedési és ökológiai megítélésére.

6.5.1 Morfológiai alapú osztályozás változása

A különböző faj észlelések közül a filogenetikai jel által a PSR, amely talán a leghamarabb észlelhető (Taylor *et al.* 2000), szemben a tényleges reproduktív izolációval, vagy a morfológiai/ökológiai különbségekkel. Mindez oda vezet, hogy egy fajképződési folyamatban - mely igen hosszú folyamat is lehet - időben egymáshoz képest elcsúsznak a fajészlelések, aszerint hogy melyik mikortól képes elkülöníteni a fajokat. Természetesen a filogenetikai jelet hordozó egy-egy allél fixálódása akár több millió generáción keresztül is eltarthat, a faj

generációs idejétől, populáció méretétől (stb.) függően (Mallet & Willmot 2003). Ugyanígy a morfológiai változások sem szükségképpen jelentkeznek, ha pl. morfológiai pangás áll fenn (*morphological stasis*) stabilizáló szelekció miatt (Bickford *et al.* 2007). Így sok esetben, amikor molekuláris filogenetikai módszerekkel már bizonyítható a két leszármazási vonal elválása, közöttük morfológiai különbségek még nem tehetőek (1. ábra), ami kriptikus fajként kezelésükhöz vezet. Ha részletes vizsgálódás révén mégis sikerül fenotípusos különbséget tenni közöttük, már pszeudokriptikus fajként kezelendők (Sáez *et al.* 2003).

A *T. brumale* A és B faj mintái előzetes morfológiai vizsgálatok alapján, általánosan használt karakterek és közepes mintaszám (kb. 10-15 minta / faj) mellett nem mutattak elkülönülést, amely alapján a fajaggregátum tagjait kriptikus fajoknak gondolhattuk volna. A szimulációk alapján, kis mintaszám mellett (3-8 minta) nem elhanyagolható esély (1-42%) lett volna olyan karaktert találni, amely átfedésmentes elkülönülést mutat az A és B faj mintái között, ám ez teljesen hibás fajleíráshoz vezetett volna. Jóval több minta és karakter bevonásával statisztikai értelemben szignifikánsan elváló, de minden esetben átfedést mutató folytonos karaktereket találtunk. Több átfedő karakter felhasználásával, lineáris diszkriminancia elemzést elvégezve, olyan diszkrimináló függvényt kaptunk, mellyel a minták 95%-a már helyesen besorolható lett. Talajtani változókkal együtt akár 2,8%-ig is lecsökkenthető az LDA-alapú fajhatározás hibázása. Ezen eredmények alapján a *T. brumale* aggr. fajai pszeudokriptikusnak tekinthetők, melyeket az integratív taxonómia módszerével sikerült egymástól elkülöníteni. A fajokon belüli nagy mintaszámnak köszönhetően megbízhatunk a kapott eredményekben, és a szimulációkkal vizsgálhatóvá vált a különböző karakterek viselkedése. A mintaszám függő változások azt jelzik, hogy közelrokon fajok közt meglévő átfedő karakterek esetén jóval több mérés szükséges a valós karakter-tér felderítéséhez.

A kriptikus és pszeudokriptikus fajok leggyakrabban tengeri élőlények körében fordulnak elő, elsősorban egy vagy többsejtű algák, kovamoszatok, szivacsok, rákok csoportjaiban (lásd: Bickford *et al.* 2007; Sáez *et al.* 2003; Cornils & Held 2014). Emellett teresztrisz fajok közül is szép számban kerülnek elő morfológiailag hasonló, de elkülönült fajok, mint például békák, rovarok, mohák és zúzmók köréből (Shaw, 2001; Bickford *et al.* 2007; Molina *et al.* 2011; Szurdoki *et al.* 2014). A nagygombák közül is már számos kriptikus faj jelenlétét mutatták ki (Geml *et al.* 2006; Bonuso *et al.* 2009; Van de Putte *et al.* 2010; Li *et al.* 2010; Chen *et al.* 2011; Stielow *et al.* 2011; Sheedy *et al.* 2013; Urban *et al.* 2013). A felsorolás alapján is kitűnik, hogy

leggyakrabban karakterszegény, egyszerű felépítésű taxonok között fedeznek fel nagyfokú kriptikus/pszeudokriptikus specializációt (Medina *et al.* 2012). A gombákra általánosan jellemző karakterszegénység, a föld alatti fajoknál még kifejezettebb (Reynolds, 2011), amely nagymértékben növelheti a kriptikus fajok előkerülésének valószínűségét. Sok esetben, mint a *T. brumale* aggr. vizsgálata során is bebizonyosodott, hogy a “nemrég” elvált, közelrokon fajok esetében a (kvalitatív) diszkrét morfológiai karakterek nem használhatóak, hanem csak kvantitatív, folytonos karakterekben lehet bízni (Verbruggen, 2005c), melyek jóval problematikusabbak (Hendrixson & Bond 2009) lehetnek. A folytonos morfológiai karakterek, mint számos genetikai additív és a környezeti hatás eredőjeként létrejövő jellegek, eredendően nagyobb változatosságot, és a fenotípusos plaszticitás megnyilvánulásának lehetőségét hordozzák magukban. Gondoljunk csak a *T. moschatum* faj leírására, mely a *T. brumale* s. l. A/I kládján belüli nagy morfológiai variabilitás eredménye, vagy a Rufum-fajcsoportban a számos morfológiai alapon leírt változatra. Saját eredményeink mellett, számos munka igazolja az alábecsült morfológiai plaszticitás jelentőségét a közel rokon fajok közti folytonos karakterek átfedésében (Verbruggen *et al.* 2005ab; Chen *et al.* 2011, Szurdoki *et al.* 2014). Mindebből úgy tűnik, hogy diszkrét, jól látható karakterekkel sok esetben csak fajkomplexek szintjéig lehetett határozó kulcsokat készíteni, a valós, már elszeparálódott közelrokon fajok szintjén már csak folytonos, gyakran átfedő karakter kombinációkkal, az integratív taxonómia segítségével lehet a fajhatárokat feloldani. A molekuláris alapokon nyugvó, több folytonos karaktert, vagy akár ökológiai változót is integráló fajfelismerés fontossága nem elhanyagolható, elég, ha csak a *Tuber* nemzetségen belüli kész vagy kezdeti filogenetikai munkákra gondolunk: az Excavatum- (Urban *et al.* 2013) Rufum-, Puberulum- (Bonuso *et al.* 2009) Gibbosum- (Bonito *et al.* 2010a) fajcsoportokra, vagy a Melanosporum-kládon belül az *T. indicum* (Chen *et al.* 2011) és *T. brumale* (Merényi *et al.* 2014) fajaggregátumokra, melyekben számos kriptikus vagy pszeudokriptikus faj felfedezése történt már meg.

A molekuláris filogenetikai és morfológiai vizsgálómódszerek közt a kriptikus fajok témakörén túlmutató ellentétek is áthidalásra várnak még. A problémát az okozza, hogy még manapság is rengeteg fajt írnak le pusztán morfológiai bélyegek alapján (Hibbet *et al.* 2011), ugyanakkor egyre több az olyan megbízható filogenetikai munka, mely nem foglalkozik a fenotípusos jellegek vizsgálatával, mivel a morfológiai bélyegek vizsgálata egyre inkább alábecsült, ráadásul a nagyszámú mintavétel sokszor nehéz (folytonos karakterek, idő, munkaerő)

vagy lehetetlen (Carstens *et al.* 2013). A közelrokon fajok között meglévő kevés, sokszor folytonos, részben átfedő karakterekkel történő munka még inkább nehezíti a morfológiai vizsgálatokat, ezáltal azok elhanyagolását erősíti. Ennek következtében a közelrokon fajokat indokolatlanul kriptikus fajként kezelik, vagy kevés minta alapján használhatatlan határozókulcsokat készítenek rájuk. Például a Rufum-fajcsoport megbízható morfológiai revidiálásához világszerte, leszármazási vonalanként elgendő számú mintát vizsgálva, több százas nagyságrendű vizsgálati anyagra lenne szükség. Ezeket a vizsgálandó karakterekkel (10-20) felsorozva, több ezer-tízezer mérést kellene végrehajtani, melynek elvégzése hatalmas munkát igényelne. Ugyanakkor a Rufum-fajcsoportból tizenhárom leszármazási vonalat csak mikorrhizából sikerült kimutatni (Bonito *et al.* 2010b), melyek morfológiai vizsgálatára, egyelőre, gondolni sem lehet. Ugyanez a helyzet a rohamosan növekvő környezeti mintavételből származó szekvencia tömeggel, amelyből számos filotípus elkülönítésére, akár leírására lenne lehetőség, pusztán DNS alapon (Hibbet *et al.* 2011). Amíg a morfológiai fajlehatárolás és a megbízhatóbb molekuláris filogenetikai munkák nem osztoznak módszereiken, vagy nem lesz elfogadott a csupán molekuláris adatokon alapuló fajleírás, addig, habár egyre több lesz a molekuláris módszerekkel felismert új filogenetikai faj, arányaiban egyre kevesebb a formálisan leírt faj (Hutsemékers *et al.* 2012, Oliver & Lee 2010).

6.5.2 Ökológiai, elterjedési eredmények változása

A faj határok megváltozása, például a korábban egy fajnak tarott minták több fajra fragmentálódása, a fajról alkotott ökológiai igényeket is átírhatja. Ezt lehetett megfigyelni a *T. regianum* példáján is, mely az eddigi adatok alapján számos fafaj alatt megtalálható volt, míg most minden esetben a *Fagus sylvatica* jelenik meg az élőhelyen (többször kizárólag csak az), ezáltal felmerül a faj gazdanövény specifitása. Ugyancsak a hegységi *T. regianum* esetén tűnt úgy, hogy a faj előfordulása egyre alacsonyabb térszínreke tolódik. A minták faji besorolásának tisztázásával bebizonyosodott, hogy az alacsonyabb területekről előkerülő minták egy másik hasonló morfológiával rendelkező fajhoz tartoznak (*T. sp. nov.*). A *T. brumale* aggr. talaj-változóit vizsgálva, a két pseudokriptikus faja között egyes változókra (Cu, K₂O stb.) nézve statisztikailag szignifikáns különbség mutatható ki. Szintén ennek tudható be a filogenetikailag változatos Rufum-fajcsoport egyes élőhely preferencia vizsgálatokban kapott tág tűrése (Merényi *et al.* 2010b).

A mikróbák körében elhíresült „minden mindenhol, de a környezet szelektál” („Everything is everywhere, but, the environment selects”; Bass-Becking, 1934; De Wit & Bouvier 2006 alapján) nézet a gombák körében is sokáig érvényesnek tűnt. A gombák kozmopolita voltának hipotézise, szintén a DNS alapú filogeográfia szolgáltatja eredményeknek köszönhetően megdőlni látszik, ugyanis kiderült, hogy a különböző területeken megtalált morfológiailag ugyanahhoz a fajhoz sorolt minták több különböző fajhoz tartoznak (Lumbsch *et al.* 2008). A földalatti gombák vizsgálata során kapott eredmények jóval diverzebb elterjedési mintázatot és populáció struktúrát mutatnak, mint korábban gondoltuk (pl. Rubini *et al.* 2005; Sica *et al.* 2007; García-Cunchillos *et al.* 2014). Ezt tapasztaltuk saját vizsgálataink során is, így például a *Rufum*-fajcsoport több tucat leszármazási vonalából csak 6-8-at lehetett kimutatni a magyar anyagok között. Ugyanígy a kilenc Európából leírt tudomány számára új *Genea* faj közül eddig mindössze három jelenlétét sikerült bizonyítani hazánkban. A ritkaságuk ellenére is úgy tűnik, hogy a *Regianum*-fajcsoport mintái széleskörben elterjedtek Dél-Európában Spanyolországtól Romániáig, de a korábbi publikációkkal ellentétben a három fajból Spanyolországban eddig csak a *T. regianum* került elő, míg Romániában csak az nem. A legrészletesebb eredményeket a *T. brumale* aggr. vizsgálatával kaptuk, ahol a *T. brumale* s. s. mellett egy Kárpát-medencére endemikus, új filogenetikai testvérfajt sikerült kimutatni. A két *T. brumale* faj potenciális áréája jóval nagyobb mértékben átfedne, mint azt a valóságban ki lehetett mutatni. Emellett a *T. brumale* A kládon belüli két, nagymértékben elkülönülő haplotípus csoportot sikerült találnunk, melyek kelet-nyugat irányú szeparációt mutatnak, egy vékony átfedő, határvonalával, mely szintén a Kárpát-medencében húzódik. Vagyis akár a fajok közötti elterjedési mintázatot, akár egy fajon belüli populáció-szerkezetet vizsgálunk, az nagyobb területi tagoltságot mutat, mint azt korábban gondoltuk, aminek elsősorban természetvédelmi, és konzervációbiológiai vonatkozásai lehetnek. Az egyébként is ritka, *T. regianum*nak határozott minták három fajba sorolódtak méginkább „megritkítva” annak előfordulási adatait. Ezen kívül, az új endemikus fajok felfedezése, mint a jelen munkában található Kárpát-medencei *T. brumale* testvérfaj (B klád), is fontos egy-egy terület természetvédelmi megítélés szempontjából. A biodiverzitás megismerése, és megőrzése érdekében a morfológiailag nehezen elkülöníthető fajok ismerete is elengedhetetlen, melyre a földalatti gombák körében is bőven találhatunk példákat.

7. Összefoglalás

Az ehető ektomikorrhiza-képző gombák, azon belül a szarvasgombák ökológiai és gazdasági jelentősége megkérdőjelezhetetlen. Ennek ellenére még nagyon keveset tudunk e fajok ökológiájáról, melynek kutatásához elengedhetetlen a valós fajhatárok ismerete. Ebben nagy változásokat okoz a hipogeák körében is jelentkező, kriptikus és pszeudokriptikus fajok problémakörével terhelt taxonómiai revíziós hullám, melyhez több, jelen dolgozatban ismertett kutatással járultunk hozzá.

Elsőként az EMSZE hipogea gyűjtemény adatait adatbázisba rendeztük, mely lehetőséget nyújtott a Kárpát-medencei hipogeák molekuláris taxonómiai vizsgálatainak megkezdéséhez, s egyben ökológiai igényeik és elterjedésük értékeléséhez. További gyűjtési munkával sikerült egy-egy területre nézve új fajokat kimutatni (*Tuber foetidum*, *Gymnomyces* sp.) vagy védett faj adatait meg többszörözni (*Elaphomyces personii*). Emellett a *Tuber* nemzetség egy új fajcsoportját sikerült kimutatni, melyben a két rendkívül ritka faj mellett (*T. regianum*, *T. bernardinii*) egy harmadik meglétét és morfológiai elválaszthatóságát is bizonyítottuk. A molekuláris taxonómiai revíziót igénylő taxonok közül a *Genea* nemzetségben három új faj leírásához járultunk hozzá. Emellett kimutattuk hogy a Rufum-fajcsoport 21-33 potenciális faja közül 6-8 a Kárpát-medencében is előfordul. Adatelemzéseink alapján megállapítható, hogy napjainkra a *T. brumale* adatgyakorisága nőtt legnagyobb mértékben, melynek oka, gyűjtés módszertani változásokkal inkább magyarázható, mint biológiai invázióval. Több lókuszon alapuló filogenetikai vizsgálatokkal sikerült a *T. brumale* s. s. faj mellett egy 17,9 millió éve elvált, Kárpát-medencére nézve endemikus, pszeudokriptikus testvérfajt kimutatnunk. Ezen fajok morfológiai karaktereit vizsgálva megállapítható, hogy a pszeudokriptikus fajok közt sokszor csak folytonos, gyakran átfedő karakterek találhatóak, melyeket csak kombinálva használhatunk fel a fajok lehatárolásához. A *T. brumale* s. s. fajon belül két ITS haplocsoport meglétét bizonyítottuk, melyek Kelet-Nyugati szeparáltsága eltérő jégkorszakbeli refugiumukra utal.

A dolgozatban bemutatott számos új hipogea adat vagy molekuláris taxonómiai módszerekkel feldolgozott fajcsoport, és azok ökológiai vizsgálata a hipogeák mikotéka alapú ökológiai kutatásának eredményességére hívják fel a figyelmet. Emellett rávilágítanak a széleskörű mintázáson alapuló, molekuláris filogenetikai elemzésekkel alátámasztott, de alapos morfológiai méréseket és ökológiai változókat is ötvöző integratív taxonómia jelentőségére.

8. Summary

The ecological and economical importance of edible ectomycorrhizal mushrooms, especially truffles is undoubted. Nonetheless, our knowledge about the ecology of these hypogeous species is incomplete. To study these ectomycorrhizal fungi, the precise separation of species is essential. New trends in the taxonomy of the cryptic and pseudocryptic fungi leads to the revision of the classification of the hypogeous fungi. This work supports these taxonomic revisions by several studies on different groups of hypogeous fungi.

First, we created a database from the data of The First Hungarian Truffle Society's collection, which provided plenty of materials for the molecular taxonomic works and for the evaluation of the ecological requirements and the distributions of species in the Carpathian Basin. Furthermore, we discovered new species for some area (*Tuber foetidum*, *Gymnomyces* sp.), and multiplied ecological and distributional data of a protected species (*Elaphomyces persoonii*). A new species group in genus *Tuber* was also proposed, where the existence and separability of a third rare species was proved beside the other two (*T. regianum*, *T. bernardinii*). We also contributed to the description of three new *Genea* species. In addition, the occurrence of 6-8 species from the 21-33 putative species of the Rufum group were shown in the Carpathian Basin. According to our data analysis, the occurrence frequency of *T. brumale* has increased the most in the last century, the reason of which is rather connected with the changed collection methodology, than a biological invasion. Based on multi-loci phylogenetic investigation, a new pseudocryptic endemic species was discovered for the Carpathian Basin, which diverged from its sister species *T. brumale* s. s. about 17.9 Mya. Based on the investigation of morphological characters, the pseudocryptic species characters are often continuous and overlapped between species, thus species delimitations are only possible by using a character combination. In *T. brumale* s. s., two main ITS haplogroups were distinguished indicating an East-West distributional separation between the related haplogroups. It also suggests that they survived the last glacial period in separate refugia.

New records, molecular taxonomic analysis of several species groups and ecological investigations indicates the importance of mycotheca-based ecological research of hypogeous fungi. Nevertheless, these results highlights the relevance of integrative taxonomy which combines accurate, detailed morphological measurements and ecological analysis based on molecular phylogenetic methods.

9. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom prof. dr. Szigeti Zoltán és dr. Fodor Ferenc tanszékvezető uraknak hogy lehetőséget biztosítottak munkám elvégzéséhez az ELTE TTK Növényélettani és Molekuláris Növénybiológiai Tanszékén.

Kiemelt köszönetemet fejezem ki témavezetőmnek, dr. Bratek Zoltánnak, a több éves tanítói-mentori munkájáért, szakmai tanácsaiért és a doktori értekezés elkészítése során nyújtott sokrétű segítségéért. Az EMSZE hipogea gyűjteménybe fektetett több évtizedes kitartó munkája nélkül sem jöhetett volna létre doktori dolgozatom.

Köszönettel tartozom Varga Tordának, akivel a kutatásaim jó részét együtt végezhettem. Hálás vagyok labortársaimnak, dr. Illyés Zoltánnak, Ouanphanivanh Noéminek, Orczán Ákos Kundnak, Tamaskó Gabriellának, és dr. Halász Krisztiánnak, akik munkám elkészítéséhez saját munkájukkal is hozzájárultak, valamint a Tanszéken dolgozók mindennapos kisebb-nagyobb segítségeikért, kiemelten dr. Solti Ádámnak, dr. Rudnóy Szabolcsnak, és dr. Tamás László vezette labor tagjainak, Éva Csabának és Pólya Sárának. Tóth Attiláné, Bezeczki Tímea, Bozó Helga, Ostroics Zsuzsa és Szabóné Gáti Zsófia aszisztenseinknek köszönöm a labormunkájukat. Köszönöm a konzultációkat, hasznos tanácsaikat a programozási és filogenetikai témakörökben dr. Ari Eszternek, dr. Bordács Sándornak, dr. Geml Józsefnek, dr. Ódor Péternek, dr. Sramkó Gábornak, Bognár Gergőnek, Daru Jánosnak, Fazekas Dávidnak, Kutszegi Gergelynek és az Őserdő projekt gombász tagjainak. A dolgozatok megírásában nyújtott segítségüket elsősorban Erős Ágnesnek, Varga Tordának, és Zajta Eriknek köszönöm. A külföldről származó termőtesteket Alessandra Zambonelli, Amer Montecchi, Benjamin Stielow, Chriss Chrysopoulos, Diamandis Stephanos, Gérard Chevalier, Joseph Maria Vidal, Lamberto Gori, Salem Shamekh és Stanislav Glejdura bocsátották rendelkezésünkre. Ezen felül köszönettel tartozok az EMSZE hipogea adatbázist gyarapító gyűjtőknek, kiemelten: Erdei Vajk, Őze István, Deák Attila, Bokros Viola, Kostyák Gábor, Bagi István, Nagy István, Kalmár Vilmos, Horváth Miklós triflászoknak.

Kutatásainkat a Jedlik Ányos program MIKOQUAL, és a Nemzeti Technológiai Program QUTAOMEL pályázatai támogatták.

Végül szeretném megköszönni családomnak, hogy nem csak gyermekkoromban támogatták a mikológia iránti elkötelezettségemet, de kutatásaimat is mindvégig segítették, a hipogea gyűjtő utak kivitelezésén, Charlie és Paca triflászok nevelésén keresztül is.

10. Irodalomjegyzék

- Agapow PM, Bininda-Emonds OR, Crandall K, Gittleman JL, Mace GM, *et al.* (2004) The impact of species concept on biodiversity studies. *The Quarterly Review of Biology*, 79(2): 161–179.
- Águeda B, Zambonelli A, Molina, R (2014) *Tuber* 2013: scientific advances in sustainable truffle culture. *Mycorrhiza* 24(1): 1-4.
- Ainsworth GC, Bisby GR (1943) *Dictionary of the Fungi*. Imperial Mycological Institute, Kew, UK.
- Akaike H (1974) A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control* 19(1): 716–723.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215(1): 403–410.
- Alvarado P, Cabero J, Moreno G, Bratek Z, Van Vooren N, Kaounas V, Konstantinidis G, Agnello C, Merényi Zs, Smith EM (2014) Species diversity of *Genea* (Ascomycota, Pezizales) in Europe. *Ascomycete.org* 6 (3): 41-51.
- Ambra R, Macino G (2000) Cloning and characterization of PKC-homologous genes in the truffle species *Tuber borchii* and *Tuber magnatum*. *FEMS Microbiology Letters* 189(1): 45-53.
- Ari E (2012) Molekuláris filogenetikai elemzések egy diszkrét matematikai módszer, a Boole analízis segítségével. Doktori értekezés (Eötvös Loránd Tudományegyetem)
- Arribas P, Andújar C, Sánchez-Fernández D, Abellán P, Millán A (2013) Integrative taxonomy and conservation of cryptic beetles in the Mediterranean region (Hydrophilidae). *Zoologica Scripta* 42(2): 182–200.
- Avise JC (2000) *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge. pp. 447. ISBN: 0674666380
- Avise JC (2004) *Molecular Markers, Natural History, and Evolution (Second Edition)*. Sinauer, Sunderland, MA. pp. 684. ISBN: 0878930418
- Ayala FJ (1999) Molecular clock mirages. *BioEssays? News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 21(1): 71–75.

- Aylor DL, Price EW, Carbone I (2006) SNAP: Combine and Map modules for multilocus population genetic analysis. *Bioinformatics* 22(1): 1399-1401.
- Barkworth ME, Murrell ZE (2012) The US Virtual Herbarium: working with individual herbaria to build a national resource. *ZooKeys* 73(209): 55–73.
- Bass-Becking LGM (1934) *Geobiologie of inleiding tot de milieukunde*. The Hague, The Netherlands: WP Van Stockum & Zoon.
- Baum DA, Shaw KL (1995) Genealogical perspectives on the species problem. In Hoch PC, Stephenson AG (Eds.) *Experimental and Molecular Approaches to Plant Biosystematics*. Missouri Botanical Garden, St. Louis. pp. 289–303.
- Beheregaray LB (2008) Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. *Molecular Ecology* 17(1): 3754–3774.
- Belfiori B, Riccioni C, Tempesta S, Pasqualetti M, Paolocci F, Rubini A (2012) Comparison of ectomycorrhizal communities in natural and cultivated *Tuber melanosporum* truffle grounds. *FEMS Microbiology Ecology* 81(1): 547–561.
- Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Clark K, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW (2012) GenBank. *Nucleic Acids Research*, 40 (Database issue), D48–53.
- Benucci GMN, Raggi L, Albertini E, Grebenc T, Bencivenga M, *et al.* (2012a) Ectomycorrhizal communities in a productive *Tuber aestivum* Vittad. orchard: composition, host influence and species replacement. *FEMS Microbiology Ecology* 76(1): 170–84.
- Benucci GMN, Bonito G, Falini BL, Bencivenga M (2012b). Mycorrhization of pecan trees (*Carya illinoensis*) with commercial truffle species: *Tuber aestivum* Vittad. and *Tuber borchii* Vittad. *Mycorrhiza* 22(5): 383–92.
- Berbee ML, Taylor JW (2010) Dating the molecular clock in fungi – how close are we? *Fungal Biology Reviews* 24(1-2): 1–16.
- Bertault G, Rousset F, Fernandez D, Berthomieu A, Hochberg ME, Callot G, Raymond M (2001) Population genetics and dynamics of the black truffle in a man-made truffle field. *Heredity* 86(1): 451–458.
- Bertini L, Amicucci A, Agostini D, Polidori E, Potenza L, Guidi C, Stocchi V (1999) A new pair of primers designed for amplification of the ITS region in *Tuber* species. *FEMS Microbiology Letters* 173(1): 239–245.

- Bickford D, Lohman DJ, Sodhi NS, Ng PKL, Meier R, Winker K, Ingram KK, Das I (2007) Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology & Evolution* 22(1): 148–55.
- Bidartondo MI, Read DJ (2008) Fungal specificity bottlenecks during orchid germination and development. *Molecular Ecology* 17(16): 3707–3716.
- Blackwell M (2011) The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *American Journal of Botany* 98(3): 426–438.
- Bohus G (1984) Studies on the pH requirement of soil inhabiting mushrooms: the R-spectra of mushrooms assemblages in deciduous forest communities. *Acta Botanica Hungarica* 30(1–2): 155–171.
- Bonito G, Trappe JM, Rawlinson P, Vilgalys R (2010a) Improved resolution of major clades within *Tuber* and taxonomy of species within the *Tuber gibbosum* complex. *Mycologia* 102(5): 1042–1057.
- Bonito GM, Gryganskyi AP, Trappe JM, Vilgalys R (2010b) A global meta-analysis of *Tuber* ITS rDNA sequences: species diversity, host associations and long-distance dispersal. *Molecular Ecology* 19(1): 4994–5008.
- Bonito G, Smith ME, Nowak M, Healy RA, Guevara G, Cázares E, Kinoshita *et al.* (2013) Historical biogeography and diversification of truffles in the Tuberaceae and their newly identified southern hemisphere sister lineage. *PLoS ONE* 8:e52765.
- Bonuso E, Zambonelli A, Bergemann SE, Iotti M, Garbelotto M (2009) Multilocus phylogenetic and coalescent analyses identify two cryptic species in the Italian bianchetto truffle, *Tuber borchii* Vittad. *Conservation Genetics* 11(1): 1453–1466.
- Bordács S, Popescu F, Slade D, Csaikl UM, Lesur I, Borovics A, Kézdy P, *et al.* (2002) Chloroplast DNA variation of white oaks in northern Balkans and in the Carpathian Basin. *Forest Ecology and Management* 156(1): 197–209.
- Borhidi A (2003) Magyarország növénytársulásai. Akadémiai Kiadó, Budapest. pp. 610. ISBN: 963-05-7983-9
- Bougher NL, Lebel T (2001) Sequestrate truffle-like fungi of Australia and New Zealand. *Australian Systematic Botany* 14(1): 439–484.

- Bratek Z, Albert L, Bagi I, Pálffy B, Takács T, Rudnóy Sz, Halász K (2001a) New and rare hypogeous fungi of Carpathian basin. Actes du Ve Congres International, Science et Culture de la Truffe et des autres Champignons Hypoges Comestibles. 4 au 6 mars 1999, Aix-en-Provence, France, Federation Française des Trufficulteurs, pp. 2.55-56.
- Bratek Z, Papp L, Merkl O (2001b) Beetles and flies living on truffle. Actes du Ve Congres International, Science et Culture de la Truffe et des autres Champignons Hypoges Comestibles. 4 au 6 mars 1999, Aix-en-Provence, France, Federation Française des Trufficulteurs, pp. 4.191-192.
- Bratek Z (2006) Biodiversity of hypogeous fungi in Carpathian region. Biodiversity of hypogeous fungi 1(1): 11–14.
- Bratek Z, Merényi Zs, Illyés Z, László P, Anton A, Papp L, Merkl O, Garay J, Viktor J, Brandt S (2010) Studies on the ecophysiology of *Tuber aestivum* populations in the Carpatho-Pannonian region. In Proceedings of the First Conference on the “European” Truffle *Tuber aestivum/uncinatum*. Österreichische Zeitschrift Für Pilzkunde / Austrian Journal of Mycology 19(1): 221-226.
- Bratek Z, Merényi Zs, Varga T (2013) Changes of hypogeous funga in the Carpathian-Pannonian region in the past centuries. Acta Mycologica 48(1): 33–39.
- Brock PM, Döring H, Bidartondo MI (2008) How to know unknown fungi: the role of a herbarium. The New Phytologist 181(3): 719–724.
- Bulman SR, Visnovsky SB, Hall IR, Guerin-Laguette A, Wang Y (2009) Molecular and morphological identification of truffle-producing *Tuber* species in New Zealand. Mycological Progress 9(2): 205–214.
- Burnham KP, Overton WS (1978) Estimation of the size of a closed population when capture probabilities vary among animals. Biometrika 65(1): 625-633.
- Bustan A, Ventura Y, Kagan-Zur V, Roth-Bejerano N (2006) Optimized conditions for mycorrhiza formation between the pink rockrose (*Cistus incanus*) and the black Périgord truffle (*Tuber melanosporum*). Israel Journal of Plant Sciences 54(1): 87–96
- CABI (2014): The Index Fungorum. – <http://www.indexfungorum.org>.

- Camargo A, Sites JJ (2013) Species Delimitation: A Decade After the Renaissance. pp. 225-248. In: Pavlinov YI (Ed.) The Species Problem - Ongoing Issues, Publisher: InTech, Chapters published. pp. 290. ISBN 978-953-51-0957-0
- Carstens BC, Pelletier Ta, Reid NM, Satler JD (2013) How to fail at species delimitation. *Molecular Ecology* 22(17): 4369–4383.
- Ceruti A, Fontana A, Nosenzo C (2003) Le specie europee del genere *Tuber*. Una revisione storica. Regione Piemonte Museo Regionale de Scienze Naturali, Monografie XXXVII, Torino.
- Chao A (1984) Non-parametric estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian Journal of Statistics*, 11(1): 265-270.
- Chapela IH, Garbelotto M (2004) Phylogeography and evolution in matsutake and close allies inferred by analyses of ITS sequences. *Mycologia* 96(1): 730–741.
- Chatin AD (1892) La truffe. Botanique de la truffe et des plantes truffières. Ed J.B. Bailliére et Fils, Paris, pp. 370
- Chen J, Liu P, Wang Y (2005). *Tuber umbilicatum*, a new species from China, with a key to the spinose-reticulate spored *Tuber* species. *Mycotaxon* 94(1): 1–6.
- Chen J, Liu PG (2007) *Tuber latisporum* sp. nov. and related taxa, based on morphology and DNA sequence data. *Mycologia* 99(3): 475–81.
- Chen J, Guo SX, Liu PG (2011) Species recognition and cryptic species in the *Tuber indicum* complex. *PloS One*, 6(1): e14625.
- Chevalier G, Frochot H, Bratek Z (2005) Az európai fekete szarvasgomba (Burgundi szarvasgomba – *Tuber uncinatum* Chatin), Első Magyar Szarvasgombász Egyesület, Budapest, pp. 228-238. ISBN: 9632182391
- Chevalier G, Sourzat P (2012) Soils and techniques for cultivating *Tuber melanosporum* and *Tuber aestivum* in Europe. In: Zambonelli A, Bonito GM (Eds.) Edible Ectomycorrhizal Mushrooms. Springer, Berlin, pp. 163–189.
- Clement M, Posada D, Crandall K (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9(10): 1657-1660
- Cornils A, Held C (2014) Evidence of cryptic and pseudocryptic speciation in the *Paracalanus parvus* species complex (Crustacea, Copepoda, Calanoida). *Frontiers in Zoology* 11(1): 19.

- Darwin RC (1859) A fajok eredete. Fordította: Kampis György (2009) Budapest, Typotex Kiadó. pp. 450. ISBN 9789639664449
- Dayrat B (2005) Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society* 85(3): 407–415.
- De Queiroz K (2007) Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology*, 56(6): 879–886.
- De Wit R, Bouvier T (2006) “Everything is everywhere, but, the environment selects”; what did Baas Becking and Beijerinck really say? *Environmental Microbiology* 8(4): 755–758.
- Degnan J, Rosenberg N (2009) Gene tree discordance, phylogenetic inference and the multispecies coalescent. *Trends in Ecology & Evolution* 24(1): 332-340.
- Diamandis S, Perlerou C (2013) Recent records of hypogeous fungi in Greece, *Acta Micologica* 43(2): 139-142.
- Donita N, Ivan D, Coldea GH, Sanda V, Popescu A, Chifu TH, Pauca-Comanescu M, Miltitelu D, Boscaiu N (1992) *Vegetatia Romaniei*. Ed. Technica Agricola, Bucuresti.
- Douet JP, Castroviejo M, Mabru D, Chevalier G, Dupré C, Bergougnoux F, Ricard JM, Médina B (2004) Rapid molecular typing of *Tuber melanosporum*, *T. brumale* and *T. indicum* from tree seedlings and canned truffles. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 379(1): 668–73.
- Doyle JJ, Gaut BS (2000) Evolution of genes and taxa: a primer. *Plant Molecular Biology* 42(1): 1–6.
- Drummond AJ, Ho SYW, Phillips MJ, Rambaut A (2006) "Relaxed Phylogenetics and Dating with Confidence". *PLoS Biology* 4(5): e88.
- Drummond AJ, Suchard MA, Xie, D, Rambaut A (2012) Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular biology and evolution* 29(8): 1969–1973.
- Erős-Honti Zs, Kovács GM, Szedlay Gy, Jakucs E (2008) Morphological and molecular characterization of *Humaria* and *Genea* ectomycorrhizae from Hungarian deciduous forests. *Mycorrhiza* 18(3): 133–143.
- Farris JS, Källersjö M, Klugem AG, Bult C (1995) Testing significance of incongruence. *Cladistics* 10(1): 315–319.
- Fielding AH, Bell JF (1997) A review of methods for the assessment of prediction errors in conservation presence/absence models. *Environmental Conservation* 24(1): 38–49.

- Fischer E (1897) Tuberales und Hemiascomycetes. In: Die Pilze Deutschlands, Österreich und der Schweiz. V. Ascomyceten. L. Rabenhorst's Kryptogamenflora von Deutschland, Österreich und der Schweiz Bd 1, Abt. 5: Ascomyceten 2nd éd. Reprint J. Cramer, Weinheim, Leipzig, pp. 37-61.
- Frankham R, Ballou JD, Dudash MR, Eldridge MDB, Fenster CB, Lacy RC, *et al.* (2012) Implications of different species concepts for conserving biodiversity. *Biological Conservation* 153(1): 25–31.
- Fu YX (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitch-hiking, and background selection. *Genetics* 147(1): 915–925.
- Fu YX, Li WH (1993) Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics* 133: 693–709.
- Gandeboeuf D, Dupré C, Chevalier G (1994) Différenciation des truffes européennes par l'analyse des isoenzymes. *Acta Botanica Gallica* 141(1): 455–463.
- Gandeboeuf D, Dupré C, Chevalier G, Roeckel-Drevet P, Nicolas P (1997) Grouping and identification of *Tuber* species using RAPD markers. *Canadian Journal of Botany* 75(1): 36–45.
- García-Cunchillos I, Sánchez S, Barriuso JJ, Pérez-Collazos E (2014) Population genetics of the westernmost distribution of the glaciations-surviving black truffle *Tuber melanosporum*. *Mycorrhiza* 24(1): 89-100.
- García-Montero LG, Díaz P, Massimo GD, García-Abril A (2010) A review of research on Chinese *Tuber* species. *Mycological Progress* 9(1): 315–335.
- Gardes M, Bruns TD (1993) ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2(1): 113-118.
- Geml J, Laursen GA, O'Neill K, Nussbaum HC, Taylor DL (2006) Beringian origins and cryptic speciation events in the fly agaric (*Amanita muscaria*). *Molecular Ecology* 15(1): 225–39.
- Giomas G, Sisti D, Zambonelli A, Amicucci A, Cecchini M, Comandini O, Stocchi V (2002) Comparative study and molecular characterization of ectomycorrhizas in *Tilia americana* and *Quercus pubescens* with *Tuber brumale*. *FEMS Microbiology Letters* 216(1): 9–14.

- Glez-Pena D, Gómez-Blanco D, Reboiro-Jato M, Fdez-Riverola F, Posada D (2010) ALTER: program-oriented format conversion of DNA and protein alignments. *Nucleic Acids Research*. 38(1): W14-W18.
- Gógán ACs, Bratek Z, Merényi Zs, Illyés Z, Dimény J (2008) *Choiromyces meandriformis* and *Mattirolomyces terfezioides*: peculiar truffles with new perspectives. *Micologia Italiana* 38(1): 21-28.
- Gori L (2003) *Tuber bernardinii* una specie chiara di *Tuber* dalla Lucchesia (Italia) *Rivista di Micologica Italiana* 46(3): 309-317.
- Grebenc T (2008) Research and cultivation of truffles in Slovenia – current status. In: Reynal B. (Ed.) *La culture de la truffe dans le monde. Actes du Colloque, Brive-la-Gaillarde*. 2. Février 2007, pp. 183-191.
- Grivet D, Petit RJ (2003) Chloroplast DNA phylogeography of the hornbeam in Europe: Evidence for a bottleneck at the outset of postglacial colonization. *Conservation Genetics* 4(1): 47–56.
- Gross, G. (1987) Zu den europa ischen Sippen der Gattung *Tuber*. *Atlas der Pilze des Saarlandes*. Teil 2. Nachweise, Ökologie, Vorkommen und Beschreibungen. H. Derbsch and J.A. Schmitt (eds.), pp. 79–99. Derlattia, Saarbrücken, Germany.
- Grubisha LC, Trappe JM, Molina R, Spatafora JW (2002) Biology of the ectomycorrhizal genus *Rhizopogon*. VI. Re-examination of infrageneric relationships inferred from phylogenetic analyses of ITS sequences. *Mycologia* 94(4): 607–619.
- Guerin-Laguette A, Cummings N, Hesom-Williams N, Butler R, Wang Y (2012) Mycorrhiza analyses in New Zealand truffières reveal frequent but variable persistence of *Tuber melanosporum* in co-existence with other truffle species. *Mycorrhiza* 23(1): 87–98.
- Guevara G, Bonito G, Cázares E, Rodríguez J, Vilgalys R, and Trappe JM (2008) *Tuber regimontanum*, new species of truffle from Mexico. *Revista Mexicana de Micologia* 26(1): 17–27.
- Guevara-Guerrero G, Stielow B, Tamm H, Cázares-Gonzales E, Göker M (2012) *Genea mexicana* sp. nov., and *Geopora toluicana* sp. nov., new hypogeous Pyronemataceae from Mexico, and the taxonomy of *Geopora* reevaluated. *Mycological Progress* 11(3): 711–724.

- Halász K, Bratek Z, Szegő D, Rudnóy S, Rácz I, Lásztity D, Trappe, JM (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.
- Halász K, Bene, F, Babos, M, & Bratek, Z. (2007) A Hazai föld alatti gombafajok magyar elnevezése. *Clusiana Mikológiai Közlemények* 46(1): 33–56.
- Halász K (2008) Különböző stressztűrőképességű nagygombanemzetségek Kárpát-medencei leletanyagának molekuláris azonosítása és rendszerezése. Doktori értekezés (Eötvös Loránd Tudományegyetem)
- Hall IR, Brown G, Zambonelli A (2007) *Taming the Truffle: The History, Lore, and Science of the Ultimate Mushroom*. Timber Press, Portland, U.S.A. pp. 304. ISBN-10: 0881928607
- Hansen K, Perry Ba, Dranginis AW, Pfister DH (2013) A phylogeny of the highly diverse cup-fungus family Pyronemataceae (Pezizomycetes, Ascomycota) clarifies relationships and evolution of selected life history traits. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 67(2): 311–335.
- Harms H, Schlosser D, Wick LY (2011) Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. *Nature Reviews Microbiology* 9(3): 177–192.
- Hatziskakis S, Papageorgiou AC, Gailing O, Finkeldey R (2009) High chloroplast haplotype diversity in Greek populations of beech (*Fagus sylvatica* L.). *Plant Biology* 11: 425–433.
- Hawker LE (1954) British hypogeous fungi. *Philosophical Transactions of Royal Society London Series B* 237(1): 429–546.
- Hawksworth DL (1991) The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological Research* 95(6): 641–655.
- Hawksworth DL, Kirk P, Sutton BC, Pegler DN (1996) *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi*, CAB International, Wallingford, Oxon, UK.
- Healy RA, Smith ME, Bonito GM, Pfister DH, Ge Z-W, Guevara GG, *et al.* (2012). High diversity and widespread occurrence of mitotic spore mats in ectomycorrhizal Pezizales. *Molecular Ecology* 22(6): 1717-1732.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society* 270(1512): 313–321.

- Heckman DS, Geiser DM, Eidell BR, Stauffer RL, Kardos NL, Hedges SB (2001): Molecular evidence for the early colonization of land by fungi and plants. *Science*, 293(5532): 1129–1133.
- Hendrixson BE, Bond JE (2009) Evaluating the efficacy of continuous quantitative characters for reconstructing the phylogeny of a morphologically homogeneous spider taxon (Araneae, Mygalomorphae, Antrodiaetidae, Antrodiaetus). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 53(1): 300–313.
- Hewitt GM (1996) Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation, *Biological Journal of the Linnean Society* 58(1): 247–276.
- Hewitt GM (1999) Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society*, 68(1-2): 87–112.
- Hewitt GM (2000) The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405(1): 907-913
- Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, *et al.* (2007) A higher-level phylogenetic classification of the fungi. *Mycological Research* 111(1): 509–547.
- Hibbett DS, Ohman A, Glotzer D, Nuhn M, Kirk P, Nilsson RH (2011) Progress in molecular and morphological taxon discovery in Fungi and options for formal classification of environmental sequences. *Fungal Biology Reviews* 25(1): 38–47.
- Ho WH, Anderson S, Guerin-Laguette A, Hesom-Williams N, Wang Y, Braithwaite M, Hill CF, Alexander BJR (2008) *Tuber brumale*, a new truffle in New Zealand. ICPP2008, 9th International Congress of Plant Pathology, Torino (Italy), August 24-29
- Hollós L (1911) Magyarország földalatti gombái, szarvasgombaféléi. K. M. Természettudományi Társulat, Budapest.
- Horváth F, Dobolyi K, Karas L, Lőkös L, Morschhauser T, Szerdahelyi T (1995) Flóra Adatbázis 1.2, Taxon-lista és attribútum-állomány. FLÓRA MTA ÖBKI – MTTM Növénytára. pp. 267.
- Hosaka K, Castellano MA, Spatafora JW (2008) Biogeography of *Hysterangiales* (Phallomycetidae, Basidiomycota). *Mycological Research* 112(4): 448–462.
- Huelsenbeck JP, Ronquist FR (2001) Mr. Bayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Biometrics* 17(1): 754–755.

- Hutsemékers V, Vieira CC, Ros RM, Huttunen S, Vanderpoorten A (2012) Morphology informed by phylogeny reveals unexpected patterns of species differentiation in the aquatic moss *Rhynchostegium riparioides* s. l. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 62(2): 748–755.
- Iotti M, Amicucci A, Bonito G, Bonuso E, Stocchi V, Zambonelli A (2007) Selection of a set of specific primers for the identification of *Tuber rufum*: a truffle species with high genetic variability. *FEMS Microbiology Letters*, 277(2): 223–231.
- Jeandroz S, Murat C, Wang Y, Bonfante P, Le Tacon F (2008) Molecular phylogeny and historical biogeography of the genus *Tuber*, the “true truffles”. *Journal Biogeography* 35(1): 815–829.
- Katoh K, Toh H (2008) Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Brief Bioinformatics* 9(1): 286–298.
- Kendall DG (1948) On the generalized “birth-and-death” process. *Annals of Mathematical Statistics* 19(1): 1–15.
- Kinoshita A, Sasaki H, Nara K (2011) Phylogeny and diversity of Japanese truffles (*Tuber* spp.) inferred from sequences of four nuclear loci. *Mycologia* 103(4): 779–794.
- Kirk P, Cannon P, Stalpers J, (2008) *Dictionary of the Fungi*. 10th ed. CABI, Wallingford pp. 784. ISBN-10: 1845939336
- Kiss M, Csóka M, Gyórfi J, Korány K (2011) Comparison of the fragrance constituents of *Tuber aestivum* and *Tuber brumale* gathered in Hungary. *Journal of Applied Botany and Food Quality* 84(1): 102 – 110.
- Knapp, A. (1950) Die Europäischen Hypogaeen Gattungen und ihre Gattungstypen. *Schweiz Zeits Pilzk*, pp. 124.
- Knowlton N (1986) Cryptic and sibling species among the decapod Crustacea. *Journal of Crustacean Biology* 6(1): 356–363.
- Knowlton N (1993) Sibling Species in the Sea. *Annual Review of Ecology and Systematics* 24(1): 189–216.
- Knudsen H, Vesterholt J (2012) *Funga nordica: agaricoid, boletoid and cyphelloid genera* (2nd edition). Copenhagen: Nordsvamp. pp. 1083. ISBN 9788798396130.

- Koljalg U, Larsson KH, Abarenkov K, Nilsson RH, Alexander IJ, Eberhardt U, *et al.* (2005) UNITE: a database providing web-based methods for the molecular identification of ectomycorrhizal fungi. *New Phytologist* 166(1): 1063-1068.
- Kovács MG, Trappe JM (2014) Nomenclatural History and Genealogies of Desert Truffles In: Kagan-Zur V, Roth-Bejerano N, Sitrit Y, Morte A (Eds.) *Desert Truffles Phylogeny, Physiology, Distribution and Domestication*. Springer Heidelberg New York Dordrecht London. ISBN 978-3-642-40096-4 pp. 97.
- Lamont BB, Ralph CS, Christensen PE (1985) Mycophagous marsupials as dispersal agents for ectomycorrhizal fungi on *Eucalyptus calophylla* and *Gastrolobium bilobum*. *New phytologist* 101(4): 651-656.
- Ławrynowicz M (1989) Chorology of the European hypogeous Ascomycetes I. Elaphomycetales. *Acta Mycologica* 25(1): 3-41.
- Ławrynowicz M (1990) Chorology of the European hypogeous Ascomycetes. II. Tuberales. *Acta Mycologica* 26(1): 7-75.
- Ławrynowicz M (1992) Distributional limits of truffles in the northern Europe. *Micologia e Vegetazione Mediterranea* 7(1): 31-38.
- Li M, Liang J, Li Y, Feng B, Yang ZL, James TY, Xu J (2010) Genetic diversity of Dahongjun, the commercially important “Big Red Mushroom” from southern China. *PLoS ONE* 5:e10684.
- Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25(1): 1451-1452.
- Ludmerszki E, Rudnóy S (2012) „Quid pro Quo” - Az ektomikorrhizás szimbiózis: A kapcsolat kialakulása és anyagcsere-életteni jellemzői. *Botanikai Közlemények* 99: 175–193.
- Lumbsch HT, Buchanan PK, May TW, Mueller GM (2008) Phylogeography and biogeography of fungi. *Mycological Research* 112(1): 423–424.
- Luoma DL, Trappe JM, Claridge AW, Jacobs KM, Cazares E (2003) Relationships among fungi and small mammals in forested ecosystems. *Mammal Community Dynamics in Western Coniferous Forests: Management and Conservation*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, pp. 343-373.

- Magri D (2008) Patterns of post-glacial spread and the extent of glacial refugia of European beech (*Fagus sylvatica*). *Journal Biogeography* 35(1): 450–463.
- Mallet J, Willmott K (2003) Taxonomy: renaissance or Tower of Babel? *Trends in Ecology & Evolution* 18(2): 57-59
- Mamoun M, Olivier JM (1993) Competition between *Tuber melanosporum* and other ectomycorrhizal fungi under two irrigation regimes. *Plant Soil* 149(1): 211–218.
- Margoliash E (1963) Primary structure and evolution of cytochrome c. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America* 50(1): 672–679.
- Marie-Stephane T (2013) Statistical approaches for morphological continuous characters: a conceptual model applied to Phytoseiidae (Acari: Mesostigmata). *Zoologica Scripta*, 42(3): 327–334.
- Marjanović Ž (2008) Truffles and possibilities for their cultivation in Serbia-current situation. In: Reynal B. (Ed.) *La culture de la truffe dans le monde. Actes du Colloque, Brive-la-Gaillarde. 2. Fevrier 2007*, pp. 163-172.
- Marjanović Ž, Grebenc T, Marković, M, Glišić, A, Milenković, M (2010) Ecological specificities and molecular diversity of truffles (genus *Tuber*) originating from mid-west of the Balkan Peninsula. *Sydowia* 62(1): 67–87.
- Marosi S, Somogyi S (1990) Magyarország kistájainak katasztere I-II. MTA Földrajztudományi Kutatóintézet, Budapest. pp. 1026.
- Martin F, Díez J, Dell B, Delaruelle C (2002) Phylogeography of the ectomycorrhizal *Pisolithus* species as inferred from nuclear ribosomal DNA ITS sequences. *New Phytologist* 153(1): 345–357
- Martin F, Kohler A, Murat C, Balestrini R, Coutinho PM *et al.* (2010) Périgord black truffle genome uncovers evolutionary origins and mechanisms of symbiosis. *Nature* 464(1): 1033–1038.
- Mayden RL (1997) A hierarchy of species concepts: the denouement in the saga of the species problem. In: MF Claridge, HA Dawah & MR Wilson (Eds.) *Species: The units of diversity*. Chapman and Hall, London, pp. 381-423.
- Mayr E (1942) *Systematics and the Origin of Species and Evolution*. Harvard University Press, Cambridge (MA). ISBN 0-674-86250-3.

- Medina R, Lara F, Goffinet B, Garilleti R, Mazimpaka V (2012) Integrative taxonomy successfully resolves the pseudo-cryptic complex of the disjunct epiphytic moss *Orthotrichum consimile* s. l. (Orthotrichaceae). *Taxon* 61(1): 1180–1198.
- Merényi Zs, Pintér Zs, Orczán ÁIK, Illyés Z, Bratek Z (2008) A kárpát-medence földalatti gombafajainak biogeográfiai és ökológiai kutatása számítógépes adatbázisok létrehozásával és integrálásával. *Mikológiai Közlemények, Clusiana* 47(2): 223-230.
- Merényi Zs, Illyés Z, Völcz G, Bratek Z. (2010a) Creation database application for development on truffle cultivation methods. In Proceedings of the First Conference on the “European” Truffle *Tuber aestivum/uncinatum*. *Österreichische Zeitschrift Für Pilzkunde / Austrian Journal of Mycology* 19: 239-244.
- Merényi Zs, Varga T, Tamaskó G, Garay J, Vikor J, Bratek Z (2010b) Do some *Tuber* species endanger the natural *Tuber aestivum/uncinatum* habitats in Carpatho-Pannon Region? In Kankaanpää A (Eds.) Second congress of the *Tuber aestivum/uncinatum* European Scientific Group. Juva, Finland 2010.08.20-22, Abstract book, pp. 34-35.
- Merényi Zs, Varga T, Geml J, Orczán ÁIK, Chevalier G, Bratek Z (2014) Phylogeny and phylogeography of the *Tuber brumale* aggr. *Mycorrhiza* 24(1): 101-113.
- Miller SL, Larsson E, Larsson KH, Verbeken A, Nuytinck J (2006) Perspectives in the new Russulales. *Mycologia* 98(6): 960–970.
- Molina MC, Del-Prado R, Divakar PK, Sánchez-Mata D, Crespo A. (2011) Another example of cryptic diversity in lichen-forming fungi: the new species *Parmelia mayi* (Ascomycota: Parmeliaceae). *Organisms Diversity & Evolution*, 11(5): 331–342.
- Molinier V, Tuinen D, Chevalier G, GolLOTte A, Wipf D, Redecker D (2013) A multigene phylogeny demonstrates that *Tuber aestivum* and *Tuber uncinatum* are conspecific. *Organisms Diversity & Evolution*, 13(4): 503–512.
- Montecchi A, Lazzari G (1987) Un nuovo tartufo di montagna: *Tuber regianum* sp. nov. *Rivista di Micologia Italiana*. 30(1-2): 3-11.
- Montecchi A, Sarasini M (2000) Funghi ipogei d'Europa. Associazione Micologica Bresadola – Fondazione Centro Studi Micologici, Trento-Vicenza pp. 714
- Mora C, Tittensor DP, Adl S, Simpson AGB, Worm B (2011) How many species are there on Earth and in the ocean? *PLoS Biology* 9(8): e1001127.

- Moreira D, Hervé P (2010) Molecular phylogeny: pitfalls and progress. *International Microbiology* 3(1): 9-16.
- Murat C (2004) Etude de la diversité génétique de la truffe blanche du Piedmont (*Tuber magnatum* Pico) et de la truffe noire du Périgord (*Tuber melanosporum* Vittad.). These de Doctorat (l'Universités de Nancy et de Turin) pp. 156.
- Murat C, Díez J, Luis P, Delaruelle C, Dupré C, Chevalier G, Bonfante P, Martin F (2004) Polymorphism at the ribosomal DNA ITS and its relation to postglacial re-colonization routes of the Perigord truffle *Tuber melanosporum*. *New Phytologist* 164(1): 401–411.
- Murat C, Zampieri E, Vizzini A *et al.* (2008) Is the Perigord black truffle threatened by an invasive species? We dreaded it and it has happened! *New Phytologist* 178(1):699–702.
- Naidoo K, Steenkamp ET, Coetzee MP A, Wingfield MJ, Wingfield BD (2013) Concerted evolution in the ribosomal RNA cistron. *PloS One* 8(3): e59355.
- Nilsson RH, Hallenberg N, Nordén B, Maekawa N, Wu SH (2003) Phylogeography of *Hyphoderma setigerum* (Basidiomycota) in the Northern Hemisphere. *Mycological Research* 107(1): 645–652.
- Nilsson HR, Kristiansson E, Ryberg M, Hallenberg N, Larsson KH (2008) Intraspecific ITS Variability in the Kingdom Fungi as Expressed in the International Sequence Databases and Its Implications for Molecular Species Identification. *Evolutionary Bioinformatics* 4(1): 193-201.
- Nylander JAA (2004) MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University. <http://www.abc.se/~nylander/mrmodeltest2/mrmodeltest2>. (letöltve: 2012)
- O'Brien HE, Parrent JL, Jackson JA, Moncalvo, J (2005) Fungal Community Analysis by Large-Scale Sequencing of Environmental Samples. *Applied and Environmental Microbiology* 71(9): 5544-5550.
- Oliver PM, Lee MSY (2010) The botanical and zoological codes impede biodiversity research by discouraging publication of unnamed new species. *Taxon* 59 (4): 1201–1205.
- Olivier JM, Savignac JC, Sourzat P (2012) Truffe et trufficulture. Éditions Falanc, Périgueux, 1996, 2002, 2012 ISBN: 2865771806

- Omar MB, Bolland L, Heather WA (1979) P.V.A. (polyvinyl alcohol). A permanent mounting medium for fungi. *Bulletin of British Mycological Society* 13(1): 31–32.
- Orczán ÁIK, Turunen O, Merényi Zs, Rudnóy Sz, Bratek Z, Shamekh S (2010) *Tuber foetidum* found in Finland. *Mycotaxon* 114(7): 127-133.
- Orczán ÁIK, Merényi Zs, Varga T, Bratek Z (2012): A *Tuber regianum* első hazai előfordulása. V. Magyar Mikológiai Konferencia absztraktkötete. Budapest, 2012. 05. 23-25. Mikológiai Közlemények, Clusiana 51(1): 20-21
- Orihara T, Smith ME, Shimomura N, Iwase K, Maekawa N (2012) Diversity and systematics of the sequestrate genus *Octaviania* in Japan: two new subgenera and eleven new species. *Persoonia* 28(1): 85–112.
- Orive E, Pérez-Aicua L, David H, García-Etxebarria K, Laza-Martínez A, *et al.* (2013) The genus *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) in a temperate estuary with description of two new species: *Pseudo-nitzschia plurisecta* sp. nov. and *Pseudo-nitzschia abrensis* sp. nov. *Journal of Phycology* 49(6): 1192–1206.
- Osmundson TW, Robert VA, Schoch CL, Baker LJ, Smith A, Robich G, *et al.* (2013) Filling gaps in biodiversity knowledge for macrofungi: contributions and assessment of an herbarium collection DNA barcode sequencing project. *PloS One* 8(4): e62419.
- Ouanphanivanh N, Merényi Zs, Orczán ÁIK, Bratek Z, Szigeti Z (2008) Could orchids indicate truffle habitats? Mycorrhizal association between orchids and truffles. *Acta Biologica Szegediensis* 52(1): 229–232.
- Padial JM, Miralles A, De la Riva I, Vences M (2010). The integrative future of taxonomy *Frontiers in Zoology*, 7(1):16.
- Padovan ACB, Sanson GFO, Brunstein A, Briones MRS (2005) Fungi evolution revisited: application of the penalized likelihood method to a Bayesian fungal phylogeny provides a new perspective on phylogenetic relationships and divergence dates of Ascomycota groups. *Journal of Molecular Evolution* 60(6): 726–735.
- Palmé AE, Vendramin GG (2002) Chloroplast DNA variation, postglacial recolonization and hybridization in hazel, *Corylus avellana*. *Molecular Ecology* 11(1): 1769–1779.
- Pázmány D (1990/1991) *Conspectus fungorum hypogaeorum Transsilvaniae, Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 20-21:23-36.

- Petit RJ, Csaikl UM, Bordács S *et al.* (2002a) Chloroplast DNA variation in European white oaks: Phylogeography and patterns of diversity based on data from over 2600 populations. *Forest Ecology and Management* 156(1): 5–26.
- Petit J, Brewer S, R. Bordács S *et al.* (2002b) Identification of refugia and post-glacial colonisation routes of European white oaks based on chloroplast DNA and fossil pollen evidence. *Forest Ecology and Management* 156(1): 49–74.
- Petit RJ, Aguinagalde I, de Beaulieu JL *et al.* (2003) Glacial refugia: hotspots but not melting pots of genetic diversity. *Science* 300: 1563–1565.
- Pevsner J (2009) *Bioinformatics and Functional Genomics*. Wiley-Blackwell. pp. 992. ISBN: 978-0-470-08585-1
- Phillips SJ, Anderson RP, Schapire RE (2006) Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling* 190(1): 231–259.
- Piattoni F, Ori F, Morara M, Iotti M, Zambonelli A (2013) The role of wild boars in spore dispersal of hypogeous fungi. *Acta Mycologica* 48(1): 145-153.
- Pomarico M, Figliuolo G, Rana GL (2007) *Tuber* spp. biodiversity in one of the southernmost European distribution areas. *Biodiversity and Conservation* 16(1): 3447–3461.
- Posada D (2008) jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25(1): 1253 – 1256.
- Posada D (2011) Collapse: Describing Haplotypes from Sequence Alignments. Version 1.2. Website last modified on May 28, 2011. <http://darwin.uvigo.es/software/collapse.html> (letöltve 2011.08.11)
- Prieto M, Wedin M. (2013) Dating the diversification of the major lineages of Ascomycota (Fungi). *PloS One*, 8(6): e65576.
- Pringle A, Adams RI, Cross HB, Bruns TD (2009) The ectomycorrhizal fungus *Amanita phalloides* was introduced and is expanding its range on the west coast of North America. *Molecular Ecology* 18(5): 817–833.
- Puillandre N, Lambert A, Brouillet S, Achaz G (2012) ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology* 21(8): 1864–1877.
- R Core Team (2014) R: A Language and Environment for Statistical Computing. In R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. <http://www.R-project.org>

- Rambaut A (2009) FigTree v1.3.1: Tree Figure Drawing Tool.
<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/> (letöltve: 2012).
- Rambaut A, Drummond AJ (2009) Tracer. Version 1.5. <http://beast.bio.ed.ac.uk>.
- Renowden G (2005) The truffle book. Amberley, New Zealand: Limestone Hills Publishing. pp. 148 ISBN: 9780473102418
- Reynolds D, Taylor J (1991) DNA specimens and the 'International code of botanical nomenclature'. *Taxon* 40(1): 311-315.
- Reynolds HT (2011) Systematics, Phylogeography and Ecology of Elaphomycetaceae. PhD thesis (Duke University)
- Rimóczi I, Siller I, Vasas G, Albert L, Vetter J, Bratek Z (1999) Magyarország nagygombáinak javasolt vörös listája. – *Mikológiai Közlemények, Clusiana* 38(1–3): 107–132.
- RiOUSset L, RiOUSset G, Chevalier G, Bardet MC (2001) Truffles d'Europe et de Chine. INRA, Paris. pp. 181. ISBN:8-7380-0932-8
- Rubini A, Paolocci F, Riccioni C, Vendramin GG, Arcioni S (2005) Genetic and Phylogeographic Structures of the Symbiotic Fungus *Tuber magnatum* Applied and Environmental Microbiology 71(11): 6584-6589.
- Rubio E, Miranda MA, Linde J, Suárez Á, García F, Juste P (2006) Catálogo provisional de hongos hipogeos de Asturias y posibles fitobiontes asociados. *Revista Catalana de Micologia* 28(1): 1-40.
- Sáez AG, Probert I, Geisen M, Quinn P, Young JR, Medlin LK (2003) Pseudo-cryptic speciation in coccolithophores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(12): 7163–7168.
- Sáez AG, Lozano E (2005) Body doubles. *Nature* 433(7022): 111.
- Salemi E, Iotti M, Leonardi P, Gardin L, D'Aguanno M, Perini C, *et al.* (2014) Effects of soil tillage on *Tuber magnatum* development in natural truffières. *Mycorrhiza* (24):79-87.
- Sanderson MJ (1997) A nonparametric approach to estimating divergence times in the absence of rate constancy. *Molecular Biology and Evolution* 14(1): 1218–1231.
- Schlick-Steiner BC, Steiner FM, Seifert B, Stauffer C, Christian E, Crozier RH (2010) Integrative taxonomy: a multisource approach to exploring biodiversity. *Annual Review of Entomology* 55(1): 421–438.

- Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, *et al.* (2012) Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(16): 6241–6246.
- Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, *et al.* (2003) Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research* 13(11): 2498-2504.
- Shavit E (2014) The History of Desert Truffle Use In: Kagan-Zur V, Roth-Bejerano N, Sitrit Y, Morte A (Eds.) *Desert Truffles Phylogeny, Physiology, Distribution and Domestication*. Springer Heidelberg New York Dordrecht London. pp. 97. ISBN 978-3-642-40096-4
- Shaw AJ (2001) Biogeographic patterns and cryptic speciation in bryophytes, *Journal of Biogeography* 28(1): 253–261.
- Sheedy EM, Van de Wouw AP, Howlett BJ, May TW (2013) Multigene sequence data reveal morphologically cryptic phylogenetic species within the genus *Laccaria* in southern Australia. *Mycologia* 105(1): 547–563.
- Sica M, Gaudio L, Aceto S (2007) Genetic structure of *Tuber mesentericum* Vitt. based on polymorphisms at the ribosomal DNA ITS. *Mycorrhiza* 17: 405–414.
- Siller I, Vasas G, Pál-Fám F, Bratek Z, Zagyva I, Fodor L (2005) Hungarian distribution of the legally protected macrofungi species. *Studia Botanica Hungarica* 36(1): 131–163.
- Silvestro D, Michalak I (2011) raxmlGUI: a graphical front-end for RAxML. *Organisms Diversity & Evolution* 12: 335–337.
- Simon T (2000) Magyarország edényes flóra határozója. Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest. pp. 848 ISBN:9789631953091
- Sites JW, Marshall JC (2003) Delimiting species: a Renaissance issue in systematic biology. *Trends in Ecology & Evolution*, 18(9): 462–470.
- Slatkin M, Hudson RR (1991) Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics* 129(1): 555–562.
- Smith ME, Trappe JM, Rizzo DM (2006) *Genea*, *Genabea* and *Gilkeya* gen. nov.: ascomata and ectomycorrhiza formation in a *Quercus* woodland. *Mycologia*, 98(5): 699–716.

- Smith SE, Read D (2008) Mycorrhizal Symbiosis. Elsevier, London. Sorensen pp. 787 ISBN: 978-0-1237-0526-6
- Soó R (1981) Magyar flóra és vegetáció rendszertani-növényföldrajzi kézikönyve VI. pp. 589. Akadémiai Kiadó, Budapest.
- Sourzat P (2011) Black truffle cultivation and competing fungi. In: Savoie JM, Foulongne-Oriol M, Largeteau M, Barroso G, (Eds.) Proceedings of the 7th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products. Arcachon, France, 4-7. October. 2011. pp. 516–528.
- Stamets P (1993) Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms. Ten Speed Press Berkeley pp. 554. ISBN: 0-89815-608-4
- States J *et al.* (*in prep*) The genus *Gautieria* (Gautieriaceae): Perspectives in biology and systematics with an emphasis on new species of western North America.
- Steele PR, Pires JC (2011) Biodiversity assessment: state-of-the-art techniques in phylogenomics and species identification. *American Journal of Botany* 98(3): 415–425.
- Stielow B, Bubner B, Hensel G, Münzenberger B, Hoffmann P, Klenk HP, Göker M (2010) The neglected hypogeous fungus *Hydnotrya bailii* Soehner (1959) is a widespread sister taxon of *Hydnotrya tulasnei* (Berk.) Berk. & Broome (1846). *Mycological Progress* 9(2): 195–203.
- Stielow B, Bratek Z, Orczán AKI, Rudnóy S, Hensel G, Hoffmann P, Klenk HP, Göker M (2011) Species delimitation in taxonomically difficult fungi: the case of *Hymenogaster*. *PloS ONE* 6:e15614.
- Swofford DL (2003) PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts
- Szemere L (1970) Föld alatti gombavilág. Második kiadás, Első Magyar Szarvasgombász Egyesület, Budapest 2005. ISBN: 963218873X
- Szemere L (1965) Die unterirdische pilze des Karpatenbeckens. Akadémiai Kiadó, Budapest.
- Szurdoki E, Márton O, Szövényi P (2014) Genetic and morphological diversity of *Sphagnum angustifolium*, *S. flexuosum* and *S. fallax* in Europe. *Taxon* 63(2): 237-248.
- Taberlet P, Fumagalli L, Wust-Saucy AG, Cosson JF (1998) Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology* 7(1): 453–464.

- Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123:585-595.
- Takács A, Lovass-Kiss Á, Ljubka T, Lisztes SZ, Molnár VA (2014) A Debreceni Egyetem Herbáriumának digitalizálása és adatfeltárása. In Schmidt D, Kovács M, Bartha D (Eds.) X. Aktuális Flóra- és Vegetációkutatás a Kárpát-medencében nemzetközi konferencia absztraktkötete. ISBN:978-963-334-153-7 A Nyugat-magyarországi Egyetem Kiadó, Sopron, pp. 180-181.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA 5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28(1): 2731–2739.
- Taylor JW, Jacobson DJ, Kroken S, Kasuga T, Geiser DM, Hibbett DS, Fisher MC (2000) Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genetics and Biology* 31(1): 21–32.
- Taylor AFS (2006): Common mycelial networks: life-lines and radical addictions. *New Phytologist* (2006) 169(1): 6-8.
- Tedersoo L, Hansen K, Perry BA, Kjøller R (2006) Molecular and morphological diversity of pezizalean ectomycorrhiza. *The New Phytologist* 170(3): 581–596.
- Tedersoo L, May TW, Smith ME (2010) Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. *Mycorrhiza* 20(4): 217–63.
- Thiers HD (1984) The secotioid syndrome. *Mycologia* 76(1): 1–8.
- Trappe JM, Castellano M, Claridge A (2001): Continental drift, climate, mycophagy and the biogeography of the hypogeous fungi. In: Fédération Française des Trufficulteurs. Actes du Ve Congrès International Science et Culture de la Truffe, 4–6 March 1999. Aix-en-Provence, France, pp. 4.241-245.
- Trappe, J.M, Claridge, A. W. (2005) Hypogeous Fungi: Evolution of reproductive and Dispersal Strategies through interactions with animals and mycorrhizal plants. In: Dighton J, James F, White Jr, White J, Oudemans P (Eds.) *The Fungal Community: Its Organization and Role in the Ecosystem*, Third Edition pp. 613-623. ISBN: 0824723554
- Trappe M. J, Claridge W. A. (2010): The hidden life of truffles. *Scientific American* (april): 78-84.

- Türkoglu A, Castellano MA (2013) New records of truffle fungi (Basidiomycetes) from Turkey. Turkish Journal of Botany 37(1): 970–976.
- Türkoglu A, Castellano MA (2014) New records of some Ascomycete truffle fungi from Turkey. Turkish Journal of Botany 38(1): 406–416.
- Urban A (2008) Truffles and truffle cultivation in Austria. In: Reynal B. (Ed.) La culture de la truffe dans le monde. Actes du Colloque, Brive-la-Gaillarde. 2. Février 2007, pp 19-34.
- Urban A (2010) Proceedings of the First Conference on the “European” Truffle *Tuber aestivum/uncinatum*. Austrian Journal of Mycology 19
- Urban A, Stielow B, Orczán AKI, Varga T, Tamaskó G, Bratek Z (2013) High phylogenetic diversity in the *Tuber excavatum* group. First International Congress of Trufficulture. Teruel, Spain. 5-8. 03. 2013. In Abstract Book: p. 73.
- Van de Putte K, Nuytinck J, Stubbe D, Le HT, Verbeken A (2010) *Lactarius volemus* sensu lato (Russulales) from northern Thailand: morphological and phylogenetic species concepts explored. Fungal Diversity 45(1): 99–130.
- Varga T, Hegyessy G, Merényi Zs, Szegedi Zs, Bratek Z (2013): Föld alatti gombák Magyarország tájain I. Tokaj-Zempléni-Hegyvidék. Mikológiai Közlemények, Clusiana 47(2): 223-230.
- Venables WN, Ripley BD (2002) Modern Applied Statistics with S. Springer, New York. pp. 498. ISBN 978-0-387-21706-2
- Verbruggen H, De Clerck O, Cocquyt E, Kooistra WHCF, Coppejans E (2005a). Morphometric Taxonomy of Siphonous Green Algae: a Methodological Study Within the Genus *Halimeda* (Bryopsidales). Journal of Phycology, 41(1): 126–139.
- Verbruggen H, De Clerck O, Kooistra WHCF, Coppejans E (2005b) Molecular and Morphometric Data Pinpoint Species Boundaries in *Halimeda* Section *Rhipsalis* (Bryopsidales, Chlorophyta) Journal of Phycology 41(3): 606–621.
- Verbruggen H (2005c) Resegmenting *Halimeda*. Molecular and Morphometric Studies of Species Boundaries Within a Green Algal Genus. PhD Thesis (Ghent University)
- Vilgalys R, Hester M (1990) Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. Journal Bacteriology 172(1): 4238–4246.

- Vita F, Lucarotti V, Alpi E, Balestrini R, Mello A, Bachi A, Massimo A, Alpi A (2013) Proteins from *Tuber magnatum* Pico fruiting bodies naturally grown in different areas of Italy. *Proteome Science* 11(1): 1.
- Vittadini C (1831) *Monographia Tuberacearum*. Milano.
- Wang Y, Tan ZM, Zhang DC, Murat C, Jeandroz S, Le Tacon F (2006) Phylogenetic relationships between *Tuber pseudoexcavatum*, a Chinese truffle, and other *Tuber* species based on parsimony and distance analysis of four different gene sequences. *FEMS Microbiology Letters* 259(1): 269–281.
- Wang Y, Tan ZM, Murat C, Jeandroz S, Le Tacon F (2007) Molecular taxonomy of Chinese truffles belonging to the *Tuber rufum* and *Tuber puberulum* groups. *Fungal Diversity* 24(1): 301–328
- Wedén C, Danell E, Tibell L (2005) Species recognition in the truffle genus *Tuber* - The synonyms *Tuber aestivum* and *Tuber uncinatum*. *Environmental Microbiology* 7(10): 1535–1546.
- Whitbeck KL (2003) Systematics of pacific northwestern species of the genus *Gymnomyces* inferred from nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. PhD thesis (Oregon State University)
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (Eds.) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, New York, pp. 315-322.
- Wiens JJ (2007) Species delimitation: new approaches for discovering diversity. *Systematic Biology* 56(6): 875–878.
- Wiley EO (1978) The evolutionary species concept reconsidered. *Systematic Zoology* 27: 17-26.
- Zambonelli A, Bonito GM (2012) *Edible Ectomycorrhizal Mushrooms*. Springer, Berlin, pp. 163–189. ISBN 978-3-642-33823-6
- Zampieri E, Guzzo F, Commisso M, Mello A, Bonfante P, Balestrini R (2014) Gene expression and metabolite changes during *Tuber magnatum* fruiting body storage. *Current Genetics* (2008).

Zhang BC (1991) Taxonomic status of *Genabea*, with two new species of *Genea* (Pezizales).
Mycological Research 95(8): 986–994.

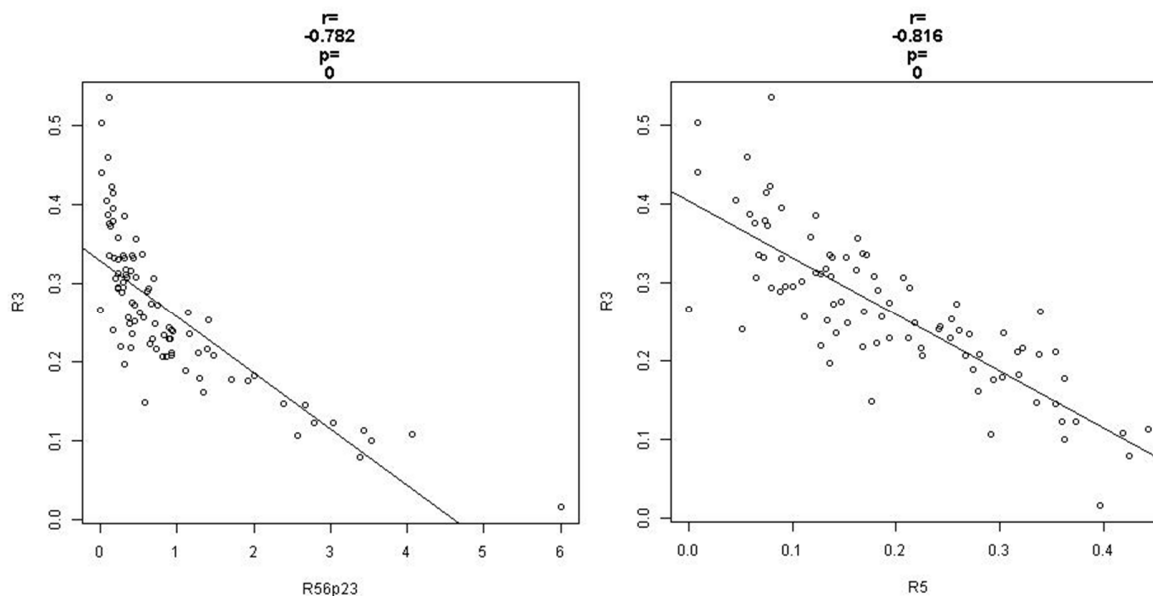
Zuckerlandl E, Pauling L (1965) Molecules as documents of evolutionary history. *Journal of Theoretical Biology* 8(1): 357–366.

11. Mellékletek

1. melléklet: A talajváltozók közötti korreláció. Az egyes cellákban a a pearson féle korrelációs együttható lett feltüntetve.

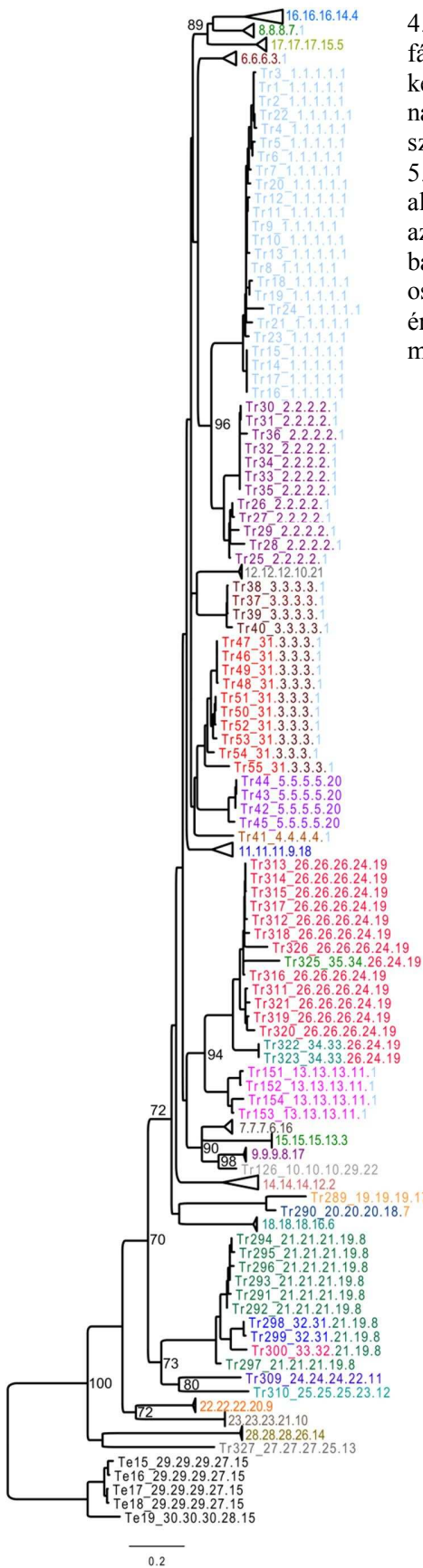
	PHKCL	CACO3	NO3NO2N	K2O	P2O5	MG	MN	NA.	CU	ZN
CACO3	0,545									
NO3NO2N	-0,191	0,103								
K2O	0,171	-0,144	-0,274							
P2O5	0,24	-0,034	-0,191	0,328						
MG	-0,434	-0,182	0,054	-0,022	0,024					
MN	-0,279	-0,398	-0,167	0,451	-0,015	0,11				
NA.	-0,199	-0,091	-0,242	-0,268	-0,035	0,34	-0,155			
CU	-0,301	-0,23	0,425	-0,348	-0,222	0,283	-0,233	0,254		
ZN	0,055	-0,199	0,021	0,631	0,164	0,125	0,404	-0,261	0,038	
SO4S	-0,247	-0,225	-0,184	0,206	0,151	0,642	0,254	0,468	0,012	0,314

2. melléklet: Példák az egyes spóra eloszlásból származtatott karakterek közötti erős korrelációra. Az r érték a pearson féle korrelációs együttható, míg a p érték az erre vonatkozó statisztikát jelöli.

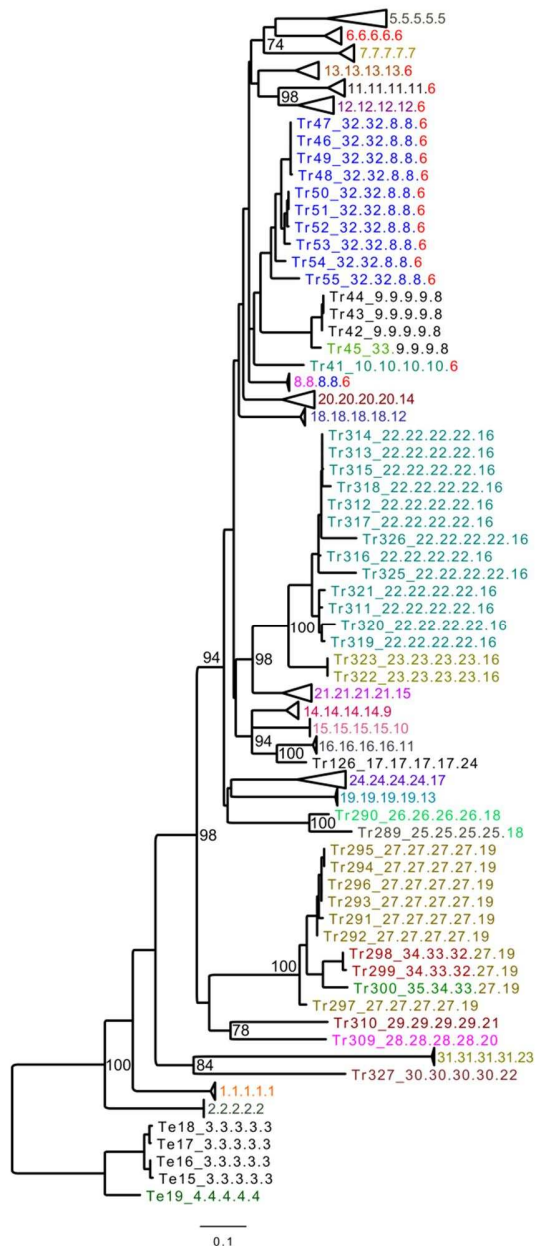


3. melléklet Az adatbázisban szereplő, aszkuszos és bazídiumos hipogea nemzetségek molekuláris taxonómiai feldolgozottsága. Alul a valódi szarvasgombák fajcsoport szintű bontásban lettek részletezve. A GenBank szekvencia: az összes GenBank-on keresztül elérhető szekvencia a nemzetség nevével keresve. Az GenBank "ITS": a címben 5.8S, ITS1, ITS2, ITS, *internal* szavakra keresés eredményei. A hipogea adatbázisból származó oszlop azt jelöli, hogy az adott nemzetség/fajcsoport revíziójában hol szerepel nagyobb mennyiségű hazai, adatbázisból származó anyag. Zárójelben a publikációban nem szereplő, de szekvenált mennyiség szerepel. A Referenciák oszlopban csak azok a publikációk szerepelnek, melyek az adott nemzetségre nézve a szekvenciák legnagyobb részét feltöltötték.

Nemzetség	Előfordulási adat a hipogea adatbázisban	GenBank szekvencia	GenBank "ITS"	Hipogea adatbázisból származók	Hazai vizsgálat	Referencia
<i>Sclerogaster</i>	15	22	0			publikálatlan
<i>Gastrosporium</i>	7	2	1		elkezdődött	
<i>Stephensia</i>	82	10	1			
<i>Arcangiella</i>	11	21	14		elkezdődött	
<i>Balsamia</i>	77	22	10			Bonito <i>et al.</i> 2013
<i>Elaphomyces</i>	288	39	27			Reynolds, 2011
<i>Zelleromyces</i>	10	16	12		elkezdődött	
<i>Elasmomyces</i>	15	0	0			
<i>Gautieria</i>	59	125	72	51		States <i>et al.</i> in prep.
<i>Choiromyces</i>	91	44	21			Bonito <i>et al.</i> 2013
<i>Genea</i>	282	154	71	30	jelen munka	Alvarado <i>et al.</i> 2014
<i>Hydnotrya</i>	30	68	58			Stielow <i>et al.</i> 2010
<i>Hymenogaster</i>	487	232	221	68(32)		Stielow <i>et al.</i> 2011
<i>Hysterangium</i>	54	339	33	(19)		Hosaka <i>et al.</i> 2008
<i>Leucogaster</i>	2	18	17			publikálatlan
<i>Melanogaster</i>	204	59	45	22	elkezdődött	Halász, 2008
<i>Octavianina</i>	41	160	54			Orihara <i>et al.</i> 2012
<i>Wakefieldia</i>	2	1	1			
<i>Rhizopogon</i>	60	1052	784			Grubisha <i>et al.</i> 2002
<i>Phlyctospora</i>	17	0	0			
<i>Hydnobolites</i>	21	53	39			Healy <i>et al.</i> 2013
<i>Mattiolomyces</i>	46	34	21	5		Kovács & Trappe 2014
<i>Pachyphloeus</i>	99	11	9	68	elkezdődött	Benjamin Stielow
<i>Tuber</i>	2487	4498	2118			
Puberulum	108			12(30)	folytatódik	Halász <i>et al.</i> 2005
Maculatum	101			18(35)	folytatódik	Halász <i>et al.</i> 2005
Macrosporium	150			32	elkezdődött	
Excavatum	512			36	elkezdődött	Urban <i>et al.</i> 2013
Aestivum	686			6		Wedén <i>et al.</i> 2005; Molinier <i>et al.</i> 2013; Sica <i>et al.</i> 2007
Melanosporium	369			106	jelen munka	Chen <i>et al.</i> 2011; Merényi <i>et al.</i> 2014
Regianum	9			9	jelen munka	
Rufum	506			(78)	elkezdődött	Bonito <i>et al.</i> 2010



4. Melléklet: A Rufum-fajcsoportról készült ITS alapú ML filogenetikai fák. A bal oldali fa a MAFFT, míg a jobb oldali a PRANK illesztéssel készült adatsoron alapul. Az elágazásokban feltüntetett számok a 70%-nál nagyobb ML *bootstrap* értéket jelölik. A „Tr”-el kódolt rufum szekvenciák azonosítóit, és az egyenként nem megjelenített mintákat is az 5. melléklet tartalmazza. Összevont (*collapsed*) megjelenítést csak akkor alkalmaztunk ha az adott klád minden tagja ugyanabba a csoportba került, az összes osztályozással. A számok az egyes csoportosításokat jelölik balról jobbra a legnagyobbtól a legkisebb számú csoportot létrehozó osztályozásig, melyet a színezés is követ a könnyebb átláthatóság érdekében. Mindkét esetben a „Te” kódok az Excavatum-fajcsoport belső mintákat jelölik, melyek itt kulcsorként szolgáltak.



5. Melléklet: A különböző elemzésekhez felhasznált minták kódjainak feloldása. A kód mellett, ha ismert volt, a fajnév és a szekvenciák GenBank-os azonosító száma látható. Ha a szekvencia még nem érhető el nemzetközi szekvencia adatbázisokban, akkor a herbáriumi száma lett feltüntetve. A kód oszlopban lévő ITS LSU illetve PKC jelzések mind a *T. brumale* aggr. filogenetikai, és MC elemzéseiben használt mintákhoz tartoznak, melyeket nem szerepeltettünk az ábrákon, vagy a Molekuláris óra elemzéshez használtunk fel (csillaggal megjelölve). Rövidítés: uc: *uncultured* (ismeretlen eredetű, pl. környezeti mintavételből származó minta)

kód	faj	Herbáriumi szám / Accession number	kód	faj	herb. / Accession szám
pan17	<i>Tuber panniferum</i>	HM485380	Tr118		TR96-tr17
mag19	<i>Tuber magnatum</i>	HM485374	Tr119	uc <i>Tuber</i>	JX625378
mag53	<i>Tuber magnatum</i>	JQ925646	Tr120	<i>T. rufum</i> f. <i>lucidum</i>	FM205665
mag54	<i>Tuber magnatum</i>	JQ925645	Tr121	<i>T. rufum</i>	DQ329375
mas20	<i>Tuber macrosporum</i>	HM485373	Tr122	<i>T. melosporum</i>	JN392144
can63	<i>Tuber</i> sp75	AB553356	Tr123	<i>T. melosporum</i>	JN392145
can64	<i>Tuber</i> sp74	AB553344	Tr124	<i>T. melosporum</i>	JX402095
cho33	<i>Choiromyces alveolatus</i>	HM485332	Tr125		JMV20000618-1
exc23	<i>Tuber fulgens</i>	HM485358	Tr126		JMV20040626
exc24	<i>Tuber excavatum</i>	HM485355	Tr127	<i>T. umbilicatum</i>	FJ797879
exc73	<i>Tuber excavatum</i>	FJ748899	Tr128	<i>T. umbilicatum</i>	FJ797880
gen21	<i>Tuber lacunosum</i>	HM485361	Tr129	<i>T. umbilicatum</i>	GU979031
gen22	<i>Tuber gennadii</i>	HM485360	Tr130	uc <i>Tuber</i>	FJ803953
gib37	<i>Tuber oregonense</i>	FJ809878	Tr131	<i>T. taiyuanense</i>	GU979033
gib38	<i>Tuber oregonense</i>	FJ809874	Tr132	<i>T. umbilicatum</i>	GU979032
gib39	<i>Tuber gibbosum</i>	FJ809868	Tr133	uc <i>Tuber</i>	GQ985432
gib40	<i>Tuber gibbosum</i>	FJ809862	Tr134	uc <i>Tuber</i>	HM105508
gib41	<i>Tuber castellanoi</i>	FJ809860	Tr135	uc <i>Tuber</i>	JQ318618
gib42	<i>Tuber castellanoi</i>	FJ809859	Tr136	uc <i>Tuber</i>	JF748109
gib43	<i>Tuber bellisporum</i>	FJ809856	Tr137	<i>T. rufum</i>	FN433158
gib44	<i>Tuber bellisporum</i>	FJ809855	Tr138	<i>T. rufum</i>	JQ288918
gib52	<i>Tuber oregonense</i>	JQ925647	Tr139	<i>T. rufum</i>	JQ288919
jap61	<i>Tuber</i> sp78	AB553446	Tr140	<i>T. rufum</i>	JQ288920
jap62	<i>Tuber</i> sp77	AB553434	Tr141	<i>T. malacodermum</i>	1326BP
lab31	<i>Reddellomyces</i> sp5	HM485337	Tr142	<i>T. rufum</i>	ZB2902
lab32	<i>Reddellomyces</i> sp2	HM485336	Tr143	<i>T. nitidum</i>	ZB3575
lab56	<i>Reddellomyces</i> sp1	JQ925641	Tr144	<i>T. nitidum</i>	ZB3323
mac10	<i>Tuber</i> sp47	HM485416	Tr145	<i>T. rufum</i>	ZB1598
mac11	<i>Tuber miquihuanense</i>	HM485414	Tr146	<i>T. nitidum</i>	ZB3356

mac12	<i>Tuber mexiusanum</i>	HM485411	Tr147	<i>T. nitidum</i>	ZB3579
mac13	<i>Tuber beyeleri</i>	HM485408	Tr148	<i>T. nitidum</i>	ZB3914
mel7	<i>Tuber brumale</i>	FJ748900	Tr149	<i>T. nitidum</i>	ZB3394
mel16	<i>Tuber pseudoexcavatum</i>	HM485381	Tr150	<i>T. rufum</i>	ZB1227
mel27	<i>Tuber brumale</i>	HM485345	Tr151	<i>T. quercicola</i>	AY918957
mel47	<i>Tuber regimontanum</i>	EU375838	Tr152	<i>T. quercicola</i>	JN022528
mel65	<i>Tuber</i> sp13	GQ221451	Tr153	uc <i>Tuber</i>	JQ393153
mel68	<i>Tuber indicum</i> A	FJ748908	Tr154	uc <i>Tuber</i>	GQ221645
mel69	<i>Tuber indicum</i> B	FJ748907	Tr156	uc <i>Tuber</i>	FJ748912
mel70	<i>Tuber indicum</i> A	FJ748906	Tr157	<i>T. sp.</i> 61 GB-2010	HM485424
mel71	<i>Tuber melanosporum</i>	FJ748904	Tr158	<i>T. sp.</i> 60 GB-2010	HM485422
mel72	<i>Tuber indicum</i> B	FJ748902	Tr159	<i>T. sp.</i> 60 GB-2010	HM485423
mul18	<i>Tuber multimaiculatum</i>	HM485377	Tr160	<i>T. sp.</i> 60	JQ925653
pub8	<i>Tuber borchii</i>	FJ809852	Tr161	<i>T. sp.</i> 60	JQ925652
pub9	<i>Tuber</i> sp70	HM485429	Tr162	<i>T. sp.</i> 12 GB-2010	GQ221452
pub14	<i>Tuber</i> sp38	HM485407	Tr163	<i>T. sp.</i> 80	JQ925651
pub15	<i>Tuber</i> sp33	HM485402	Tr164	<i>T. malacodermum</i>	FJ809889
pub25	<i>Tuber dryophilum</i>	HM485354	Tr165	<i>T. rufum</i>	FM205615
pub26	<i>Tuber californicum</i>	HM485346	Tr166		ZI5/2
pub28	<i>Tuber borchii</i>	HM485344	Tr167		JMV20020202-3
pub29	<i>Tuber anniae</i>	HM485339	Tr168	<i>T. sp.</i> NZT0302	AM900439
pub30	<i>Tuber anniae</i>	HM485338	Tr169	uc <i>Tuber</i>	AY634169
pub45	<i>Tuber sphaerosporum</i>	FJ809854	Tr170	<i>T. sp.</i> 57	JQ925650
pub46	<i>Tuber sphaerosporum</i>	FJ809853	Tr171	uc <i>Tuber</i>	GU990353
pub55	<i>Tuber dryophilum</i>	JQ925644	Tr172	<i>T. rufum</i>	AY940646
pub57	EcM on <i>Nothofagus alpina</i>	JQ925640	Tr173	uc <i>Tuber</i>	FJ748909
pub58	EcM on <i>Salix humboldtiana</i>	JQ925632	Tr174	<i>T. sp.</i> 57 GB-2010	HM485420
pub59	EcM on <i>Salix humboldtiana</i>	JQ925631	Tr175	<i>T. sp.</i> 57 GB-2010	HM485421
pub60	<i>Tuber</i> sp14	AB553464	Tr176	<i>T. rufum</i>	ZB1644
pub66	<i>Tuber shearii</i>	GQ221450	Tr177	<i>T. ferrugineum</i>	ZB3358
reg1	<i>Tuber regianum</i> A	M43	Tr178	<i>T. rufum</i>	ZB3184
reg2	<i>Tuber regianum</i> A	ZB3081	Tr179	<i>T. rufum</i>	ZB1650
spn3	<i>Tuber sp. nov.</i> B	ZB4559	Tr180	<i>T. rufum</i>	ZB1383
spn4	<i>Tuber sp. nov.</i> B	ZB4293	Tr181		ZI5per1
ber5	<i>Tuber bernardinii</i> C	M23	Tr182	<i>T. rufum</i> var. <i>apiculatum</i>	ZB3366
ber6	<i>Tuber bernardinii</i> C	M45	Tr183	<i>T. ferrugineum</i>	ZB3363
ruf34	<i>Tuber malacodermum</i>	FJ809889	Tr184	<i>T. rufum</i>	ZB1716
ruf35	<i>Tuber nitidum</i>	FJ809885	Tr185	uc <i>Tuber</i>	HM370453
ruf36	<i>Tuber spinoreticulatum</i>	FJ809884	Tr186	uc <i>Tuber</i>	HM370490
ruf48	<i>Tuber</i> sp60	JQ925653	Tr187	uc <i>Tuber</i>	JX135044

ruf49	<i>Tuber</i> sp57	JQ925650	Tr188	uc <i>Tuber</i>	FJ846623
ruf50	<i>Tuber</i> sp79	JQ925649	Tr189	uc <i>Tuber</i>	AY634153
ruf51	<i>Tuber</i> sp65	JQ925648	Tr190		ZI37
ruf67	<i>Tuber lyonii</i>	FJ748910	Tr191	<i>T. rufum</i>	ZB3262
M45	<i>T. bernardinii</i>	M45	Tr192	<i>T. apiculatum</i>	ZB3381
4293	<i>T. sp. nov.</i>	ZB4293	Tr193	<i>T. rufum</i>	ZB1656
4559	<i>T. sp. nov.</i>	ZB4559	Tr194	<i>T. rufum</i>	ZB2959
4749Truf	<i>T. rufum</i>	ZB4749	Tr195	<i>T. ferrugineum</i>	ZB3350
1ru	<i>T. rufum</i>	DQ336336	Tr196	<i>T. rufum</i>	ZB3383
2br	<i>T. brumale</i>	KF581131	Tr197	<i>T. rufum</i>	FM205608
3br	<i>T. brumale</i>	KF581110	Tr198	<i>T. rufum</i> f. <i>ferrugineum</i>	FM205674
4br	<i>T. brumale</i>	KF581126	Tr199	<i>T. rufum</i>	FM205609
5br	<i>T. brumale</i>	KF581121	Tr200	<i>T. rufum</i> f. <i>nitidum</i>	FM205670
6br	<i>T. brumale</i>	KF581119	Tr201	<i>T. rufum</i> var. <i>rufum</i>	FN433163
7br	<i>T. brumale</i>	KF581117	Tr202	<i>T. rufum</i> var. <i>rufum</i>	FN433164
8br	<i>T. brumale</i>	DQ336324	Tr203	<i>T. rufum</i> var. <i>rufum</i>	FN433168
9br	<i>T. brumale</i>	DQ336323	Tr204	<i>T. rufum</i> f. <i>lucidum</i>	FM205675
10br	<i>T. brumale</i>	KF581113	Tr205	<i>T. rufum</i> f. <i>rufum</i>	FM205673
11br	<i>T. brumale</i>	KF581129	Tr206	<i>T. rufum</i> var. <i>apiculatum</i>	FM205669
12br	<i>T. brumale</i>	KF581112	Tr207		JMV20021012-1
13br	<i>T. brumale</i>	KF581111	Tr208	<i>T. rufum</i>	ZB3279
14br	<i>T. brumale</i>	KF581125	Tr209	<i>T. rufum</i>	ZB3280
15br	<i>T. brumale</i>	KF581124	Tr210		TR88-tr25
16br	<i>T. brumale</i>	KF581128	Tr211	<i>T. rufum</i>	EU784432
17br	<i>T. brumale</i>	KF581130	Tr212	uc <i>Tuber</i>	DQ355253
18br	<i>T. brumale</i>	KF581123	Tr213		ZI25
19br	<i>T. brumale</i>	KF581115	Tr214	<i>T. rufum</i>	ZB1219
20br	<i>T. brumale</i>	KF581114	Tr215	<i>T. rufum</i>	ZB4291/2
21pse	<i>T. pseudoexcavatum</i>	DQ336335	Tr216	<i>T. rufum</i>	ZB4298/2
22pse	<i>T. pseudoexcavatum</i>	DQ336334	Tr217	<i>T. rufum</i>	ZB1222
23in	<i>T. indicum</i>	DQ336333	Tr218	<i>T. rufum</i>	ZB1898
24in	<i>T. indicum</i>	DQ336330	Tr219	<i>T. rufum</i>	ZB3261
25in	<i>T. indicum</i>	DQ336332	Tr220	<i>T. rufum</i>	ZB1381
26in	<i>T. indicum</i>	DQ336331	Tr221	<i>T. rufum</i>	ZB167
27in	<i>T. indicum</i>	DQ336329	Tr222	<i>T. rufum</i>	EF362475
28in	<i>T. indicum</i>	DQ336327	Tr223	uc <i>Tuber</i>	GU327387
29in	<i>T. indicum</i>	DQ336328	Tr224	uc <i>Tuber</i>	HM146884
30ex	<i>T. excavatum</i>	DQ336326	Tr225	<i>T. rufum</i>	ZB1231
31ex	<i>T. excavatum</i>	DQ336325	Tr226	<i>T. rufum</i> f. <i>rufum</i>	FM205672
32bor	<i>T. borchii</i>	FJ594273	Tr227	<i>T. rufum</i>	FM205690
33bor	<i>T. borchii</i>	FJ594269	Tr228	<i>T. rufum</i>	FM205682

34bor	<i>T. borchii</i>	FJ594265	Tr229	uc <i>Tuber</i>	HE687182
35bor	<i>T. borchii</i>	FJ594264	Tr230	<i>T. rufum</i> f. <i>nitidum</i>	FM205610
36bor	<i>T. borchii</i>	FJ594259	Tr231	<i>T. rufum</i>	FM205611
37bor	<i>T. borchii</i>	FJ594258	Tr232	<i>T. rufum</i>	JF926123
38bor	<i>T. borchii</i>	FJ594257	Tr233	<i>T. rufum</i>	AY112894
39bor	<i>T. borchii</i>	FJ594256	Tr234		ZB4316
40bor	<i>T. borchii</i>	FJ594255	Tr235	uc <i>Tuber</i>	JX474855
41bor	<i>T. borchii</i>	FJ594254	Tr236	uc <i>Tuber</i>	JX474853
42bor	<i>T. borchii</i>	FJ594253	Tr237		Ludvari
43bor	<i>T. borchii</i>	FJ594252	Tr238	<i>T. rufum</i>	EU784431
44bor	<i>T. borchii</i>	FJ594251	Tr239	<i>T. rufum</i>	ZB226
45bor	<i>T. borchii</i>	FJ594250	Tr240	<i>T. rufum</i> f. <i>ferrugineum</i>	FN433160
46bor	<i>T. borchii</i>	FJ594276	Tr241	<i>T. rufum</i> var. <i>apiculatum</i>	FM205671
47bor	<i>T. borchii</i>	FJ594275	Tr242	uc <i>Tuber</i>	GU327386
48bor	<i>T. borchii</i>	FJ594274	Tr243	<i>T. rufum</i>	ZB3572
49bor	<i>T. borchii</i>	FJ594272	Tr244	<i>T. rufum</i>	ZB3263
50bor	<i>T. borchii</i>	FJ594271	Tr245	<i>T. rufum</i>	ZB3080
51bor	<i>T. borchii</i>	FJ594270	Tr246	karfiolos	G9/186
52bor	<i>T. borchii</i>	FJ594268	Tr247	<i>T. rufum</i>	ZB1717
53bor	<i>T. borchii</i>	FJ594267	Tr248	<i>T. rufum</i>	ZB3383per3
54bor	<i>T. borchii</i>	FJ594266	Tr249	uc <i>Tuber</i>	FR852057
55bor	<i>T. borchii</i>	FJ594263	Tr250	uc <i>Tuber</i>	GU327385
56bor	<i>T. borchii</i>	FJ594262	Tr251	<i>T. rufum</i>	ZB1081
57bor	<i>T. borchii</i>	FJ594261	Tr252	uc <i>Tuberaceae</i>	HM370487
58bor	<i>T. borchii</i>	FJ594260	Tr253	<i>T. sp.</i> NW1Tsp	KJ524538
59bor	<i>T. borchii</i>	AJ245437	Tr254	<i>T. rufum</i>	ZB3096
60aes	<i>T. aestivum</i>	DQ336322	Tr255		ZB1224
61aes	<i>T. aestivum</i>	DQ336321	Tr256	<i>T. rufum</i>	EF362473
62mag	<i>T. magnatum</i>	AJ245438	Tr257	<i>T. rufum</i>	JF908745
DQ206863	<i>Genea cazaresii</i>	DQ206863	Tr258	<i>T. cf. rufum</i> TG-2008	FM205612
ALV2497	<i>Genea pseudobalsleyi</i>	ALV2497	Tr259	<i>T. cf. rufum</i> TG-2008	FM205613
ALV1382	<i>Genea pinicola</i>	ALV1382	Tr260	<i>T. rufum</i> var. <i>rufum</i>	FN433165
ALV2095	<i>Genea vagans</i>	ALV2095	Tr261	<i>T. rufum</i> var. <i>rufum</i>	FN433167
ALV986	<i>Genea verrucosa</i>	ALV986	Tr262	<i>T. rufum</i> var. <i>rufum</i>	FN433166
ALV0973	<i>Genea compressa</i>	ALV0973	Tr263	<i>T. rufum</i> var. <i>rufum</i>	FN433162
DQ220353	<i>Humaria hemisphaerica</i>	DQ220353	Tr264	<i>T. rufum</i> f. <i>ferrugineum</i>	FM205676
FJ809794	<i>Choiromyces meandriformis</i>	FJ809794	Tr265	uc <i>Tuber</i>	EF644166
ALV1806	<i>Genea sphaerolobulata</i>	ALV1806	Tr266	uc <i>Tuber</i>	HM370491
ALV1199	<i>Genea hispidula</i>	ALV1199	Tr267	<i>T. rufum</i>	ZB1676
DQ206864	<i>Genabea cerebriformis</i>	DQ206864	Tr268	<i>T. rufum</i>	ZB3180

T13007	<i>Genea gardneri</i>	T13007	Tr269	<i>T. rufum</i>	ZB1654
ALV1122	<i>Genea arenaria</i>	ALV1122	Tr270	<i>T. rufum</i>	ZB3289
KC122794	<i>Helvella</i> sp.	KC122794	Tr271		TR92-tr21
ALV2093	<i>Genea fagetii</i>	ALV2093	Tr272	<i>T. rufum</i>	ZB1044
FJ809843	<i>Tuber aestivum</i>	FJ809843	Tr273	<i>T. rufum</i>	ZB67
ALV2414	<i>Genea brachyteca</i>	ALV2414	Tr274		TR87-tr26
DQ470948	<i>Peziza vesiculosa</i>	DQ470948	Tr275	<i>T. rufum</i>	ZB1157
ALV2419	<i>Genea harknessi</i>	ALV2419	Tr276	<i>T. rufum</i>	ZB3170
ALV1121	<i>Genea brunneoocarpa</i>	ALV1121	Tr277	<i>T. rufum</i>	ZB3193
ALV1810	<i>Genea thaxteroconfusa</i>	ALV1810	Tr278	<i>T. rufum</i>	ZB3054
AY261178	<i>Orbilbia delicatula</i>	AY261178	Tr279	<i>T. rufum</i>	ZB1048
DQ206862	<i>Gilkeya compacta</i>	DQ206862	Tr280	uc <i>Tuber</i>	EU668304
ALV2960	<i>Genea tuberculata</i>	ALV2960	Tr281	uc <i>Tuber</i>	JX625374
ALV1029	<i>Genea fragrans</i>	ALV1029	Tr282	uc <i>Tuber</i>	JX625376
ALV1856	<i>Genea dentata</i>	ALV1856	Tr283	uc <i>Tuber</i>	JX625375
ALV1110	<i>Genea pseudoverrucosa</i>	ALV1110	Tr284	uc <i>Tuber</i>	JX474832
ALV2407	<i>Genea anthracina</i>	ALV2407	Tr285	uc <i>Tuber</i>	JX474842
ALV1193	<i>Genea lespiaultii</i>	ALV1193	Tr286	<i>T. rufum</i>	ZB3405
DQ220333	<i>Genea</i> sp.	DQ220333	Tr287	<i>T. sp. src709</i>	DQ974798
ALV1120	<i>Genea mexicana</i>	ALV1120	Tr288	<i>T. sp. SOC1404</i>	JN022530
ALV2413	<i>Genea balsleyi</i>	ALV2413	Tr289	<i>T. sp. 79</i>	JQ925649
Tr1	<i>T. sp. 3 KA-2010</i>	AB553369	Tr290	<i>T. sp. 11 GB-2010</i>	GQ221453
Tr2	<i>T. sp. 3 KA-2010</i>	AB553376	Tr291	<i>T. lyonii</i>	EF202593
Tr3	<i>T. sp. 3 KA-2010</i>	AB553370	Tr292	<i>T. lyonii</i>	EU268567
Tr4	<i>T. sp. 3 KA-2010</i>	AB553377	Tr293	<i>T. lyonii</i>	FJ748910
Tr5	<i>T. sp. 3 KA-2010</i>	AB553375	Tr294	uc <i>Tuber</i>	JN569358
Tr6	<i>T. sp. 3 KA-2010</i>	AB553371	Tr295	<i>T. lyonii</i>	EU394704
Tr7	<i>T. sp. 3 KA-2010</i>	AB553372	Tr296	<i>T. lyonii</i>	FJ809883
Tr8	uc <i>Tuber</i>	AB873195	Tr297	<i>T. lyonii</i>	FJ748911
Tr9	<i>T. huidongense</i>	FJ797877	Tr298	<i>T. sp. 65 GB-2010</i>	HM485426
Tr10	<i>T. huidongense</i>	FJ797884	Tr299	<i>T. sp. 65</i>	JQ925648
Tr11	<i>T. huidongense</i>	DQ486031	Tr300	<i>T. sp. 64 GB-2010</i>	HM485425
Tr12	<i>T. huidongense</i>	DQ486032	Tr302	uc <i>Tuberaceae</i>	AJ893251
Tr13	<i>T. huidongense</i>	GU979035	Tr303	<i>T. rufum</i>	ZB2944
Tr14	<i>T. formosanum</i>	EU380276	Tr304	<i>T. rufum</i>	ZB2945
Tr15	<i>T. furfuraceum</i>	FJ176920	Tr305	<i>T. rufum</i>	ZB2945
Tr16	<i>T. furfuraceum</i>	FJ859900	Tr306		ZB4965
Tr17	<i>T. furfuraceum</i>	GU979034	Tr307	<i>T. spinoreticulatum</i>	FJ748914
Tr18	<i>T. huidongense</i>	FJ797881	Tr308	<i>T. spinoreticulatum</i>	GQ221454
Tr19	<i>T. huidongense</i>	FJ797882	Tr309	<i>T. sp. GB-2009e</i>	FJ809887
Tr20	<i>T. huidongense</i>	FJ797883	Tr310	<i>T. sp. 66 GB-2010</i>	HM485427

Tr21	<i>T. sp. 3 KA-2010</i>	AB553373	Tr311	uc <i>Tuber</i>	AY634170
Tr22	<i>T. sp. 3 KA-2010</i>	AB553374	Tr312	<i>T. candidum</i>	AY830856
Tr23	<i>T. huidongense</i>	FJ797878	Tr313	<i>T. cf. candidum</i> src625	DQ974807
Tr24	<i>T. huidongense</i>	JF921163	Tr314	uc <i>Tuber</i>	EF641836
Tr25	<i>T. sp. 4 KA-2010</i>	AB553379	Tr315	uc <i>Tuber</i>	EF411117
Tr26	<i>T. sp. MES448</i>	JN102491	Tr316	<i>T. candidum</i>	HM485348
Tr27	<i>T. subglobosum</i>	KF002728	Tr317	<i>T. candidum</i>	JN022527
Tr28	<i>T. sinoalbidum</i>	JF921164	Tr318	<i>T. candidum</i>	HM485349
Tr29	<i>T. sp. FL-2013c</i>	JX267043	Tr319	uc <i>Tuber</i>	EU334898
Tr30	uc <i>Tuber</i>	GQ985433	Tr320	uc <i>Tuber</i>	FJ348404
Tr31	uc <i>Tuber</i>	HM105540	Tr321	uc <i>Tuberaceae</i>	EU018589
Tr32	uc <i>Tuber</i>	GU722195	Tr322	<i>T. sp. 1 RG-2012</i>	KC152265
Tr33	uc <i>Tuber</i>	JX129159	Tr323	<i>T. sp. 1 RG-2012</i>	KC152266
Tr34	<i>T. liaotongense</i>	GU979037	Tr325	uc <i>Tuber</i>	EF661992
Tr35	<i>T. liaotongense</i>	GU979036	Tr326	uc <i>Tuberaceae</i>	EU018590
Tr36	uc <i>Tuber</i>	JQ318616	Tr327	<i>T. multimaculatum</i>	NR119863
Tr37	uc <i>Tuber</i>	AY748863	Tr328	<i>T. anamorph sp. Y86</i>	AY212880
Tr38	uc <i>Tuber</i>	JX630357	Tr329	ectomycorrhiza sp. Y86M2	AY212881
Tr39	uc <i>Tuber</i>	JX630932	Tr330	uc <i>Tuber</i>	DQ990872
Tr40	<i>T. sp. FL-2013d</i>	JX267044	LSU	<i>Tuber melanosporum</i>	AF435821
Tr41	uc <i>Tuber</i>	FR852061	LSU	<i>Tuber melanosporum</i>	FJ809819
Tr42	<i>T. nitidum</i>	JX402090	LSU	<i>Tuber melanosporum</i>	JQ925703*
Tr43	<i>T. nitidum</i>	JX402091	LSU	<i>Tuber melanosporum</i>	GU979139
Tr44	<i>T. nitidum</i>	JX402092	LSU	<i>Tuber indicum</i>	GU979137
Tr45	<i>T. rufum</i>	FN433159	LSU	<i>Tuber indicum</i> B	FJ809840*
Tr46	uc <i>Tuberaceae</i>	DQ402504	LSU	<i>Tuber indicum</i>	FJ809822
Tr47	<i>T. rufum</i> f. <i>nitidum</i>	FM205677	LSU	<i>Tuber indicum</i>	GU979113
Tr48	<i>T. nitidum</i>	ZB3441	LSU	<i>Tuber indicum</i>	GU979125
Tr49		Zambonelli3994	LSU	<i>Tuber indicum</i>	JQ925696
Tr50	uc <i>Tuber</i>	GQ254857	LSU	<i>Tuber indicum</i>	GU979112
Tr51	uc <i>Tuber</i>	GQ254859	LSU	<i>Tuber indicum</i>	GU979115
Tr52	uc <i>Tuber</i>	GQ254858	LSU	<i>Tuber indicum</i>	GU979132
Tr53	<i>T. requienii</i>	Fr	LSU	<i>Tuber indicum</i>	GU979130
Tr54	uc <i>Tuber</i>	HQ204754	LSU	<i>Tuber indicum</i>	GU979128
Tr55	uc <i>Tuber</i>	HE687179	LSU	<i>Tuber indicum</i>	GU979116
Tr56	<i>T. rufum</i>	EF362474	LSU	<i>Tuber indicum</i>	GU979114
Tr57		D70	LSU	<i>Tuber indicum</i>	GU979131
Tr58	uc <i>Tuber</i>	HE687181	LSU	<i>Tuber sp.</i>	AB553517
Tr59	<i>T. rufum</i>	EU326690	LSU	<i>Tuber sp.</i>	AB553518
Tr60	<i>T. rufum</i>	FM205604	LSU	<i>Tuber indicum</i>	GU979129

Tr61	<i>T. rufum</i>	FM205605	LSU	<i>Tuber indicum</i>	GU979136
Tr62	<i>T. rufum</i> f. <i>sphaerospora</i>	FM205667	LSU	<i>Tuber indicum</i>	GU979138
Tr63	<i>T. rufum</i> f. <i>lucidum</i>	FN433161	LSU	<i>Tuber indicum</i>	GU979118
Tr64	<i>T. rufum</i>	KC330221	LSU	<i>Tuber</i> aff. <i>indicum</i>	JQ925694
Tr65	<i>T. rufum</i> f. <i>nitidum</i>	FM205606	LSU	<i>Tuber indicum</i>	GU979121
Tr66		TR94-tr19	LSU	<i>Tuber indicum</i>	GU979133
Tr67	uc <i>Tuber</i>	FR852064	LSU	<i>Tuber indicum</i>	FJ809821
Tr68		JMV20090230	LSU	<i>Tuber indicum</i>	FJ809820
Tr69	<i>T. requienii</i>	42063Bp	LSU	<i>Tuber indicum</i> A	JQ925695*
Tr70	<i>T. lucidum</i>	ZB2927	LSU	<i>Tuber indicum</i>	GU979135
Tr71	<i>T. rufum</i>	JX402094	LSU	<i>Tuber sinense</i>	GU979117
Tr72		ZA4336	LSU	<i>Tuber indicum</i>	GU979127
Tr73		JMV20071125-3	LSU	<i>Tuber indicum</i>	GU979119
Tr74		TR91-tr22-	LSU	<i>Tuber indicum</i>	GU979120
Tr75		TR89-tr24-	LSU	<i>Tuber indicum</i>	GU979122
Tr76		JMV970905-9	LSU	<i>Tuber indicum</i>	GU979124
Tr77	<i>T. rufum</i>	EF362476	LSU	<i>Tuber formosanum</i>	GU979126
Tr78	<i>T. apiculatum</i>	ZB3398	LSU	<i>Tuber indicum</i>	GU979123
Tr79	<i>T. rufum</i>	ZB3393	LSU	<i>Tuber regimontanum</i>	EU375838
Tr80	<i>T. lucidum</i>	ZB3395	LSU	<i>Tuber regimontanum</i>	FJ809823
Tr81	<i>T. nitidum</i>	ZB3070	LSU	<i>Tuber indicum</i>	FJ233102
Tr82	<i>T. lucidum</i>	ZB3115	LSU	<i>Tuber pseudoexcavatum</i>	GU979109
Tr83		ZA3898	LSU	<i>Tuber pseudoexcavatum</i>	GU979106
Tr84	<i>T. rufum</i>	ZB3400	LSU	<i>Tuber pseudoexcavatum</i>	FJ809816*
Tr85	<i>T. rufum</i> f. <i>lucidum</i>	FJ809888	LSU	<i>Tuber pseudoexcavatum</i>	GU979103
Tr86	<i>T. rufum</i>	EF362477	LSU	<i>Tuber pseudoexcavatum</i>	GU979102
Tr87	<i>T. rufum</i>	ZB1900	LSU	<i>Tuber pseudoexcavatum</i>	GU979107
Tr88	<i>T. rufum</i>	ZB1719	LSU	<i>Tuber pseudoexcavatum</i>	GU979105
Tr89	<i>T. rufum</i>	JX402093	LSU	<i>Tuber pseudoexcavatum</i>	GU979104
Tr90	<i>T. rufum</i>	FM205607	LSU	<i>Tuber</i> sp.	AB553516
Tr91	<i>T. rufum</i>	FM205668	LSU	<i>Tuber furfuraceum</i>	GU979111
Tr92	<i>T. rufum</i>	FM205666	LSU	<i>Tuber</i> sp.	JQ925713*
Tr93	<i>T. lucidum</i>	ZB3935	LSU	<i>Tuber spinoreticulatum</i>	FJ809814
Tr94	<i>T. rufum</i>	FM205614	LSU	<i>Tuber lyonii</i>	EU394704
Tr95	<i>T. rufum</i>	JX402087	LSU	<i>Tuber umbilicatum</i>	GU979088
Tr96	<i>T. rufum</i>	JX402089	LSU	<i>Tuber liaotongense</i>	GU979092
Tr97		JMV960526-10	LSU	<i>Tuber huidongense</i>	GU979093
Tr98	<i>T. rufum</i>	JX402088	LSU	<i>Tuber rufum</i> f. <i>lucidum</i>	FJ809810
Tr99	<i>T. rufum</i>	AF106892	LSU	<i>Tuber rufum</i> f. <i>lucidum</i>	FJ809811
Tr100	<i>T. ferrugineum</i>	AF132506	LSU	<i>Tuber pseudoexcavatum</i>	FJ809816
Tr101		JMV20040523-3	LSU	<i>Tuber regimontanum</i>	EU375838*

Tr102	<i>T. rufum</i>	FM205603	LSU	<i>Tuber indicum B</i>	FJ809840
Tr103	uc <i>Tuber</i>	EU668244	PKC	<i>Tuber pseudoexcavatum</i>	DQ336334
Tr104		JMV20010526-3	PKC	<i>Tuber pseudoexcavatum</i>	DQ336335
Tr105	uc <i>Tuber</i>	AY634152	PKC	<i>Tuber indicum</i>	DQ336330
Tr106		ZI32	PKC	<i>Tuber indicum</i>	DQ336333
Tr107	uc <i>Tuber</i>	JX625377	ITS	<i>Tuber indicum</i>	AF300824
Tr108		JMV20070304-2	ITS	<i>Tuber indicum</i>	DQ375512
Tr109	<i>T. rufum</i>	FM205600	ITS	<i>Tuber melanosporum</i>	KF591751
Tr110	<i>T. rufum</i>	FM205602	ITS	<i>Tuber melanosporum</i>	AF300825
Tr111	<i>T. rufum</i>	ZB4802	ITS	<i>T.sp13</i>	GQ221451*
Tr112	<i>T. rufum</i>	FM205601	ITS	<i>Tuber pseudoexcavatum</i>	HM485381*
Tr113	<i>T. rufum</i>	FM205636	ITS	<i>Tuber regiomontanum</i>	EU375838*
Tr114	uc <i>Tuber</i>	JF506838	ITS	<i>Tuber indicum A</i>	FJ748908*
Tr115	uc <i>Tuber</i>	HQ204752	ITS	<i>Tuber indicum B</i>	FJ748907*
Tr116	<i>T. rufum</i>	ZB3088	ITS	<i>Tuber melanosporum</i>	FJ748904*
Tr117		ZA2448			

6. melléklet: A vizsgálatokba vont *T. brumale* aggr. minták. A filogenetikai fákön a kód alapján azonosíthatóak be a minták. A kódban a „TB”-t követően egy egyedi számláló van, melyet a „k” 1, 2 vagy 3 követ, amely a kládot jelöli. Az 1 az A faj I. haplocsoportját, 2 a II. haplocsoportját míg a 3 a B fajt jelöli. A csillaggal megjelölt szekvencia azonosítókat nemzetközi adatbázisokból töltöttük le, míg a többi jelen munka során töltöttük fel. A táblázatban található rövidítések feloldása: ES = környezeti mintavétel; ECM = ektomikorhizából származó szekvencia; AZ = Alessandra Zambonelli; AM = Amer Montecchi; BI = Bagi István; CC= Chriss Chrysopoulos; DS= Diamandis Stephanos; GC = Gérard Chevalier; JMV = Joseph Maria Vidal; SG = Stanislav Glejdura; TG = Tine Grebenc; ZB = Bratek Zoltán

Kód	Tulajdonos	Ország	Év	Klád/ haplocsoport	Haplotípus	ITS vagy RFLP	LSU	PKC
TB1k1		Olaszország		A/I	C2	HM485345*		
TB2k3	TG	Szerbia	2005	B	N	FM205552*		
TB3k2	TG	Szlovénia	2005	A/II	K1	FM205551*		
TB4k1		Spanyolország	1988	A/I	C1	FM205550*		
TB5k1	TG	Szlovénia	2006	A/I	C1	FM205549*		
TB6k1	TG	Szlovénia	2005	A/I	C1	FM205548*		
TB7k1	TG	Szlovénia	2005	A/I	C1	FM205547*		
TB8k1	TG	Szlovénia	2005	A/I	C1	FM205546*		
TB9k1	TG	Szlovénia	2006	A/I	C1	FM205545*		
TB10k1	TG	Szlovénia	2005	A/I	C1	FM205544*		
TB11k1	TG	Szlovénia	2005	A/I	C1	FM205543*		
TB12k1		Olaszország	2007	A/I	C2	FJ748900*		
TB13k1	TG	Szlovénia	2005	A/I	C1	FM205542*		

TB14k1	TG	Szlovénia	2006	A/I	C1	FM205541*
TB15k1	TG	Szlovénia	2006	A/I	C1	FM205540*
TB16k1	TG	Szlovénia	2006	A/I	C1	FM205539*
TB17k1	TG	Horvátország	2006	A/I	C1	FM205538*
TB18k1		Franciaország		A/I	C1	AF132504*
TB19k3	TG	Szerbia	2005	B	O	FM205699*
TB20k1		Új-Zéland		A/I	C1	EU753268*
TB21k3	TG	Szerbia	2008	B	N	FM205692*
TB22k3	TG	Szerbia	2005	B	O	FM205684*
TB23k2	TG	Montenegró	2005	A/II	K1	FM205660*
TB24k2	TG	Montenegró	2006	A/II	K2	FM205657*
TB25k1	TG	Szlovénia	2009	A/I	C1	FN433130*
TB26k1		Olaszország		A/I	F	AF106880*
TB27k1	TG	Szlovénia	2009	A/I	C1	FN433129*
TB28k1	TG	Szlovénia		A/I	C1	FN433128*
TB29k3	TG	Szlovénia	2007	B	N	FM205639*
TB30k1		Franciaország		A/I		DQ329359*
TB31k1		Franciaország		A/I		DQ329360*
TB32k3	TG	Szlovénia	2007	B		FM205641*
TB33k2	TG	Szerbia	2006	A/II		FM205658*
TB34k2	TG	Szerbia	2005	A/II		FM205659*
TB35k2	TG	Szerbia	2006	A/II		FM205661*
TB36k2	TG	Szerbia	2006	A/II		FM205686*
TB37k2	TG	Szerbia	2008	A/II		FM205694*
TB38k2	TG	Szerbia	2008	A/II		FM205696*
TB39k2	TG	Szerbia		A/II		FM205700*
TB40k1		Magyarország		A/I		JF693893*
TB41k1		Németország		A/I	C1	JF926118*
TB42k1		Olaszország		A/I		AF001010*
TB43k1		Szlovénia		A/I	C1	KF551064
TB44k2		Makedónia		A/II	K1	KF551065
TB45k1		Anglia		A/I	C1	EU668242*
TB46k2		Irán		A/II	L	FR852065*
TB47k2		Irán		A/II	L	FR852067*
TB48k1		Olaszország		A/I	C1	HM370454*
TB49k1		Olaszország		A/I	C1	HM370488*
TB50k1		Olaszország		A/I	C2	JF927066*
TB51k1		Olaszország	2007	A/I		JF927067*
TB52k1		Olaszország	2008	A/I		JF927068*
TB53k1		Olaszország	2008	A/I		JF927069*
TB54k1		Olaszország		A/I		JX625371*

TB55k1	ZB	Anglia	2010	A/I	C1	KF550970		
TB56k1	GC	Anglia	2003	A/I	C1	KF550971		
TB57k1	GC	Ausztria	2002	A/I	C1	KF550972		
TB58k1	GC	Franciaország	2003	A/I	C1	KF550973		
TB59k1	GC	Franciaország	2004	A/I	C1	KF550974		
TB60k1	GC	Franciaország	2001	A/I	C1	KF550975		
TB61k1	GC	Franciaország	2004	A/I	E	KF550976		
TB62k1	GC	Franciaország	2001	A/I	C1	KF550977		
TB63k1	GC	Franciaország		A/I	C1	KF550978		
TB64k1	GC	Franciaország		A/I	C1	KF550979		
TB65k1	GC	Franciaország	2003	A/I	C1	KF550980		
TB66k1	GC	Franciaország	2000	A/I	C1	KF550981		
TB67k1	GC	Franciaország	2003	A/I	G	KF550982		
TB68k1	GC	Franciaország	2004	A/I	C1	KF550983		
TB69k1	GC	Franciaország	2002	A/I	C1	KF550984		
TB70k1	GC	Franciaország	2005	A/I	G	KF550985		
TB71k1	GC	Franciaország	2002	A/I	C1	KF550986		
TB72k1	GC	Franciaország	2005	A/I	H	KF550987		
TB73k1	GC	Franciaország	1992	A/I	C1	KF550988		
TB74k1	GC	Franciaország	1998	A/I	I	KF550989		
TB75k1	GC	Franciaország	1995	A/I	I	KF550990		
TB76k1	GC	Franciaország	1978	A/I	C1	KF550991		
TB77k1	GC	Franciaország	1994	A/I	C1	KF550992		
TB78k1	GC	Franciaország	2000	A/I	C1	KF550993		
TB79k1	GC	Franciaország	2000	A/I	C1	KF550994		
TB80k1	GC	Franciaország	2000	A/I	C1	KF550995		
TB81k1	GC	Franciaország	1983	A/I	I	KF550996		
TB84k2	CC	Görögország	2007	A/II	K4	KF550997		
TB85k2	CC	Görögország	2008	A/II	K1	KF550998		
TB86k2	CC	Görögország	2010	A/II	K1	KF550999		
TB87k2	DS	Görögország	2012	A/II	K1	KF551000	KF581088	KF581120
TB88k2	DS	Görögország	2012	A/II	K1	KF551001	KF581087	KF581118
TB89k2	DS	Görögország	2012	A/II	J	KF551002	KF581086	KF581116
TB90k1	ZB	Lengyelország	2012	A/I	C1	KF551003		
TB91k1	ZB	Lengyelország	2012	A/I	C1	KF551004		
TB92k1	ZB	Lengyelország	2012	A/I	D	KF551005	KF581099	KF581119
TB93k2	ZB	Lengyelország	2012	A/II	M2	KF551006		
TB94k1	ZB	Magyarország	1999	A/I	C1	KF551007	KF581095	
TB95k1	ZB	Magyarország	1999	A/I	C1	KF551008		
TB96k1	ZB	Magyarország	1999	A/I	C1	KF591748		
TB97k1	ZB	Magyarország	2000	A/I	C1	KF551009		

TB98k2	ZB	Magyarország	2001	A/II	K1	KF551010		
TB99k3	ZB	Magyarország	2001	B	O	KF551011	KF581105	KF581124
TB100k2	ZB	Magyarország	2003	A/II	A	KF551012	KF581082	
TB101k2	ZB	Magyarország	2003	A/II	A	KF551013	KF581083	
TB102k1	ZB	Magyarország	2004	A/I	C1	KF551014	KF581108	
TB103k2	ZB	Magyarország	2004	A/II	K1	KF551015	KF581090	
TB104k3	ZB	Magyarország	2004	B	N	KF551016	KF581106	KF581129
TB105k3	ZB	Magyarország	2004	B	N	KF551017		
TB106k1	ZB	Magyarország	2005	A/I	C1	KF591749	KF581092	
TB107k1	ZB	Magyarország	2005	A/I	C1	KF551018		
TB108k3	ZB	Magyarország	2006	B	O	KF551019	KF581104	
TB109k2	ZB	Magyarország	2006	A/II	K1	KF551020	KF581093	
TB110k3	ZB	Magyarország	2006	B	N	KF551021	KF581100	
TB111k2	ZB	Magyarország	2006	A/II	K1	KF551022	KF581091	KF581112
TB112k1	ZB	Magyarország	2006	A/I	C1	KF551023	KF581098	KF581111
TB113k1	ZB	Magyarország	2006	A/I	C1	KF551024		
TB114k2	ZB	Magyarország	2006	A/II	A	KF551025		
TB115k3	ZB	Magyarország	2007	B	O	KF551026	KF581101	KF581125
TB116k1	ZB	Magyarország	2007	A/I	C1	KF551027		
TB117k1	ZB	Magyarország	2007	A/I	C1	KF551028	KF581094	KF581122
TB118k2	ZB	Magyarország	2008	A/II	M1	KF551029		
TB119k2	ZB	Magyarország	1995	A/II	K5	KF551030		
TB120k3	ZB	Magyarország	2010	B	O	KF551031		
TB121k2	ZB	Magyarország	2010	A/II	A	KF551032		
TB122k2	ZB	Magyarország	2010	A/II	A	KF551033		
TB123k3	ZB	Magyarország	2010	B	O	KF551034		KF581126
TB124k1	ZB	Magyarország		A/I		KF591750		
TB125k1	ZB	Magyarország		A/I	C1	KF551035		
TB126k2	ZB	Magyarország	2010	A/II	A	KF551036		
TB127k2	ZB	Magyarország	2010	A/II	A	KF551037		
TB128k2	ZB	Magyarország	2010	A/II	A	KF551038		
TB129k2	ZB	Magyarország	2010	A/II	A	KF551039	KF581085	KF581113
TB130k1	ZB	Magyarország	2007	A/I	C1	KF551040		
TB131k1	ZB	Magyarország	2007	A/I	C1	KF551041		
TB132k1	ZB	Magyarország	2013	A/I		MboI Hinfl		KF581121
TB133k1	ZB	Magyarország	2013	A/I		MboI Hinfl		KF581115
TB134k1	ZB	Magyarország	2013	A/I		MboI Hinfl		KF581114
TB135k1	ZB	Magyarország	2013	A/I		MboI Hinfl		
TB136k1	ZB	Magyarország	2013	A/I		MboI Hinfl		KF581117
TB137k3	ZB	Magyarország	2013	B		MboI Hinfl		
TB138k3	ZB	Magyarország	2013	B		MboI Hinfl		KF581131

TB139k3	ZB	Magyarország	2013	B		MboI Hinf		
TB140k3	ZB	Magyarország	2013	B		MboI Hinf		KF581130
TB141k1	ZB	Magyarország	2013	A/I		MboI Hinf		
TB142k3	ZB	Magyarország	2012	B		MboI Hinf		
TB143k3	ZB	Magyarország	2012	B		MboI Hinf		
TB144k3	ZB	Magyarország	2012	B		MboI Hinf		
TB145k1	ZB	Olaszország	2007	A/I	C1	JQ288900	KF581096	
TB146k1	AZ	Olaszország	2010	A/I	C1	KF551042		
TB147k1	AZ	Olaszország	2006	A/I	C1	KF551043		
TB148k1	AZ	Olaszország	2010	A/I	C1	KF551044		
TB149k1	AZ	Olaszország	2009	A/I	C1	KF551045		
TB150k1	AM	Olaszország	2010	A/I	C2	KF551046		
TB151k3	ZB	Románia	1989	B	N	KF551047		
TB152k2	ZB	Románia	2004	A/II	K2	KF551048		
TB153k3	ZB	Románia	2006	B	O	KF551049	KF581103	KF581128
TB154k3	ZB	Románia	2006	B	N	KF551050	KF581102	KF581127
TB155k2	ZB	Románia	2006	A/II	A	KF551051	KF581084	
TB156k2	ZB	Románia	2006	A/II	K3	KF551052		
TB157k2	ZB	Románia	2004	A/II	K1	KF551053		
TB158k2	ZB	Románia	2006	A/II	K1	KF551054		
TB159k1	JMV	Spanyolország	1992	A/I	C1	KF551055		
TB160k1	JMV	Spanyolország	2006	A/I	C1	KF551056		
TB163k2	ZB	Szlovákia	2005	A/II	K1	KF551057		
TB164k2	ZB	Szlovákia	2005	A/II	K1	KF551058		
TB165k2	ZB	Szlovákia	2005	A/II	M2	KF551059		
TB166k1	ZB	Szlovákia	2005	A/I	C1	KF551060	KF581097	
TB167k3	SG	Szlovákia	2008	B	O	KF551061	KF581107	
TB168k1	SG	Szlovákia	2008	A/I	C1	KF551062		
TB169k2	BI	Törökország	2010	A/II	K1	KF551063	KF581089	KF581110
TB170k1		Olaszország		A/I		JQ925683*		
TB171k1		Olaszország		A/I		JQ925684*		
TB172k1		Franciaország		A/I		DQ336323*		
TB173k1		Franciaország		A/I		DQ336324*		
TB174k1		Olaszország	2007	A/I		FJ809817*		
TB175k1		Olaszország	2007	A/I		FJ809818*		
TB176k3	ZB	Magyarország	2011	B		MboI Hinf		
TB177k3	ZB	Magyarország	2011	B		MboI Hinf		
TB178k1	ZB	Magyarország	2011	A/I		MboI Hinf		
TB179k1	ZB	Magyarország	2012	A/I		MboI Hinf		KF581123
TB180k1	ZB	Magyarország	2012	A/I		MboI Hinf		
TB181k1	ZB	Magyarország	2012	A/I		MboI Hinf		

TB182k1	ZB	Magyarország	1999	A/I		MboI HinfI
TB183k2	ZB	Szlovákia	2005	A/II		MboI HinfI
TB184k2	ZB	Magyarország	2006	A/II		MboI HinfI
TB185k3	ZB	Magyarország	1996	B		MboI HinfI
TB186k3	ZB	Magyarország	1998	B		MboI HinfI
TB187k3	ZB	Magyarország	1998	B		MboI HinfI
TB188k3	ZB	Magyarország	1998	B		MboI HinfI
TB189k3	ZB	Románia	2001	B		MboI HinfI
TB190k3	ZB	Magyarország	2007	B		MboI HinfI
TB191k3	ZB	Magyarország	2011	B		MboI HinfI
TB192k2	ZB	Magyarország	1991	A/II		MboI HinfI
TB193k2	ZB	Magyarország	1999	A/II		MboI HinfI
TB194k3	ZB	Magyarország	1999	B		MboI HinfI
TB195k1	ZB	Magyarország	2006	A/I		MboI HinfI
TB196k1	ZB	Magyarország	2013	A/I		MboI HinfI
TB197k1	ZB	Magyarország	2013	A/I		MboI HinfI
TB198k1	GC	Franciaország		A/I	C1	KF551066

a doktori értekezés nyilvánosságra hozatalához

I. A doktori értekezés adatai

A szerző neve Merényi Zsolt

MTMT-azonosító: 10044652

A doktori értekezés címe és alcíme:

Molekuláris biológiai és ökológiai vizsgálatok hipogeikus gombákon

DOI-azonosító³⁹

A doktori iskola neve: Biológia Doktori Iskola

A doktori iskolán belüli doktori program neve: Kísérletes Növénybiológia Program

A témavezető neve és tudományos fokozata: Dr. Bratek Zoltán PhD egyetemi adjunktus

A témavezető munkahelye: ELTE Növényélettani és Molekuláris Növénybiológiai Tanszék

II. Nyilatkozatok

A doktori értekezés szerzőjeként⁴⁰

a) hozzájárulok, hogy a doktori fokozat megszerzését követően a doktori értekezésem és a tézisek nyilvánosságra kerüljenek az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban. Felhatalmazom a Természettudományi Kar Tudományszervezési és Egyetemközi Kapcsolatok Osztályának ügyintézőjét, hogy az értekezést és a téziseket feltöltse az ELTE Digitális Intézményi Tudástárba, és ennek során kitöltse a feltöltéshez szükséges nyilatkozatokat.

b) kérem, hogy a mellékelt kérelemben részletezett szabadalmi, illetőleg oltalmi bejelentés közzétételéig a doktori értekezést ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban;⁴¹

c) kérem, hogy a nemzetbiztonsági okból minősített adatot tartalmazó doktori értekezést a minősítés (datum)-ig tartó időtartama alatt ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban;⁴²

d) kérem, hogy a mű kiadására vonatkozó mellékelt kiadó szerződésre tekintettel a doktori értekezést a könyv megjelenéséig ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban, és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban csak a könyv bibliográfiai adatait tegyék közzé. Ha a könyv a fokozatszerzést követően egy évig nem jelenik meg, hozzájárulok, hogy a doktori értekezésem és a tézisek nyilvánosságra kerüljenek az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban.⁴³

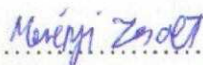
2. A doktori értekezés szerzőjeként kijelentem, hogy

a) az ELTE Digitális Intézményi Tudástárba feltöltendő doktori értekezés és a tézisek saját eredeti, önálló szellemi munkám és legjobb tudomásom szerint nem sértem vele senki szerzői jogait;

b) a doktori értekezés és a tézisek nyomtatott változatai és az elektronikus adathordozón benyújtott tartalmak (szöveg és ábrák) mindenben megegyeznek.

3. A doktori értekezés szerzőjeként hozzájárulok a doktori értekezés és a tézisek szövegének plágiumkereső adatbázisba helyezéséhez és plágiumellenőrző vizsgálatok lefuttatásához.

Kelt: 2014. szeptember 8.


.....
a doktori értekezés szerzőjének aláírása

³⁸ Beiktatta az Egyetemi Doktori Szabályzat módosításáról szóló CXXXIX/2014. (VI. 30.) Szen. sz. határozat. Hatályos: 2014. VII.1. napjától.

³⁹ A kari hivatal ügyintézője tölti ki.

⁴⁰ A megfelelő szöveg aláhúzendő.

⁴¹ A doktori értekezés benyújtásával egyidejűleg be kell adni a tudományági doktori tanácshoz a szabadalmi, illetőleg oltalmi bejelentést tanúsító okiratot és a nyilvánosságra hozatal elhalasztása iránti kérelmet.

⁴² A doktori értekezés benyújtásával egyidejűleg be kell nyújtani a minősített adatra vonatkozó közokiratot.

⁴³ A doktori értekezés benyújtásával egyidejűleg be kell nyújtani a mű kiadásáról szóló kiadói szerződést.