

SZENT ISTVÁN EGYETEM

**A *TILLETIA*-FAJOK DIAGNOSZTIKÁJA ÉS
FELDERÍTÉSE MAGYARORSZÁGON ŐSZI BÚZÁBAN**

Doktori (PhD.) értekezés

HALÁSZ ÁGNES

**GÖDÖLLŐ
2014**

A doktori iskola

Megnevezése: Növénytudományi Doktori Iskola

Tudományága: Növénytermesztési és Kertészeti Tudományok

Vezetője: Dr. Helyes Lajos
egyetemi tanár, az MTA doktora
SZIE Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar
Kertészeti Technológiai Intézet

Témavezető: Dr. Virányi Ferenc
ny. egyetemi tanár, az MTA doktora
SZIE Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar
Növényvédelmi Intézet

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS	7
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	9
2.1. A gazdaságilag jelentős, illetve zárlati <i>Tilletia</i> -fajok	9
2.1.1. A hazánkban előforduló <i>Tilletia</i> -fajok kártétele és jelentősége	9
2.1.2. A hazánkban előforduló <i>Tilletia</i> -fajokhoz kapcsolódó növény-egészségügyi szabályozás	12
2.1.3. A hazánkban előforduló <i>Tilletia</i> -fajok biológiája és morfológiája	13
2.1.4. A hazánkban előforduló <i>Tilletia</i> -fajok elkülönítése hagyományos módszerekkel	19
2.1.5. Az Európában nem honos, de gazdaságilag jelentős zárlati <i>Tilletia indica</i> üszöggomba jellemzőinek áttekintése	20
2.2. Gabonatórolók aerobiológiai vizsgálata	23
2.2.1. A légkörben előforduló gombák egészségkárosító hatása	24
2.2.2. A légkörben előforduló gombák növény-egészségügyi vonatkozásai	25
2.2.3. A gombák szerepe a raktári ökoszisztémában	26
2.2.4. A légkör, illetve a gabonatórolók levegőjének elemzése	27
2.3. Gombafajok elkülönítése molekuláris módszerekkel	28
2.3.1. A <i>Tilletia</i> -fajok elkülönítése nukleinsav alapú molekuláris módszerekkel	28
2.3.1.1. DNS-izolálás	29
2.3.1.2. A DNS-alapú molekuláris azonosítási módszerek	29
2.4. Gombafajok elkülönítése fehérjealapú módszerekkel	33
2.4.1. A gombaképletek esetében alkalmazott sejtfeltárási eljárások	33
2.4.2. Fehérje-extrakció gombaképletekből	35
2.4.3. Fehérje-elválasztás gél-elektroforézissel	36
2.4.4. A <i>Tilletia</i> -fajok egydimenziós gél-elektroforézissel történő elkülönítésében eddig elért eredmények	39
3. ANYAG ÉS MÓDSZER	41
3.1. Mintagyűjtés	41
3.1.1. Mintagyűjtés mikroszkópos vizsgálathoz	41
3.1.2. Mintavétel Hirst-típusú térfogatosszámológéppel	42
3.1.3. Por-mintavétel	45
3.1.4. Mintagyűjtés a DNS- és fehérjealapú vizsgálatokhoz	46
3.2. Mikroszkópos vizsgálatok	47
3.2.1. Teliospórák kinyerése és vizsgálata lemosásos módszerrel	47
3.2.2. Fluoreszcens fénymikroszkópos vizsgálat	48
3.2.3. Spóracsapdázás során vett levegőminták kiértékelése	48
3.2.4. Statisztikai elemzés	48
3.3. DNS-alapú módszerek alkalmazása a <i>Tilletia</i> -fajok elkülönítésére	49
3.3.1. DNS-kinyerés DNEasy Plant Mini Kit-tel	49
3.3.2. DNS-koncentrációk	49
3.3.3. PCR-vizsgálatok	50
A) <i>Tilletia</i> faj-specifikus PCR (TILf, TILr)	50
B) <i>Tilletia contraversára</i> specifikus PCR-eljárás	50
C) <i>Tilletia contraversa</i> azonosítása SCAR-marker felhasználásával	52
3.4. Fehérjealapú módszerek alkalmazása a <i>Tilletia</i> -fajok elkülönítésére	53
3.4.1. Fehérjék kinyerése teliospórákból	53

3.4.2. Egydimenziós gél-elektroforézis (1-D SDS-PAGE)	54
3.4.3. A PBS-puffer hatékonyságának vizsgálata a 2x Laemmli-pufferrel szemben	56
4. EREDMÉNYEK	57
4.1. A 2007-2012. évi országos <i>Tilletia</i> spp. felderítések	57
4.2. Levegő-mintavétel Hirst-típusú térfogatos spóracsapdával	66
4.3. A <i>Tilletia</i> -fajok elkülönítése DNS-alapú molekuláris módszerekkel	70
4.4. A <i>Tilletia</i> -fajok elkülönítése fehérjealapú molekuláris módszerekkel	72
5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK	79
5.1. Az éves országos <i>Tilletia</i> -felderítés	79
5.2. Levegő-mintavétel Hirst-típusú térfogatos spóracsapdával	84
5.3. A <i>Tilletia</i> -fajok elkülönítése DNS-alapú molekuláris módszerekkel	87
5.4. A <i>Tilletia</i> -fajok elkülönítése fehérjealapú molekuláris módszerekkel	88
5.5. Új tudományos eredmények	90
6. ÖSSZEFOGLALÁS	93
7. SUMMARY	97
8. MELLÉKLETEK	101
M1. Irodalomjegyzék	101
M2. Fényképmelléklet	123
M3. Hirst-típusú térfogatos spóracsapdával végzett mintavételek	133
M4.1 A <i>Tilletia</i> -fajok országos felderítése (2008-2013): fertőzött minták (a kórokozó, őszi búza fajta és csávázószer feltüntetésével)	141
M4.2 A <i>Tilletia</i> -fajok országos felderítése (2008-2013) során ugyanazon a településen, eltérő évben talált pozitív minták	145
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	147

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AFLP	<u>A</u> mplified <u>F</u> ragment <u>L</u> ength <u>P</u> olymorphism
BOX / REP / ERIC	rep-PCR módszer során alkalmazott különböző primer szettek
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool (bioinformatikai program)
CTAB	cetil-trimetil-ammónium-bromid
ISSR	<u>I</u> nter <u>S</u> imple <u>S</u> equence <u>R</u> epeat
ITS	<u>I</u> nternal <u>T</u> ranscribed <u>S</u> pacers
LSU	nagy riboszóma alegység - <u>L</u> arge <u>R</u> ibosomal <u>S</u> ubunit
NTS/IGS	<u>N</u> on- <u>T</u> ranscribed <u>S</u> pacers/ <u>I</u> ntergenic <u>S</u> pacers
PAGE	poliakrilamid gélelektorforézis - <u>P</u> olyacrilamide <u>G</u> el <u>E</u> lectrophoresis
PCR	polimeráz láncreakció - <u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction
RAPD	<u>R</u> andom <u>A</u> mplified <u>P</u> olymorphic <u>D</u> NA
rep-PCR	<u>R</u> epeated Sequence-based PCR
rDNS	riboszómális DNS
RFLP	<u>R</u> estriction <u>F</u> ragment <u>L</u> ength <u>P</u> olymorphism
RM-PCR	primer mediated asymmetric-PCR (YUAN et al 2009)
SCAR	<u>S</u> equence <u>C</u> haracterized <u>A</u> mplified <u>R</u> egion
SDS	nátrium-dodecil-szulfát (<u>S</u> odium <u>D</u> odecyl <u>S</u> ulfate)
SSR	<u>S</u> imple <u>S</u> equence <u>R</u> epeat
SSU	kis riboszóma alegység - <u>S</u> mall <u>R</u> ibosomal <u>S</u> ubunit
TEMED	tetrametil-etilén-diamin
TCK	<i>Tilletia contraversa</i> kockázatbecslési modell

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

A búza (*Triticum aestivum* L.) tápanyagban gazdag, gazdaságilag jelentős növényünk, a világ 40%-án alapvető élelmiszernek számít, csak a rizs és a kukorica rendelkezik hasonló jelentőséggel. A világ egyik legértékesebb és legnagyobb területen termesztett gabonaféléje, vetésterülete 245–250 millió hektár (BORSOS et al. 1995)¹ körül van. Széles körű elterjedését a búzafajok és fajták változatos éghajlati igénye és jó alkalmazkodóképessége tette lehetővé. A búza vetésterülete hazánkban a 2000-es évek elejétől állandósult 1,1 millió hektár körüli értékre, termésátlaga 3–5 t/ha között ingadozik (ÁGOSTON 2009).

Az őszi búza legfontosabb kenyérgabona-növényünk, amelynek szénhidrát- és fehérjetartalma kedvező. A lágy búzát édes- és tésztaipari, valamint takarmányozási célra használják fel. Kenyérsütésre a kemény búzák a megfelelőbbek (HORVÁTH 1995). Fontos megélhetési forrás, ezért gazdasági és ökológiai védelme elsőrendű feladat.

A búzatermesztés sikerét a különböző kórokozók, mint a rozsda- és üszöggombák, nagymértékben befolyásolják, fellépésük esetén rontják a gabona minőségét és csökkentik a termés mennyiségét. A csíranövény-fertőző *Tilletia*-fajok világszerte az egyik legveszélyesebb kórokozónak számítanak (KELLERER et al. 2006).

A gabonaüszög a történelmi időktől kezdve napjainkig ismert (SZEPESSY 1977). Mitterpacher 1777-ben különítette el a kőüszögöt a porüszögtől. Linhardt a „Fungi Hungarica” című munkájában 31 üszögfajt ismertetett (HORVÁTH 1995). Az üszögbetegség az intenzív gabonatermesztés kibontakozásáig az egyik legfőbb gabonakárosító volt (TÓTH 2006). A búza kőüszög ma olyan vidékeken lehet jelentős, ahol nem csáváznak (pl. biotermesztés), vagy azt nem végzik szakszerűen.

Magyarországon általánosan két őszi búzát fertőző *Tilletia*-faj fordul elő: a *T. caries* (DC.) Tul. és a *T. laevis* J. G. Kühn. Gazdaságilag jelentős üszögfaj még a *T. contraversa* J. Kühn, mely az irodalmi adatok szerint napjainkban már nem fordul elő hazánkban. Figyelembe kell venni továbbá a zárlati státuszú kórokozóként számon tartott *T. indica* Mitra fajt, mely Európában még nem fordult elő.

Számos országban van érvényben hatósági szabályozás a *Tilletia*-fajokkal fertőzött búzaszállítmányokkal kapcsolatban, ez főként importkorlátozásban nyilvánul meg. Az érintett fajokkal szemben – *T. contraversa* és *T. indica* – zéró tolerancia, illetve fertőzöttségi küszöbértékek vannak érvényben, azért, hogy elsősorban meggátolják ezeknek a gombáknak a

¹ Az Irodalomjegyzék az M1. fejezetben található.

kórokozómentes területeken való megtelepedését, valamint, ha már jelen vannak, akkor korlátozzák terjedésüket, és felszámolják jelenlétüket. Export szállítmányaink esetleges visszautasításának elkerülése érdekében hazánkban évente végzünk felderítést a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal, Növény-, Talaj- és Agrárkörnyezet-védelmi Igazgatóság, Növény-egészségügyi és Molekuláris Biológiai Laboratóriumában a *T. contraversa*-mentesség igazolására.

A *T. caries* és *T. contraversa* teliospóráinak a nagyfokú hasonlósága megnehezíti a növény-egészségügyi vizsgálatok elvégzését (MURRAY et al. 1998). Többféle, morfológiai és csírázási tulajdonságokon alapuló vizsgálati módszer együttes alkalmazása szükséges a megbízható diagnózis felállításához. Ez magában foglalhatja a fénymikroszkópos, fluoreszcens fénymikroszkópos jellemzőkön túl a táptalajon való csíráztatást is. Ezen technikák rendkívül idő- és munkaigényesek, gyakorlott, szakértő szemet igényelnek. Ezért szükségesnek látszott a lehetséges DNS és fehérje alapú azonosítási módszerek feltérképezése, és a módszerfejlesztés.

Bár néhány aerobiológiai tanulmány leírta a *Tilletia*-fajok teliospóráinak különböző földrajzi helyeken a levegőben való jelenlétét (TSE et al. 1980; SAVINO és CARETTA 1992; CROTZER és LEVETIN 1996), nem áll rendelkezésre adat a *Tilletia*-fajok teliospóráinak gabonatarházak légterében való előfordulására. A *Tilletia*-fajok gazdasági jelentőségére való tekintettel is szükséges a gabonatarhások levegőbiológiai vizsgálata a spórák terjedése, az átfertőződés, az esetleges zárlati szabályozások, valamint az alkalmazandó kezelési technológiák kidolgozása kapcsán.

Munkánk során célkitűzéseink az alábbiak voltak:

1. A *Tilletia*-fajok előfordulásának felderítése Magyarországon kombájn-tiszta, learatott őszi búza minták vizsgálata alapján a 2007-2012. közötti időintervallumban, illetve a 2011-ben kimutatott, „visszatérő” *Tilletia contraversa* morfológiai jellemzése, és újbóli színrelépésének háttérben lévő lehetséges tényezők áttekintése.
2. A gabonatarházak levegő-összetételének vizsgálata Hirst-típusú térfogatos spóracsapdával: a tárolók levegőjének növény- és humán-egészségügyi vonatkozású analízise különös tekintettel az üszögspórák jelenlétének felderítésére.
3. A *T. caries* és *T. contraversa* elkülönítését célzó DNS alapú módszerek tesztelése, a megfelelőnek talált módszer adaptálása a laboratóriumi eljárásaink közé.
4. A *T. caries* és *T. contraversa* elkülönítését célzó, fehérje-összetételen alapuló rutin diagnosztikai módszer kifejlesztése, egy megbízható, gyors és ismételhető elektroforetikus technika létrehozása.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A gazdaságilag jelentős, illetve zárlati *Tilletia*-fajok

2.1.1. A hazánkban előforduló *Tilletia*-fajok kártétele és jelentősége

A Magyarországon gazdasági jelentőséggel bíró üszögök, a törpeüszög, *Tilletia contraversa* és a két kőüszög- vagy bűdösüszög, *T. caries* és *T. laevis*, közeli rokonságban álló bazídiumos gombák. Hazánkban és a világ más tájain a különböző üszögbetegségek évente eltérő mértékű, de minden évben megjelenő termésveszteséget okoznak. Általánosságban ugyanakkor elmondható, hogy az üszögbetegségek ma kevesebb gazdasági kárt okoznak, mint ötven évvel ezelőtt, főképpen a kémiai védekezési módszerek fejlődésének köszönhetően (WIESE 1998).

A magyarországi *Tilletia*-fajok elterjedésének feldolgozása során megállapították, hogy a *T. caries* az ország csapadékosabb nyugati, délnyugati és északkeleti megyéiben fordul elő, a kevesebb csapadékú vidékeken pedig a szárazabb klímát jobban tűrő *T. laevis* (UBRIZSY 1965). PODHRADSKY (1962) szerint viszont Magyarországon a sima spórájú *T. laevis* a legelterjedtebb. A *T. laevis* a legtöbb búzatermesztő országban jelen van, de nem olyan gyakori, mint a *T. caries*.

Az őszi búzát fertőző üszögfajok nevezéktanát tekintve két dolgot kell tisztázni. A *T. laevis* Kühn in Rabenh. szinonimája a *T. foetida* (Wallr.) Liro (KÖVICS 2000). A magyar és angol nyelvű publikációkban a két elnevezés vegyesen fordul elő. Kövics György (1997) Növényvédelemben megjelent publikációjában leírja, hogy a *T. foetida* elnevezés illegitim. Az Index Fungorum leírása szerint is a *T. laevis* a jelenleg használt hivatalos megnevezés. Az igaz, hogy Moesz Gusztávnál (1950) elsődleges névként még a *T. foetida* szerepel, ugyanakkor, mint fentebb már említettem, Kövics György Növénybetegséget okozó gombák névtára (1997) című művében már az elsődleges megnevezés a *T. laevis*, ugyanígy, Vánky Kálmán (1994) is ezt a terminológiát követi monográfiájában. A másik kérdés a *T. contraversa* névhasználata. Leírója, Kühn az eredeti „*contraversa*” megnevezést ortográfiai hibának tartva, saját magát tévesen korrigálva, „*controversa*”-ra módosította, a szakirodalomban pedig így terjedt el széles körben. Míg Magyarországon PODHRADSKY (1962) nyomán a „*Tilletia contraversa*” helyes névhasználat a szokásos (KÖVICS 1997).

A *Tilletia intermedia* olykor előfordul a *Tilletia caries* és a *T. laevis* közös elterjedési területein, valószínűleg azok hibridjeként, a kettősen fertőzött növények kalászában (VÁNKY 1994). Elterjedése: Törökország, Románia, Magyarország.

A *T. contraversa* eredetileg az *Agropyron*-fajok kőüszögjeként ismert faj. Azután, amikor 1935-ben Young az Egyesült Államokban megtalálta búzán a törpeüszögöt, a búzán okozott kártétele miatt az érdeklődés és a kutatások ráterelődtek erre a gombára (UBRIZSY 1965). A törpeüszög Kelet-Európában elterjedt betegség, de már Svédországban is felfedezték a jelenlétét (GAIR et al. 1983).

A *T. contraversa* 1952 óta ismert hazánkban (HORVÁTH 1995), herbáriumi példányok szerint azonban már az 1920-as években is jelen volt. Gyakorlatilag az egész ország búzatermő területe fertőzött volt (SZEPESSY 1977). 1955-ben és 1957-ben erősebben jelentkezett Zemplén, Szatmár, Hajdú, Heves és Szolnok megyékben. Ezek után visszaesett jelentősége, újabb járványa 1964-ben volt Baranya megyében, ahol 20%-os fertőzést mutattak ki (UBRIZSY 1965). Elsősorban azért veszélyes, mert vetőmagcsávázással nem lehet ellene teljes hatékonysággal védekezni, a csávázás az esetben lehet részben eredményes, ha szisztemikus, hosszabb hatástartamú fungicideket alkalmaznak (HORVÁTH 1995).

A *T. caries* nagy jelentőségű kórokozó, világszerte előfordul főként őszi búzán, míg a *T. contraversa* előfordulása nagyobb valószínűséggel azon területekre korlátozódik, ahol hosszabb ideig hótakaró fedi az őszi vetésű gabonákat, ezek a következők: Amerikai Egyesült Államok, Kanada, Közép- és Kelet-Európa, Közép-Ázsia, Argentína és Uruguay (MURRAY et al. 1998).

Azt, hogy a *T. caries* milyen károkat eredményezhet, jól illusztrálja az 1948. évi nagy kőüszög-járvány, amikor búzáink kőüszög-fertőzöttsége országosan 22% volt, az általa okozott termésveszteség pedig 400 ezer tonna (PODHRADSZKY 1968). A negyvenes-ötvenes években elterjedt vetőmagcsávázás azonban jelentős mértékben visszaszorította az üszögfertőzöttséget. Ekkor terjedt el a rézgálicos csávázás mellett szélesebb körben a szerves higany, HCB, PNCB, és a TMTD hatóanyagok használata.

A gazdaságos üzemméretek, intenzívebb gabonatermesztés kialakulását követően (1960-as évektől) a gabonaüszög teljesen visszaszorult, elsősorban a kedvező agrotechnikai módszereknek (pl.: optimalizált tápanyagellátás, csávázás, precízebb technológia) köszönhetően.

A mai helyzet viszont némi visszalépést jelent az 1970-es és 1980-as évekhez képest mind a termelés színvonalát, mind az agrotechnikai igényességet illetően. A fajták terméspotenciálja, a gépesítés színvonala tulajdonképpen azóta is fejlődött, de miután a termelés bizonyos szegmensei kiestek a gazdasági szakirányítás hatásköréből (kis és gazdaságtalan üzem- és táblaméretek, csávázás elhagyása, kényszergazdálkodás, stb.), a gabonaüszög ismét felütötte a fejét. Az 1990-es évek közepétől egyre gyakrabban lehet találkozni a por- vagy kőüszög-fertőzést mutató gabonatáblákkal (TÓTH 2006), viszont a törpeüszög nem lépett fel az utóbbi 10-15 évben, azután a közelmúltban, 2011-ben egy alkalommal ismét felbukkant (HALÁSZ 2012).

SZUNICS L. és munkatársai (1996) leírása szerint a csávázószerek hatékonyságának köszönhetően a búzafajták üszögökkel szembeni ellenállóságát hazánkban nem vizsgálták. Az évtizedek óta kötelezően előírt és szakszerűen végrehajtott vetőmagcsávázás ugyanis, ahogy azt az előbbieken is leírtam, teljesen visszaszorították a fertőzést. Miután később az esetenként elmaradó csávázás miatt a *Tilletia*-fajok újból megjelentek, 1986-ban beindították Martonvásáron a búzafajták kőüszöggel szembeni ellenállóságát értékelő mesterséges fertőzési kísérleteket (SZUNICS LU. és SZUNICS L. 1990; VEISZ et al. 1997 a, b; VEISZ et al. 2000). Tapasztalataik szerint csak néhány törzs volt nagyon ellenálló, ezek agronómiai értéke azonban viszonyaink között csekély. A minősített fajták között nem volt rezisztens, és a durumbúzák ellenállósága sem jobb a kenyérbúzáénál. Mivel Magyarországon a kőüszöggel szemben nem nemesítettek, az ellenálló vagy mérsékelten ellenálló fajta csak a véletlen eredménye. A kőüszöggel fertőzött növények télállósága gyengülhet. Ennek következtében, ha fokozottabb a téli kitettség, ugyanazon fajta fertőzött növényeinek lényegesen nagyobb hányada válik a betegség martalékává, mint a nem fertőzöttekének. Az évjárat genotípusra gyakorolt hatásában is találtak különbséget.

Az üszög közvetlen kártétele a termésveszteség (mennyiségi kár), közvetett kártétele pedig a szükséges védekezés többletköltsége és az üszögös gabonaőrlemények minőségi romlása (PODHRADSKY 1968; SZUNICS LU. és SZUNICS L. 1990). A termésveszteség mértéke körülbelül megegyezik az üszöggel fertőzött kalászok százalékos arányával. Ha egy kalász csupán részlegesen fertőzött az üszögpuffancsokkal, akkor is csökken az értéke és a végtermék eladhatósága, ugyanis az üszöggel fertőzött búzatétel átható romlott halszagú (a trimetil-amin szerves vegyület jelenlétének következtében) és sötétebb színezetű. A fertőzött szemek aszottak, kisebb lesz a súlyuk és a csírázókéességük is csökken. A teliospórák aratáskor szóródhatnak, amikor az üszögpuffancsok mechanikai behatásokra szétrepednek, ha pedig épek maradnak, a learatott terménnyel együtt a tárolóba kerülnek (MURRAY et al. 1998). A cséplés folyamán kikerülő üszögspórák tűzveszélyesek, így robbanások, tüzek keletkezhetnek a kombájnból esetlegesen kipattanó elektromos szikrák hatására (WIESE 1998). Az üszöggel szennyezett termés felhasználásával kapcsolatos kutatások ellentmondásos eredményeket hoztak, és a „legfrissebb” eredmények is az 1980-as évekből származnak. Lehetségesnek tartják, hogy a spórákat nagyobb mennyiségben fogyasztva, azok emésztési és idegzavarokat okozhatnak, illetve a spóratömeg belégzése allergiás tüneteket válthat ki (UBRIZSY 1965; SZUNICS LU. és SZUNICS L. 1990).

Egyes tanulmányok szerint a *Tilletia*-fajokkal fertőzött liszt és táp nem toxikus az emberek illetve állatok számára, bár, jobb körülményeknek lenni, hiszen meglehetősen kevés kutatási eredmény áll rendelkezésre a témában. A fiatal állatokkal feletetett üszögös búza

megmérgezhetheti azokat (PODHRADSZKY 1968). Mindemellett a kísérletben szereplő állatok (borjak, kecskék és juhok /APPEL et al. 1911/) bélcsatornáján keresztüljutott kőüszög teliospórák, valamint azon teliospórák, melyek specifikus trágyakezelésen estek át egyaránt elvesztették csírázókéességüket (PODHRADSZKY 1968). HOFFMAN és PURDY (1964) szerint a földigiliszta-ürülékből izolált *T. contraversa* teliospórák csírázókéessége nem csökkent szignifikáns mértékben. Kifejlett szöcskéket, Holstein tehenet és nőtény leghorn csirkéket vizsgálatba vonva SMILANICK és munkatársai (1986) azt tapasztalták, hogy a bélcsatornán átjutott üszögspórák (*T. caries*, *T. contraversa* és *T. indica*) megőrizték csírázókéességüket, bár a csírázási erélyük valamelyest csökkent. BAUDYS (1921) saját magán és állatokon (nyulak, csirkék és egerek) végzett kísérletei során megállapította, hogy a teliospórák általában véve nem mérgezőek (PODHRADSZKY 1962). Más vélemények alapján a nagy mennyiségben elfogyasztott üszögspórák hasmenést, idegrendszeri bántalmakat okozhatnak, belégzésük pedig allergiás reakciót válthat ki (UBRIZSY 1965). Naprakész irodalmi adatokat alapul véve elmondható, hogy a teliospórák nem toxikusak a lábasjóságokra, bár egyes esetekben a nagy mennyiségben fogyasztott üszög- illetve rozsdaspórák allergiás reakciót okozhatnak (CFIA 2009).

2.1.2. A hazánkban előforduló *Tilletia*-fajokhoz kapcsolódó növény-egészségügyi szabályozás

A *T. contraversa* Kína búzatermő területein nem őshonos, így a kínai hatóságok 1973-ban zéró toleranciát rendeltek el a *T. contraversa* teliospóráival fertőzött búzaimportszállítmányokra. Egy éven belül, ennek a karantén intézkedésnek köszönhetően, betiltották az Egyesült Államok északnyugati, Csendes-óceán partmenti államaiból történő importot a búzátételek esetleges fertőzöttségének veszélye miatt (RUSSEL és MILLS 1994). A kínai példát követve, azóta már számos ország tiltja a *Tilletia*-fajokkal fertőzött búzaszállítmányok bevitelét. Kína mellett 14 ország (Algéria, Brazília, Kanada, Csehország, Szlovákia, India, Macedónia, Marokkó, Új-Zéland, Paraguay, Lengyelország, Dél-Afrika, Tunézia és Törökország) rendelkezik hatósági szabályozással a *T. contraversa*val fertőzött importszállítmányokkal szemben. A kórokozó jelenlétét ezen országok nem mindegyikében mutatták ki (PETERSON et al. 2009). A PETERSON és munkatársai (2009) által kifejlesztett *T. contraversa*-kockázatelemzési (TCK) modell révén több országot (Brazília, Peru, Mexikó) sikerült meggyőzni arról, hogy törölje el a kórokozóval szembeni hatósági szabályozását, illetve Kína 34 év embargót követően felállított egy *T. contraversa* fertőzöttségi tűrészatárt az importszállítmányok tekintetében. Az exportszállítmányok lehetséges visszautasítása miatt

Magyarországon is évente történik felderítés a *T. contraversa*-mentesség igazolásának érdekében. Az éves felderítést a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal (NÉBIH) Növény-, Talaj- és Agrárkörnyezet-védelmi Igazgatóság, Növény-egészségügyi és Molekuláris Biológiai Laboratóriuma (NMBL) végzi.

2.1.3. A hazánkban előforduló *Tilletia*-fajok biológiája és morfológiája

A *T. caries* és *T. contraversa* fejlődésmenete hasonló, elsősorban a megjelenésük idejében különböznek, mely a következőkben leírt főbb tényezők függvénye. Ezek a kórokozók teliospórák formájában maradnak fenn a talajban vagy a magok felszínén. A *T. caries* mageredetű teliospórái az elsődleges fertőzési források a világ legnagyobb részén, míg a talajeredetű fertőzés ott lép előtérbe, ahol a száraz nyár folyamán az alacsony nedvességtartalmú talajban fennmaradó teliospórák az őszi vetésű gabonán csírázni kezdenek. A járványszerű *T. contraversa* fertőzés nem mageredetű, hanem szinte kizárólag talajeredetű forrásokból származik. A csírázó teliospórák elsődleges bazídiospórákat (sporídiumok) képeznek. A sporídiumok párosával plazmogámia formájában egyesülnek dikariotikus (kétsejtmagvú) hifát fejlesztve, amely a koleoptil szárrészen keresztül megfertőzi az időközben kialakult csíranövényeket. A fertőzést követően a gomba együtt növekszik a növényvel a kalászkezdemény kifejlődéséig, és a tenyészőcsúcsba hatol. A gombahifák a fiatal ováriumban a növény szövet helyét töltik ki, és később üszögspórákká darabolódnak fel. A betegség tünetei a szárba indulás kezdetétől válnak láthatóvá. A *T. caries*-szel fertőzött növények kissé alacsonyabbak lehetnek az egészségeseknél, viszont a *T. contraversa*-fertőzés esetén a növények jelentősen törpülnek (egyharmad, egynegyed méretűre). Mindkét üszögfajra érvényes, hogy a fertőzött kalászcsoportok hosszabb ideig maradnak zöldek, a toklások pedig szétnyílnak, láthatóvá téve az üszögpuffancsokat, borzas megjelenést kölcsönözve. Az üszögös kalász egyes búzafajok esetében megnyúlik, másoknál megrövidül. A kalászban a szemek száma is emelkedhet. Az is gyakori, hogy a szálcás búza fertőzött kalásza tar, vagyis a fertőzés képes megváltoztatni a fajtajelleget. Az üszögpuffancsok hasonlítanak a magokra, de sokkal inkább kerekdedek és sötét szürkés-zöldes színűek. Az üszögspórákkal telt puffancs éréskor szürkésbarna lesz, és apró, szabálytalan ráncok képződnek rajta. Az érett üszögös szem olyan könnyű, hogy úszik a víz felszínén. Az aratás során felrepedő puffancsok szennyezik az egészséges búzaszemeket. A teliospórák széllel, fertőzött maggal és talajjal is terjedhetnek. Az 1. és 2. ábrák a *T. caries* és *T. contraversa* által fertőzött kalászcsoportok képét mutatják.



1. ábra A *Tilletia caries* által okozott tünetek búzakaraláson. (Saját felvétel.)



2. ábra A *Tilletia contraversa* által okozott tünetek búzakaraláson. (Forrás: jobb: William M. Brown Jr., Bugwood.org, bal: Mary Burrows, Montana State University, Bugwood.org)

A *T. caries* teliosporái 5–15°C-os talajhőmérséklet és megfelelően magas talajnedvességtartalom mellett 5–8 nap alatt csíráznak. Az elsődleges fertőzési hely a koleoptil. A *T. contraversa* teliosporáinak csírázáshoz szükséges hőmérsékleti optimuma alacsonyabb (3–8°C), és hosszabb inkubációs időt (3–10 hét) igényelnek. Egy hosszabb ideig tartó nagyon kis intenzitású megvilágítás is elengedhetetlen a kifejlődésükhöz. Az északi félteke búzatermesztő területein a csírázás legtöbbször a decembertől február–áprilisig tartó időszakra tehető, amit az összefüggő hótakaró is elősegíthet. A fertőzés létrejöhet a hó és a talajfelszín érintkezésénél, ha a

hó a meg nem fagyott talajra hullik, és ottmarad több hónapig keresztül. A spórák csírázása 15°C-on már gátolt. A *T. contraversa* megjelenésére 300–1000 méteres tengerszint feletti magasságokban lehet számítani, és olyan években, amikor gyakori a hóesés, komoly járvány alakulhat ki. A levegőtlen, tömődött talaj és a sekély vetésmélység is elősegíti a *T. contraversa*-fertőzést. A gomba növénybe hatolása a fiatal száron keresztül történhet a hótakaró alatt a talajfelszínen vagy annak közelében. A 2–3 lomblevelés állapotú növények a legfogékonyabbak a fertőzésre. A *T. contraversa* teliospóriái 10 évig is fennmaradhatnak a talajban, sőt a baromfi és sertés bélrendszerén átjutva is megtartják életképességüket. Ezzel szemben a *T. caries* üszögspóriái kevésbé ellenállóak, rendszerint 1 évnél tovább nem tudnak fennmaradni a talajban (OEPP/EPP0 1982; COOK és VESETH 1991; FAO/IPGRI 1995; MURRAY et al. 1998; WIESE 1998; BÁN 2006).

A *T. laevis* szintén csíranövény-fertőző. A spórák csírázókéességüket 11–25 évig is megőrizhetik (LOWTHER 1950). Az üszögspóra csírázási optimuma 16–18°C. Igen száraz talajban a spórák éppúgy nem csíráznak, vagy csak későn és abnormálisan, mint a vízgőzzel telítettben. OLGYAY (1935) szerint a 40%-nál nagyobb talajnedvesség a spórák normális csírázását csökkenti vagy hemibazidiumos csírázást okoz (ugyanakkor a búza csíranövénykéjének fejlődése felgyorsul). A spórák nagy mennyiségű oxigént igényelnek a csírázáshoz. Kellő oxigénellátás mellett a spóra még desztillált vízben is kicsírázik (RABIEN 1928). RABIEN (1928) azt is kimutatta, hogy az erős fény gátolja a spórák csírázását, a savas kémhatású talaj pedig kedvezőtlenül befolyásolja a csírázást. HULEA (1947) szerint a legkedvezőbb a 8,5–9 pH-jú talaj.

Általánosan érvényes mindhárom *Tilletia*-faj fertőzőképességével kapcsolatban, hogy a vetésidő és –mélység jelentősen befolyásolhatja kedvező vagy kedvezőtlen irányban a fejlődő gazdanövény fogékony stádiumát (SZEPESSY 1977).

A *Tilletia* spp. teliospóriáinak kettős burka van. A külső spórafalon sokszögű hálózatos rajzolat látható, ami az exosporium léces vastagodásából adódik. A spórák tehát fénymikroszkópban a magas lécek miatt tüskésnek tűnnek. A *T. contraversa* mindenekelőtt a spórák méretével, zselatinszerű, vastag kocsonyás burokkal és a spórafal magasabb lécezottságával különbözik a *T. cariestől*. A hialin nyálkás burok, és a magas lécezottság minden bizonnyal szoros összefüggésben van a törpeüszög fertőzőmódjával, biológiájával. Szerepük lehet például abban, hogy a spórák ellenállóbbak, és a talajban hosszabb élettartamúak, mint a kőüszögök. A burok egyrészt a külső hatásoktól védi a plazmát, másrészt a kiszáradását és a trimetilamin eltávozását is gátolja. A spóratömeget összeragasztja, így egy tömegben hosszabb ideig fertőzőképesek maradnak a talajban, és átvészelik az esetleges hosszú időt a fertőzésig, jobban, mint a különálló, magányos spórák. A kőüszögnél erre nincs szükség, a spórák

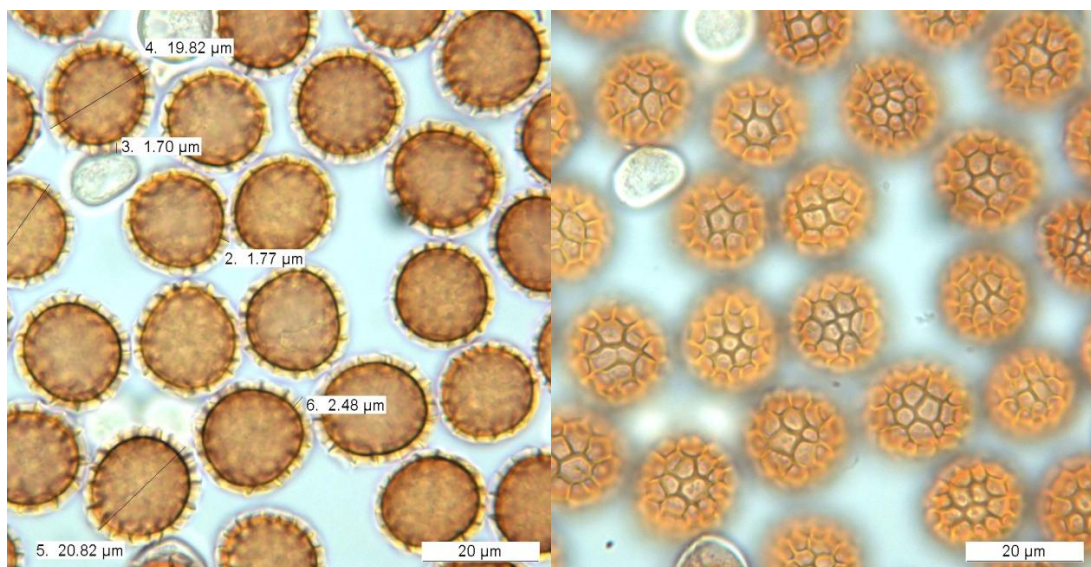
szétporoznak, és a mag felületére tapadva pár hónappal később már alkalmuk nyílik, hogy a búza-csíránövényt megfertőzzék (PODHRADSKY 1962).

A *T. caries* és *T. contraversa* teliospóráinak nagyfokú hasonlósága megnehezíti a növény-egészségügyi vizsgálatok elvégzését (MURRAY et al. 1998). A *T. caries* üszögpuffancsai hasonló méretűek, mint az egészséges búzaszemek (4–8 mm hosszúak). A spóratömeg porszerű, vörösesbarna-sötétbarna színű és bűzös szagú. A *T. caries* spóráinak (3. ábra) alakja gömbölyű, néha szélesen elliptikus, ritkán szögletes. Méretük 16–20 μm (14–25 μm). A spórák fala lécesen vastagodott, és a lécek sokszögű, 5–8 szögű mezőcskéket határolnak (a mezőcskéek 2,5–6 μm szélesek). A mezőcskéket határoló lécek kiemelkedők, magasságuk 0,5–1,5 μm . A spórafal világosbarna, átlátszó, a hialinburok nélküli *T. caries* teliospórái kisebbek a burokkal rendelkező *T. contraversa* teliospóráinál. A puffancsban steril, szintelen spórák is találhatóak. Ezek alakja gömbölyű, elliptikus vagy tojásdad, faluk vékony, sima vagy gyengén hálózott, átmérőjük 10–20 μm (a legtöbb 13 μm körüli). (CAB 1981; BÁNHEGYI et al. 1985; VÁNKY 2012).

A *T. contraversa* üszögpuffancsai rendszerint minden magházat megfertőznek, gömbölyűek vagy szélesen elliptikusak, terméshéjjal fedettek; kifejlődve porszerű az állaguk, de éretlen állapotban kemények, összetapadtak; sötét vörösesbarna-feketésbarna színűek és bűzös szagúak. Méretük 3,3 x 3,2 mm (WARMBRUNN 1952), illetve 3,9 x 1,9 mm (PODHRADSKY 1962). A teliospórák fala a *T. caries*éhez hasonlóan lécesen vastagodott, a lécek jellemzően szélesebbek és magasabbak. A *T. contraversa* teliospóráinak (4. ábra) színe sárga, vörösesbarna (érett állapotban jellemzően még sötétebb), formája gömbölyded, mérete változó: 16,8–21 μm x 18–32 μm . Az érett spórákat hialin, zselatinszerű burok veszi körül, mely 1,5–4 μm vastagságú lehet. A spórák fala 1,5–3 μm magas lécektől recés. A lécek által határolt sokszögű mezőcskéek mérete 3,5 μm . A mezőcskéek felülnézetben hálózatos rajzolatúnak, a lécek pedig a kerületen tüskésnek látszanak. A spórákon átlós irányban 5–6 (4–7) mezőcske számolható. A steril sejtek kisebbek a normál teliospóráknál. Gömbölyűek, sima a faluk, hialinok vagy halvány zöldes-szürkés színűek, legtöbbször 2–4 μm vastag zselés burokkal határoltak, méretük a burkot is beleértve 11–16 μm (9–22 μm) (BÁNHEGYI et al. 1985; WIESE 1998; VÁNKY 2012).



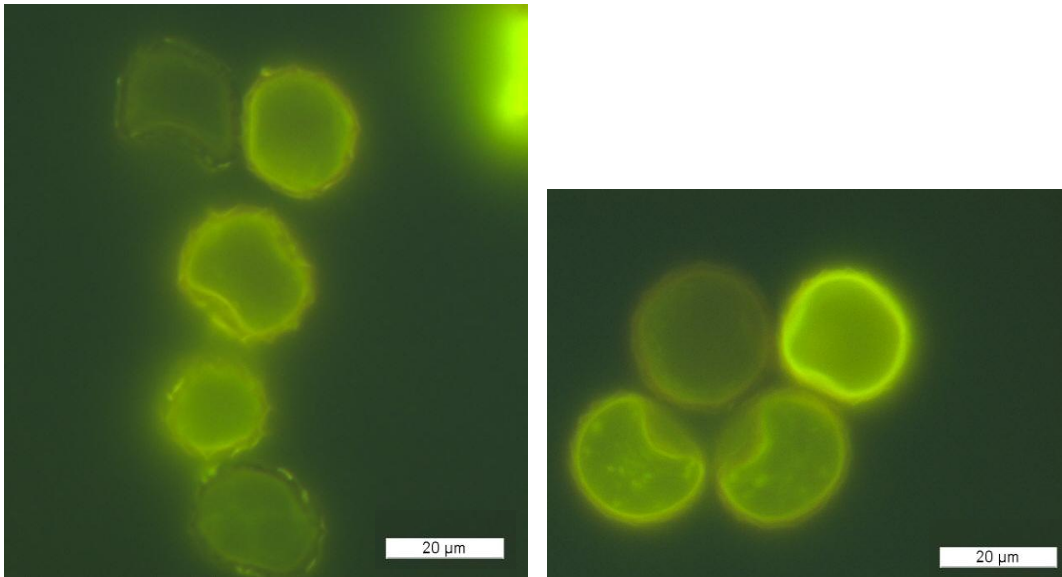
3. ábra A *Tilletia caries* teliospóráinak fénymikroszkópos képe. Bal: egyenlítői síkban, jobb: felszíni nézet. (Saját felvétel.)



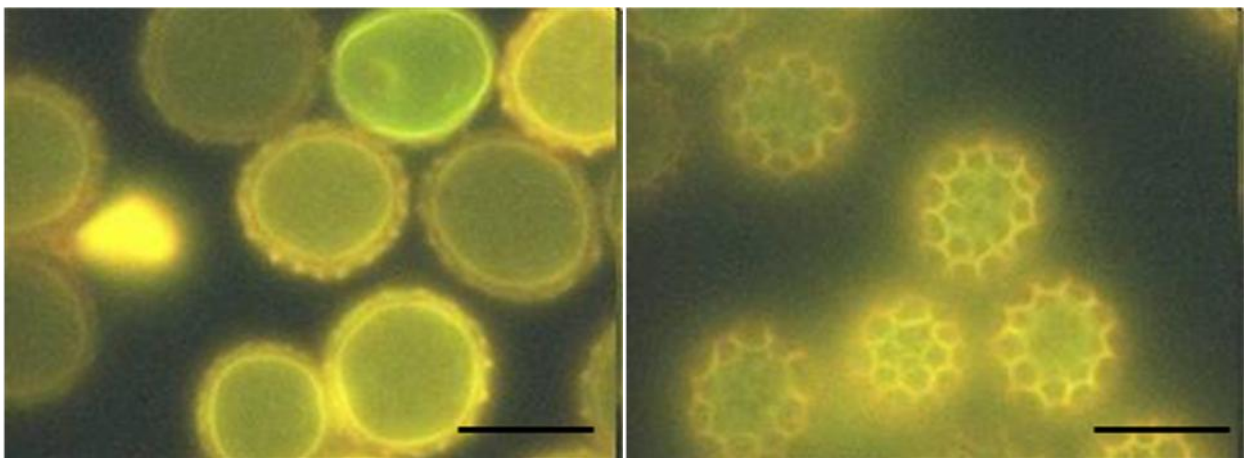
4. ábra A *Tilletia contraversa* teliospóráinak fénymikroszkópos képe. Bal: egyenlítői síkban, jobb: felszíni nézetben. (Saját felvétel.)

A két faj teliospórái eltérő fényvisszaverő tulajdonságokkal rendelkeznek. A *T. contraversa* fluoreszcens fénymikroszkóppal nézve sárgás-narancssárgás színnel fluoreszkál, a lécesen recézett falszerkezet a spóra területén tüskék formájában látható, míg felülnézetben hálózatos rajzolatú a spórák felszíne. Ezzel szemben a *T. caries* teliospóráin mindez nem figyelhető meg: a *T. caries* recés falszerkezete nem fluoreszkál, a spórák szerkezete immerziós olajba merítve roncsolódik, alaktalan lesz, de a citoplazmában jól megfigyelhetők a fluoreszkáló testek pontok formájában (RUSSEL és MILLS 1994). PRIEKULE (2007) megfigyelése szerint a

T. contraversa belső spórafala sárgán fluoreszkál, és a teljes citoplazma is sárgás-zöldes színű. (5. és 6. ábra)



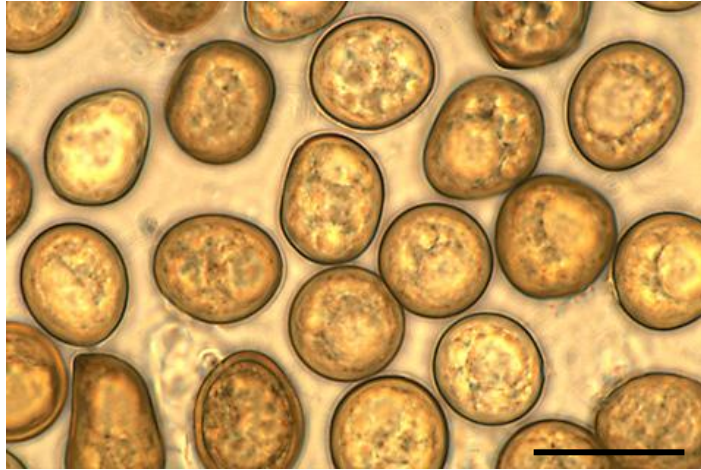
5. ábra A *T. caries*-teliospórák fluoreszcens fénymikroszkópos képe. Bal: egyenlítői síkban, jobb: felszíni nézet. (Saját felvétel.)



6. ábra A *T. contraversa*-teliospórák fluoreszcens fénymikroszkópos képe. Bal: egyenlítői síkban, jobb: felszíni nézet (bar = 20 µm). (Saját felvétel.)

A *T. laevis*-t sima kőüszögnek is nevezik sima felületű teliospórái miatt. Ez a tulajdonsága is hozzájárul, hogy a *T. contraversa* és *T. caries* fajoktól könnyen elkülöníthető. A zsíros vagy kőüszög nevet onnan kapta, hogy a még meg nem keményedett spóratömeg lágy, ujjaink között szétnyomva tapadós, „zsíros”. A búza kalászában a *T. laevis* a szem helyén a maghéj által burkolt, spóratömeggel telt puffancsban fejlődik. A *T. laevis* teliospórái (7. ábra) tömegben feketés olajbarna színűek. Alakjuk változatos: gömbölyű, elliptikus, tojásdad, sőt szögletes is lehet. Méretük 14–17 µm x 16–24 µm. A teliospóra fala halványbarna sárgás

árnyalattal, felülete sima (falvastagsága 0,6–1,0 μm). Kisebb-nagyobb szemcséket és olajcseppeket tartalmaz, legtöbbször egy nagy olajcsepp foglalja el a sejtüreg nagy részét. A steril spórák vékonyfalúak, hialinok, 11–18 μm átmérőjűek (BÁNHEGYI et al. 1985; VÁNKY 2012).



7. ábra *T. laevis* teliospórák fénymikroszkópos képe (bar = 20 μm). (Fotó: M. Babadoost)

2.1.4. A hazánkban előforduló *Tilletia*-fajok elkülönítése hagyományos módszerekkel

A *T. contraversa* és a *T. caries* elkülönítésére jelenleg használt tulajdonságok, vagyis - a csírázáshoz szükséges optimum hőmérséklet, a teliospórák falának morfológiája, a betegség tünetei – a természetes populáción belüli változékonyság miatt, külön-külön felhasználva, az azonosítási folyamatban eleve kizárják a megbízható eredményt (RUSSEL és MILLS 1993). A csírázási teszt megfelelő módszer a két faj életképes teliospóráinak elkülönítésére, bár hátrányként említendő, hogy több hetes inkubációt igényel (STOCKWELL és TRIONE 1986). A fénymikroszkópos vizsgálathoz pontos morfológiai leírások állnak rendelkezésre a *T. contraversa* és a *T. caries* megkülönböztetésére, de jelentős mértékű átfedések vannak a mérettartományokban, ami nehezíti az azonosítást, különösen kevert fertőzés esetén (TRIONE és KRYGIER 1977; STOCKWELL és TRIONE 1986). A *T. contraversa* és *T. caries* morfológiai elkülönítése során figyelembe kell venni azt a tény, hogy kb. 10%-os átfedés van a *Tilletia*-fajok léces falszerkezetében megfigyelhető tüskék méretében, így az egyes spórák meghatározásakor a 1,5 μm vastagságú zselatin burokkal rendelkező és rövid tüskéjű *T. contraversa* teliospórák hibásan *T. caries*ként azonosíthatók (GOATES 1996). LIANG és munkatársai (1982) a két fajt a lécesen vastagodott falszerkezet mérete, a zselatinszerű burok vastagsága és a csírázási teszt alapján 70%-os hatékonysággal tudták elkülöníteni. További problémát jelenthet, hogy a *T. fusca* komplex részét képező *T. bromi*, melynek nem gazdanövénye a búza, de a gyomnövényeket fertőzi (*Bromus* spp. és *Festuca* spp.), összetéveszthető a *T. contraversa*val (ZUPUNSKI et al.

2011). Ráadásul a fentebb felsorolt technikák rendkívül időigényesek, ezért a rutin diagnosztikában kevésbé hasznosíthatók. A két faj fluoreszcens fénymikroszkópos elkülönítését azért ajánlják, mert a spórák a vizsgálat után is életképesek maradnak, tehát alkalmasak a csírázási tesztre. Ha a fluoreszcens mikroszkópos tulajdonságokat vesszük alapul, akkor a teliospórák nagy biztonsággal elkülöníthetők az alábbi jellemzők alapján: a *T. caries* teliospórák immerziós olajba merítve deformáltak és a citoplazmájuk fluoreszkáló gömböket tartalmaz, a *T. contraversa* teliospóráinak fala sárgásan fluoreszkál (STOCKWELL és TRIONE 1986).

2.1.5. Az Európában nem honos, de gazdaságilag jelentős zárlati *Tilletia indica* üszöggomba jellemzőinek áttekintése

A *Tilletia indica* Mitra üszöggombát 1930-ban Indiában (Karnal, Punjab) fedezték fel, nevét a találat helyéről kapta. A betegséget egészen az 1970-es évekbeli járványig jelentéktelennek tartották. A *T. indica* őshonos az indiai szubkontinensen (Pakisztán, Nepál, India). Innen indult meg terjedése Mexikó (1970-es évek eleje), Szíria (1983), Brazília (1995), az Egyesült Államok délnyugati része (1996), Irán (1997) és Dél-Afrika (2000) területére (TAN et al. 2013). A betegség megjelenéséről Irak, Afganisztán és Libanon térségéből is hírt adtak, de ezt azóta nem erősítették meg szántóföldi előfordulási adatokkal. A *T. indica* szigorú hatósági szabályozás célpontja több mint 70 országban, jelenléte kereskedelmi korlátozások bevezetését vonja maga után (RUSH et al. 2005; SANFORD et al. 2008). A kórokozó zárlati státusza a megjelenését követő indirekt gazdasági következmények miatt van, nem pedig a károsítás mértéke indokolja (JONES 2009).

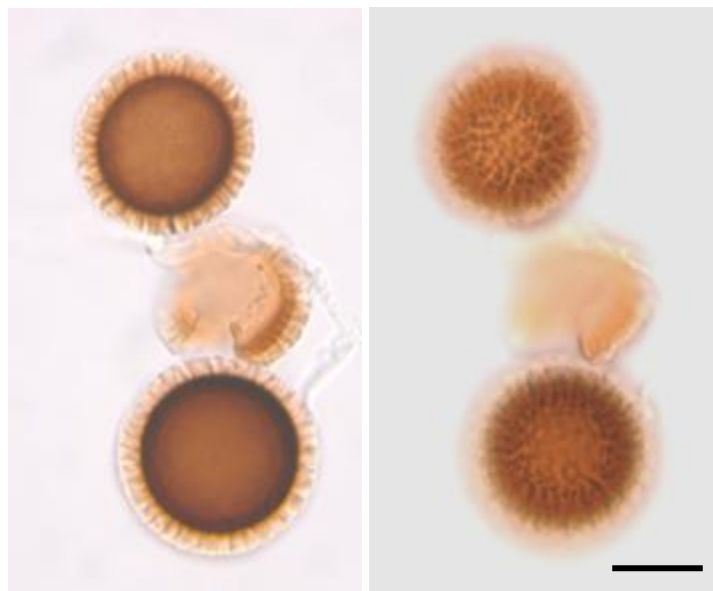
A kis foltban sérült szemekből normális növények fejlődnek, míg az erősebb fertőzés csökkenti a magok csírázókéességét, és gyenge, torzult növények fejlődnek (RAI és SINGH 1978; SINGH 1980; BANSAL et al. 1984). A betegség súlyosbodásával az ezerszem tömegben csökkenés figyelhető meg, de a termésveszteség általában nem számottevő (MUNJAL 1975; BRENNAN et al. 1990). Ezt az is alátámasztja, hogy járványos években Indiában a termésveszteség mindössze 0,3–0,5% között volt (viszont a szemfertőzöttség aránya néhány esetben 89%-os volt) (JOSHI et al. 1983). A *T. indica* a lisztminőséget is rontja: szín, szag, íz tekintetében már 1–4%-os fertőzöttségi szint is elfogadhatatlan. Kis mennyiségű spórafertőzés is sötét színűvé és elviselhetetlenül bűdössé teszi a lisztet (a szag a trimetilamin tartalomból ered, ami a többi *Tilletia*-fajra is jellemző). Öt százalékos fertőzöttség esetén a minőség jelentősen leromlik (SEKHON et al. 1980), csökken a gluténtartalom és más kémiai összetevők aránya is változik. A mexikói hatósági szabályozás szerint 3%-os vagy e feletti fertőzöttségi szint esetén nem használható fel a gabona malomipari célokra, de takarmányként eladható (FUENTES-

DAVILA 1996). További korlátozás, hogy azon a területen, ahol 2% feletti volt a *T. indica* fertőzöttség, tilos kenyérbúzáat vetni. Zárlati intézkedések más országokban is életben vannak a *T. indicával* szemben. Az Egyesült Államok tiltja a Mexikóból való búzaimportot, a kísérleti célú behozatalra pedig szigorú szabályok érvényesek (ANON 1983; COOPER 1983). A szállítmányokat laboratóriumi vizsgálattal ellenőrzik, hogy ezzel elsődlegesen meggátolják a kórokozó új területekre való behurcolását, vagy pedig intézkedéseket léptetnek életbe annak érdekében, hogy felszámolják a kórokozót vagy a terjedésében gátolják. A *T. indica* kórokozóra Magyarországon is érvényben van az éves hatósági felderítés, melynek célja, hogy igazoljuk a *T. indicá-tól* való mentességet.

A jelenlegi diagnosztikai protokoll a fajsztíű meghatározást a teliospórák morfológiája, csírázási tulajdonságai, illetve a molekuláris biológiai módszerek alapján javasolja. A felderítések, exportvizsgálatok során gyűjtött nagy mennyiségű minta vizsgálatokor a detektált *Tilletia*-fajok morfológiai elkülönítése, meghatározása munka- és időigényes és gyakorlott szakértői szemeket igényel. A búzatételekben a *T. indica* (8. és 9. ábra) mellett általában előforduló további két faj a *T. walkeri* és a *T. horrida*. A rendszertani besorolás során alkalmazott tulajdonságok a három faj esetében nagyfokú átfedést is mutatnak, így, ha csak néhány spóra áll rendelkezése, nehézkes a fajsztíű elkülönítés. A spórák táptalajon való csíráztatása abból a célból, hogy a kifejlődött micéliumból DNS-t nyerjenek ki a morfológiai azonosítás eredményének molekuláris módszerrel történő megerősítéséhez, újabb 14 napot igényel a diagnosztikai vizsgálat során (TAN et al. 2013).



8. ábra A *Tilletia indica* által okozott tünetek búzakaraláson (bal) és búzaszemeken (jobb).
(Forrás: bal: Ruben Durán, Washington State University, Bugwood.org; jobb: Department of Plant Pathology Archive, North Carolina State University, Bugwood.org)



9. ábra A *Tilletia indica* teliospóráinak fénymikroszkópos képe egyenlítői síkban (bal) és felszíni nézetben (bar = 20 μ m). (Saját felvétel.)

A *T. indica* Európában való megtelepedésének esélye a legfrissebb irodalmi adatok alapján csekélynek mondható. Kétséges, hogy a megfelelő mennyiségű *T. indica*-teliospóra elég hosszú ideig életképes marad-e a talaj felszínén európai időjárási viszonyok között, valamint,

hogy összehangolódik-e a búza virágzása és a gomba csírázásának időszaka. A *T. indica* ugyanis a gazdaságilag jelentős, Európában honos egyéb üszögfajokkal szemben virágfertőző. Továbbá az Európában engedélyezett búzafajták csaknem kétharmada rezisztensnek vagy gyengén fogékonyak minősül a *T. indicával* szemben. Mindezek alapján alacsony mértékű minőségi és mennyiségi kártételre számítanak a kórokozó esetleges megtelepedése esetében (FUENTES-DAVILA 1996; JONES 2009).

2.2. Gabonátárolók aerobiológiai vizsgálata

A levegőbiológia (aerobiológia) a légkörben található vírusok, baktériumok, gombák, virágporok, magok, és élőlények által termelt kémiai anyagok vizsgálatával foglalkozó tudományág. Egyik leggyakrabban kutatott területe a levegő-mikológia (aeromikológia), melynek egyik legfőbb vizsgálati köre a levegőben található gomba eredetű részecskék, az ún. gombaelemek (spórák, konídiumok, micéliumdarabok) azonosítása. A levegőminták értékelésével nagy mennyiségű ökológiai és mikológiai ismerethez juthatunk a mikroszkopikus élővilág elterjedéséről és változásáról. A légkör és biológiai eredetű részecskéinek (bioaeroszolnak) vizsgálata mind növényvédelmi, mind közegészségügyi szempontból napjaink egyik legfontosabb környezetvédelmi kérdése (MAGYAR 2005).

A kül- és beltéri levegőből származó bioaeroszol döntő hányada - mintegy egynegyed része (MATTHAIS-MASER et al. 2000) - gombaeredetű részecskékből, főként spórákból adódik (COX 1987). A legtöbb humán- és növénykórokozó, valamint más gazdaságilag jelentős gomba jellemzően levegő útján terjed. Ahhoz, hogy megértsük és kezelni tudjuk a gombák által okozott emberi, állati és növényi betegségeket, meg kell ismernünk a gombaspóráknak való kitettség és a kórokozók hatása közötti kapcsolatot. A levegőminták vizsgálata során a hagyományos eljárások közé tartozik a közvetlen mikroszkópos meghatározás vagy a kitenyésztés. Mindkét módszer időigényes, nagyfokú szakértelmet, gyakorlatot igényel. A mikroszkópos azonosítás során két faj morfológiai jellemzői között jelentős átfedések lehetnek. Ha pedig nem áll rendelkezésre szelektív táptalaj az adott kórokozó kitenyésztésére, hasonlóan problémás esetben ütközünk, vagy fennállhat az is, hogy az adott kórokozót nem lehet táptalajon tenyészteni.

Levegő-mikológiai vizsgálatokat - légköri koncentráció, fajösszetétel és biometeorológiai elemzés - folytathatunk nyílt és zárt légterekben. A nyílt légterek vizsgálatát legtöbbször városokban és mezőgazdasági kísérleti területeken végzik, míg a beltéri vizsgálatokat lakásokban, irodákban, kórházakban, barlangokban, mezőgazdasági célból üvegházakban, malmokban és raktárakban folytatnak. A mezőgazdasági raktárak és malmok levegőjének

domináns alkotóeleme a gabonapor. A gabonapor egy komplex összetételű elegy, mely növényi részekből (pelyvadarabok, cellulózsálak, trichomák, fitolit, keményítőszemcsék, pollen), gombákból (spórák és micélium), aktinobaktériumokból, rovarlemekből, atkákból, rágcsálószőrökből és 12–18% szerves anyagból tevődik össze. A gabonaporok két típusba sorolhatók attól függően, hogy az aratáskor vagy a tároláskor keletkeznek. Az aratáskori por talaj- és növényrészecskékből, baktériumokból, gombaspórákból (*Tilletia*, *Ustilago* és *Puccinia* fajok (CADHAM 1924; HARRIS 1939; JIMENEZ-DIAZ et al. 1947; FARANT et al. 1973) épül fel, melyek a kalászból és a szalmából származnak. A tároláskor keletkező gabonaport az ún. raktári (post-harvest) penészgombák, főként *Aspergillus*- és *Penicillium*-fajok alkotják (HARRIS 1939; WILLIAMS et al. 1964; RIDDLE et al. 1968; CHANNELL et al. 1969; MIHAIL et al. 1969; LACEY 1971; POPESCU et al. 1975; MARTIN és SAUER 1975; DARKE et al. 1976).

2.2.1. A légkörben előforduló gombák egészségkárosító hatása

A gabonapor egy része a gabona mozgatásakor a levegőbe kerül. A gabonatárház dolgozói körében előforduló gabonapor okozta légzőszervi tünetek régóta ismertek (RAMAZZINI 1713; HARRIS 1939; LACEY 1980; MAGAN és LACEY 1988; MISHRA et al. 1992), egészségkárosító hatását már 1713-ban felismerték (TSE et al. 1980). Számos tanulmány született a témában, a légzőszervi megbetegedések, allergiás reakciók és egyéb tünetek felsorakoztatásával azon dolgozókról, akik munkahelyi ártalomként gabonapor belégzésének voltak kitéve (TSE et al. 1980). WILLIAMS és munkatársai (1964) írták le először a gabonapor egészségre gyakorolt hatásával kapcsolatos meglátásaikat, utalva a munkahelyi kitétségre, valamint arra, hogy a köhögés és légszomj (dyspnea) tünetek előfordulásának fokozódása mögött is ez állhat (BECKLAKE 1980).

Mindkét típusú gabonapor légzőszervi megbetegedéseket okozhat, főként gomba eredetű összetevői révén allergizálhat (COHEN és OSGOOD 1953; LACEY 1990; O'NEILL et al. 1991), azonban az aktinobaktériumok számbavétele is lényeges, mivel ezek szintén szerepet játszanak bizonyos betegségek, pl. a farmertüdő kialakításában (LACEY 1980). Amennyiben a légkör gyakran, ill. hosszabb ideig és nagy mennyiségben telített spórákkal, a légzőszervi megbetegedések kockázata fokozott mértékű. Ezek a körülmények a gabonaiparban adóttak. A kiszáradások és sérülések nyomán töredezett-aprózódott gombaelemek ráakódhatnak a légkör kisebb mérettartományú (1–2 μm) összetevőire (pl. szállópor). Az elhalt spóráknak nincs növényvédelmi jelentősége, azonban közegészségügyi vonatkozásait érdemes figyelembe venni. A tüdő szabad behatolási régiójának első szakaszába, a felső légutakba a 7 μm feletti részecskék is bejuthatnak (a legelterjedtebb allergén gombaelemek esetén ezek az *Alternaria*,

Drechslera, *Epicoccum*, *Stemphylium* spp.). A 4,7–7 μm közötti részecsketartomány kiülepedése a trachea területére esik (*Candida*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, bazidiospórák, *Botrytis*, *Fusarium*, *Monilia*, *Mucor*, *Stachybotrys*, *Torula*, *Ustilaginales*), míg ennél mélyebbre csak a kisméretű spórák (3,3–4,7 μm) az *Aspergillus*, *Phoma*, *Penicillium* spp. jutnak be. A bronchusok és alveolusok szintjét feltételezhetően csak gombatöredékek, vagy az allergénjükkel szennyezett finom por frakció érheti el (<3,3 μm). Az akut tünetekért általában az 5 μm -nél nagyobb, míg az idült reakciókért az ennél kisebb spórák felelősek. A mezőgazdasági dolgozók több ponton is kapcsolatba kerülnek a gabonaporrall: termesztés, aratás, szállítás, tárolás, feldolgozás (malomipar, takarmányipar, élelmiszeripar) során (MAGYAR et al. 2012).

A gabonapor mikrobiológiai jellemzőit, az izolálható fajokat befolyásolja a gabonanövény mikrobiális közössége, mely mind az érés, mind a tárolás során változik. Számos jelen lévő faj allergén, kórokozó vagy toxintermelő, és nagy valószínűséggel egy részük a légzőszervi megbetegedések kialakításában is fontos tényező. A gabonátételek mozgatásával nagy mennyiségű gombaspóra szóródik a levegőbe, melyek ekkor leggyakrabban farmertüdő betegséget, illetve hiperszenzitív tüdőgyulladást válthatnak ki a kitett dolgozókon (LACEY 1980).

A *Basidiomycetes* nemzetség több tagja aeroallergén faj, szerepet játszanak az asztma és az allergiás rhinitis kialakulásában (MORALES et al. 2006). Azok az emberek, akiknek a bőrtesztje pozitív lett az üszögspórákra, IgE antitestet termeltek a gomba-antigénekkal szemben (BURGE 1985; SANTILLI et al. 1985). A *Tilletia*-fajok allergenitására vonatkozóan azonban jelenleg nem áll rendelkezésre tudományos adat.

A gombák előfordulása fungicidek használatával, a gabonák aratás utáni szárításával (14% nedvességtartalom alá) és helyes kezelésével csökkenthető (LACEY 1980). A szellőztetés, takarítás és gépi porleválasztás eredményesen csökkentheti a spórakoncentrációt. A dolgozók védelmére szűrős álarcok vethetők be.

2.2.2. A légkörben előforduló gombák növény-egészségügyi vonatkozásai

A spórák egy része nemcsak humán-egészségügyi problémát okoz, hanem a gomba kifejlődése révén részt vesz a gabona minőségének, tápértékének, csírázóképeségének tárolás közbeni csökkentésében, és élelmiszer-biztonság tekintetében jelentős problémákat vethet fel mikotoxinok termelése révén (PANDIT et al. 1995).

A legtöbb gombafaj spórát juttat a levegőbe, melynek fizikai folyamatai biztosítják számára a terjedést. Számos aerobiológiai tanulmányban kimutatták az üszögspórák jelenlétét a légkörben, így Kuwaitban (HALWAGY 1989), Jordániában (SHAHEEN 1992), Indiában

(MISHRA 1987) és Svédországban (RUBULIS 1984) is. Egy Spanyolországban végzett kétéves kísérlet során Hirst-típusú térfogatos spóracsapdával 18 különböző bazídiospórát fogtak, melyek között az *Ustilago*-fajok nagy gyakorisággal fordultak elő (CROTZER és LEVETIN 1996; MORALES et al. 2006). HAMILTON (1959) megfigyelései szerint a *Tilletia*-teliospórák koncentrációja augusztus végén, szeptember elején tetőzik a levegőben. Mivel ezen spórák a száraz légköri spórák közé sorolhatók, az alacsony légnedvesség és a nagyobb erejű szél elősegíti, hogy nagy távolságokra terjedjenek el (HIRST 1953; LEVETIN 1995). Ezen levegőbiológiai eredmények mellett viszont nem áll rendelkezésre adat a teliospórák hazai gabonátárházak légterében való előfordulására.

2.2.3. A gombák szerepe a raktári ökoszisztémában

Aratáskor a növényi biomassza nagy része a gabonátárolókba jut magok formájában, ezek később vetőmagként, takarmányként vagy emberi táplálékként kerülnek felhasználásra. Sok kórokozó gomba a frissen learatott terménnyel kerül be a tárházakba. A magokon megtelepedő inaktív gombák a tárolás során megfelelő nedvességtartalom esetén – 0,65 vízakaktivitás felett – aktiválódnak, mint kórokozók, illetve lebontók (SINHA 1995). A gombák tárolt terményekre gyakorolt hatását két, emberek által irányított, napenergián alapuló rendszer megismerésével értelmezhetjük (SINHA 1995). Az első a mezőgazdasági ökoszisztéma a szántóföldön termő zöld gabonanövényekkel (aktív autotrófok), a második a gabonátárházak ökoszisztémája a nyugvó fenológiai stádiumban lévő magvakkal (inaktív autotrófok) és a heterotróf szervezetekkel (kórokozó és lebontó gombák, valamint ízeltlábúak). Mindkét rendszer folyamatosan ki van téve a levegő eredetű gombák és egyéb fertőzőanyag támadásának (SINHA 1995). Számos gombafaj csak az egyik, túlnyomó részt az agro-ökoszisztémában játszik szerepet, a tárolás során nyugalmi állapotban van: ezek például a szemek felületén megtapadó üszöggombák.

A maggal terjedő kórokozó gombák a szemek felszínén vagy belsejében maradnak fenn megváltoztatva a mag minőségét; életmódjukat az időjárás, a tároló felépítése és az emberi tevékenység is befolyásolja. A spórákat ezért aktív szereplőként kellene kezelni, nem pedig csak a terjedésben szerepet játszó komponensként (SINHA 1995).

Előfordulhat, hogy a kórokozó olyan bevonatot képez a növényen, amelyet nehéz eltávolítani, viszont másik részük olyan spórákat termel, mely az aratás során könnyen a levegőbe kerül. Ha az *Ustilago*-nemzetség tagjai nagy mennyiségben mutathatók ki a tároló levegőjéből, az a gabona erős fertőzöttségére utal, a spórák pedig átkerülhetnek a tételek mozgatásával más tételekbe is a légmozgás segítségével (LACEY 1980). A mozgatás során

keletkező por a tárolt termény felszínén gyűlik össze. A gabonaporból már izoláltak mind a szántóföldről származó (*Tilletia* spp.-t is), mind a tárolás során képződő gombákat, az utóbbiak mindig nagyobb számban voltak jelen (LACEY 1980). Azonos gombafajok izolálhatók a kültérből és a gabonátárolók belső légteréből, a különbség az, hogy a tárházak belsejében szignifikánsan nagyobb a fajok koncentrációja (CHEUNG és GERARD 1980).

2.2.4. A légkör, illetve a gabonátárolók levegőjének elemzése

A gabonapor mintázására és kiértékelésére számos módszer áll rendelkezésre. A módszerek és eszközök sokasága különböző célok szerint hasznosítható. A légütköztetési (impaktor) típusú csapdák izokinetikus mintavételt tesznek lehetővé, ebben az esetben az eszköz állandó sebességgel veszi a levegőmintát, ezért reprezentatív mérést biztosít (ilyen az általunk alkalmazott Hirst-típusú térfogatos spóracsapda is). Segítségünkre lehetnek a légzőszervi megbetegedések környezeti hátterének feltárásában, hiszen méret szerint is elkülönítik a beszívott mintát a mintavétel során. A mikrobiológiai és allergológiai vizsgálatokban fontos az egyes partikulumok típusának és méretének a megállapítása. A csapdázott részecskék fénymikroszkóp segítségével osztályozhatók és számolhatók, beleértve a növényrészeket, rovar- és atkadarabokat, ürülék részecskéket és az obligát növénykórokozókat, melyek kitenyésztéssel nem vizsgálhatók, de az allergia szempontjából mégis lényeges tényezők. A kitenyészthető mikroorganizmusok azonosítása és életképességének megállapítása pedig táptalajon történik.

A mikroorganizmusok mikroszkópos vizsgálatához a mintát egy ragadós anyaggal bevont tárgylemezre viszi fel a mintavevő készülék, pl. a térfogatos spóracsapdák (MAY 1945; HIRST 1952). Más esetben forgó karokkal történik a csapdázás, pl. forgókaros (PERKINS 1957) vagy forgólemezes (OGDEN és RAYNOR 1967) mintavevővel. Az Andersen-féle mintavevő (ANDERSEN 1958) a mikroorganizmusok levegőből való közvetlen izolálását, tenyésztését teszi lehetővé, ami különösen hasznos az aktinobaktériumok esetében (LACEY 1971; DARKE et al. 1976; GREGORY és LACEY 1963; LACEY és DUTKIEWICZ 1976). A gombáknak viszont csak egy részét lehet tenyésztési mintavevővel értékelni.

Jelenleg nincs elérhető irodalmi adat a magyarországi gabonátárházak levegőjében előforduló mikroszkopikus gombákról, vagy azok vizsgálatáról, viszont számos nemzetközi publikáció áll rendelkezésre ebben a témában.

2.3. Gombafajok elkülönítése molekuláris módszerekkel

A makromolekulák (DNS, RNS, fehérje) izolálása döntő lépés a molekuláris biológiai módszerek alkalmazásakor. DNS, RNS és fehérje bármely biológiai anyagból kinyerhető, legyen az akár élő vagy tartósított szövet, sejt, vírusrészecske, növény- vagy gombasejt. A DNS-tisztítás irányulhat rekombináns DNS-t hordozó plazmidokra vagy bakteriofágokra, illetve prokarióta és eukarióta sejtek DNS-ére. A sikeres DNS-kinyerés négy lépése: a sejtek vagy szövet hatékony feltárása, a nukleoprotein komplexek denaturálása, a nukleázok gátlása (az RNS-kinyerés esetén RNáz, DNS-kinyerés esetén DNáz gátlás) és a szennyeződések eltávolítása. A cél az, hogy a nukleinsav ne tartalmazzon olyan szennyezőket, mint fehérjék, szénhidrátok, lipidek, vagy nem kívánt egyéb nukleinsavak (DNS-mentes RNS vagy RNS-mentes DNS) (TAN és YIAP 2009).

A fehérje kinyerés- és tisztítás a makromolekula méretének, töltésének, alakjának meghatározásához és feladatának megértéséhez szükséges. A kiinduló lépés szinte minden esetben a sejt szintű extrakció. A sejt fal és sejt hártya lebontásához számos módszer felhasználható: oldó puffer, nyírőerő, kis ionerősség és a nyomás gyors változtatása. A fehérjék kinyerését számos tényező befolyásolja, mint a hőmérséklet, a puffer tulajdonságai, a víz tisztasága, a fehérje inhibitorok, a detergenssek, a redukálószer és a tárolás. A fehérjék elválasztására számos technika áll rendelkezésre: ioncserélő kromatográfia, gélszűrés, affinitás kromatográfia és gélelektroforézis. Tiszta DNS, RNS vagy fehérje extrakciója történhet oldat- vagy oszlop-specifikus módszerekkel (TAN és YIAP 2009).

2.3.1. A *Tilletia*-fajok elkülönítése nukleinsav alapú molekuláris módszerekkel

Az üszöggombák esetében kevés olyan tulajdonság van (spóraméret, spóraalak, spórafal morfológiája, csírázási típus, gazdanövénykör), mely a rendszertani besorolás során alkalmazható. A *Tilletia*-fajok kimutatására felhasználható módszerek időigényesek, és sajnos nem mindig vezetnek tökéletesen megbízható eredményre a fajok elkülönítésében. Ide sorolható a teliospórák fénymikroszkópos vizsgálata (TRIONE és KRYGIER 1977; HESS és FRIONE 1986), immunológiai módszerek (BANOWETZ et al. 1984), a polipeptid profil jellemzése (KAWCHUK et al. 1988), a triacylglicerol profil jellemzése (BEATTIE et al. 1993), a teliospórák fluoreszcens tulajdonságai (STOCKWELL és TRIONE 1986) és a genetikai és citogenetikai jellemzők (TRAIL és MILLS 1990; RUSSELL és MILLS 1993). A klasszikus módszerekkel összevetve a molekuláris technikák számos előnnyel rendelkeznek, mint például a pontosság és megbízhatóság. A *T. contraversa* molekuláris módszerrel történő gyors és egyértelmű azonosítása nagy előrelépést jelentene. Az utóbbi időben a molekuláris markerekre

épülő kutatások az üszöggombák közül a *T. contraversa*, *T. indica*, *T. walkeri*, *T. horrida*, *T. caries*, *T. laevis* és rokon fajaikra irányultak (ZERUCHA és KIM 1970; GANG és WEBER 1995; FREDERICK et al. 1998; PIMENTEL 2000; JOSEFSEN és CHRISTIANSEN 2002; LIANG et al. 2006).

2.3.1.1. DNS-izolálás

Korábban a DNS izolálás során a teliospórákat táptalajra oltották, majd az ott fejlődő micéliumból nyerték ki a DNS-t. A spórák csíráztatása, micélium termeltetése hosszú időt igényel és nehézkes, ezért nem mindig vezet eredményre. A *Tilletia*-fajok teliospóráinak fala vastag, magas a lipidkoncentrációja is. Később kifejlesztettek egy olyan módszert (BLACK és FOARDE 2007), mely alkalmasnak bizonyult a teliospórák falának feltörésére is (nyugvó állapotban lévő spórákra is érvényes megállapítás), majd az így felszabaduló anyagból nyerték ki a vizsgálathoz szükséges DNS-t (GANG és WEBER 1995). Az említésre kerülő DNS-kinyerési módszerek alkalmasak arra, hogy akár egyetlen gombaspórából is kinyerjék a vizsgálathoz szükséges DNS-t, illetve olyan gombáknál is alkalmazhatóak, melyeket nem lehet táptalajon tenyészteni (LEE és TAYLOR 1990). A DNS-kivonás többnyire CTAB-módszerrel vagy kereskedelmi forgalomban lévő kitek (pl. DNEasy Plant mini kit) alkalmazásával történik.

2.3.1.2. A DNS-alapú molekuláris azonosítási módszerek

Alapvetően két eltérő megközelítést használnak a növénypatogén gombák elkülönítésére és azonosítására használt DNS-szakaszok kiválasztásánál: egyrészt a konzervatív régiók egyedi szekvenciáit használhatják fel az azonosításra, mely a célterület variabilitását hasznosítja; másrészt a gomba genom olyan véletlenszerűen kiválasztott részeit vizsgálják, melyek fajspecifikus jellegeket hordozhatnak (McCARTNEY et al. 2003). A gombagenom véletlenszerű feltérképezése RAPD, SSR vagy mikroszatellit markerek és AFLP segítségével eredményre vezethet (GAO et al. 2010).

Az utóbbi időszakban a *Tilletia*-fajokat vizsgáló molekuláris biológiai megközelítések a *T. contraversa* és a vele közeli rokonságban álló fajok közötti viszonyokat kívánták feltárni (YUAN et al. 2009). A kutatók a *T. caries* és *T. contraversa* elkülönítésére szolgáló különböző DNS-alapú módszerek fejlesztésekor főként a fajspecifikus primerek tervezésére törekedtek. Számos, az irodalomban fellelhető kísérlet alapján elmondható, hogy a *T. contraversa* és a *T. caries* konzervált génjei kevés természetes variabilitással rendelkeznek, így sokáig sikertelen volt a két faj elkülönítése az ITS-régióik konzervált génjeire tervezett primerekkel (JOSEFSEN

és CHRISTIANSEN 2002; LIANG et al. 2006; GAO 2010). Egyes kutatók szerint a teliospórák morfológiája és a genetikai jellemzőik alapján olyannyira egyforma a két faj, hogy nem tekinthetők külön fajoknak, csak egyazon faj két változatának (GANG és WEBER 1996).

A kórokozó gombák azonosítására alkalmazott polimeráz láncreakció (PCR) leggyakrabban az eukarióta patogének riboszómális DNS-ének (rDNS) 18S-5.8S-28S alegységeit elválasztó ITS régiókat célozza (ZOUHAR et al. 2010). Az rDNS szekvenciák az együttes evolúció homogenizáló hatásának következtében stabilak, konzervatív és változékony régiókból épülnek fel (HIBBETT 1992). Az ismétlődő szakaszokon belül az rDNS cisztronok között olyan át nem íródó szakaszok (nem kódoló régiók, azaz NTS-ek vagy IGS-ek) vannak, amelyekben a szelekciós kényszerektől függetlenül zajlanak le a genetikai változások (ZOUHAR 2010). Ebből következik, hogy az át nem íródó részek (NTS-ek) az evolúciós változások érzékeny markerei, melyeknél sokkal jelentősebb a genetikai sodródás (genetikai drift) hatása, mint az ITS-ek esetében (COLLINS és CUNNINGHAM 2000; STREUD et al. 2002). Az ITS és IGS régiók is sikeresen alkalmazhatók a fajspecifikus primerek tervezése során, melyek segítségével a közeli rokon gombafajok elkülöníthetők (BRYAN et al. 1995; ABD-ELSALAM et al. 2003).

Tehát kezdetben az egyedi fragment-mintázatot eredményező PCR alapú technikákra alapozták a DNS szintjén jelentkező variabilitás vizsgálatát a *T. contraversa*, *T. caries* és egyéb fűféléket támadó üszöggombák közötti polimorfizmus kimutatására, ezek a RAPD, AFLP és az rDNS ITS régióját célzó PCR-RFLP technikák voltak (BOYD et al. 1998; PIMENTEL et al. 1998 b; SHI et al. 1996). Ezek a módszerek nem különítették el egyértelműen a *T. contraversát* a *T. cariestől*, viszont világosan elhatárolták a búzát fertőző üszögöket az egyéb fűféléket fertőző *Tilletia*-fajoktól. Például McDONALD és munkatársai (2000) egyértelműen elkülönítették a *T. fusca* komplexet a búzát megbetegítő üszögöktől a gazdanövény-specifitást alapul véve (ZUPUNSKI 2011).

GANG és WEBER (1996) RAPD módszer alkalmazásával nem jártak sikerrel a rassz- vagy fajspecifikus markerek detektálásában, SHI és munkatársai (1996) szintén ebben az évben közölt RAPD alapú tanulmányukban a *Tilletia*-fajok rokonsági kapcsolata újragondolásának szükségességét hozták ki végeredményként. McDONALD és munkatársai (2000) teliospórából közvetlenül kinyert DNS-t felhasználva PCR-módszert fejlesztettek, mely a *Tilletia indicát* elkülöníti a *Tilletia cariestől* és *T. contraversától*, viszont a kő- és törpeüszög elkülönítésére nem alkalmas. JOSEFSEN és CHRISTIANSEN (2002) a *T. caries*, *T. laevis* és *T. contraversa* ITS2 régiójában kerestek fajspecifikus különbséget, de meghatározó különbséget nem találtak. McNEIL és munkatársai (2004) real-time PCR rendszerben TaqMan próbát fejlesztettek a búzátételek *T. cariessel* való fertőzöttségének mennyiségi meghatározására, melyben genus-

specifikus *Tilletia*-primereket használtak. Ez gyorsabbnak és pontosabbnak bizonyult, mint MULLHOLLAND és McEWAN (2000) módszere, mely a mennyiségi meghatározásban korábban elterjedt kompetitív PCR-technikát használta; és további előnye, a módszer érzékenysége: kevesebb, mint 1 db *Tilletia*-teliospóra/búzaszem fertőzőttségi értéket is képes volt kimutatni. KOCHANOVA és munkatársai (2004) az NCBI (National Center for Biotechnology Information) adatbázis segítségével tervezték az ITS1 régióból a TILf és TILr primerpárt, mellyel a *T. contraversa* és *T. caries* minták a várt 361 bp terméket adták, más búzát fertőző gombával nem volt keresztreakció. Ezek a primerek gyakorlati szempontból hasznosabbak, mint az univerzális ITS1, ITS4 primerek (PIMENTEL et al. 1998 a), amelyek két terméket adnak: 550 bp és 750 bp. Az előbbi *Tilletia*-specifikus termék, az utóbbi búza DNS-amplifikátum. EIBEL és munkatársai 2005-ben kifejlesztettek egy olyan primerpárt (Tcar2A és Tcar2B), mely a *T. caries* izolátumokra specifikus 276 bp méretű 26S rDNS szakasz felszaporítására alkalmas, így felhasználható a kőszög-fertőzés korai kimutatására. Hátránya, hogy nem kívánt keresztreakciót ad a *T. contraversa* izolátumok vizsgálatakor. Ennek alapján a szerzők feltételezték a két faj igen közeli rokonságát.

McDONALD és munkatársai (2000) rep-PCR fingerprinting technikával különítették el a *T. indicát* a *T. indica* rokon fajaitól. A vizsgálatok során azt is kimutatták, hogy a *T. caries*, *T. contraversa* és *T. laevis* az említett módszerrel elkülöníthetők. Ezt az eredményt a későbbi kutatók eltérően értékelték. LIU és munkatársai (2009) szerint nem alkalmas a *T. caries* és *T. contraversa* elkülönítésére a módszer, míg ZUPUNSKI és munkatársai (2011) szerint használható a rep-PCR a *Tilletia*-fajokkal fertőzött búzátételek monitorozására, a fajok megkülönböztetésére. Ez a technika a genomban található konzervált, ismétlődő elemekre (BOX, REP, ERIC) tervezett primerekkel, a közöttük elhelyezkedő szekvenciáknak PCR eljárással történő felszaporításán alapszik. Ezeket a repetitív szekvenciákat (ismétlődő elemeket) először prokarióta genomból mutatták ki, de azóta bizonyították hasznosságukat a gombanemzetségek genom-variabilitásának elemzésében is, mint például a *Verticillium* (ARORA et al. 1996), *Fusarium* (EDEL et al. 1995), *Staganospora* és *Septoria* (CZEMBOR és ARSENIUK 1999), és *Leptosphaeria* (JEDRYCZKA et al. 1999) nemzetségek esetében. A rep-PCR fingerprinting előnye a RAPD-technikával szemben az egyszerűsége, vagyis független a DNS koncentrációjától és reprodukálhatóbb eredményt ad (McDONALD et al. 2000).

YUAN és munkatársai (2009) és LIU és munkatársai (2009) RAPD, RM-PCR és AFLP-technikák segítségével olyan, a *Tilletia*-fajokra szelektív primereket találtak, amelyek alkalmasak a két faj egyértelmű elkülönítésére. YUAN és munkatársai (2009) RM-PCR segítségével detektáltak egy 1 322 bp DNS szakaszt a PR32 génen, mely szekvencia specifikus a vizsgálatba vont 18 db *T. contraversa* izolátummal, és szinte egyáltalán nem mutat homológiát a kiválasztott

29 db *T. caries* mintával és egyéb, az adatbázisban szereplő kórokozókkal. A PR32 génről tervezett primerekkel a *T. contraversa*-specifikus 747 bp hosszúságú fragmentek amplifikálódtak, míg a *T. caries* törzsek nem adtak jelet.

1994 óta elérhető módszer az ISSR is, mely a mikroszatellit régiók közötti szakaszokat amplifikálja 16-18 bp hosszúságú primerpárt használva. A technika nem igényli a genom-szekvencia ismeretét, multilókuszos és meglehetősen magas a polimorf mintázat aránya. Az ISSR egy PCR alapú módszer, mely képes elkülöníteni a közeli rokonságban álló egyedeket, egyesíti az AFLP- és az SSR-markerek előnyeit, és magában foglalja a RAPD univerzalitását is. A RAPD-technikával szemben az ISSR-primerek hosszabbak és mikroszatellit régiók alapján tervezik őket, ezért a primerek tapadási hőmérséklete magasabb, így a PCR-termékek következetesebbek. Az ISSR-t sikeresen alkalmazták a genetikai diverzitás kutatásában például a *Fusarium graminearum* (MISHRA et al. 2004), *Sphaeropsis sapinea* (BURGESS et al. 2001), *Phialophora gregata* (MENG és CHEN 2001), *Cryphonectria cubensis* (VAN DER MERWE et al. 2003), *Trichaptum abietinum* (KAUSERUD és SCHUMACHER 2003), *Ustilago* spp. (MENZIES et al. 2003), *Serpula lacrymans* (KAUSERUD 2003) és *Beauveria bassiana* (ELENA ESTRADA et al. 2007) esetében. HANTULA és munkatársai (1996) kimutatták, hogy az ISSR-régiók gyakoriak az *Ustilago*-nemzetség genomjában. A *T. contraversa* esetében az ilyen jellegű technikákat 2010 előtt főként a *Tilletia*-genuson belüli rokonsági kapcsolatok tisztázására alkalmazták.

A SCAR-markerek felhasználása szintén egy kiemelkedő módszer bizonyos fajok, fajták egyértelmű azonosítására. Ezeket a markereket ismert genom-szekvencia alapján tervezik, és kodomináns markerként alkalmazhatók. A SCAR-analízis olcsó és egyszerűen kivitelezhető. A SCAR-markerek a célszekvenciára specifikusak, és így a szekvenált genomszakasz PCR-módszerrel való felszaporítására alkalmazhatók, ezért az ISSR-markereknél sokkal specifikusabbnak tekinthetők. Az ISSR818 primerrel generált polimorf mintázatban található a *T. contraversa* specifikus 867 bp méretű DNS fragmentum (GAO et al. 2010). A szerzők a markerből SCAR-primereket terveztek (TCKSF3/TCKSR3) a PCR elemzéshez. A SCAR-primerek egy 419 bp hosszúságú *T. contraversa*-specifikus DNS-fragmentumot amplifikáltak, mely nem volt jelen a *T. caries* izolátumokban.

2.4. Gombafajok elkülönítése fehérjealapú módszerekkel

2.4.1. A gombaképletek esetében alkalmazott sejtfeltárási eljárások

A fehérjék vizsgálatának meghatározó része a fehérjék kinyerésére szolgáló protokoll kidolgozása és optimalizálása, hiszen csak akkor nyílik lehetőség a keresett fehérje detektálására és azonosítására, ha azt előbb kivontuk a mintából és oldatba vittük. Ez különösen fontos a nehezen feltárható növény- és gombaminták esetében. A fonalas gombák feltárása tekintetében a fehérjekinyerést befolyásoló fő tényező a sejtfal, ami a sejttömeg legnagyobb részét teszi ki. A sejtfal kiemelkedően tartós és ellenálló képlet, melynek feltárása a fehérjék reprodukálható és hatékony kinyerésének első és legjelentősebb lépése. (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ et al. 2010; SATTAYASAI 2012)

A gombák és baktériumok erős sejtfalának feltárása nehéz (TAN és YIAP 2009; SATTAYASAI 2012). Számos módszer áll rendelkezésre a sejtek szerkezetének megbontására a sejttípustól függően (SCOPES 1982; SATTAYASAI 2012). Nem tanácsos a szükségesnél drasztikusabb módszert alkalmazni, mert az instabil enzimek még oldatba kerülés előtt inaktiválódhatnak (SCOPES 1982). A mechanikai sejtfeltárási módszerek, mint a nyomás változtatása (GRABSKI 2009) vagy az üveggyöngyök felhasználása, eltávolítják a sejtfalat, melyet egy pufferral történő kinyerés követ az összfehérje-extrakció végső lépéseként (TAN és YIAP 2009).

A gombák szilárd sejtfallal és összetett sejtmembrán rendszerrel rendelkeznek. Sok fehérje kötődik a sejtfalhoz, membránhoz vagy a sejtservecskék membránjához, ezek vesznek részt a citoskeleton (sejtváz) felépítésében és a membrántranszportban. Ezért fontos annak ismerete, hogy az általunk vizsgálni kívánt fehérje hol helyezkedik el, mert például a sejten belüli fehérjék kinyerése során a sejten kívüli proteinek elvesznek (BRIDGE et al. 2004; PÉCS 2011).

A gombák sejtfaláról általános érvényű szabályokat nem lehet felállítani, mivel egyrészt az egyes fajoknál az összetételben és szerkezetben jelentősek a különbségek, másrészt túl kevés fajról áll rendelkezésre részletes leírás ahhoz, hogy általánosítani lehessen. Ha viszont csak a sejtfeltárási szempontjából nézzük, néhány megállapítást tehetünk. A legtöbb gombában a sejtfal elsősorban poliszacharidokból áll, lényegesen kevesebb fehérjét és lipidet tartalmaz. A baktériumokhoz és az élesztőkhöz hasonlóan az alaktartást és a szilárdságot a sejtfal-poliszacharidok kölcsönzik.

A szerkezeti molekulahálót külső védőburok is bevonhatja, így mind a szerkezeti, mind az egyéb komponensek ismerete hasznos a megfelelő enzimes vagy kémiai módszerek kiválasztásánál. A befolyásoló környezeti tényezők közé tartozik a keverés nyíró hatása is. A

mechanikai feltárásnál a sejt mérete és alakja mellett a szerkezeti polimerek térhálósodási foka is befolyásolja a feltárás eredményességét (PÉCS 2011).

Az intracelluláris fehérjék kinyerése rendszerint a sejt aprítását vagy a sejtfa adott enzimekre való átjárhatóságának kialakítását jelenti. A sejtmentes extraktokat mechanikai, kémiai és enzimikus módszerekkel állíthatjuk elő. Az alkalmazott eljárás függ a feltárandó mikroorganizmus tulajdonságaitól, pl. méret, szerkezet, sejtfa szilárdsága és a fehérjék érzékenysége (SZAMOS et al. 1994).

Számos kutató próbálta tökéletesíteni a sejtfa feloldását és az intracelluláris fehérjék kinyerését célzó módszert. Példaként említhetők a mechanikai feltöréshez alkalmazott üveggyöngyök (GRINYER et al. 2004; EBSTRUP et al. 2005), a sejthomogenizáló malom (BÖHMER et al. 2007) vagy az ultrahangos sejtfa feltárás (WARD és SWIATEK 2009), melyek sokkal hatékonyabbnak bizonyultak a kémiai vagy enzimikus emésztésnél (HARRISON 1991; HOPKINS 1991; MIDDELBERG 1995; CUMMING és ICETON 2001; NANDAKUMAR és MARTEN 2002). Ezekon kívül elterjedt módszer még a sejtfa feltárására a folyékony nitrogénben való fagyasztást követő őrlés, porítás (HERNÁNDEZ-MACEDO et al. 2002; FERNÁNDEZ-ACERO et al. 2006; YAJIMA és KAV 2006; GRABSKI 2009). A fehérjekinyerés során gyakran fehérjét kicsapó közeget szükséges alkalmazni, legtöbbször triklórecetsavat (TCA) vagy acetont. Ezt követi a pellet visszaoldása egy megfelelő pufferben. Ez a lépés növeli az oldat célfehérje-koncentrációját, és segít eltávolítani a nem kívánt összetevőket (sók, lipidek, poliszacharidok, fenolok és nukleinsavak), amelyek az elválasztást zavarhatják (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ et al. 2010). Ez az általános leírás egyaránt alkalmazható növényi (CARPENTIER et al. 2005; MALDONADO et al. 2008) és gombafehérjék (WILDGRUBER et al. 2002; NANDAKUMAR et al. 2003) kinyerésére.

A mechanikai feltárásnál egyrészt a maximális feltárási hatékonyságot, másrészt a kinyert sejtanyagok minimális károsodását tartották szem előtt. Kis mennyiségű, néhány milliliternyi sejtuszpenzió feltárására megfelelő eljárás lehet például a sejttömeg eldörzsölése egy porcelánmozsárban kvarchomokkal, mely idő- és munkaigényes (15–30 perc egy minta feldolgozása), de fonalas gombák intracelluláris enzimjeinek mérésénél bevált. Manuális eszközök az ún. homogenizálók, amelyekben a feltárás két szorosan illeszkedő, érdesített üvegfelület közötti dörzsöléssel történik.

A sejtfa feltárás bevált módszerei a késes homogenizálás, illetve a keverőművel szerelt gyöngymalomban való őrlés (HARRISON 1991; SZAMOS et al. 1994; MIDDELBERG 1995). A sejthomogenizálás kivitelezhető egyszerű készülékek, mint például mágneses keverő, vortex keverő, turmixgép segítségével is, de elérhetők speciális berendezések is: különböző nagy sebességű malmok, agitátorok és mixerek formájában (GRABSKI 2009).

A gyöngymalmok jellemző kialakítása egy vízszintes henger alakú őrlőtér, tele apró üveggyöngyökkel, amelyeket a vízszintes tengelyen lévő keverőtárcsák tartanak mozgásban (PÉCS 2011).

A feltárást számos technikai paraméter befolyásolja, a nedves őrlés jellemezhetősége szempontjából összesen 44 paramétert azonosítottak (SZAMOS et al. 1994), többek között az alábbiakat: a gyöngyök mérete, a feltöltés mértéke, a sejtkoncentráció a szuszpenzióban, a keverőelem kialakítása, mérete és kerületi sebessége, a hőmérséklet és folytonos üzemben a betáplálás sebessége (CUMMING és ICETON 2001; RAMANAN et al. 2008; GRABSKI 2009). Ehhez járul még, hogy ugyanaz a malom másképpen működik vízszintes és függőleges helyzetben. Az őrlés célja általánosságban, hogy a kinyerés során a minta minél nagyobb felületen érintkezzen a kioldó pufferrel. A felaprózódási törvény alapján ugyanis minél több részre vágjuk az anyagot, annál nagyobb lesz a részecskék összfelülete (MENNINGER 1965).

A gyöngyök méretével kapcsolatban szerzett tapasztalatok nem egyértelműek. A mikrobiális szuszpenziók viszkozitása rendszerint kicsi, ezért a hatékony sejtfeltáráshoz 1 mm-nél kisebb üveggyöngyök szükségesek. A laboratóriumi készülékekben az alkalmazott alsó határ 0,2 mm. Általánosítható megfigyelés, hogy minél kisebb a sejtek mérete, annál kisebb az optimális átmérő is. (SZAMOS et al. 1994) Mivel kisebb átmérőnél ugyanolyan töltési fok mellett a gyöngyök száma nagyobb, az ütközések frekvenciája növekszik. Példaként említendő, hogy SZAMOS és munkatársai (1994) szerint az *Aspergillus niger* micéliumának feltáráshoz az optimális gyöngyátmérőt 0,25-0,5 mm között célszerű megválasztani.

A gyöngymalmok piacán a FastPrep (MP Biomedicals, Irvine, CA; www.mpbio.com), Geno/Grinder (SPEX Certiprep, Inc., Metuchen, NJ; www.spexcsp.com), MagNA Lyser (Roche Diagnostics, Penzberg, Germany; www.roche.com), Mikro-Dismembrator (Sartorius Stedim Biotech, Aubagne, France; www.sartorius-stedim.com), Mini-Bead Beater (BioSpec Products, Bartlesville, OK; <http://www.biospec.com>) és a Retsch Mixer Mill (Retsch GmbH, Haan, Germany; www.retsch.com) mind rázáson alapuló készülékek, egyszerre több minta feldolgozására alkalmasak, és 1-5 ml kiindulási anyagból is képesek hatékonyan feltárni a célfehérjéket (GRABSKI 2009).

2.4.2. Fehérje-extrakció gombaképletekből

A spórafal feltárást követően az oldhatatlan anyagokat centrifugálással eltávolítjuk, miközben a kívánt fehérjék pedig oldatban maradnak. A kinyerés során a fehérjék egy része az oldhatatlan anyaghoz kötődhet, ennek a veszteségnek nem szabad 20% felett lennie; a kioldó puffer és a minta arányát ez alapján kell megválasztani. A vastag sejtfallal rendelkező gombák

esetében a képződő pellet mennyisége megközelítőleg azonos a kiindulási anyag mennyiségével (SCOPE 1982). A spórafal feltöréséhez használt MagNa Lyser sejtfeltáró készülék a sejtfalat olyan apró részecskékre bontja, melyeket nehéz egyszerű centrifugálással eltávolítani, mert a kiüleptetéshez nem lehet megfelelően magas fordulatszámot beállítani, és az oldat így zavaros lesz. Az apró szemcséjű részecskék eltávolítása ezért szűréssel történik (SCOPE 1982; SATTAYASAI 2012).

A sejtfeltáró pufferek összetétele és mennyisége nemcsak a hatékony feltárás szempontjából fontos, hanem azért is, mert befolyásolhatják az elválasztást, a sejtből való kiszabadulást követően pedig a célfehérje stabilitását és kivonását. Általában bizonyos fehérjetípusokra meghatározott jellegű puffer használatos. A főbb befolyásoló tényezők a puffer oldat pH-ja, ionerőssége, valamint a lebomlást gátló és a stabilitást növelő hozzáadott anyagok (STOLL és BLANCHARD 2009).

Egy egyszerű extrakciós puffer összetétele a következő: 20-50 mM foszfát (pH 7-7,5), 0,1 M Tris-Cl (pH 7,5), 0,1 M KCl kevés pufferben oldva, valamint, ha sejtszervecskék kinyerése a cél, az izoozmotikus puffer tartalmazhat még szacharózt, mannitolt, szorbitolt, sókat és ionokat is. A spórafal feltörését követően célszerű ellenőrizni az oldat pH-ját is.

A fehérjék stabilabbak, ha nagyobb a koncentrációjuk az oldatban, de a nagy koncentráció magával hozza, hogy az oldat nehezebben kezelhető, és kicsapódás is végbemehet. Bár a 3:1 arányú extrakciós puffer : kiindulási anyag koncentráció segítségével töményebb oldatot állíthatunk elő, előnyösebb az 5-10-szeres arány alkalmazása, mert az több oldható fehérjét és kevésbé viszkózus oldatot eredményez. (STOLL és BLANCHARD 2009)

Ha a kinyert fehérjét oldat formájában tároljuk, célszerű azonos mennyiségeket mikrocentrifuga csövekbe osztani, és minimum -20°C-on tárolni, mivel a többszöri kiolvasztás hatására sérülhet a molekulák szerkezete. (BRIDGE et al. 2004)

2.4.3. Fehérje-elválasztás gél-elektroforézissel

Az elektroforézis széles körben elterjedt módszer fehérjék elválasztására, az aminosav-összetétel elemzésére, mikroszekvenálásra és tömegspektrometria céljára (RABILLOUD 1996). Az elektroforézisnek, mint elválasztási módszernek közismerten az az alapja, hogy az elektromos töltéssel rendelkező oldott anyagok az egyenárammal létrehozott elektromos mező hatására elmozdulnak. A gélelektroforézis a fehérjéket méretük és töltésük szerint választja el (HAJÓS 1993; TAN és YIAP 2009). Az elektroforetikus technikákat az irodalom négy csoportba sorolja: szabad elektroforézis (mozgó határfelületek módszere), kötött vagy zóna-elektroforézis, izotachoforézis és izoelektromos fókuszálás. A fehérjéket általában nem denaturáló

poliakrilamidgél-elektroforézissel (PAGE) vagy natív gél-elektroforézissel vizsgálják (TAN és YIAP 2009).

A gél-elektroforézis során a töltéssel rendelkező részecskék sebességét az elektromos térben többféle tényező befolyásolja (TAN és YIAP 2009): 1. a részecskék: mérete, töltése, töltésének nagysága, disszociációs foka, amfoter jellege, diffúziós állandója; 2. a környezetben lévő anyagok (pufferek és elektrolitok): koncentrációja, ionerőssége, kémiai és dielektromos tulajdonságai, pH-ja, hőmérséklete, viszkozitása és más fehérjékkel való kölcsönhatása; 3. az elektromos tér: térerőssége, áramintenzitása, az áram eloszlása; 4. a hordozó tulajdonságai: granulálás módja, porozitás-jellemzői, kölcsönhatásba lép-e a fehérjékkel.

Az elektromosan töltött részecskék lehetnek egyszerű ionok vagy komplex makromolekulák. Mivel a szabad folyadékfázisban történő elválasztás során a fehérjék könnyen leülepednek, ennek a megakadályozására hordozó anyagot alkalmaznak, ezek az elektroforetikus technikákban leggyakrabban az agaróz és a keresztkötéseket tartalmazó poliakrilamid (HAJÓS 1993).

Az SDS-PAGE során a fehérjék szétválását hidrodinamikai tulajdonságaik és azonos fajlagos negatív töltésük határozza meg. A gél előállításához leggyakrabban az akrilamid és az N,N'-metilén-biszakrilamid gyökös kopolimerizációs reakcióját alkalmazzák N,N,N',N'-tetrametil-etiléndiamin (TEMED) és ammónium-peroxidiszulfát (APS) katalizátorok jelenlétében (GARFIN 2009). Az ammónium-perszulfát – TEMED rendszerben a TEMED szabad gyököket képez a perszulfátból, a szabad gyökök pedig katalizálják a polimerizációt. Az akrilamid típusú hordozók előnyei: a pórusméretek eloszlása, az optikai átlátszóság, a töltéssel rendelkező csoportok hiánya, a hidrofil jelleg és a fehérjemintákkal való kölcsönhatás csekély volta. (HAMES 1982)

A minta-előkészítés során a fehérjéket forró SDS-sel kezelik (BOWEN et al. 1980), ennek hatására fajlagos negatív töltésük alapvetően azonos lesz, így méretük alapján válnak el a poliakrilamid gélben (HAMES 1982).

A fehérjék elválasztása ma már kizárólag az SDS-PAGE-vel történik. Az azonos méretű fehérjék azonos sebességgel haladnak a gélben, és a nagyméretű fehérjék egyre lassabban mozognak, ahogy érvényesül a pórusok szűrőhatása (TAN és YIAP 2009). Az SDS-sel kötött fehérjék anód felé való elmozdulása és molekulatömegük között logaritmikus összefüggés van (SHAPIRO et al. 1967; WEBER AND OSBORN 1969), ezért egy kalibrált gélben a fehérjék molekulatömege meghatározható (GARFIN 2009; TAN és YIAP 2009).

A kétdimenziós (2D) gélelektroforézist Patrick O'Farrell fejlesztette ki 1975-ben, a technika az izoelektromos fókuszálás és a SDS-PAGE eljárásokat egyesíti. A 2D-PAGE

különböző körülmények, így fejlődési stádiumok, sejtciklus, szervezet, függvényében alkalmas a fehérje-összetétel változásának követésére (TAN és YIAP 2009).

A legtöbb egydimenziós gélelektroforézis vertikális elrendezésű (ANDREWS 1986). A modern készülékek elvezetik a felesleges hőt, mivel a túlmelegedés értékelhetetlen mintázatot eredményezhet. A futtatás időtartama rendszerint 4-5 óra, mini cellák alkalmazásával ez az idő felére-harmadára csökken (GARFIN 2009).

Az SDS-PAGE egy nem folytonos rendszer, mely két különböző koncentrációjú gélből épül fel: egy elválasztó, vagy fő gélből (alsó) és egy gyűjtő gélből (felső). A két gélnek különböző a porozitása, pH-ja és ionerőssége. A gyűjtő gél koncentrálna a mintákat, ennek hatására az elválasztó gélben jobb felbontást kapunk. Az alacsony vezetőképességű mintaoldó pufferben oldott mintákat (0,06M Tris-Cl, pH 6,8) a nagyobb vezetőképességű futtató puffer (0,025 M Tris, 0,192 M glicin, pH 8,3) és a gyűjtő gél (0,125 M Tris-Cl, pH 6,8) közé töltjük a fésűvel kialakított zsebekbe. Elektromos áram hatására a fehérjék a gyűjtő gélbe vándorolnak (ALLEN et al. 1984; ANDREWS 1986; BURY 1981). Az előre haladó protein-komplexek a gélmátrixban folyamatosan lassulnak, megtörténik az elválasztás molekulatömegük szerint.

A fehérjék detektálására gélfestést alkalmaznak, ami lehet progresszív vagy regresszív. A festési módszer progresszív jellegű, ha a gélen elválasztott fehérjék által megkötött festék mennyiségét a festés idejével szabályozzák. Regresszív a festés, ha a gél erősen túlfestik, majd a felesleget megfelelő oldattal kivonják belőle. A legtöbb esetben a fehérje-elválasztás során a gélek festéséhez regresszív festést alkalmaznak. Négy fő gélfestési módszert különböztetnek meg: szerves festékek használata, ezüst festés, negatív festés és fluorszcens festékek (SYPRO festékcsalád) alkalmazása.

A legnépszerűbb festési eljárások a szerves festékek alkalmazásán alapulók, valamint az ezüst festés (RABILLOUD és CHARMONT 2000). Az ezüst festés 1979-es első alkalmazásakor SWITZER és munkatársai (1979) a fehérje-kimutatás hatékonyságának 2000-szeresre való emelkedését mutatták ki a Coomassie Blue (FAZEKAS DE et al. 1963) festéssel szemben.

Az ezüstoffestés a legérzékenyebb festési eljárás, ennek ellenére a mennyiségi fehérjeanalízissel foglalkozó tudósok a szerves festékek közé tartozó Coomassie festékcsaládot részesítik előnyben. Az utóbbi módszer alacsony érzékenységét az ismételhősége ellensúlyozza, ami annak köszönhető, hogy ellenáll a környezeti hatásoknak (hőmérséklet, oldószer minősége és hatóidő) (RABILLOUD és CHARMONT 2000).

NEUHOFF és munkatársai (1988) fejlesztéseik során szulfoszalicil-sav és foszforsav hozzáadásával kísérletezve kidolgozták a koloid festést, az utóbbi eljárás a Coomassie festékek legérzékenyebbjének bizonyult. Módosított Neuhoff-módszer esetében az érzékenység eléri az 1

ng fehérje/sávot, így méltán nevezik „kék ezüst” festésnek az ezüst festések érzékenysége utalva. (CANDIANO et al. 2004; GARFIN 2009)

2.4.4. A *Tilletia*-fajok egydimenziós gél-elektroforézissel történő elkülönítésében eddig elért eredmények

BANOWETZ és munkatársai (1984) monoklonális antitesteket termeltettek a *T. contraversa* és *T. caries* ellen, de nem találtak egyetlen fajspecifikus antitestet sem, mely alkalmas lenne a törpe- és kőüszög elkülönítésére. WEBER és SCHAUZ (1985) SDS-gélelektroforézissel hasonlították össze a *T. contraversa* és a *T. caries* fehérje-összetételét, és találtak egy 65 kDa méretű proteint, mely csak a *T. contraversa* izolátumokban van jelen. KAWCHUCK és munkatársai (1988) kétdimenziós gél-elektroforézissel vetették össze a *T. contraversa*, *T. caries* és *T. laevis* fenol-oldható fehérjéit. Mivel a kísérleteik során nem mutattak ki fajspecifikus különbségfehérjét a mintáikban, előrevetítették ezen üszőfajok rendszertani felülvizsgálatának szükségességét, feltevéseik szerint a *T. contraversa* és a *T. laevis* a *T. caries* fajon belüli változatai lehetnek. Később BANOWETZ és DOSS (1994) azonosítottak egy 116 kDa méretű fehérjét, mely csak a *T. contraversa* izolátumokban volt jelen, a *T. caries* mintázatából hiányzott, viszont az előbb említett 65 kDa méretű különbségfehérjét (KAWCHUCK et al. 1988) nem sikerült azonosítaniuk.

A csírázási tulajdonságokban megfigyelhető alapvető különbségeket alapul véve BEATTIE és munkatársai (1993) feltételezték, hogy a csírázás szabályozásában fontos szerepet betöltő zsírsavak összetételében is lehetnek eltérések, ezért vizsgálták a *T. contraversa* és *T. caries* triaciglicerol (TG) profilját. Szignifikáns, fajszintű azonosításra is felhasználható eltérést azonban nem tudtak kimutatni.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Mintagyűjtés

3.1.1. Mintagyűjtés mikroszkópos vizsgálathoz

A vizsgálati minták gyűjtése a *Tilletia*-fajok éves országos felderítése keretében történt a NÉBIH NTAI szakmai irányításával.

A felvételezés a 7/2001 (I. 17.) FVM rendelet alapján történik, a hatósági mintavételt a megyei növényvédelmi felügyelők végzik. Valamennyi szállítmányból vagy szállítmányon belüli tételből elemi mintát kell venni. Egy tételként mintázható szállítmányból (vasúti kocsis, gépjármű, egyéb jármű és légi szállítmányokból) veendő elemi minták száma is meghatározott. A mi esetünkben a tétel alsó, középső, és felső rétege is mintázandó. A mintavétel gyakrabban mintázóbot vagy ritkábban szúrscap segítségével zajlik. A rétegekből vett 3 elemi mintát elkeveréssel homogenizálni kell. Az így keletkező alapmintából kell vizsgálati mintát venni. A vizsgálati minta mennyisége 1000 g. Ebből a vizsgálati mintából veszünk ki 2*50 g mintát, melyen elvégezzük a Lemosásos módszerrel a *Tilletia*-teliospórák kinyerését.

A szállítmányok 1-1 tábláról származnak. A tábla méretét a mintavételi jegyzőkönyv tartalmazza. Ezeket az adatokat összesítve kapjuk meg, hogy az adott évben hány hektár őszi búzatábla került megmintázásra.

A megyei növényvédelmi felügyelők 2007-ben 19, 2008-ban 17, 2009-ben 19, 2010-ben 18, 2011-ben 17 és 2012-ben 16 megyében gyűjtöttek őszi búzából mintákat (*1. táblázat*). A mintavétel során a kombájntiszta állapotban lévő búzatételekből (az egy tábláról származó tételek nem keveredtek egymással) minimum 2 x 50 g búzaszemet gyűjtöttek be, és összesen 133 db (2007), 94 db (2008), 105 db (2009), 103 db (2010), 90 db (2011) és 98 db (2012) mintát vettek évente (A kötelezően előírt mintaszám megyénként 5 db). A minták gyűjtése szűrőpróba szerűen történik, mely során annyi csak a követelmény, hogy megyénként öt különböző tábláról származó tételből történjen a mintavétel. A mintákat feldolgozás előtt és után száraz, szobahőmérsékletű helyiségben tároltuk.

1. táblázat A *Tilletia*-fajok országos felderítése során gyűjtött őszi búza minták száma megyénként, éves bontásban (2007-2012).

	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Baranya	6	5	5	5	5	6
Bács-Kiskun	5	5	5	5	6	9
Békés	5	0	5	6	5	5
Borsod-Abaúj-Zemplén	5	5	7	5	5	5
Csongrád	16	5	5	5	5	5
Fejér	5	5	5	5	0	0
Győr-Moson-Sopron	5	5	6	6	5	5
Hajdú-Bihar	5	0	7	0	0	0
Heves	5	10	5	8	5	5
Komárom-Esztergom	5	5	6	5	5	0
Nógrád	5	5	5	5	5	6
Főváros és Pest	5	6	5	5	5	5
Somogy	5	5	5	5	6	5
Szabolcs-Szatmár-Bereg	5	5	7	13	6	5
Jász-Nagykun-Szolnok	6	6	7	5	7	6
Tolna	5	5	5	5	5	6
Vas	25	6	5	5	5	5
Veszprém	10	6	5	5	5	5
Zala	5	5	5	5	5	15
Összesen	133	94	105	103	90	98

3.1.2. Mintavétel Hirst-típusú térfogatós spóracsapdával

A levegőmintákat hordozható Hirst-típusú térfogatós spóracsapdával (10-12. ábrák) vettük (HIRST 1952). E módszert világszerte szabványműveleti eljárás szerint alkalmazzák a 0,5 és néhány száz mikrométer közötti mérettartományba eső biológiai eredetű részecskék légkörből történő kimutatására (LACEY és VENETTE 1995). A készülék egy nagy teljesítményű levegőszívóból és egy óraszerkezet által mozgatott hengerből áll. Az óraszerkezet egy sínpart mozgat, melybe egy vazelinnel bevont tárgylemez helyezhető el. A csapda belsejébe egy 14 mm széles és 1,7 mm magas nyíláson át beszívott levegő az áramlás irányára merőleges felületnek, a tárgylemeznek csapódik. Az átszívott levegőmennyiség percenként 10 liter.



10. ábra Hirst-típusú levegő-mintavevő készülék. (Saját felvétel.)

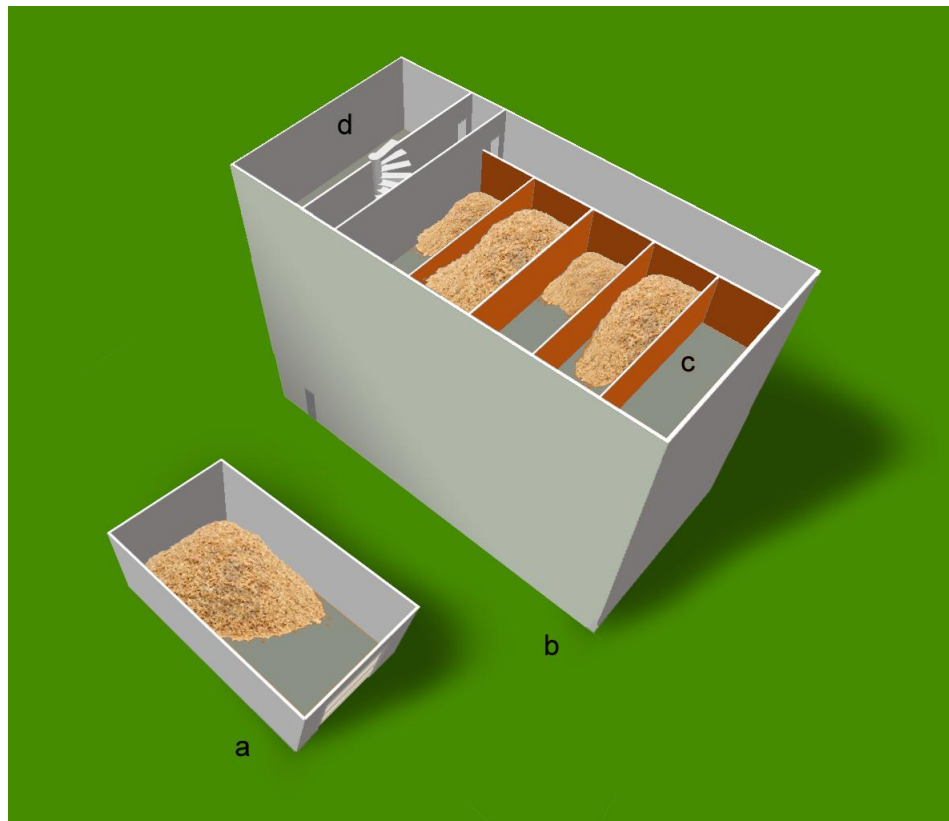


11. ábra Hirst-típusú levegő-mintavevő készülék belső szerkezete. (Saját felvétel.)



12. ábra A levegőminta a tárgylemezen (Hirst-típusú levegő-mintavevő készülék). (Saját felvétel.)

A levegőmintákat két központi gabonátárházban gyűjtöttük Budapesten (Bp), illetve Jászapátiban (Ja), valamint 14 kisebb méretű siktárolóban (10 cégnél) (*M2. és M3. Melléklet*). A levegőminták mellett búzamintákat is gyűjtöttünk az egyes mintavételi helyszíneken. A budapesti és jászapáti központi tárházak nagyobb, 13, illetve 7 szintes tárolók nyitott tetejű cellás tároló rendszerrel (*13. ábra*). A szállítmányok ki- és berakodása gravitációs módszerrel történik. A mintákat az 1-3. szinteken (2008.10.02.), az 1–8 szinteken (2008.11.03) és a 4., 7. és 9-10. szinteken (2009.10.20.) vettük Budapesten, valamint az 1-2. szinteken (2012.01.25.) Jászapátiban. Budapesten a cellánként betárolt gabona mennyiségét mértük a halom magasság alapján. A levegőmintákat kültéren és egy beltéri referencia helyszínen (a budapesti tárházban egy nem *Tilletia*-gazdanövényt, azaz napraforgót tároló helyiségben) is vettünk. A mintavételek időtartama az *M3. melléklet*ben megadottak szerint alakult.



13. ábra A vizsgált gabonatárházak sematikus felépítése: a) vidéki tárház, b) központi tárház (a 13 emeletből 3-at ábrázoltunk), c) cellás rendszerrel tagolt tárolószint, d) referencia tér.

A kisebb méretű vidéki gabonatárolók a helyi termelők gabonájának tárolására szolgálnak. Ezen tárolók boltozatos tetejű síktárolók, a búzatárolás legegyszerűbb változatát képviselik. A ki- és berakodás rakodógépekkel vagy szállítószalagos rendszerrel történik, a búzát halmokban tárolják. Az épületek tárolókapacitása 1800–6000 tonna (átl. 3943 t), ahol 80-4400 tonna (átl. 1247 t) búzát tároltak a mintavételek idején. A mintavétel Békésszentandrás (2012.03.01., 1 cég), Dunavecse (2012.01.18., 1 cég), Hajdúszoboszlón (2009.07.27., 1 cég), Hódmezővásárhelyen (2012.03.21., 3 cég), Jászapátiban (2012.01.25., 1 cég, de más, mint a jászapáti központi tárház), Szalkszentmártonban (2012.01.18., 1 cég), Jászárokszálláson (2012.01.25., 1 cég) és Telekgerendáson (2012.03.01., 1 cég) zajlott. Minden tárolóban működtek ciklon porleválasztó rendszert a levegő eredetű gabonapor eltávolításához.

3.1.3. Por-mintavétel

A búza mintavételek során pormintákat is gyűjtöttünk, mégpedig a gabonatárolók vízszintes felületein leülepedett anyagból műanyag csövekbe. Pormintát vettünk a beltéri referencia mintavételi helyen is (a budapesti gabonatárház nem *Tilletia*-gazdanövényt, kukoricát, tároló helyiségében). A porminták vizsgálata során 3 mg port elegyítettünk 200 μ l 0,01%-os

Tween-20 oldattal, majd ebből 30 μ l-t pipettáztunk tárgylemezre. A számolt teliospórák mennyiségét „db teliospóra/mg” mértékegységben fejeztük ki.

3.1.4. Mintagyűjtés a DNS- és fehérjealapú vizsgálatokhoz

Két lengyel és egy régi magyar *Tilletia contraversa* izolátumot, valamint 5 db magyar *T. caries* izolátumot vontunk be a molekuláris diagnosztikai munkánkba. Ezek adatait és az izolátumok jelölését a 2. táblázat szemlélteti. A *T. contraversa*val fertőzött üszkös kalászokat Grazyna Szkuta (Növényvédelmi és Vetőmagvizsgáló Szolgálat, Központi Laboratórium, Torun /Central Laboratory, Plant Protection and Seed Inspection Service (PPSIS)/) bocsátotta a rendelkezésünkre, illetve herbáriumi anyag formájában Dr. Révay Ágnes (Magyar Természettudományi Múzeum, Növénytár, Budapest) szíves felajánlása alapján jutottunk hozzá. A *Tilletia cariess*el fertőzött mintákat Magyarország különböző régióiban 2008–2009-ben a megyei növényvédelmi felügyelők és Varga András növényvédelmi mikológus (Csongrád megyei Kormányhivatal Növény- és Talajvédelmi Igazgatósága) gyűjtötték.

2. táblázat A molekuláris vizsgálatokhoz felhasznált *Tilletia*-minták listája.

Izolátum jele	Faj megnevezése	Származási hely (ahol elérhető, a gazdanövény fajtája)	Gyűjtés ideje
TILLCAR 1	<i>Tilletia caries</i>	Tardos, Magyarország	2009
TILLCAR 2	<i>Tilletia caries</i>	Dudar, Magyarország (Capo)	2008
TILLCAR 3	<i>Tilletia caries</i>	Dudar, Magyarország (Capo)	2008
TILLCAR 4	<i>Tilletia caries</i>	Hódmezővásárhely, Magyarország	2009
TILLCAR 5	<i>Tilletia caries</i>	Debrecen, Magyarország	2008
TILLCO A	<i>Tilletia contraversa</i>	Lublin, Lengyelország	1999
TILLCO B	<i>Tilletia contraversa</i>	Lublin, Lengyelország (Rysa)	2000
TILLCO C	<i>Tilletia contraversa</i>	Hajdúnánás, Magyarország	1952

3.2. Mikroszkópos vizsgálatok

3.2.1. Teliospórák kinyerése és vizsgálata lemosásos módszerrel

A *Tilletia*-fajok jelenlétének meghatározásához a kiinduló mintamennyiség 50 g búzaszem volt. Ezt a mennyiséget 250 ml-es Erlenmeyer lombikba téve hozzáöntöttünk 100 ml 0,01%-os Tween-20 oldatot. A lombikot parafilmmel zártuk le, és rázógépen rázattuk 200 fordulat/perc egységen 3 percig. Ez nyújtotta a megfelelő erőhatást, mely által a mintában esetlegesen jelenlévő üszögpuffancsok felrepedhettek. Ezt követően a folyadékfázisból 15–20 ml-t átpipettáztunk egy 50 ml-es centrifugacsőbe és 8 percig 6000 fordulat/perccel centrifugáltuk. A felülúszót lepipettáztuk a pelletől, majd a pelletet újra feloldottuk 1–2 ml desztillált vízben. A mintából 30–40 μ l mennyiséget tárgylemezre pipettáztunk és pipettával összekevertük 1–2 csepp Shears-oldattal (MATHUR és KONGSDAL 2003). A fedőlemez felhelyezését követően a tárgylemezt alulról gázlámg felett néhány másodpercig melegítettük, ezzel kis mértékben tartósítva a mintát. A mikroszkópos vizsgálatot 250–400x nagyításon végeztük. A teliospóra-méret meghatározásához 1000x nagyítást használtunk immerziós

olajba merített lencsével (USDA 1974; OEPP/EPPO 1982, 2007). A *Tilletia*-teliospórák morfológiai meghatározását VÁNKY (2012) alapján végeztük.

Tween 20 oldat (0,01%)

Tween 20	0,1 ml
Desztillált víz	1000 ml

A Shear's oldat az alábbiak szerint készült: 19,212 g citromsavat 1000 ml desztillált vízben feloldottunk, és alaposan összekevertük. 28,382 g Na₂HPO₄-ot 1000 ml desztillált vízben feloldottunk, és alaposan összekevertük. 8,25 ml citromsav oldathoz 291,75 ml Na₂HPO₄ oldatot adtunk. Az így előállított oldatban feloldottunk 6 g kálium-acetátot, és alaposan összekevertük. Végül hozzáadtunk 120 ml glicerint és 180 ml 96%-os etil-alkoholt.

3.2.2. Fluoreszcens fénymikroszkópos vizsgálat

Ezt a vizsgálati eljárást STOCKWELL és TRION (1986) által leírt módszer szerint végeztük, kisebb módosításokat alkalmazva az alábbiak szerint. A vizes szuszpenzióban lévő teliospórákat mikroszkóp tárgylemezre pipettáztuk, és hagytuk beszáradni, majd ezt követően kis viszkozitású nem-fluoreszkáló immerziós olajat pipettáztunk a mintákra, és lefedtük fedőlemezzel. A fényvisszaverési tulajdonságokat fluoreszcens fénymikroszkóppal (Leica DM LB2, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) vizsgáltuk, és ehhez 50 W higanylámpát és I3 Leica szűrőket (450–490 nm extinkciós filter, 515 nm barrier filter) alkalmaztunk.

3.2.3. Spóracsapdázás során vett levegőminták kiértékelése

Néhány csepp laktofenolt tartalmazó gyapotkék festéket cseppentettünk a tárgylemezen lévő mintához, majd fedőlemezzel fedtük le. A kiértékelés Olympus BX51 fénymikroszkóppal történt 800x nagyításon, valamint Leica DM LB2 fénymikroszkóppal, 1000x nagyítást használva immerziós olajba merített lencsével. A *Tilletia*-teliospórák morfológiai meghatározását VÁNKY (2012) alapján végeztük.

3.2.4. Statisztikai elemzés

A teliospóra koncentráció értékek elemzéséhez nem-paraméteres statisztikai próbákat alkalmaztunk, mert az adatok nem mutattak normál eloszlást a Kolmogorov-Szmirnov-, és a

Lilliefors-próbák szerint. A levegő-, búza- és porminták teliospóra-koncentrációja közötti összefüggés feltárására Spearman-féle rangkorrelációt alkalmaztunk. A budapesti tárházban a tételek elkülönítésére alkalmazott félig zárt celláknak a teliospórák szabad terjedésére gyakorolt hatását külön is megvizsgáltuk. Ennek során kilenc emeleten, a félig zárt cellákat tartalmazó helyiségek két legtávolabbi pontján gyűjtöttünk levegőmintákat, melyek teliospóra-koncentrációja közötti eltérést a Wilcoxon-teszttel vizsgáltuk meg. A betárolt búzamennyiség hatását a levegő teliospóra koncentrációjára a Mann-Whitney U-teszttel elemeztük. A statisztikai értékeléshez a STATISTICA 6.1 szoftvert alkalmaztuk.

3.3. DNS-alapú módszerek alkalmazása a *Tilletia*-fajok elkülönítésére

3.3.1. DNS-kinyerés DNEasy Plant Mini Kit-tel

A kinyerést a gyártó használati utasításának megfelelően végeztük, kis módosítással, azaz a DNS-kinyerés lépéseinek végrehajtása előtt az Eppendorf-csőben lévő teliospórákra pipettázott 400 μ l Lizis pufferhez (AP1) néhány mg kvarchomokot adtunk, és sejthomogenizáló pálcával fél percig dörzsöltük a teliospórák falának feltörése érdekében.

3.3.2. DNS-koncentrációk

A vizsgálatba vont minták DNS-koncentrációja az alábbiak szerint alakult:

T. contraversa minták:

TILLCO A: 12,38 ng/ μ l

TILLCO B: 5,86 ng/ μ l

TILLCO C: 19,46 ng/ μ l

A *T. caries* esetében:

TILLCAR 1: 21,15 ng/ μ l

TILLCAR 2: 3,00 ng/ μ l

TILLCAR 3: 2,45 ng/ μ l

TILLCAR 4: 11,28 ng/ μ l

3.3.3. PCR-vizsgálatok

A. *Tilletia* faj-specifikus PCR (TILf, TILr)

A polimeráz láncreakciókat a BioRad iCycler Thermal Cycler készülékben, KOCHANOVA és munkatársai (2004) alapján végeztük.

Ehhez az alábbi primereket alkalmaztuk:

TILf: 5'-CACAAGACTACGGAGGGGTG-3'

TILr: 5'-CTCCAAGCAACCTTCTCTTTC-3'

A PCR reakció végtérfogata 25 μ l volt. A reakcióelegy a következő összetevőket tartalmazta:

PCR reakcióelegy:	végkoncentráció
10x puffer	1x
MgCl ₂	1,5 mM
dNTP	0,2 mM
TILf primer	0,8 μ M
TILr primer	0,8 μ M
Taq polimeráz	0,04 U/ μ l

A mixhez 2 μ l DNS-t adtunk. Az elegy mennyiségét 25 μ l-re egészítettük ki Fluka vízzel (Water for molecular biology, Fluka Analytical, 95284).

A PCR reakciókörülmények az alábbiak voltak: 5 min 95 °C-os kezdeti denaturáció, ezt 50 ciklusban 1 min 94°C-os denaturáció, 1 min 58°C-os primerkötés, 1 min 72°C-os lánchosszabbítás követte, melyet egy végső 4 min 72°C-os lánchosszabbítási szakasz zárt le.

A PCR-terméket 2%-os agaróz gélen való futtatást követően UV fényben vizualizáltuk és dokumentáltuk. A PCR termék mérete: 361 bp volt.

B. *Tilletia contraversára* specifikus PCR-eljárás

A polimeráz láncreakciókat a BioRad iCycler Thermal Cycler készülékben, YUAN és munkatársai (2009) alapján végeztük, az alábbi primerek használatával:

CQUTCK2: 5'-TCTAACTTACCTCGCGGTAGG-3'

CQUTCK3: 5'-ACGCAGTGACGGGTGGATA-3'

A PCR reakció végtérfogata 25 μ l, a reakcióelegy összetétele a következő volt:

PCR reakciókeverék:	végkoncentráció
10x Puffer	1x
MgCl ₂	1,5 mM
dNTP	0,2 mM
CQUTCK2 primer	0,4 μ M
CQUTCK3 primer	0,4 μ M
Taq polimeráz	0,04 U/ μ l

A mixhez 2 μ l DNS-t adtunk. Az elegy mennyiségét 25 μ l-re egészítettük ki Fluka vízzel (Water for molecular biology, Fluka Analytical, 95284).

A PCR program lépései az alábbiak voltak: 3 min 94 °C-os kezdeti denaturáció, ezt 40 ciklusban 30 s 94°C-os denaturáció, 30 s 60°C-os primerkötés, 45 s 72°C-os lánchosszabbítás követte, melyet egy végső 7 min 72°C-os lánchosszabbítási szakasz zárt le.

A PCR-terméket 1,5%-os agaróz gélen való futtatást követően UV fényben vizualizáltuk és dokumentáltuk, a várt PCR termék mérete 747 bp volt.

A módszert kilencszer ismételve próbáltuk meg reprodukálni. A CQUTCK2/CQUTCK3 primerpár nem amplifikálja a mintáinkból a *T. contraversa* specifikus terméket.

Ezután megkíséreltük az alábbi primerpár alkalmazásával a cikkben szereplő másik módszer reprodukálását, mellyel a fenti primer-párt kifejlesztették:

P23-BA0166: 5'-AAGGCGGCAG-3'

CQUTCK1: 5'-CCCTAAACCCTAACCCWAA-3'

A PCR reakció végtérfogata 25 μ l, a reakcióelegy összetétele a következő volt:

PCR reakciókeverék:	végkoncentráció
10x Puffer	1x
MgCl ₂	3,0 mM
dNTP	0,4 mM
P23-BA0166 primer	0,25 μ M
CQUTCK1 primer	0,25 μ M
Taq polimeráz	0,04 U/ μ l

A mixhez 2 μ l DNS-t adtunk. Az elegy mennyiségét 25 μ l-re egészítettük ki Fluka vízzel (Water for molecular biology, Fluka Analytical, 95284).

A PCR program lépései az alábbiak voltak: 4 min 94 °C-os kezdeti denaturáció, ezt 5 ciklusban 30 s 94°C-os denaturáció, 45 s 53°C-os primerkötés, 1 min 72°C-os lánchosszabbítás követett, ezután 10 ciklusban 30 s 94°C-os denaturáció, 45 s 36°C-os primerkötés, 1 min 72°C-os lánchosszabbítás következett, melyet egy végső 10 min 72°C-os lánchosszabbítási szakasz zárt le.

A PCR-terméket 1,5%-os agaróz gélen való futtatást követően UV fényben vizualizáltuk és dokumentáltuk, a várt PCR termék mérete 1322 bp volt.

C. *Tilletia contraversa* azonosítása SCAR-marker felhasználásával

A polimeráz láncreakciókat a BioRad iCycler Thermal Cycler készülékben, GAO és munkatársai (2010) alapján, az alábbi primereket felhasználva végeztük.

TCKSF3: 5'-CACACACACACAGGAAGC-3'

TCKSR3: 5'-CGAGGAAGCAGACAAGGCAT-3'

A PCR reakció végtérfogata 25 μ l volt. A reakcióelegy összetétele a következők szerint alakult:

PCR reakciókeverék:	végkoncentráció
10x puffer	1x
MgCl ₂ (25 mM)	2 mM
dNTP (10 mM)	0,12 mM
TCKSF3 primer (10 mM)	0,4 μ M
TCKSR3 primer (10 mM)	0,4 μ M
Taq polimeráz (2,5 U/ μ l)	0,02 U/ μ l
DNS (25 ng)	3

Az elegy mennyiségét 25 μ l-re egészítettük ki Fluka vízzel (Water for molecular biology, Fluka Analytical, 95284).

A PCR reakció körülményei az alábbiak voltak: 5 min 94 °C-os kezdeti denaturáció, ezt 30 ciklusban 30 s 94°C-os denaturáció, 30 s 55°C-os primerkötés, 1 min 72°C-os lánchosszabbítás követte, melyet egy végső 10 min 72°C-os lánchosszabbítási szakasz zárt le.

A PCR-terméket 1,5%-os agaróz gélen futtatást követően UV fényben vizualizáltuk és dokumentáltuk, a PCR termék mérete: 419 bp volt.

Az eredeti cikk szerinti körülményeket ismételve viszonylag halvány sávokat kaptunk a gélben. A PCR körülményeken változtatva, optimalizálva elértük, hogy a sávok határozottabbak lettek. A módszerfejlesztés sikeres volt a PCR-program változtatásával.

Az új, általunk fejlesztett PCR-programban a lánchosszabbítás ideje hosszabb. A bekötődés hőfokát változtattuk meg, touch down PCR-t alkalmazva. 5 ciklus előzte meg a fő 35 db PCR ciklust, ahol a bekötődés hőmérsékletét csökkentettük 45°C-ra. Az alacsonyabb hőmérséklet elősegíti a primer bekötődését (akkor is megtörténik a bekötődés, ha nem teljesen azonos a templát és a primerek bázissorrendje).

A PCR reakció körülményei az alábbiak voltak: 15 min 95 °C-os kezdeti denaturáció, ezt 5 ciklusban 30 s 94°C-os denaturáció, 30 s 45°C-os primerkötés, 30 s 72°C-os lánchosszabbítás követett. Ezután 30 s 94 °C-os kezdeti denaturáció, majd 30 ciklusban 30 s 94°C-os denaturáció, 30 s 55°C-os primerkötés, 30 s 72°C-os lánchosszabbítás következett, melyet egy végső 10 min 72°C-os lánchosszabbítási szakasz zárt le.

3.4. Fehérjealapú módszerek alkalmazása a *Tilletia*-fajok elkülönítésére

3.4.1. Fehérjék kinyerése teliospórákból

Negyven-negyvenöt mg *T. contraversa* teliospórárt, illetve 35-40 mg *T. caries* teliospórárt mértünk ki Eppendorf-csövekbe, és hozzáadtunk 600 μ l desztillált vizet (1:15 w/v arány). A teliospórák felszínének tisztítása céljából a mintákat 3 percig vortexeltük, majd 13 000 rpm fordulatszámon 2 percig centrifugáltuk, és a felülúszót minden esetben eltávolítottuk. Ezt a lépést addig ismételtük, amíg a felülúszó víztiszta nem lett (3-4 ismétlést igényel). A legutolsó centrifugálás ideje 3 perc volt 13 000 rpm fordulatszámon. A teliospórák falának feltörése előtt 500 μ l PBS-t, azaz foszfát-puffer oldatot (0,137 M NaCl, 0,0027 M KCl, 0,01 M Na₂HPO₄ és 0,002 M KH₂PO₄, pH 7,4) adtunk a pellethez. A keveréket 1-2 percig vortexeltük, ezután pedig 2 ml-es csavaros tetejű műanyag csövekbe pipettáztuk át, amelyekbe 0,2 g mennyiségű 0,5 mm átmérőjű üveggyöngyöt helyeztünk. A csövek lezárását követően a mintákat 10 percig jégen inkubáltuk. A spórafal feltörése MagNA Lyser készülékben (Roche Applied Science, Mannheim, Németország) történt (160 másodperc, 4800 fordulat/perc). A roncsolást követően a keveréket 1 percig 13 000 rpm fordulatszámon centrifugáltuk, és a felülúszót új Eppendorf-csőbe pipettáztuk. Ezután újabb centrifugálás következett 10 percig 13 000 rpm fordulatszámon, majd a felülúszót ismét új Eppendorf-csőbe pipettáztuk. Ezt a felülúszót újra 10 percig 13 000 rpm fordulatszámon centrifugáltuk, majd a pellet felsértése nélkül a folyadékot új Eppendorf-csőbe pipettáztuk. A fehérjeoldatot 5 percig 13 000 rpm fordulatszámon centrifugáltuk, és ezt követően egy 0,45 μ m lyukbőségű műanyag szűrőn (Millipore) szűrtük át. A minták fehérjekoncentrációját a Bradford-módszer alapján határoztuk meg (ROSENBERG 2004). A kinyert fehérjemintákat aliquotokra osztva további felhasználásig -70°C-on tároltuk.

Az általunk is alkalmazott MagNA Lyser asztali készülék felhasználható a sejtek vagy más biológiai anyagok feltárására, valamint olyan nukleinsav- vagy fehérjetartalmú felülúszó képzésére, mely további tisztítási folyamatnak, kinyerésnek és analízisnek vethető alá. Az eszköz alkalmas emlős, növényi vagy egyéb szövet (pl. gomba) feltárására is. Működés közben a speciális mintatartó csövekkel működő MagNa Lyser készülék rotorja nagy sebességgel oszcillál. Az eltávolítható rotor maximálisan 16 minta befogadására alkalmas. Az oszcilláló mozgás erősen keveri a csövek tartalmát (kerámia/üveggyöngyök, sejtek, lízisreagensek) extrém magas sebességgel forogva. A mintatartó csövekben lévő sejtek fala szinte azonnal feltörik, amint összeütköznek a kerámia-, illetve üveggyöngyökkel. Az ütközés mértéke és energiája (melyek a feltörés hatékonyságát befolyásolják), az alkalmazott rázási sebességtől és a gyöngyök gravitációs tulajdonságaitól függ. Ezen paraméterek beállításával optimális eredményt érhetünk el. A működtetés idejének megválasztása is fontos tényező, a szövetféleség függvényében. A MagNa Lyser készülékkel leegyszerűsíthető a munkaigényes minta-előkészítési folyamat, valamint állandó és megismételhető hatékonysággal dolgozik. A kísérleteink során a kerámia gyöngyök helyett 0,2 mm átmérőjű üveggyöngyöket alkalmaztunk.

3.4.2. Egydimenziós gél-elektroforézis (1-D SDS-PAGE)

A gélelektroforézis vizsgálatokat LAEMMLI (1970) leírását követve végeztük. Az előkészítés során a kinyert fehérjemintákhoz 4x-es SDS mintaoldó puffert adtunk 3:1 térfogatarányban, majd 3 percre forrásban lévő vízbe tettük az oldódás elősegítésére. Ezután mintánként 15-30 μ l mennyiséget (kb. 1 μ g/ μ l fehérjekoncentráció) vittünk fel a gélre.

Az SDS mintaoldó puffer (12,5 ml, pH 6,8) összetétele:

SDS	0,375 g
Trisz-(hidroximetil)-amino-metán	0,0945 g
Glicerol (87%-os)	1,25 ml
β -merkapto-etanol	1,25 ml
Desztillált víz	10,6 ml

A vizsgálatokat E5889 – Dual mini típusú (Sigma-Aldrich Co. LLC) vertikális gélelektroforézis készüléken végeztük.

A főgél (10%-os, 5 ml-re) összetétele a következő volt:

Desztillált víz	2360 μ l
38,5% akril-amid	1290 μ l
TRISZ 1,5 M (pH: 8,8)	1250 μ l
10%-os SDS	50 μ l
10 % ammónium-persulfát	50 μ l
TEMED	2 μ l

A főgél kiöntése után alkohollal (etanol) csökkentettük a felületi feszültséget, melynek eredményeként a gélfelszín homogén maradt. Az etanolt csak a főgél megkötése után távolítottuk el. Ezután gyűjtőgélét öntöttünk a főgél fölé, melynek az alábbi volt az összetétele:

Gyűjtőgél (5%-os, pH 6,8, 3 ml-re):

Desztillált víz	2160 μ l
38,5% akril-amid	390 μ l
TRISZ 1,5M (pH: 6,8)	390 μ l
10%-os SDS	30 μ l
10 % ammónium-persulfát	30 μ l
TEMED	3 μ l

Az egydimenziós gél-elektroforézis során az alábbi futtató puffert használtuk:

TRISZ	3,03 g
SDS	1,0 g
Glicin	14,4 g

1000 ml-re feltöltve desztillált vízzel.

A gél futtatása során a következő paramétereket alkalmaztuk: feszültség 55 V, amíg a brómfenolkék jelzőfesték elérte a gyűjtőgél alját, majd 45 V, amíg a brómfenolkék jelzőfesték elérte a főgél alját. Az alkalmazott áramerősség 6 mA, a futtatás ideje mintától függően 3-4 óra volt.

A gélt 15 percig fixáltuk 12%-os triklór-ecetsavban (TCA), ezalatt a szétválasztott fehérjék adott helyen kicsapódtak, rögzültek. A kék ezüst gél-festést CANDIANO és munkatársai (2004) alapján végeztük. Az alkalmazott festékoldat összetétele a következő volt:

Desztillált víz	25 ml
Foszforsav	25 ml
Ammónium-szulfát	25 g
Coomassie G-250 festék	0,3 g

A szilárd halmazállapotú összetevők feloldódását követően (30 percig mágneses keverőn kevertetve) az alábbi összetevőket adtuk az oldathoz: 200 ml desztillált víz és 50 ml etanol. A festékoldat barna üvegben tárolva legfeljebb 6 hónapig stabil.

A gélt a festést követően kamerával lefotóztuk és Quantity One 1-D Analysis szoftver (Bio Rad) segítségével értékeltük ki.

3.4.3. A PBS-puffer hatékonyságának vizsgálata a 2x Laemmli-pufferrel szemben

A fehérjék teliospórákból történő kinyeréséhez az alábbi kétféle puffert használtuk.

A PBS-puffer receptje:

NaCl	0,137 M
KCl	0,0027 M
Na ₂ HPO ₄	0,01 M
KH ₂ PO ₄	0,002 M
pH 7.4	

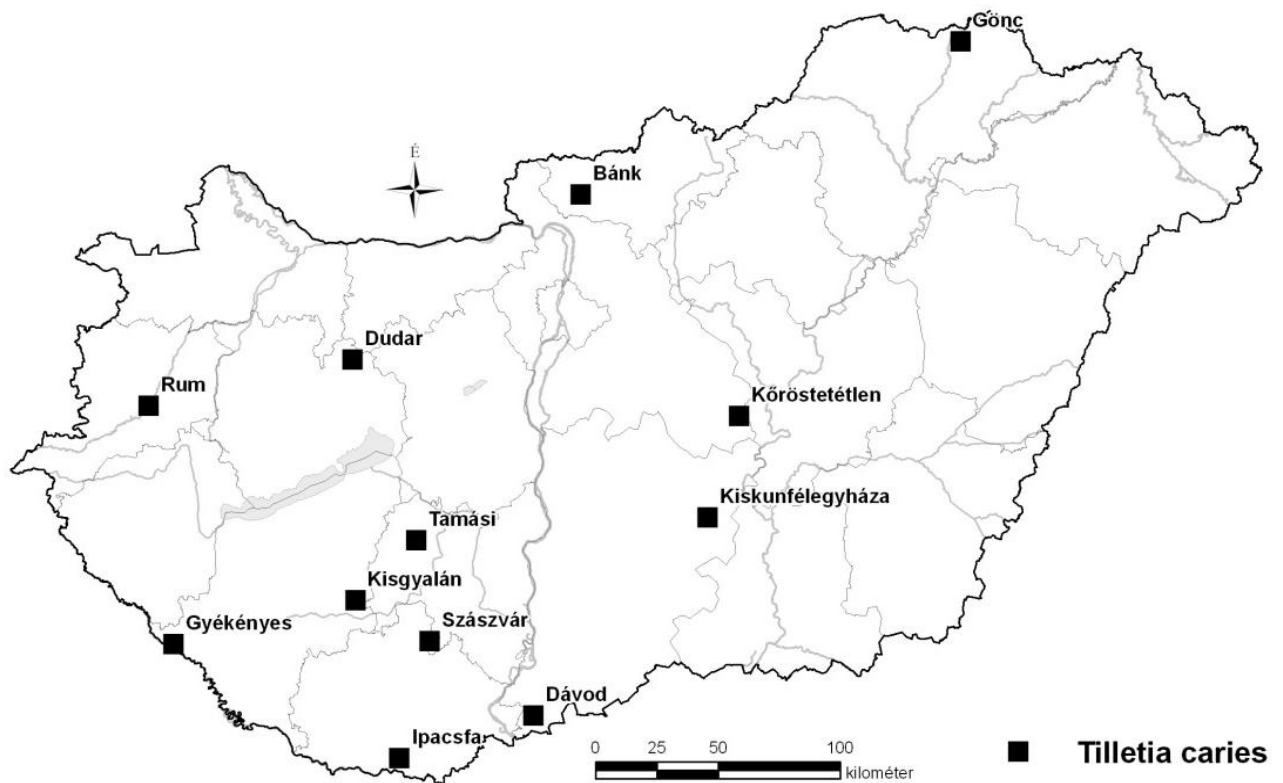
A 2x Laemmli-puffer receptje megegyezik az SDS mintaoldó puffer (12,5 ml, pH 6,8) összetételével.

Az 1-D SDS-PAGE futtatási körülményei, fixálása és festése megegyeztek a 3.4.2. fejezetben leírtakkal.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A 2007-2013. évi országos *Tilletia*-felderítések

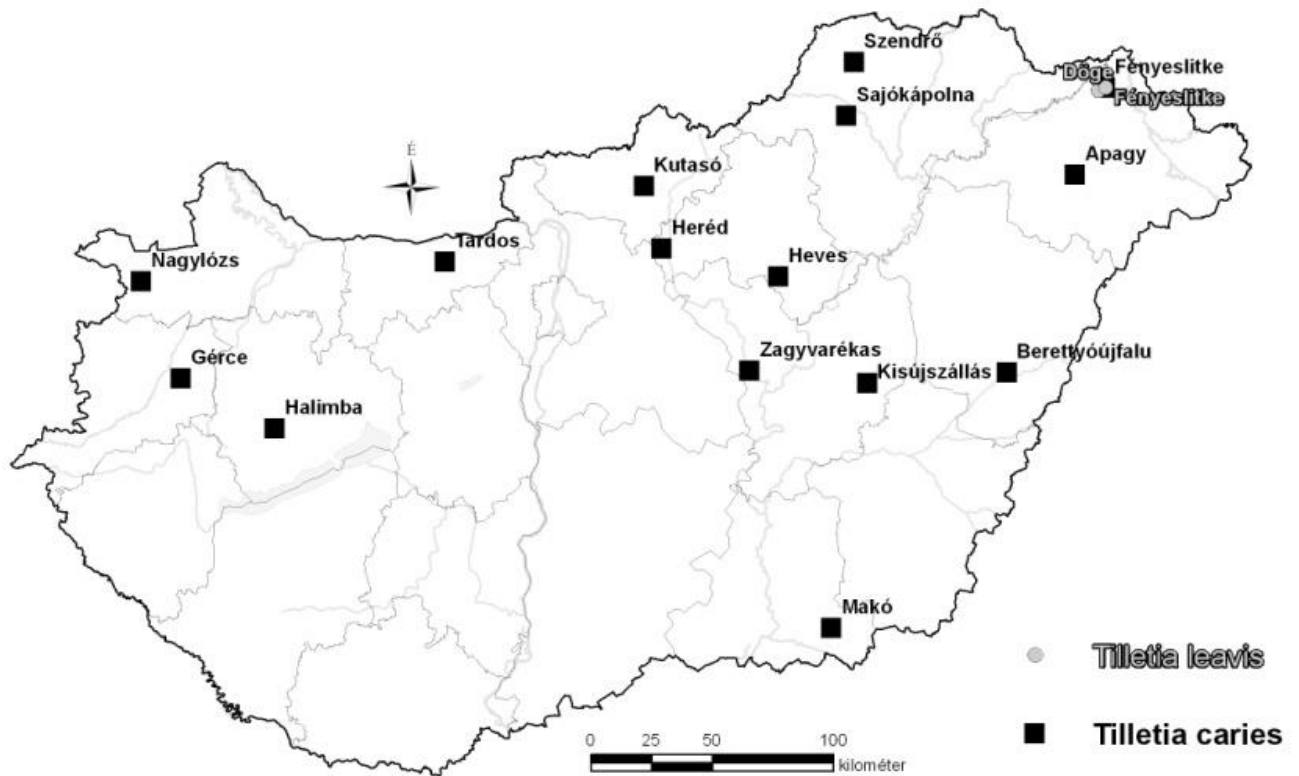
2007-ben a *Tilletia*-fajok felderítése 3000 ha-ra terjedt ki. A begyűjtött minták laboratóriumi vizsgálata során sem *T. contraversa*, sem egyéb *Tilletia*-fajokat nem mutattunk ki. 2008-ban az országos *Tilletia*-felmérést hozzávetőlegesen 4500 ha-on végeztük el, melynek során a növényvédelmi felügyelők 94 db őszi búza mintát gyűjtöttek. A 94 mintából 12-ben találtunk *T. caries* teliospórákat, de valamennyi minta mentesnek bizonyult a *T. contraversa* kórokozótól. A *T. caries*szel fertőzött búzaminták a 14. ábrán jelölt mintavételi helyekről származtak.



14. ábra A *Tilletia caries* előfordulási helyei Magyarországon 2008-ban. (térkép: NÉBIH NTAI AKV Ig.)

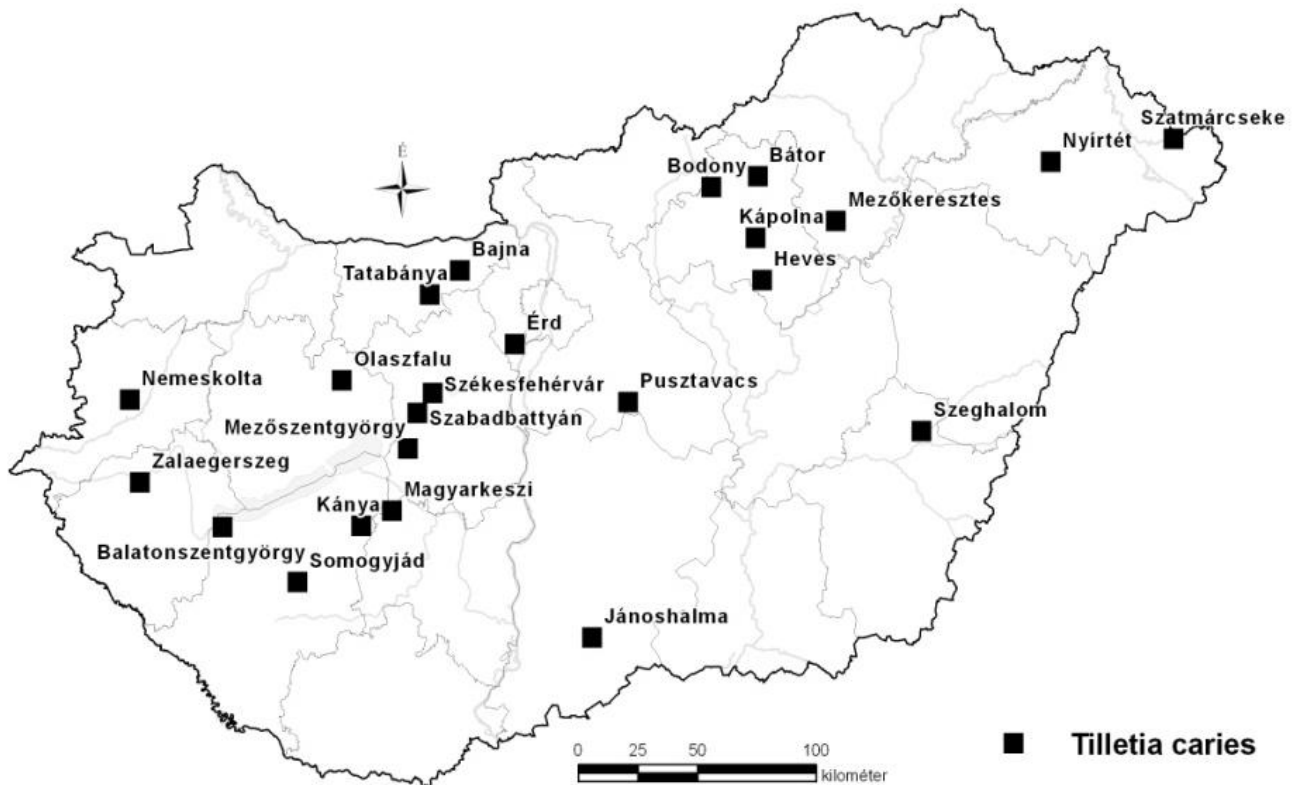
2009-ben a növényvédelmi felügyelők 3810 ha-on végezték el a *Tilletia*-fajok felvételezését, amelynek keretében összesen 105 db búzaminta érkezett a laboratóriumunkba. A 105 db mintából 17 minta volt üszöggel fertőzött. Tizenöt mintából mutattunk ki *T. caries* fertőzést. Egy mintában találtunk *T. caries* és *T. laevis* kevert fertőzést (Fényeslitke), valamint egy mintában

csak *T. laevis* kórokozót azonosítottunk (Döge). Egyik mintában sem találtunk *T. contraversa* teliospórákat. Emellett, termelői megrendelésre, megvizsgáltunk 3 db tönkölybúza (*Triticum spelta*) mintát is. Mindhárom tönkölybúza minta *T. cariesszel* volt fertőzött. A 2009-es felvételezésből származó fertőzött minták a 15. ábrán feltüntetett mintavételi helyekről származnak.



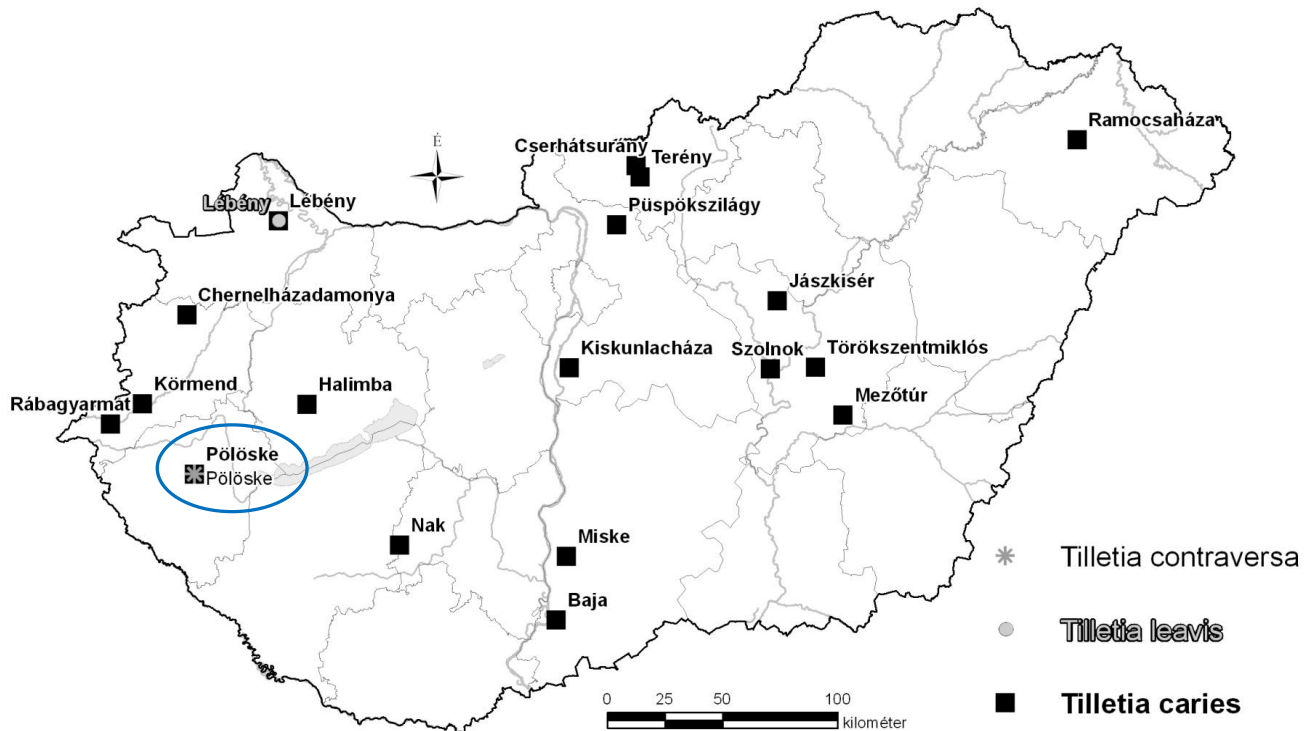
15. ábra A *Tilletia caries* és *T. laevis* előfordulási helyei Magyarországon 2009-ben. (térkép: NÉBIH NTAI AKV Ig.)

2010-ben az országos *Tilletia*-felderítés hozzávetőlegesen 3900 ha-on történt, ennek során a növényvédelmi felügyelők 103 db mintát gyűjtöttek. A 103 db mintából 24 bizonyult *Tilletia cariesszel* fertőzöttnek a laboratóriumi vizsgálatok során (Szeghalomról két különböző tábláról kaptunk mintát, és mindkét mintában kimutattuk a *T. cariest*), viszont *Tilletia contraversát* egyik mintából sem tudtunk kimutatni. Termelői megrendelés alapján még két minta érkezett vizsgálatra a laboratóriumba, de ezek *Tilletia*-fajoktól mentesek voltak. A *T. cariesszel* fertőzött, 2010-ben gyűjtött búzaminták a 16. ábrán látható mintavételi helyekről származnak.



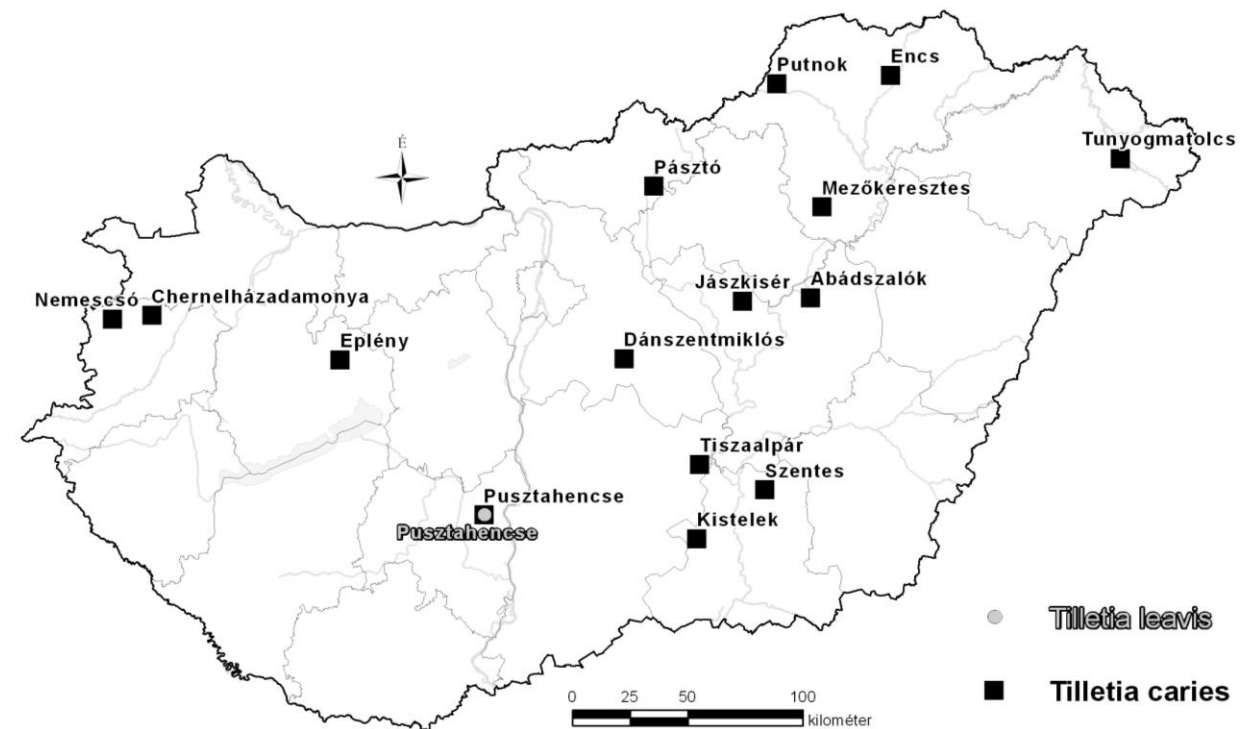
16. ábra A *Tilletia caries* előfordulási helyei Magyarországon 2010-ben (térképet készítette: NÉBIH NTAI AKV Ig.)

A *Tilletia* fajok felvételezését 2011-ben 3000 ha-on végezték el a felügyelők, és ennek során 90 db őszi búza mintát gyűjtöttek. A 90 db mintából 18-ban találtunk *T. caries* teliospórákat. A 18 mintából kettőben kevert fertőzést is kimutattunk: egyben kevert fertőzés formájában *T. laevis* spórákat is azonosítottunk (Lébény), a másik vizsgált mintában pedig *T. contraversa* teliospórákat detektáltunk (Pölöske) (17. ábra).



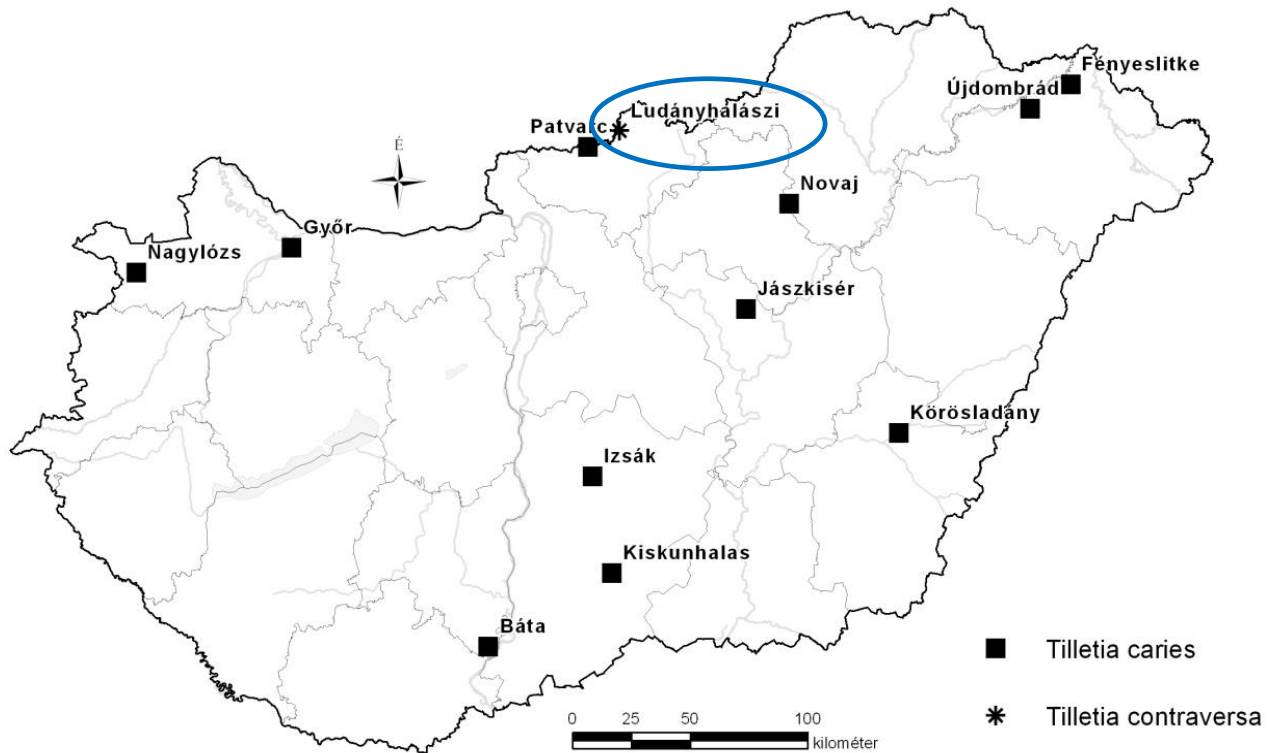
17. ábra A *Tilletia caries*, *T. laevis* és *T. contraversa* előfordulási helyei Magyarországon 2011-ben. (térkép: NÉBIH NTAI AKV Ig.)

2012-ben a *Tilletia*-fajok országos felderítése 98 db mintát eredményezett. A 98 db mintából 83 db-ban nem találtunk semmilyen *Tilletia*-kórokozót, viszont 15 db mintából *T. cariest*, 1 db mintából pedig kevert fertőzés formájában *T. cariest* és *T. laevis* mutattunk ki (Pusztahencse) (18. ábra). Érkezett továbbá az év elején 2 db minta a *Tilletia indica* mentesség igazolása céljából, ezekben nem találtunk *T. indica* fajt. A 2011. évben a Zala megyei Pölöskeről azonosított *T. contraversa* miatt az érintett területen megemelt mintaszámmal fokozott felderítést végeztünk. 2012-ben a Pölöske környékéről behozott minták egyikéből sem tudtuk kimutatni a *T. contraversa* kórokozót, sőt ebben az évben ezen mintákban egyetlen más *Tilletia*-fajt sem találtunk.



18. ábra A *Tilletia caries* előfordulási helyei Magyarországon 2012-ben. (térkép NÉBIH NTAI AKV Ig.)

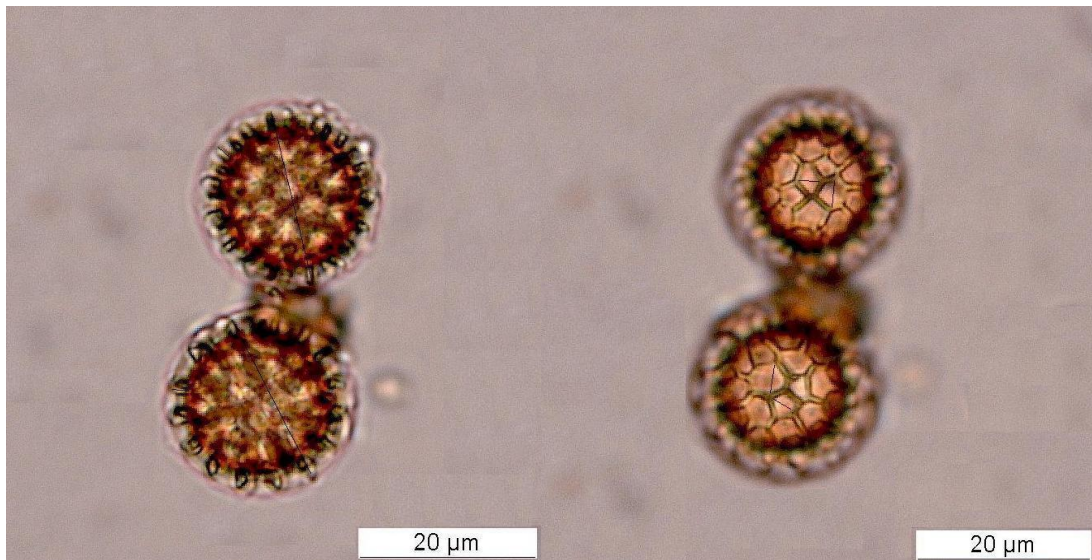
A 2013-ban végzett felderítés eredményei még nem teljesek, de fontosnak tartom kiemelni, hogy ebben az évben is detektáltunk egy mintában *T. contraversa* fertőzést (19. ábra). Egyébként az eddig beérkezett 78 db mintából 12 db bizonyult üszöggel fertőzöttnek (Fejér és Vas megyékből nem kaptunk még mintát).



19. ábra A *Tilletia caries* és *T. contraversa* előfordulási helyei Magyarországon 2013-ben.
(térkép NÉBIH NTAI AKV Ig.)

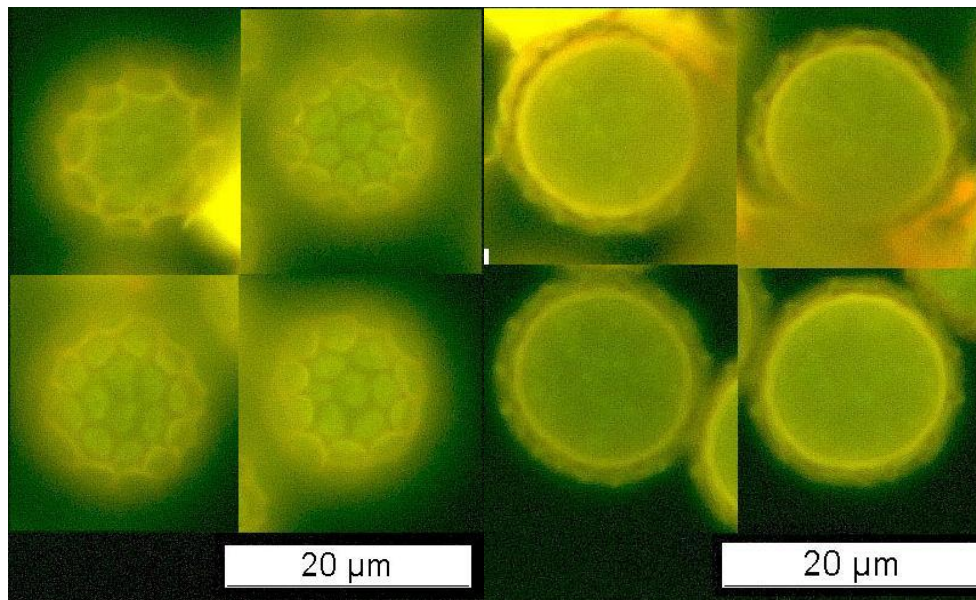
A pozitív eredmények összesítve az *M4.1.-es mellékletben* található.

A *T. contraversa* fertőzésre gyanús mintát mind a lemosásos módszerrel, mind a fluoreszcens fénymikroszkópos módszerrel megvizsgáltuk. Szabad szemmel vizsgálva az üszögpuffancsok feketésbarna színűek, a trimetil-amintól romlott halszagúak voltak, bennük a spórák összetapadtak. A teliospórák arany-, illetve sötétbarna színűek, átmérőjük $19,29 \pm 1,3 \mu\text{m}$ volt. A spórafaluk lécesen vastagodott, átlónként 4–5 mezőcske volt megfigyelhető, a mezőcskék mérete $3,08 \pm 1,04 \mu\text{m}$. A spórafalról kiemelkedő lécek, a tüskék átlagosan $1,49 \pm 0,69 \mu\text{m}$ hosszúak voltak, a spórát körülvevő átlátszó zselatinburok mérete $2,44 \pm 0,18 \mu\text{m}$ volt (20. ábra).



20. ábra A *Tilletia contraversa* teliospórák fénymikroszkópos képe a spórák lemosásos kinyerését követően. Balra: egyenlítői síkban fókuszálva, jobbra: felszíni nézetben, poláris síkban fókuszálva (1000x). (Saját felvétel.)

A fluoreszcens fénymikroszkópos technika segítségével a következő morfológiai bélyegeket figyeltük meg a *T. contraversa* teliospórakon: a spórák narancssárgás színűek, a citoplazma sárgás-zöldes színben fluoreszkál. A léces falszerkezet felülnézetben hálózatos, futball-labdára emlékeztető mintázatú; a spóra kerületén pedig tüskék formájában látható, rajzolt Nap jellegű (21. ábra).

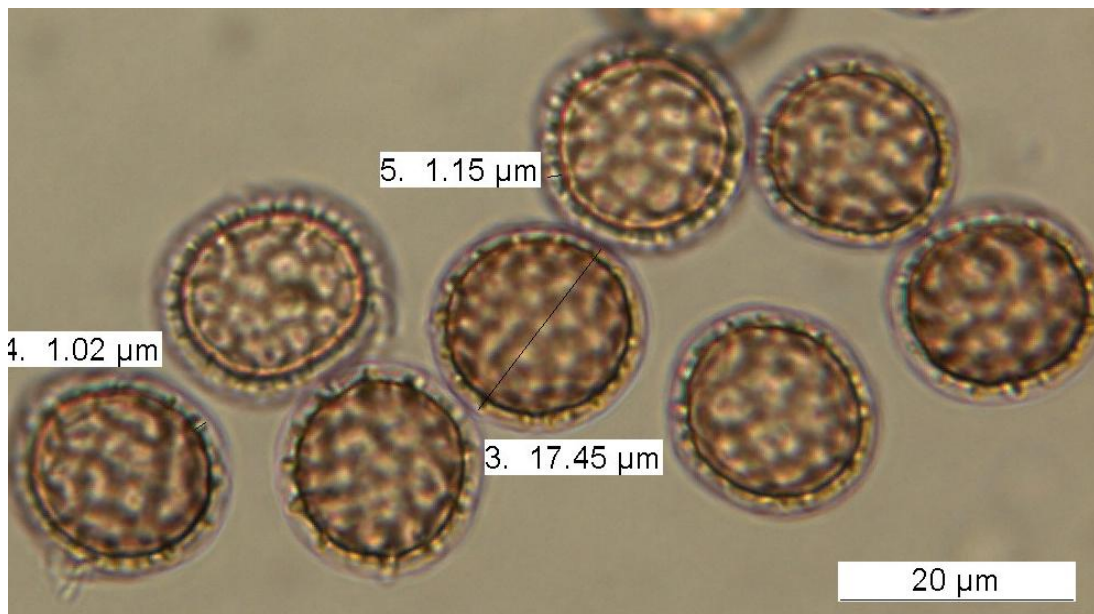


21. ábra A *Tilletia contraversa* teliospórák fluoreszcens fénymikroszkópos képe. Jobbra a léces falszerkezet a spóra kerületén tüskék formájában figyelhető meg (rajzolt Nap jellegű), balra: a léces falszerkezet felülnézetben hálózatos, futball-labdára emlékeztető rajzolatú (1000x).

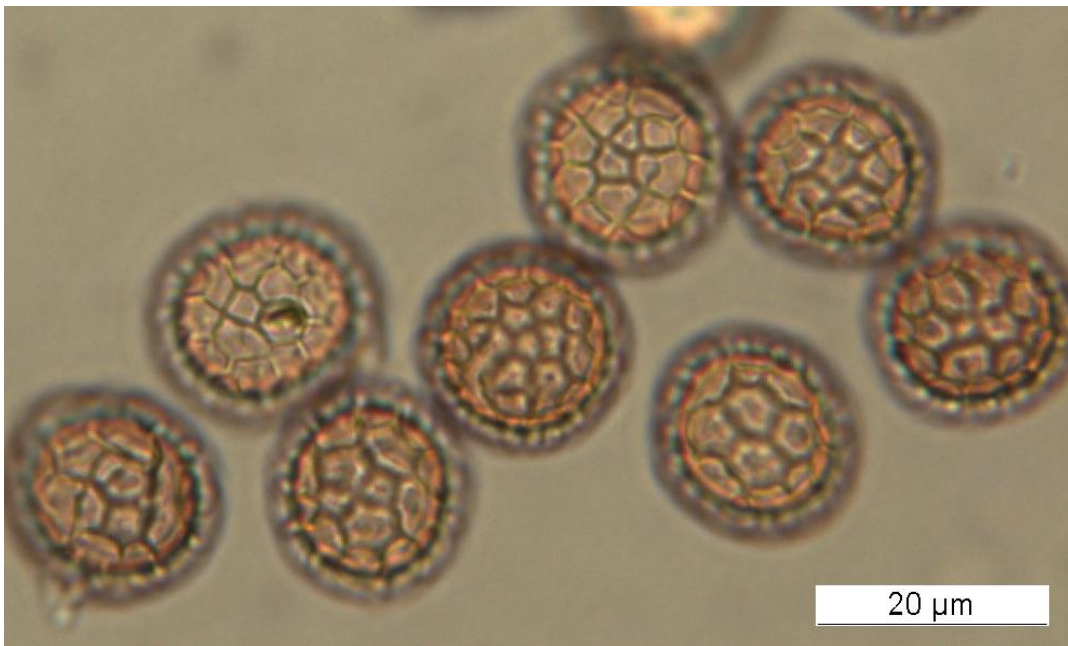
(Saját felvétel.)

A *T. caries* és *T. laevis* fajokkal fertőzött mintákban talált teliospórák az irodalmi adatoknak megfelelő morfológiai jellemzőkkel rendelkeztek, amint azt az ezekkel kapcsolatos vizsgálati eredmények is mutatják.

A feltételezeten *T. cariessel* fertőzött mintákat is két módszerrel vizsgáltuk, a lemosásos és a fluoreszcens fénymikroszkópos módszerrel. Az üszőgpuffancsok belsejében lévő spóratömeg sötétbarna volt, porszerűen széteső. A teliospórák gömbölyűek, sárgás vagy világosbarna színűek, $17,41 \pm 1,2 \mu\text{m}$ átmérőjűek voltak. A teliospórák fala léces szerkezetű volt, és 4-5 mezőcskét figyeltünk meg átlónként, a mezőcskék $3,55 \pm 0,45 \mu\text{m}$ átmérőjűek. A spórafalról kiemelkedő kisméretű tüskék átlagosan $0,99 \pm 0,014 \mu\text{m}$ rövidek voltak (22. és 23. ábra).

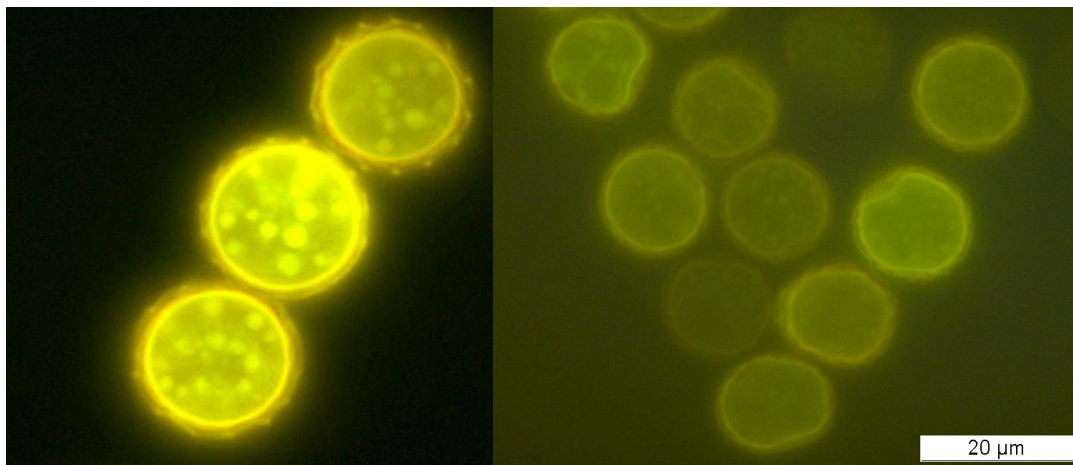


22. ábra A *Tilletia caries* teliospórák fénymikroszkópos képe a spórák lemosásos kinyerését követően egyenlítői síkban fókuszálva (1000x). (Saját felvétel.)



23. ábra A *Tilletia caries* teliospórák fénymikroszkópos képe a spórák lemosásos kinyerését követően felszíni nézetben, poláris síkban fókuszálva (1000x). (Saját felvétel.)

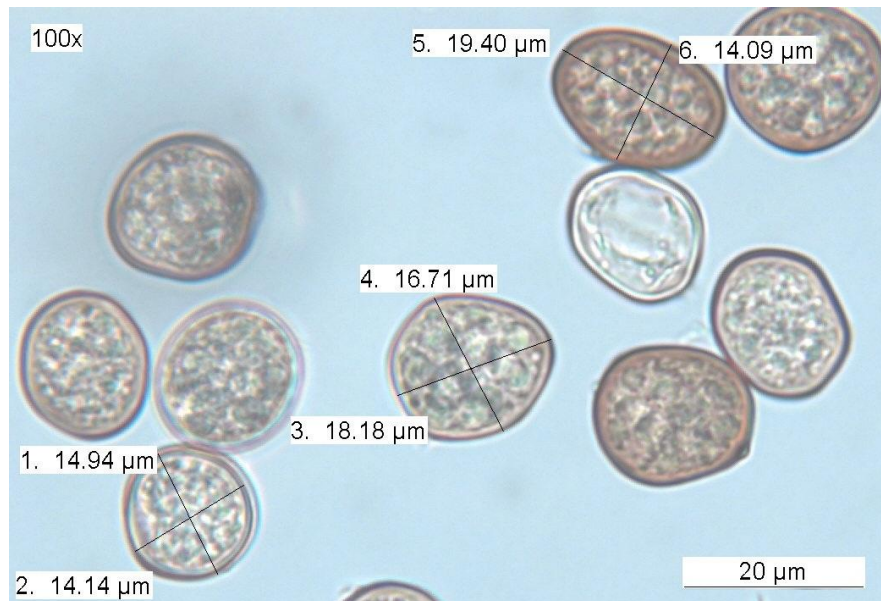
A *T. caries* fluoreszcens fénymikroszkópos vizsgálata során a következő morfológiai jellegeket figyeltük meg: a spórák citoplazmája világos, sárga-sárgászöld, fluoreszkáló gömböket tartalmaz, a spóra vékony burka nem fluoreszkál. Immerziós olajba merítve a *T. caries* teliospórák szerkezete összeomlott, ezért deformált képet mutattak (24. ábra).



24. ábra A *Tilletia caries* teliospórák fluoreszcens fénymikroszkópos képe. Balra: sárgás-zöldes fluorszkáló testek a teliospórák citoplazmájában, jobbra: immerziós olajba merített deformálódott szerkezetű teliospórák (1000x). (Saját felvétel.)

Néhány mintában *T. laevis* kórokozót mutattunk ki a lemosásos módszer segítségével. Ezekben az esetekben a spóratömeg barna volt és porszerű, nem összetapadt. A teliospórák

gömbölyűek vagy ovális alakúak, sárgásbarna színűek, sima felszínűek, $16.8 \pm 0.4 \mu\text{m}$ átmérőjűek voltak, citoplazmájukban olajcseppeket tartalmaztak (25. ábra).



25. ábra *Tilletia laevis* teliosporák fénymikroszkópos képe (1000x). (Saját felvétel.)

4.2. Levegő-mintavétel Hirst-típusú térfogatos spóracsapdával

A Hirst-típusú térfogatos spóracsapdával végzett mintavétel során gyűjtött levegő- és búzamintákban a *Tilletia caries* faj dominált, míg a *T. laevis* csak alacsony koncentrációban mutattuk ki a budapesti központi raktárban (Bp) gyűjtött mintákból. Ez utóbbi faj viszont a Jászapátiban (Ja) és a kisebb méretű vidéki siktárolókban vett mintákban egyáltalán nem fordult elő. Nem tudtuk kimutatni sem a zárlati kórokozóként nyilvántartott *T. indicát*, sem a nagy gazdasági jelentőségű *T. contraversát* egyik mintából sem.

A budapesti és vidéki gabonátárházakban begyűjtött minták levegő- és búzaeredetű teliospora-koncentrációját az 3. táblázatban foglaltuk össze. Közéértéket csak abban az esetben számoltunk, ha minimum három adat állt rendelkezésre, illetve ha nem csak nulla/zérus értékekből állt az adott adatsor.

3. táblázat A *Tilletia*-fajok levegőbeli (db teliospóra/m³) és búzatételben (db teliospóra/50g) mért koncentrációja a központi (Bp, Ja) és a vidéki gabonátárolókban.

		Beltéri levegő, db teliospóra/m ³					Kültéri levegő, db teliospóra/m ³					db teliospóra/50 g búzaminta				
		Minta- szám	Zérus értékek száma	Közép- érték	Min.	Max.	Minta- szám	Zérus értékek száma	Közép- érték	Min.	Max.	Minta- szám	Zérus értékek száma	Közép- érték	Min.	Max.
Bp	<i>Tilletia caries</i>	33	0	320	80	960	6	0	60	20	80	2	0	-	10	25
	<i>Tilletia laevis</i>		17	0	0	133.3		3	5	0	40		1	-	0	5
	törött <i>Tilletia</i> - fajok		0	480	100	2720		0	90	10	130		0	-	10	15
	egyéb <i>Tilletia</i> - fajok		1	233.3	0	780		0	50	20	140		0	-	10	25
Jp	<i>Tilletia caries</i>	3	2	-	0	10	1	1	-	0	0	3	1	-	0	20
	<i>Tilletia laevis</i>		3	-	0	0		1	-	0	0		3	-	0	0
	törött <i>Tilletia</i> - fajok		2	-	0	10		1	-	0	0		1	-	0	10
	egyéb <i>Tilletia</i> - fajok		2	-	0	10		1	-	0	0		3	-	0	0
vidéki	<i>Tilletia caries</i>	13	9	0	0	100	11	11	-	0	0	13	3	10	0	810
	<i>Tilletia laevis</i>		13	-	0	0		11	-	0	0		12	-	0	150
	törött <i>Tilletia</i> - fajok		10	0	0	120		11	-	0	0		8	0	0	1025
	egyéb <i>Tilletia</i> - fajok		12	-	0	70		9	-	0	8		13	-	0	0

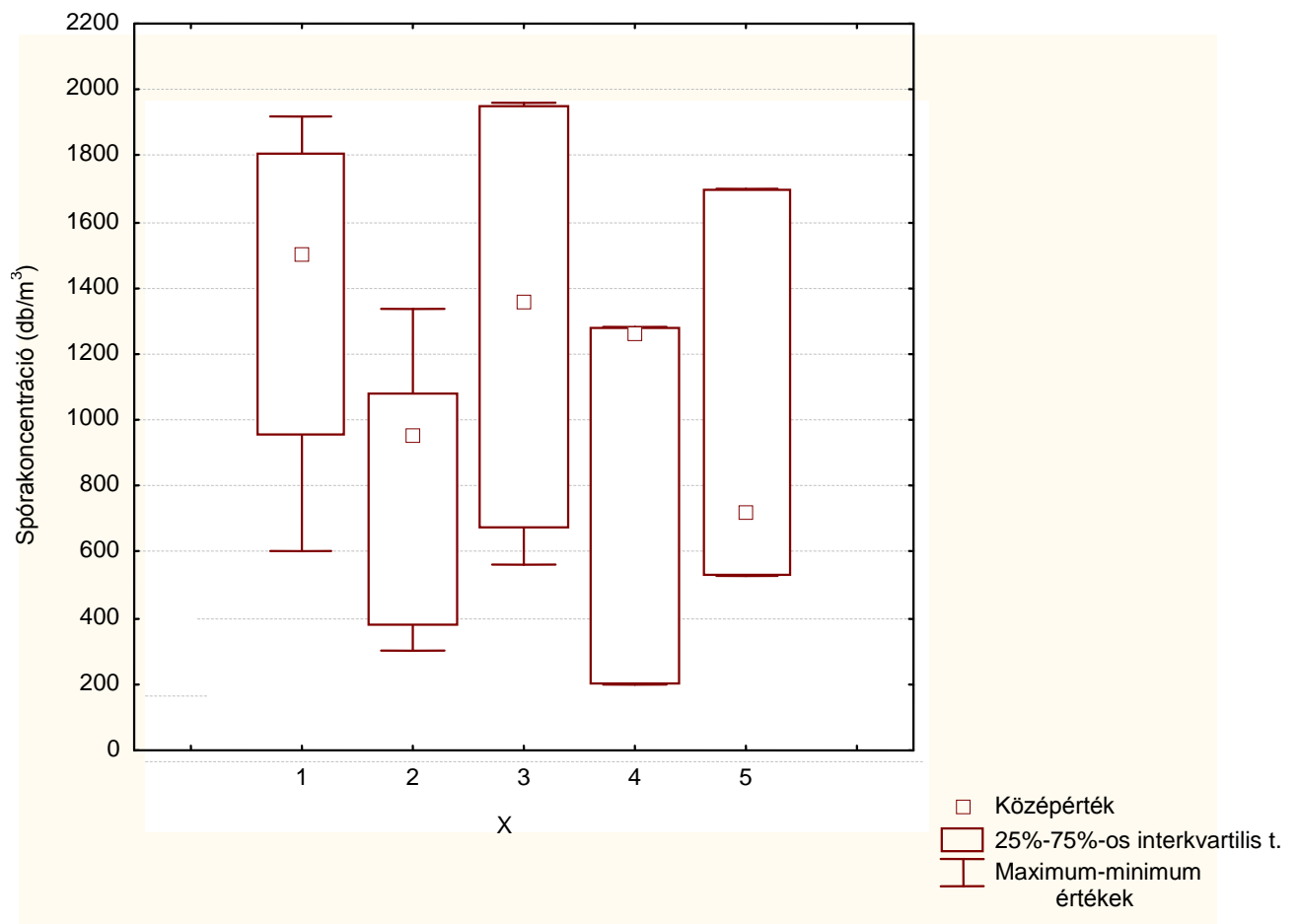
A 3. táblázat szerint a jászapáti központi raktárban (Ja) gyűjtött levegőminták teliospóra koncentrációja alacsonyabb volt, mint a budapestieké. A vidéki siktárolókban vett minták tekintetében a búzaminták 88,9%-ában, a porminták 25,8%-ában, valamint a levegőminták 56,3%-ában azonosítottuk a *Tilletia*-fajok teliospóráit. A mért spóra koncentrációk általában alacsony értékeket mutattak egy eset kivételével (Hódmezővásárhely, 3. helyszín), ahol kiemelkedően magas levegő- és búzamintabeli koncentrációt mértünk (220 db teliospóra/m³, 1985 db teliospóra/50g.).

Abban az esetben, ha a teliospórák kimutathatók voltak a levegőben, az ugyanott vett búzamintákat mindig fertőzötteknek találtuk, azonban ez nem mondható el fordított esetben. A mintavételek 38,8%-ában ugyanis nem tudtunk kimutatni *Tilletia*-teliospórákat a kőszöggel fertőzött búzahalom feletti levegőben.

A Budapesten (Bp) gyűjtött levegőmintákban (26. ábra) tehát magasabb koncentrációban voltak jelen a *Tilletia*-fajok teliospórái, mint a Jászapátiban (Ja) és a vidéki siktárolókban gyűjtött minták esetében. A budapesti levegőminták mindegyikében azonosítottunk teliospórákat. A fajok tekintetében a *T. caries*, a *T. laevis* és az egyéb (nem zárlati és gazdaságilag jelentős) *Tilletia*-teliospórák 31,5, 1,8 és 21,8 százalékban voltak jelen a beltéri mintákban, ugyanakkor a teliospórák 45%-a törött vagy sérült volt, ami miatt nem lehetett fajszerint azonosítani. A budapesti tárházban a kilenc emeleten, a félig zárt cellákat tartalmazó helyiségek két legtávolabbi pontján mért teliospóra koncentrációt összehasonlítva, nem találtunk szignifikáns különbséget az értékek között ($P=0,16$). A lineáris regresszió eredménye azt mutatta, hogy a két legtávolabbi mintavételi pont légköri teliospóra koncentrációja szignifikáns összefüggésben állt egymással, tehát amennyiben egyik ponton magas a spórakoncentráció, a másik ponton is az ($R^2=0,45$, $P=0,003$). Továbbá a betárolt búza mennyisége nem befolyásolta szignifikánsan a felette lévő levegőben mért *Tilletia*-koncentrációt ($P=0,64$, $U=3,00$) (27. ábra). (A búza mennyiségét a búzahalmok magasságával fejeztük ki.)



26. ábra Hirst-típusú levegő-mintavevővel Budapesten vett minta kiértékelése fénymikroszkóppal: *Tilletia caries* teliospórák fénymikroszkópos képe. (Saját felvétel.)



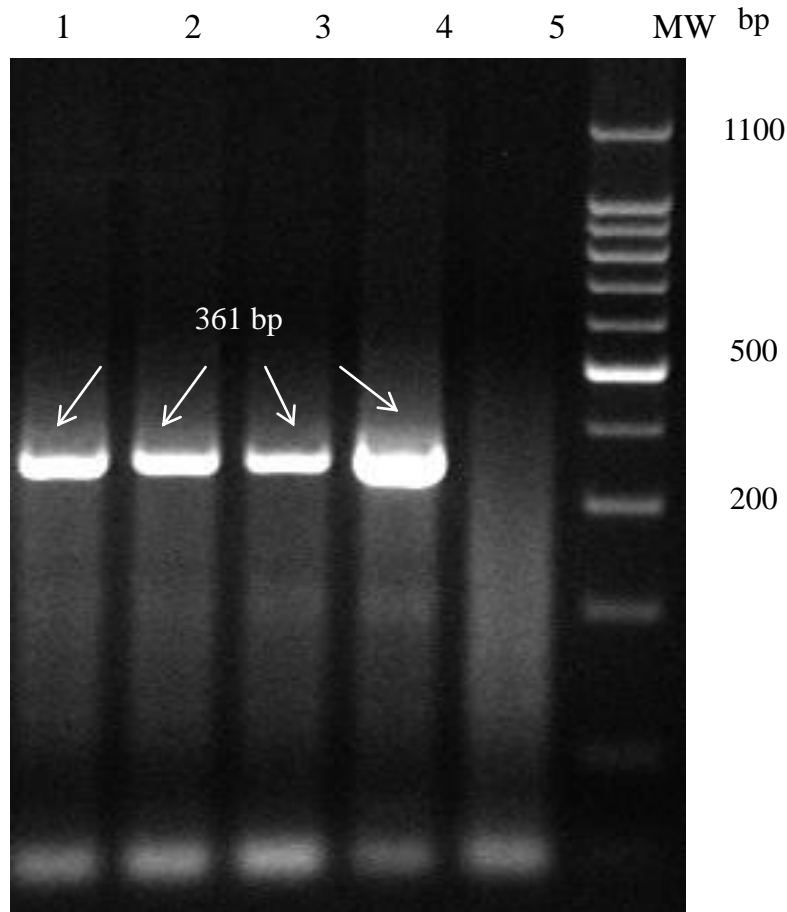
27. ábra A spórakoncentráció és a betárolt gabona mennyisége (gabonahalmok magassága) közötti összefüggés. Az X tengelyen feltüntetett kategóriák: 1: 1-10, 2: 11-25, 3: 26-99, 4: 100-149, 5: 150-250 m (gabonahalom magasság)

A búzamintákban mért teliospóra mennyiség korrelált a mintavételi pont feletti levegőben mért teliospóra koncentrációval ($n=12$, $r_s=0,581$, $P<0,05$). Nagy mennyiségű teliospórát mutattunk ki a központi gabonatarházakban vett pormintákban (Bp: 53,3 db teliospóra/mg, Ja: 11,1 db teliospóra/mg), ezzel szemben a vidéki siktárolókban gyűjtött mintákban alacsony koncentrációban voltak jelen a *Tilletia*-teliospórák (átlagosan 1,4 db teliospóra/mg). Közepes összefüggést találtunk a por teliospóra tartalma és a levegő-eredetű teliospóra-koncentráció között ($r_s = 0.551$, $P<0.05$), viszont nem volt összefüggés a por-, és a magminták teliospóratartalma között.

A két különböző évben (bármely két év adatait összehasonlítva) azonos helyen mért értékek között nem volt szoros korreláció. A külső referencia helyszíneken, vagyis az udvaron és a tetőn vett mintákból szintén kimutattuk a *Tilletia*-teliospórákat: 16,5%-a, illetve 14,1%-a volt a kint mért érték a beltéri teliospóra koncentrációnak. Meglepetésünkre a beltéri referencia mintavételi helyek (a budapesti gabonatarház nem búzát, hanem napraforgót vagy kukoricát tároló helyiségei) levegőjében is nagy koncentrációban találtuk meg a *Tilletia*-fajok teliospóráit, a búzát tároló helyiségek teliospóra koncentrációjának 86,7%-át, illetve 91,5%-át mértük.

4.3. A *Tilletia* fajok elkülönítése DNS-alapú molekuláris módszerekkel

A *Tilletia caries* és *T. contraversa* teliospórákból kinyert DNS-t a KOCHANOVA és munkatársai (2004) által leírt módszer alapján, a TILf és TILr primerpár felhasználásával vizsgáltuk, és eredményül minden esetben a várt 361 bp hosszúságú terméket kaptuk, aspecifikus terméket nem detektáltunk (28. ábra). Ez a primerpár a szerzők leírása alapján *Tilletia* nemzetség-specifikus, melyet a munkánk során mi is megerősítettünk.

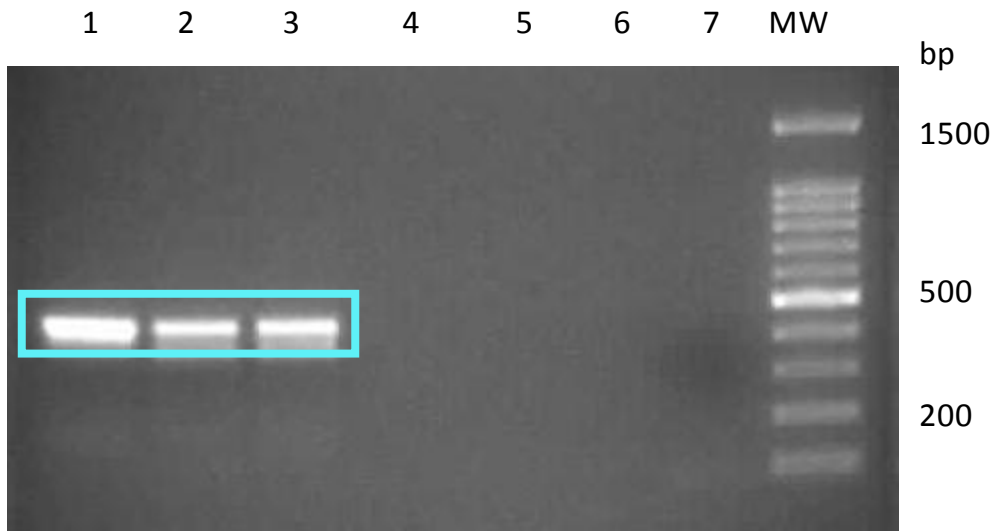


28. ábra *Tilletia* nemzetség-specifikus primerekkel (TILf, TILr) végzett PCR-analízis eredménye. 1-2: *T. caries* izolátumok, 3-4: *T. contraversa* izolátumok; 5: negatív kontrol; MW: DNS-létra. Fehér nyilak jelölik a 361 bp nagyságú *Tilletia* nemzetség-specifikus DNS-fragmentumokat.

Munkánk során a YUAN és munkatársai (2009) által kifejlesztett PCR-módszert is teszteltük a *T. caries* és *T. contraversa* fajsztíű elkülönítésére a szerzők által leírt, kizárólag a *T. contraversa* izolátumokból felszaporított, 747 bp hosszúságú fragmentum kimutatására. Sajnos azonban a módszert kilencszer ismételve sem tudtuk reprodukálni az ebben a publikációban leírt eredményeket.

Amikor világossá vált, hogy a cikkben leírt CQUTCK2/CQUTCK3 primerpárral nem tudjuk felszaporítani a mintáinkból a *T. contraversa*-specifikus terméket, megnéztük, hogy a YUAN-publikációban szereplő P23-BA0166/CQUTCK1 primerpárral kapunk-e reakciót. A szerzők ezt a primerpárt használták ugyanis a tervezés során, amikor olyan gént kerestek, mely a *T. contraversára* specifikus. Ekkor találtak egy 1322 bp hosszúságú terméket, mely specifikus a *T. contraversára*. Azonban a mi izolátumainkból ezzel a primerpárral sem sikerült felszaporítani a várt 1322 bp hosszúságú DNS-szakaszt.

Ezt követően a GAO és munkatársai (2010) által leírt új, SCAR-marker alapú ISSR módszert teszteltük a laboratóriumunkban. A SCAR primerek (TCKSF3/TCKSR3) felhasználásával a vizsgált *T. contraversa* izolátumokból a leírt fajspecifikus DNS-fragmentumot amplifikáltuk (419 bp), amely azonban nem volt jelen egyik *T. caries* izolátumban sem (29. ábra). A megfelelően értékelhető gélképet az eredeti cikkhez képest módosított PCR-körülményekkel értük el, mely módszerfejlesztés leírását az Anyag és módszer fejezet 3.3.3. C pontja tartalmazza.

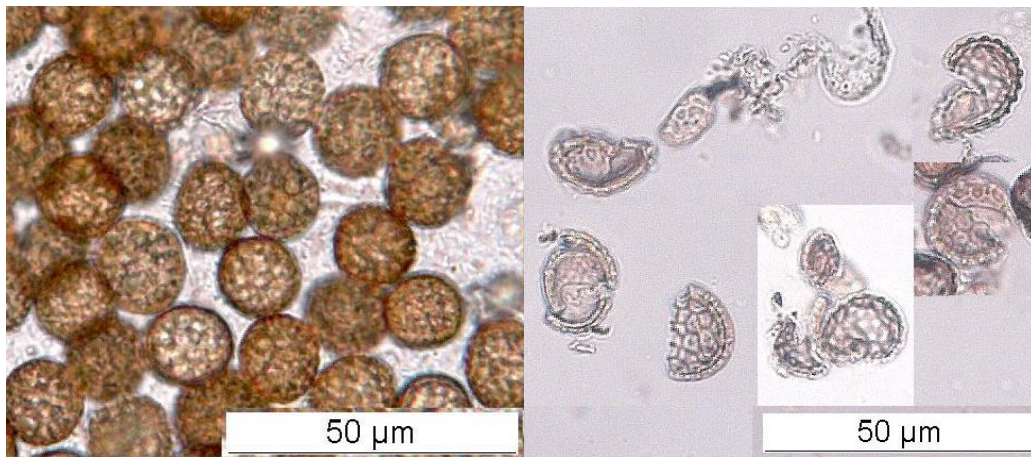


29. ábra A *T. contraversa* fajspecifikus SCAR-marker kimutatása GAO és munkatársai (2010) munkája alapján. 1-3: *T. contraversa* izolátumok; 4-6: *T. caries* izolátumok, 7: negatív kontrol.

MW: DNS-létra. Kék téglalappal keretezve láthatók a 419 bp nagyságú *T. contraversa*-specifikus DNS-fragmentumok.

4.4. A *Tilletia*-fajok elkülönítése fehérjealapú molekuláris módszerekkel

Mivel a célunk az volt, hogy a különböző *Tilletia*-fajok teliospóráin belüli fehérjeösszetételt hasonlítsuk össze, több lépésben alkalmaztunk desztillált vizes mosást a felesleges anyagok oldatból és a teliospórák faláról való eltávolításához. A teliospórák falának feltörése sikeres volt a sejten belüli fehérjék kinyeréséhez (30. ábra).

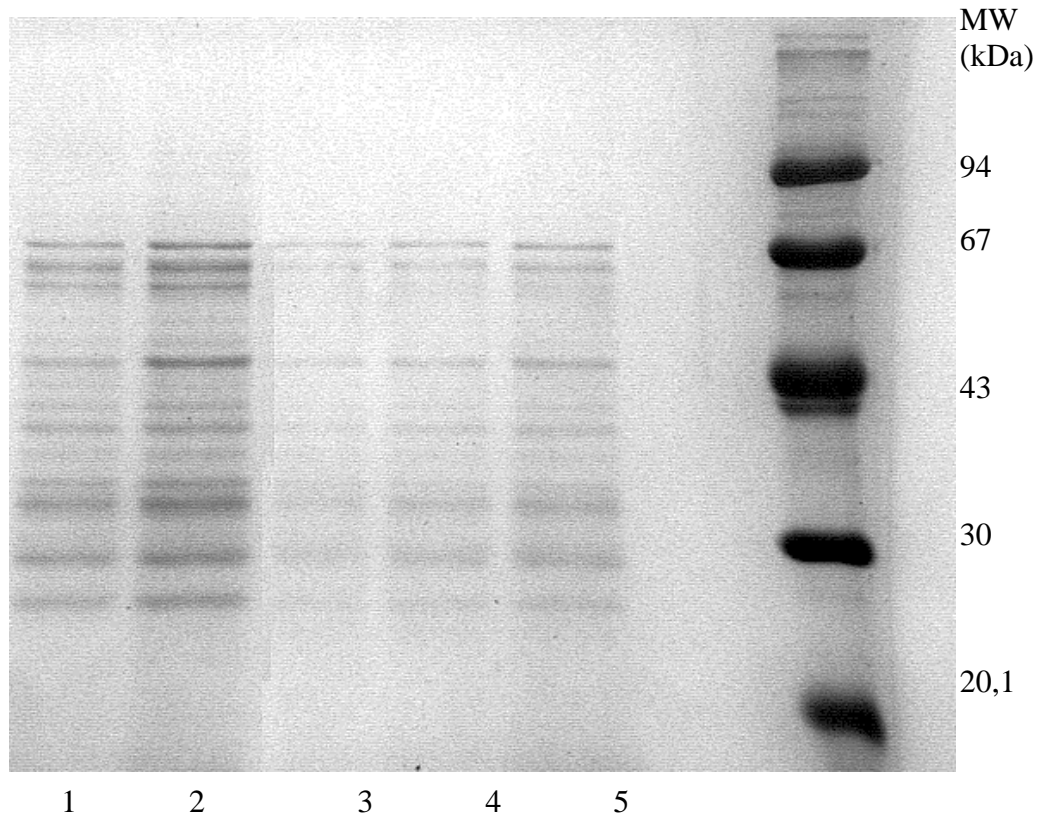


30. ábra Az ép (bal) és feltört (jobb) *Tilletia caries* teliospórák mikroszkópos képe (400x).
(Saját felvétel.)

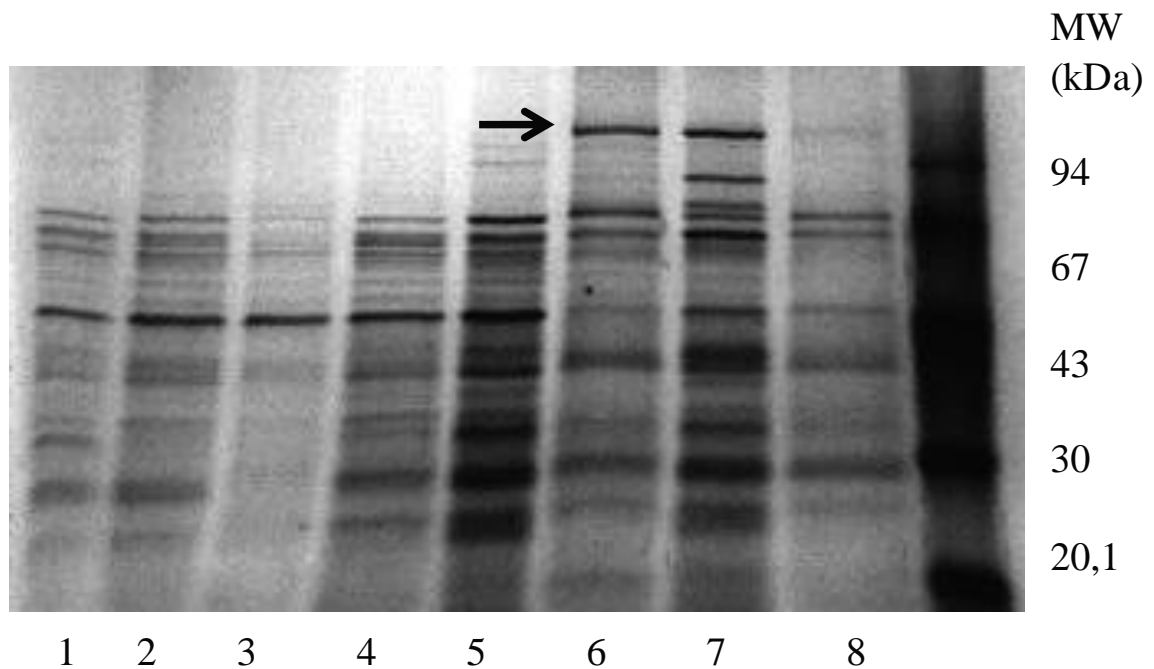
Az extrakció során eltérő mennyiségű fehérjét nyertünk ki mind a *T. caries*, mind a *T. contraversa* mintákból. Ugyanazon körülmények között végzett extrakció a *T. contraversa* izolátumokból kevesebb mennyiségű fehérjét eredményezett, mint a *T. caries* minták esetében. A *T. caries* tekintve a kiindulási teliospóra mennyiség 35–40 mg volt, míg a *T. contraversa* esetében 40–45 mg. A két lengyel (TILLCO A és B) és az egy magyar *T. contraversa* (TILLCO C) mintából kinyert fehérjemennyiség 0,85 mg fehérje / 41,7 mg teliospóra, 1,12 mg fehérje / 40,6 mg teliospóra, illetve 0,85 mg fehérje / 41,5 mg teliospóra volt. Az öt *T. caries* minta (TILLCAR 1–5) esetében az extraktumok fehérjekoncentrációja a következőképp alakult: 1,49 mg fehérje / 38,0 mg teliospóra, 0,88 mg fehérje / 37,6 mg teliospóra, 1,03 mg fehérje / 38,7 mg teliospóra, 0,86 mg fehérje / 35,6 mg teliospóra és 1,47 mg fehérje / 35,3 mg teliospóra. Nem volt szignifikáns különbség a kinyert fehérje mennyiségében, sem az azonos fajból származó minták között, sem a két faj izolátumait összevetve. Mindezek ellenére a polipeptidek festődési sajátosságaiban eltérések mutatkoztak a fajok között, sőt az azonos fajból származó izolátumok között is. A *T. caries* fehérjemintázatok összességében erősebben festődtek a *T. contraversa* izolátumoknál. A három *T. contraversa* minta közül a plusz két fehérjesávval rendelkező TILLCO B fehérjemintázata festődött a legintenzívebben, míg a magyar *T. contraversa* izolátum (TILLCO C) festődött a legkevésbé.

Az egyes búzamintákból több ismétlésben kinyert teliospóra-extraktumok következetes és reprodukálható fehérjemintázatot adtak. Az SDS gél-elektroforézis során mind a *T. caries*ből, mind a *T. contraversa*ból származó mintákból jól elkülöníthető fehérjesávokat kaptunk. Homogén géleket alkalmazva, a teliospórákból származó fehérjemintákból 14–110 kDa mérettartományban detektáltunk fehérjéket. Az öt *T. caries* izolátum fehérje-gélképe a 31. ábrán látható, mely jól illusztrálja, hogy az azonos fajon belüli fehérjemintázat a különböző helyről származó izolátumokban állandó. A 32. ábrán lévő gélen az 5 db *T. caries* és a 3 db *T.*

contraversa teliospóra-izolátum egydimenziós gél-elektroforézissel nyert proteinmintázatát hasonlítottuk össze. Az elektroforetikus mintázatban egy 106 kDa méretű, fajspecifikus fehérjét azonosítottunk, amely minden *T. contraversa* mintából kimutatható volt, viszont a *T. caries*-ből származókból nem.

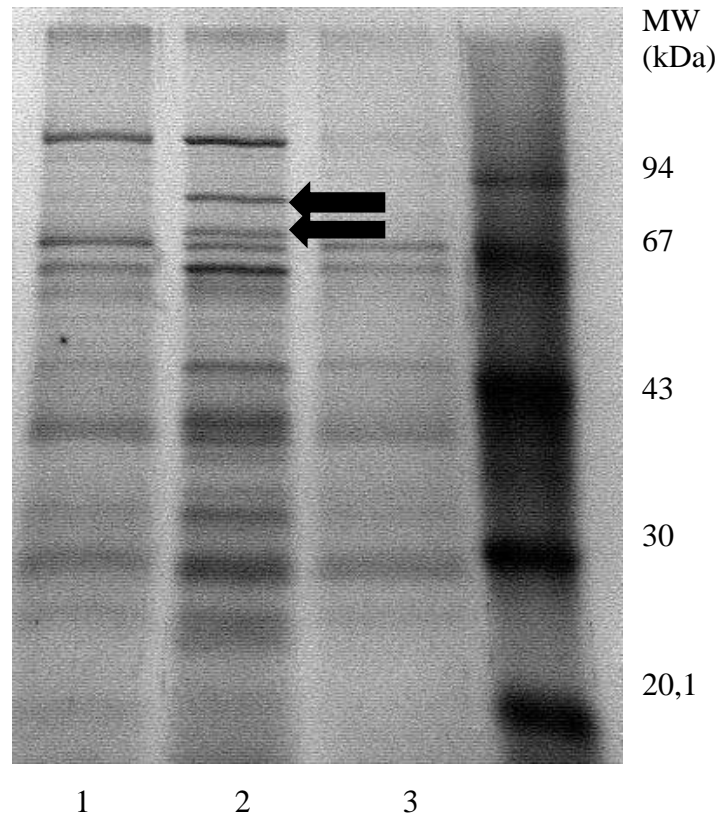


31. ábra Az 5 db *Tilletia caries* izolátum egydimenziós SDS-PAGE gélképe (10% akrilamid). 1: TILLCAR 1; 2: TILLCAR 2; 3: TILLCAR 3; 4: TILLCAR 4; 5: TILLCAR 5; MW: Molekulatömeg standard. Mindegyik *T. caries* izolátum gélképe egyöntetű.



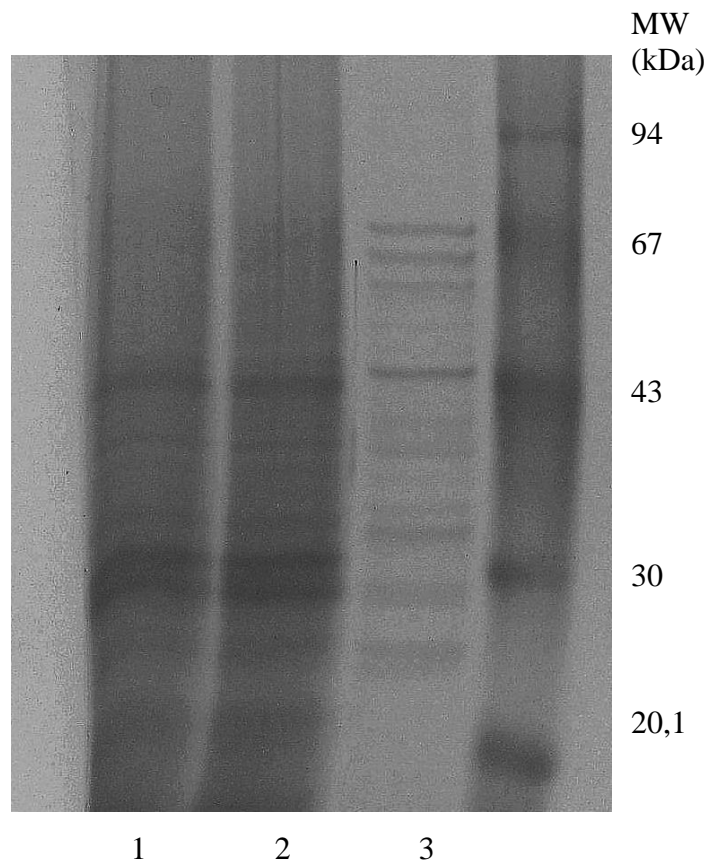
32. ábra *Tilletia caries* és *T. contraversa* izolátumok egydimenziós SDS-PAGE gélképe (10% akrilamid). 1: TILLCAR 1; 2: TILLCAR 2; 3: TILLCAR 3; 4: TILLCAR 4; 5: TILLCAR 5; 6: TILLCO A, 7: TILLCO B; 8: TILLCO C.; MW: Molekulatömeg standard. Fekete nyíllal jelölve látható a faj-specifikus, 106 kDa méretű polipeptid a 3 db *T. contraversa* (6-8. oszlop) mintában.

Emellett az egyik lengyel *T. contraversa* izolátumban (TILLCO B) két további, 73 és 85 kDa méretű fehérjét is kimutattunk, melyek sem a másik lengyelországi (TILLCO A), sem pedig a magyar izolátumban (TILLCO C) nem jelentek meg (33. ábra). Ezen fehérjesávok egyike sem volt jelen egyik *T. caries* izolátumban sem.



33. ábra A *T. contraversa* izolátumok egydimenziós SDS-PAGE gélképe (10% akrilamid). 1: TILLCO A, 2: TILLCO B; 3: TILLCO C; MW: Molekulatömeg standard. A két fekete nyíl a 73 és 85 kDa méretű egyedi polipeptideket mutatja a TILLCO B (*T. contraversa*) izolátumban.

Összevetettük a 2x Laemmli-puffer és a PBS-puffer hatékonyságát fehérje-kinyerés szempontjából, és a 34. ábrán demonstráltuk a PBS extrakciós puffer alkalmazhatóságát. (A kísérletben a TILLCAR 5 izolátumot használtuk.) A 2x Laemmli extrakciós pufferrel a fehérjemintázat elmosódott, kevésbé elkülöníthető sávokat kaptunk, valamint túl erős volt a háttérzaj. Ezzel ellentétben a PBS extrakciós pufferrel nyert mintázat tiszta, a sávok és oszlopok denzitometriásan könnyen összehasonlíthatók.



34. ábra A 2x Laemmli puffer és a PBS puffer hatékonyságának összehasonlítása egydimenziós SDS-PAGE-vel (10% akrilamid). 1-2: 2x Laemmli pufferrel kinyert fehérjék; 3: PBS-oldható proteinek; MW: Molekulatömeg standard. A 2x Laemmli extrakciós pufferrel a fehérjemintázat elmosódott, kevésbé elkülöníthető sávokat kapunk, és a sávok háttérében túl erős a háttérzaj. A PBS extrakciós pufferrel nyert mintázat tiszta, a sávok és oszlopok denzitometriásan könnyen összehasonlíthatók.

Összefoglalva tehát a *T. caries* és *T. contraversa* minták SDS-PAGE analízise során nyert fehérjemintázatokban egy 106 kDa méretű fajspecifikus különbségfehérjét detektáltunk, mely mindhárom *T. contraversa* izolátumban reprodukálható módon jelen volt, viszont a *T. caries* extraktumok egyikében sem mutattuk ki. A legtöbb fehérjesáv mindkét *Tilletia*-fajban előfordult.

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

5.1. Az éves országos *Tilletia*-felderítés

A *Tilletia caries* a *T. contraversa* mellett az intenzív gabonatermesztés kibontakozásáig az egyik legfőbb gabonabetegség okozója volt (WIESE 1998; TÓTH 2006). A *T. caries* történelmi jelentőségű betegség, világszerte megjelenik, főként őszi búzán, a *T. contraversa* elterjedése viszont korlátozott speciális környezeti igényei miatt. A *T. contraversa* 1952 óta ismert hazánkban (HORVÁTH 1995), herbárium példányok szerint azonban már a 20-as években is jelen volt. Az ötvenes-hatvanas években gyakorlatilag az egész ország búzatermő területe fertőzött volt (SZEPESSY 1977). A járvány 1955-ben és 1957-ben erősebben jelentkezett több megyében. Ezek után jelentősége visszaesett, újabb járvány 1964-ben alakult ki, néhány területen 20%-os fertőzést is kimutattak (UBRIZSY 1965). Ezután a betegség előfordulásának gyakorisága csökkent, később megszűnt, ugyanis az ötvenes években elterjedt vetőmagcsávázás jelentős mértékben visszaszorította az üszögfertőzést. Ekkor terjedt el a rézgálicos csávázás mellett szélesebb körben a szerves higany, a HCB, PNCB és TMTD hatóanyagok használata. A gazdaságos üzemméretek és az intenzívebb gabonatermesztés elterjedését követően a betegség teljesen visszaszorult, elsősorban a kedvező agrotechnikai módszerek (pl.: optimalizált tápanyagellátás, csávázás, precízebb technológia) használata következtében.

A mai helyzet némi visszalépést jelent az 1970-es és 1980-as évekhez viszonyítva mind a termelés színvonalát, mind az agrotechnikai igényességet illetően. A fajták terméspotenciálja, a gépesítés színvonala tulajdonképpen azóta is fejlődött, de miután a termelés bizonyos szegmensei kiestek a gazdasági szakirányítás hatásköréből (kis és gazdaságtalan üzem- és táblaméretek, csávázás elhagyása, kényszergazdálkodás stb.), a gabonaüszög ismét felütötte a fejét. Az 1990-es évek közepétől egyre gyakrabban lehet találkozni *T. caries* fertőzést mutató gabonatóblákkal (TÓTH 2006).

Az általunk végzett *Tilletia*-felderítés során 2007-től a 2010. évig bezárólag Magyarországon nem mutattunk ki *T. contraversa* fertőzést. A begyűjtött minták egy része *T. cariesszel*, illetve *T. laevis*szel voltak fertőzöttek: 2008-ban 12,77%-ban, 2009-ben 15,24%-ban és 2010-ben 23,30%-ban (HALÁSZ 2012), 2011-ben 20%-ban és 2012-ben 19,28%-ban.. A 2011-es évben a minták 20,00%-ában mutattunk ki *T. caries* fertőzést, és egy mintában *T. contraversa* jelenlétét is bizonyítottuk a laboratóriumi vizsgálatok során. Ez utóbbi eset, vagyis hogy a *T. caries* fertőzések mellett egy mintában *T. contraversa* és *T. caries* kevert fertőzést is

találtunk, feltétlenül figyelmet érdemel. Ennek gazdasági jellegű következménye is lehet (lásd. Irodalmi áttekintés), de a problémát részletesen szükséges vizsgálni. Egyetlen pozitív mintából ugyanis még nem tanácsos messzemenő következtetéseket levonni, hiszen a pozitív találatot követő fokozott felderítés keretében 2012-ben Zala megyében gyűjtött 15 db minta egyikéből sem mutattunk ki *T. contraversa* kórokozót. Feltétlenül figyelmet érdemel viszont az, hogy 2013-ban ismételten *T. contraversa* kórokozót azonosítottunk egy mintából, mely a Nógrád megyei Ludányhalásziból származott. Mindezek alapján méltán lehet számítani a törpeüszög jövőbeli szórványos előfordulására.

A 2008-2013. évek során nyert eredmények magyarázatát két szempontból is megközelíthetjük. Az egyik: a mezőgazdasági gyakorlatban bekövetkezett változások, melyeket korábban már taglaltam (elaprózott táblaméreték, csávázás elhagyása, gyenge minőségű agrotechnika). Itt érdemes azonban még egyszer hangsúlyozni, hogy a termesztéstechnológiában bekövetkezett negatív irányú változások elősegíthették a kórokozó újbóli megjelenését. A másik: a kórokozó környezeti igényeiben, és a természetes környezeti viszonyok folytonos változásában keresendő.

Közismert, hogy a gombabetegségek kialakulását befolyásoló tényezők között szerepel a csávázás, a fajta és az időjárás is és a gombafajtól függ, melyik milyen súllyal szerepel a fertőzés kialakításában. Mindenesetre a járványok kialakulásának elsősorú kockázati tényezője általában az általunk nem befolyásolható időjárás.

Irodalmi adatok alapján, a *T. contraversa* a csírázásához tartósan magas nedvességtartalmat, és alacsony, -2 és 10°C közötti hőmérsékletet igényel 3–8 hét időtartamban. A 15°C feletti hőmérséklet már gátolja a csírázást. Kizárólag a talajfelszínen vagy a talajfelszín közelében fekvő teliospórák képesek csírázásra és bazídiospóra fejlesztésre, mely a fertőzési folyamat első lépése. A *T. contraversa* által kiváltott jelentősebb kártételre ott lehet számítani, ahol 60 vagy ennél több napon át összefüggő hóréteg fedi a még meg nem fagyott talajfelszínű búzamezőket (PETERSON et al. 2009). A tanulmány azt is leírta, hogy a fertőzéshez szükséges hóborítottság időtartamába beleszámolandó az is, ha a hótakaró nem összefüggő, hanem csak foltokban van jelen, és figyelembe kell venni az 1 cm-nél kisebb vastagságú hóréteget is. Mindezek együttesen optimális körülményeket nyújtanak a teliospórák csírázásához, és megvédik a gombát a kiszáradástól (HOFFMANN 1982; GREY et al. 1986; PETERSON et al. 2009). Ebből is következik, hogy a *T. contraversa* főként a hosszabb ideig tartó összefüggő hóréteggel borított őszi búzát termő területeken terjedt el, beleértve az Egyesült Államokat, Kanadát, Európát, Közép-Ázsiát, Argentínát és Uruguay-t. Másrészt ZHANG és munkatársai (1995) leírták, hogy Kína azon területén, ahol a legnagyobb az esély a *T. contraversa* megtelepedésére, szinte soha nincs összefüggő hótakaró, és enyhe, csapadékos 2,5–3 hónapig

tartó időszak a tél. Hozzá tették azonban, hogy ha ezen régióban a korán leesett hó hónapokig fennmarad, jelentősen nő az esély a *T. contraversa* fertőzésre. Ezzel ellentétben a *T. caries* hőmérsékleti igénye nagyobb (16–18°C), kellően nedves talajban 2–2,5 hét alatt kicsírázik. Ez a *Tilletia*-faj kevésbé gyakori a tavaszi búzát termő területeken, elsősorban az őszi búza termesztését veszélyezteti. A *T. caries* kevésbé igényes kórokozó, következésképpen gyakrabban elő is fordul hazai körülmények között.

Magyarországot tekintve tizenöt időjárás állomás adatai állnak rendelkezésre 2000 és 2013 között (forrás: OMSZ). Az adatok kiértékelése során, az állandó hótakaróval fedett napok száma és azon teljes periódusok hossza alapján, amikor havazott (öt napnál több hótakaróval való borítottság már havas időszaknak számít) kiderült, hogy a PETERSON és munkatársai (2009) által említett feltételnek hazánkban a 2002/2003. és 2005/2006. évek telei feleltek meg (HALÁSZ 2012). 2002/2003 telén volt a legalkalmasabb az időjárás a *T. contraversa* fertőzéshez: a 19 időjárás állomásból 13 mért 60 napnál hosszabb ideig tartó összefüggő hóborítottságot ezen a télen. A 2007-2009-es periódusban nem volt olyan időszak, amikor a kritériumnak megfelelő hóborítottságot mértek volna. A 2010-2013. időszakára vonatkozóan is áttekintettük a rendelkezésre álló adatokat, melyeket a továbbiakban fogunk említeni. Előljáróban elmondható, hogy 2007-től kezdve nem volt olyan hosszú csapadékos, illetve hóborította időszak, ami az említett tanulmány alapján elősegítette volna a *T. contraversa* terjedését, fertőzését, viszont a talaj szükséges nedvességtartalmát adhatta az időszakos nagyobb csapadékhullás az egyes években.

Ahhoz, hogy lássuk, milyen kockázati tényezőkkel kell még számolnunk a *T. contraversa* fertőzés szempontjából, nemcsak a hóborítottságot kell figyelembe vennünk. PETERSON és munkatársai (2009) szerint a *T. contraversa* által kiváltott fertőzéshez minimum 42 napig tartó folyamatos csapadékhullásra van szükség, miközben a talajhőmérséklet -2 és $+10^{\circ}\text{C}$ között marad az őszi búza bokrosodási fenofázisának elején.

Ennek tükrében áttekintve hazánk éghajlati sajátosságait megállapítható, hogy Magyarországon nem jellemző a 42 napon át tartó csapadékos periódus. Hazánkban az őszi búza októberben kezd csírázni, és ebben a fenológiai stádiumban válik fogékonyá a *T. contraversa* fertőzésre. A meteorológiai állomások megfigyelései alapján hazánkban januártól márciusig van a legnagyobb esély a hótakaró kialakulására, míg az októbertől decemberig tartó periódusban ennek sokkal kisebb az esélye (10 év alatt 5 alkalom).

Valószínűsíthető, hogy a *T. contraversa* fertőzéshez nemcsak a hótakaró kialakulása lehet előfeltétel. Felmerül tehát a kérdés, vajon a 2011-ben kimutatott *T. contraversa* fertőzéshez mennyiben járulhatott hozzá a 2010/2011. év telének időjárása? A szóban forgó tél középhőmérséklete az ország nagy részén -2 és 0°C között alakult, a szokásosnál hidegebb volt.

2010/2011 tele szokatlanul csapadékos decemberrel indult, a sokéves átlag másfélszeresét meghaladó mennyiséggel. Ezt követte két meglehetősen száraz hónap, mindezt összegezve egy átlaghoz közeli évszakos értéket eredményezett. Átlagosan 30 napon hullott csapadék, ebből 22 napon volt havazás a szokásos 17 helyett. A megfigyelések szerint havazás a megszokottal ellentétben, decemberben volt, és februárban is jelentettek kisebb havazást. Pölöske térségéből a tél folyamán csak három napon jelentettek havazást, február közepén és március elején. Tehát a hőmérsékleti értékek, a talajnedvesség és a búza fejlettségi állapota adott lehetett a *T. contraversa* fertőzés kialakulásához, ugyanakkor a járványszerű betegség kialakulását elősegítő hótakaró nem volt jelen. Bár a vetésmélység is befolyásoló tényező lehetett, erre vonatkozólag viszont nincs adatunk. Amennyiben az adott helyen sekély vetést alkalmaztak, az tovább növelhette a kockázatot.

A 2012/2013-as év telén a szokásosnál hidegebb volt a december, viszont a január és február melegebb volt az átlagosnál. A középhőmérséklet 0 és +1°C között alakult. Ezek a hónapok jóval csapadékosabbak voltak, a sokéves átlag 150-200%-a hullott. A legtöbb csapadékot a Dunántúlon regisztrálták, de 2013 februárjában, Nógrád megyében is jelentős mennyiség hullott. Bár az első havazás átlagos időpontja még hegységeinkben is novemberre esik, 2012-ben országszerte már október végén lehullott az első hó (28-29-én), s néhány helyen – főként az ország nyugati felében – meg is maradt rövid ideig. Ezután csak 2013 márciusában volt jelentősebb hóesés, országos átlagban 7-7 havas, illetve hótakarós napot jegyeztek (a sokévi 3, illetve 0 nappal szemben). Így elmondható, hogy helyenként rendelkezésre állhatott a megfelelő talajnedvesség az üszögfertőzéshez.

A már említett amerikai tanulmány (PETERSON et al. 2009) szerint a sikeres *T. contraversa*-fertőzéshez a következő tényezők közül legalább négy együttes előfordulása szükséges: összefüggő hótakaró meghatározott számú napon át; a búza a csírázás és bokrosodás kezdete állapotában legyen, alacsony hőmérséklet, magas talajnedvesség-tartalom és sekély vetésmélység. Ez utóbbira magyarázatul szolgálhat, hogy a járványszerű *T. contraversa* fertőzés nem mageredetű, hanem szinte kizárólag talajeredetű forrásokból származik, ezért a vetésmélység is jelentős szempont a fertőzés kialakulása szempontjából: a *T. contraversa* esetében kizárólag a talajfelszínen vagy a talajfelszín közelében fekvő teliospórák képesek csírázásra és bazídiospóra fejlesztésére, mely a fertőzési folyamat első lépése.

Kiegészítésként érdemes még megemlíteni, hogy a *T. contraversa* kórokozó a környezeti feltételeket tekintve igen igényes, viszont mindezen feltételek együttes előfordulása kevésbé valószínű, bár előfordulhat. És ez valamelyest magyarázatot adhat a 2011-ben kimutatott *T. contraversa* fertőzésre is. Azután a 2011/2012. év telén kialakult hosszan tartó hótakaró kedvező környezeti feltételt teremthetett volna a *T. contraversa* ismételt fertőzéséhez. Ennek ellenére a

fokozott mintavétellel sem tudtunk újabb *T. contraversa*-fertőzést kimutatni. Viszont 2013-ban földrajzilag eltérő helyen a Nógrád megyei Ludányhalászinál gyűjtött búzamintából azonosítottunk *T. contraversa* kórokozót, mely eredmény előrevetíti, hogy a jövőben szórványosan újabb találatok várhatók.

Visszatérve a gombabetegséget kialakító tényezők további taglalásához: Veisz Ottó és Szunics László tájékoztatása szerint az is tény, hogy a Magyarországon köztermesztésben lévő őszi búza fajták egyike sem rezisztens a *Tilletia*-fajokkal szemben. Nálunk ezzel a kórokozóval szembeni ellenállóságra nem nemesítettek, ezért a kőüszögnek ellenálló vagy mérsékelten ellenálló fajta csak a véletlen eredménye.

A csávázásra és a fajtára vonatkozó fenti megállapításokat az *M4.1. melléklet* illusztrálja, ahol a feltüntetett *Tilletia*-fajokkal fertőzött minták esetén a rendelkezésünkre bocsátott csávázószer és az őszi búza fajta adatok szerepelnek. Sajnos a mintavételkor nem mindig volt sikeres az adatfelvétel. A táblázat alapján az alábbi következtetések vonhatók le:

A csávázás sikeressége nem ítéhető meg, mert a találatok közel 50%-ában nem áll rendelkezésre adat a csávázószerrel, illetve, hogy történt-e csávázás.

A fertőzött őszi búza fajták is változatosak, és elmondható, hogy adott őszi búzafajta esetén előfordult a mintáink között fertőzött és fertőzésmentes is.

A mintahelyekre vonatkozóan az *M4.2. melléklet* ad tájékoztatást. Eszerint a két különböző évben azonos településen észlelt fertőzésekre vonatkozóan: nem minden esetben áll rendelkezésre pontos adat a mintavétel helyét illetően, így sokszor nem tudható, hogy például szomszédos vagy egymás közelében lévő táblákról van-e szó az ismételt fertőzések esetén.

Egymást követő években ugyanazon cégeknél többször találtunk üszöggel fertőzött őszi búza tételt, de legtöbb esetben a minták nem ugyanarról a szántóföldi területről származtak. Három esetben fordult elő, hogy azonos évben (2009, 2010, illetve 2012), azonos cégnél (Fényeslitke, Tiszagyöngye Mg. Kft., Szeghalom, Nánási Agro Kft. és Kistelek, ismeretlen termelő) találtunk üszöggel fertőzött két tételt, melyek a rendelkezésre álló adatok alapján nem azonos tábláról származnak; vagy pedig nincs adat (Szeghalom). Fényeslitke esetén a két minta egyikében csak *T. caries* azonosítottunk, a másikban pedig *T. caries* és *T. laevis* kevert fertőzést. Halimba településnél 2009-ben és 2010-ben is *T. caries* fertőzést azonosítottam ugyanannál a termelőnél, de a mintavétel helye eltérő volt. Az azonos évben azonos kórokozóval fertőzött két tétel oka az is lehet, hogy a kombájn fertőzött lett, és nem megfelelően takarították ki.

Összegezve tehát, a saját adatok alapján nem vonhatók le egyértelmű következtetések azzal kapcsolatban, hogy mi befolyásolja elsődlegesen a kő- és törpeüszög megjelenését. Kijelenthető viszont az irodalmi adatok alapján, hogy az őszi búzát fertőző kő- és törpeüszög esetében, ellentétben több más kórokozóval, az időjárás, a termesztéstechnika egyes elemei

(vetésmélység), valamint a fajta nem játszanak elsődleges szerepet a betegség megjelenésében, hiszen a szakszerűen alkalmazott vetőmagcsávázással a fertőzés biztonsággal megelőzhető. Irodalmi adatok alapján ellenük hatékony a kontakt (mankoceb, fludioxonil, guazatin, TMTD) + felszívódó (azol, benzimidazol, karboxamid /karboxin/) hatóanyagok alkalmazása.

5.2. Levegő-mintavétel Hirst-típusú térfogatos spóracsapdával

A Hirst-típusú térfogatos spóracsapdával vett minták feldolgozása után az eredményeink alapján elmondható, hogy a *Tilletia*-fajok teliosporái általánosan előfordulnak a gabonatárházak levegőjében. Igaz, a jelenlétük előre feltételezhető volt, hiszen a betárolt gabonával kapcsolatba hozható levegőben lévő spórák a tárolt gabonában képződő mikroflórában élő gombákból származtathatók (LACEY 1980). A levegőmintáinkban a *T. caries* teliosporák domináltak, ezen üszögfaj leggyakoribb előfordulása azzal magyarázható, hogy Magyarország klimatikus tényezői a *T. caries* életmódjának felelnek meg leginkább.

Budapesten, a két különböző búzátároló-helyiségben mért teliospora koncentrációk között nem találtunk szignifikáns különbséget. A kültéri levegő, a referencia tároló helyiségekhez hasonlóan, télen is tartalmazott *Tilletia*-teliosporákat (az üszögszóródás nyáron, aratáskor történik). Mindez arra enged következtetni, hogy a tárházakban végzett anyagmozgatás hatására a teliosporák bármikor áramolhatnak a légmozgással.

A teliosporák viszonylag gyorsan szóródnak, terjednek a tároló helyiségek és a szintek között a nyitott tetejű cellákon és a ki-és betárolásban szerepet játszó beömlőnyílásokon keresztül. A nyitott tetejű cellák rendeltetése, hogy elválasszák egymástól a szállítmányokat, megakadályozva a tételek keveredését, bár az egyértelmű, hogy a levegőáramlatokat nem gátolják, illetve azt sem, hogy a levegőből spórák és egyéb képletek ülepedjenek le a gabonahalmokra. A beömlőnyílásoknak jelentős szerepük van a repülő por képzésében és a keverő légáramlatok kialakításában. Többen leírták, hogy a tárházakban nagy az átfertőződés veszélye, ha a gabonátételeket összekeverik, de ugyanúgy kockázati tényező a keveredés szempontjából a szállítás is (járművek, vonatkocsik, művelőeszközök, stb.) /BONDE et al. 1997; FORSTER és GOATES 1997/. Az egészséges gabona is üszöggel fertőzötté válhat, ha teliosporákkal szennyezett tárolókba kerül (EFSA 2010). Kutatásaink alapján jelentős kockázata van annak, hogy a *Tilletia*-fajok teliosporáit tartalmazó levegőből fertőződnek meg az addig még tiszta búzátételek. LACEY (1980) feltételezte, hogy az adott helyszínen korábban tárolt fertőzött gabona által is megfertőződhet az ott később raktározott tétel, mivel nem várt módon teliosporákat talált ott is, ahol a korábbi években repcét, hajdinát vagy mustárt tároltak. Ezt a

tézisét *Ustilago*-fajokra alapozta, amely üszöggomba szoros rokonságban áll a *Tilletia*-fajokkal. Az eredményeink alátámasztják ezt a hipotézist, mivel mi is találtunk teliospórákat a nem-*Tilletia* gazdanövényt tároló referencia helyiségekben. Az intenzív anyagmozgatás mindennapos tevékenység a budapestihez hasonló központi gabonátárházakban, azonban meglehetősen ritka a vidéki tárolókban, ezért itt a levegő eredetű átfertőződés kockázata kisebb, bár megfigyeléseink szerint a tételek összekeverésének esélye viszont nagyobb. Budapesten folyamatos az anyagmozgatás, ennek következtében a levegőből kimutatott *Tilletia*-teliospóra koncentráció 140-szerese volt a többi mintavételi helyének. A légmozgást generáló események nélkül a teliospórák 24 óra alatt leülepednek a tárolókban, ahogy az a *T. caries* teliospórák végsebességéből kiszámítható (0,59–1,21 m/sec) (LACEY 1981).

A leülepedett por a repülő teliospórák fontos forrása lehet. Szoros korrelációt mutattunk ki a por- és a levegőminták teliospóra-tartalma, valamint a búza- és a levegőminták teliospóra-tartalmai között, de nem volt összefüggés a búza- és porminták teliospóra-koncentrációi között. Nyilvánvalóvá vált, hogy a repülő teliospórák egyaránt lehetnek búza- vagy poreredetűek. A teliospórák a búzatételek mozgatása során könnyen a levegőbe juthatnak, de ennél is kevesebb mozgási energia szükséges ahhoz, hogy a porból felszálljanak. Annak ellenére, hogy a tárolt gabonát rendszeresen ürítik a tárolókból, a por hosszabb ideig ott maradhat. A budapesti központi tárházban 2–3 mm-es porréteget figyeltünk meg a vízszintes felületeken, melyből vett mintákban magas volt a *Tilletia*-koncentráció (53,3 db teliospóra/mg). Ezzel szemben az itt gyűjtött búzaminták teliospóra-tartalma ehhez képest jóval kevesebb volt. Következésképp a levegőben lévő fertőző anyag forrása Budapesten elsősorban a por. Ha a levegő teliospóra-koncentrációja magas, de a búzáé alacsony, akkor feltételezzük a por eredetű fertőzést (pl. Budapesten). Ha a *Tilletia*-teliospórák nagy mennyiségben vannak jelen mind a levegőben, mind a búzatételben – főképp anyagmozgatást követően -, az azt jelenti, hogy a búzatétellel került be a fertőző anyag (pl. Hódmezővásárhely egyik síktárolója esetében).

További vizsgálataink során célunk az ülepedési idő és a tárházak anyagmozgatási dokumentációjának összevetése a mért levegőbeli teliospóra-koncentrációkkal. Természetesen a levegő-mintavételes vizsgálatok abban az esetben szolgálnak releváns eredménnyel, ha a teliospórák valamely módon már belekerültek a levegőbe. Mindemellett javasoljuk az aerobiológiai módszereken nyugvó standardok kiegészítését a zárlati és egyéb gazdaságilag jelentős *Tilletia*-fajok kimutatására irányuló technikával.

Mind a fővárosi, mind a vidéki gabonátárolókban működtetnek porciklont a levegő portartalmának kiszűrésére, elszívására. A budapesti mintavételi helyszínen ennek ellenére magas teliospóra koncentrációt mértünk a levegőben. BECHTEL és munkatársai (1999) tanulmánya alapján a malomba bejutó teliospórák 1,8%-a akad fenn a malom

légszűrőrendszerében. A szűrő hatékonysága 96%-os, így a szűrőrendszerben fennakadó teliospórák (1,8%) 4%-a mégis bejut a malomba. Ebből következik, hogy a porciklonok nem alkalmasak a teliospóra-mentes légtér biztosítására. A budapesti gabonátárház kültéri levegőjében is magas *Tilletia*-koncentrációt detektáltunk, ennek az lehet a magyarázata, hogy az épület nyílásain keresztül kijutottak a teliospórák. Ezt alátámasztják CHEUNG és GERRARD (1980) kutatásai is: nem mutattak ki jelentős különbséget a gabonátárolók kül-, és beltéri levegőjének mikroszkópikus gombaösszetétele között - bár a teliospóra-sűrűség épületen belül jóval magasabb volt.

Az aerobiológiai kutatási eredményeink bizonyítékkul szolgálnak és számszerűsítik a gabonátárházak levegőjének teliospóra-tartalmát, és hozzájárulhatnak a TCK kockázatbecslési modell elkészítéséhez. A jelenlegi TCK modellek azon kívül, hogy időjárási adatokat hasznosítanak, csak a búzátételekben (PETERSON et al. 2009) kimutatott, valamint a vízzel és állatok által szállított (JIA et al. 2013) *Tilletia* teliospóra-mennyiséget veszik figyelembe, azonban a levegő spóratartalmát nem. Kísérleteink során kimutattuk, hogy a beltérben lévő teliospórák a gabonátárolókból kijuthatnak, így megvan annak az esélye, hogy a tárolók közelében lévő búzamezőkre jutva azokat megfertőzik. További vizsgálatok szükségesek ezen fertőzésveszély feltárására, a légköri teliospórák levegőben és talajban való fennmaradásának felderítésére, és, hogy milyen messze tudnak eljutni a spórák a légmozgások által a gabonátárolóktól - az izolációs távolság megállapításához. Az átfertőzésre veszélyes zónában elhelyezkedő szántóföldeken ajánlott a búzatermesztés tilalma vagy pedig a rendszeres ellenőrzés laboratóriumi vizsgálattal (JIA et al. 2013).

A búzátételek gabonátárházon belüli levegő- vagy gabonaeredetű átfertőződésének elkerülése érdekében a következő javaslatokat tesszük. Aratáskor a búzátételek zárlati vagy egyéb gazdaságilag jelentős *Tilletia*-fajtól való mentességének laboratóriumi vizsgálata (le mosásos módszer) szükséges éves felderítés keretében (ezt jelenleg is végezzük a NÉBIH NTAI NMBL-ben). Ha egy mintában 10 vagy ennél több *Tilletia*-teliospórát detektálunk, a minta fertőzöttnek tekinthető (OEPP/EPPO 2007). Ha a mikroszkópos vizsgálat alapján a minta mentes a zárlati vagy gazdaságilag jelentős *Tilletia*-kórokozóktól, a búzátétel a tárolóba szállítható, és például export célra hasznosítható. A pozitív minták takarmányozásra használhatók fel, ha az állatok hajlandók felenni. A bizonyítottan *Tilletia*-fajokkal fertőzött területekről származó búzátételeket ajánlott az egészséges tételektől elkülönítve tárolni. A mentes és fertőzött tételeket tároló tárházakat érdemes lenne egymástól távol létesíteni úgy, hogy az üszögmentes szántóföldeket se fertőzhessék át. A tárolókat fertőtlenítő- és sterilizáló berendezéssel kellene felszerelni. A fertőzött tételeket nem ajánljuk, hogy központi tárházakba szállítsák, mert a levegőbe bekerülő teliospórák újabb tételeket fertőzhetnek meg.

A növény-egészségügyi vonatkozások mellett meg kell említeni a *Tilletia*-teliosporák humán egészségügyi káros hatásait is. A gabonatételek mozgatásával nagy mennyiségű teliospóra szóródik a levegőbe, mely ekkor leggyakrabban (az allergén hatás mellett) farmertüdő betegséget, illetve légúti irritációt válthat ki, illetve részt vehet az endotoxikózis kialakításában (LACEY 1980; MAGYAR et al. 2012).

Amennyiben a légkör gyakran, ill. hosszabb ideig és nagy mennyiségben telített spórákkal, ahogy az a központi gabonatárházakban rendszeresen előfordul, a légzőszervi megbetegedések kockázata fokozott mértékű. A mezőgazdasági dolgozók több ponton is kapcsolatba kerülnek a gabonaporrall: termesztés, aratás, szállítás, tárolás, feldolgozás (malomipar, takarmányipar, élelmiszeripar) során, ezért mindenképpen javasolt a megfelelő, légutakat védő felszerelés használata a munka során (MAGYAR et al. 2012).

5.3. A *Tilletia*-fajok elkülönítése DNS-alapú molekuláris módszerekkel

A doktori munka során három már leírt DNS-alapú módszert vizsgáltunk meg a laboratóriumban azzal a céllal, hogy valamelyiket diagnosztikai módszerként alkalmazhassuk az éves hatósági felderítések során. A KOCHANOVA és munkatársai (2004) által leírt TILf és TILr primerpár felhasználásával egy 361 bp hosszúságú terméket kaptunk, aspecifikus terméket nem detektáltunk. A 361 bp hosszúságú fragmentum a szerzők leírása alapján *Tilletia* nemzetség-specifikus, melyet mi is bizonyítottunk. Az általános primereknél (ITS1/ITS4) (PIMENTEL et al. 1998 a) specifikusabb ez az újonnan fejlesztett primerpár, mivel az ITS1/ITS4 primerpár a *Tilletia*-fajok esetében két fragmentumot szaporít fel – 550 bp és 750 bp -, az első *Tilletia*-specifikus, míg a második a búza DNS-ét szaporítja fel. Ez a gyakorlati munka során gondot okozhat, ha nem tiszta tenyészetből, hanem növényvel is szennyezett mintából indulunk ki.

A másodikként vizsgált módszert YUAN és munkatársai (2009) fejlesztették ki a *T. caries* és *T. contraversa* fajszerűtű elkülönítésére. A tanulmányukban közölt 747 bp hosszúságú fragmentumot, amely kizárólag a *T. contraversa* izolátumokból szaporítható fel, a munkánk során nem detektáltuk a gélben, tehát nem tudtuk reprodukálni az említett publikációban leírt eredményeket. Szándékunkban állt a YUAN és munkatársai által ajánlott módszer adaptálása és felhasználása a diagnosztikai munkában a laboratóriumunkban, mivel ez volt az első közölt cikk a *Tilletia*-fajspecifikus primerek sikeres fejlesztéséről. Annak, hogy nem tudtuk reprodukálni ezen eredményeket egyik oka az is lehet, hogy eltérő a YUAN és munkatársai (2009), illetve az általunk felhasznált izolátumok földrajzi származási helye, azaz az ő izolátumaik és a mi mintáink kérdéses szekvenciái, ahová a primerek bekötődnek, néhány bázispárban eltérhetnek.

Kiegészítésként megállapítható, hogy YUAN és munkatársai (2009) *Tilletia*-micéliumból izoláltak DNS-t, és 1 ng DNS-t adtak a reakcióhoz. A DNS-kinyerés kiindulási anyaga a mi esetünkben tehát eltér a cikkben közölttől, mi teliospórákból indultunk ki, de ez nem okozhat problémát véleményünk szerint a PCR-reakció során. Továbbá a szerzők cikkükben nem térnek ki a módszerük érzékenységére. A YUAN-cikkre vonatkozó citációk száma: 3 db. Az első két publikáció innen vette a SCAR-primerek diagnosztikában való hasznosítására irányuló ötletet, de más gombafajok azonosításában használják fel ezt az új lehetőséget, és így ők sem értékelik az eredeti módszer hatékonyságát, tehát nincs arra vonatkozó adat, hogy mások tudták-e reprodukálni a publikált eredményeket.

Végül a GAO és munkatársai (2010) által leírt új ISSR módszert sikeresen alkalmaztuk saját körülményeinkre a laboratóriumunkban. A SCAR primerek (TCKSF3/TCKSR3) felhasználásával a vizsgált *T. contraversa* izolátumokból a leírt fajspecifikus DNS fragmentumot amplifikáltuk (419 bp), mely nem volt jelen egyik *T. caries* izolátumban sem. Ennek megfelelően ez a módszer felhasználható a hatósági diagnosztikai munkánk során. Felmerült viszont a probléma, hogy az eredeti PCR-körülményeket alkalmazva nem elég éles és világos fragmentumokat kapunk a géiben. Ennek kiküszöbölésére sikeres módszerfejlesztést hajtottunk végre. Az új PCR-programban a lánchosszabbítás ideje hosszabb és megváltoztattuk a bekötődés hőfokát is, touch down PCR-t alkalmazva. Az alacsonyabb hőmérséklet elősegíti a primer bekötődését (akkor is megtörténik a bekötődés, ha nem teljesen azonos a templát és a primerek bázissorrendje).

Új eredménynek tekinthető, hogy a módszert adaptáltuk helyi körülményeinkre (a fenti módosítással), és a morfológiai identifikációt követő megerősítő vizsgálatként alkalmazhatónak tekintjük a *T. caries* és *T. contraversa* fajsintű elkülönítésére. A későbbiekben, amint rendelkezésre áll nagyobb számú izolátum, tervezzük a módszer megfelelő reprodukálhatóságának tesztelését is.

5.4. A *Tilletia*-fajok elkülönítése fehérjealapú molekuláris módszerekkel

A teliospóra gyűjteményünk egyes darabjai eltérő földrajzi helyről, illetve eltérő fajtájú őszi búza gazdanövényről származtak, mely nehezítette, hogy stabil biokémiai markert találjunk a *T. caries* és *T. contraversa* elkülönítésére, olyat, melyet nem befolyásolnak a különböző környezeti feltételek, illetve a gazdanövény-specifikus tényezők. Ezen felvetődő problémát jól szemlélteti az, hogy két különbségfehérjét detektáltunk az egyik lengyel *T. contraversa* izolátumban (TILLCO B) - 73 és 85 kDa mérettartományban -, mely nem volt jelen a másik

lengyel izolátumban (TILLCO A). Az eltérő mintázat magyarázata lehet az is, hogy különböző a mintavételi hely, vagy, hogy más őszi búza gazdanövény-fajtáról származnak a minták (sajnos az őszi búza fajta nem ismert a TILLCO A esetében).

Az általunk egydimenziós SDS-PAGE módszerrel nyert fehérjemintázat eltér WEBER és SCHAUZ (1985) eredményeitől, akik a két *Tilletia*-faj fenol-oldható fehérje-extraktumaiban egy 65 kDa méretű faj-specifikus különbségfehérjét írtak le a *T. contraversa* mintákból. A kísérleteink során mi a teliospórák teljes PBS-oldható fehérjemennyiségét elemeztük, de ezen extraktumokban nem találtuk meg ezt a 65 kDa méretű különbségfehérjét, azonban egy jól elkülöníthető 106 kDa méretű sávot detektáltunk. Mindemellett eredményeink nem egyeznek meg KAWCHUCK és munkatársai (1988) megfigyeléseivel sem, akik szintén a két faj fenol-oldható fehérjefrakcióját vizsgálták kétdimenziós gél-elektroforézissel. Ezen szerzők minden mintában jelentős mennyiségű polipeptidet mutattak ki, de végül arra a következtetésre jutottak, hogy nincs olyan faj-specifikus marker a két *Tilletia*-fajban, amely alapján a két faj biztonságosan és következetesen elkülöníthető lenne. És végül, BANOWETZ és munkatársai (1994) tanulmányukban leírtak egy 116 kDa méretű polipeptidet, mely egyedi és fajra jellemző a *T. contraversa* esetében. A fehérje-extrakció során 2x Laemmli puffert használtak. Saját vizsgálataink során ezen 116 kDa méretű különbségfehérjét sem detektáltuk sem a *T. caries*, sem a *T. contraversa* izolátumokban.

A fehérjék fenol-alapú extrakciója a kevésbé reprodukálható módszerek közé tartozik: a régebbi időkben előszeretettel alkalmazták, de már akkor is úgy tartották, „inkább művészet, mint tudomány”. A 2x Laemmli-puffer az SDS-gélelektroforézis általános futtató puffere, így 15-20%-ban glicerolt vagy szacharózt tartalmaz, hogy meggátolja a betöltött fehérjeminta és elektród oldat keveredését a gél zsebeiben. Ennek következtében a fehérje-kinyerésre történő felhasználása több szempontból is kétséges: keverés során erőteljesen habzik (ez a fehérjék denaturációjához is vezethet), magas a viszkozitása, stb. Viszont az általunk is alkalmazott PBS-oldat manapság is általánosan alkalmazott a biológiai kutatásokban. Megfelelő extrakciós puffer a szobahőmérsékleten való fehérjekinyeréshez, és nincs limitáló tényezője a fehérje-elválasztás tekintetében sem. Bizonyítottuk a PBS extrakciós pufferrel hatékonyságát a 2x Laemmli-pufferrel szemben, hiszen a 33. ábrán látható gélkép alapján elmondhatjuk, hogy az elektroforetikus mintázat tiszta, a sávok és oszlopok denzitometriásan könnyen összehasonlíthatók a PBS-sel extrahált fehérjék esetében.

A *Tilletia caries* és *T. contraversa* elkülönítésére kétféle molekuláris módszert alkalmaztunk: DNS- és fehérjealapú technikákat. A DNS-alapú technikák napjainkban sokkal népszerűbbek a fehérjevizsgálatoknál, a *Tilletia*-fajok esetében is jelentősen bővebb az ehhez kapcsolódó kutatási projektek, publikációk száma, ezeket tesztelve végül a GAO és munkatársai

(2010) által kifejlesztett ISSR módszert sikerült saját laboratóriumi viszonyaink között megerősíteni. A fehérjevizsgálat esetében nem állt rendelkezésre publikált megbízható módszer, így saját módszerfejlesztés keretében tökéletesítettük az általunk alkalmazott technikát.

A DNS-vizsgálatok előnyeként említhető, hogy gyorsak, könnyen adaptálhatók és kevés mennyiségű minta szükséges hozzájuk. Ezzel szemben a fehérje-elválasztás esetén egy nagyságrenddel is több mintamennyiségből kell kiindulni, ami alacsony fertőzöttségi szint esetén problémát jelenthet, valamint hosszabb a minta-előkészítés és a futtatás időtartama. Mindkét módszer esetében limitáló tényező a sejtfal feltörése, ezt a problémát sikeresen áthidaltuk minden esetben. Tapasztalataink szerint mindkét módszernél eltéréseket okozhat az, ha a minták különböző földrajzi helyről származnak. A fehérjék esetében plusz sávok jelenhetnek meg, mely azonban a mi esetünkben nem befolyásolta a kiértékelés sikerét. Ellenben a DNS vizsgálatok során egy teljes módszer alkalmazhatóságát kérdőjelezhetik meg (lásd. YUAN et al. (2009) tesztelése).

Összefoglalva mind a fehérje-, mind a DNS-alapú módszer adaptálása, alkalmazása javasolt, az adott laboratórium felszereltségének függvényében. Manapság a DNS-alapú technikák térhódítása figyelhető meg, de nem szabad megfeledkeznünk a fehérjealapú módszerekről sem, melyek nem csak néhány amplikont szaporítanak fel, hanem nagyszámú génterméket, azaz fehérjét hasonlíthatunk össze segítségükkel egy gélen, tehát ezek bármelyikében jelentkező változás diagnosztikai értékű lehet. Egyedüli limitáló tényezőként jelentkezik a fertőző anyag mennyisége, kis mennyiségű minta esetén a DNS-vizsgálat elvégzése az indokoltabb.

5.5. Új tudományos eredmények

1. Országos felderítés keretében (2007-2013) bizonyítottuk a *Tilletia caries* domináns előfordulását a *T. laevisszel* szemben, valamint két esetben megtaláltuk a gazdaságilag jelentős károsítóként ismert *T. contraversa* fajt is. Megállapítottuk, hogy az időjárási körülmények nagyban hozzájárulhatnak a fertőzés sikeréhez, de a hatékony csávázás megfelelő védelmet kellene, hogy jelentsen az üszögök ellen. A fajtának van a legkisebb jelentősége a fertőzés szempontjából, mivel hazánkban nem nemesítettek üszög-ellenállóságra.
2. Bizonyítottuk a SCAR-primerek (TCKSF3/TCKSR3) felhasználásával nyert 419 bp méretű *T. contraversa* faj-specifikus DNS fragmentumot adó DNS-alapú módszer

laboratóriumi használhatóságát. A publikált eljárást módosítva adaptáltuk helyi körülményeinkre, és a morfológiai identifikációt követő megerősítő vizsgálatként alkalmazhatónak tekintjük a *T. caries* és *T. contraversa* fajsztintú elkülönítésére. Ezen kívül igazoltuk a TILf és TILr primerpár felhasználásával kapott 361 bp hosszúságú, *Tilletia* nemzetség-specifikus terméket adó technika alkalmazhatóságát is.

3. Hatékony fehérje-kinyerési módszert dolgoztunk ki a *Tilletia*-fajok teliospóráinak belső, teljes fehérjetartalmának kinyerésére, a teliospórák falának feltörésével.
4. Elsőként fejlesztettünk ki a hatósági laboratóriumi diagnosztikában is alkalmazható, egydimenziós gél-elektroforézisre épülő fehérje-elválasztási technikát a *T. caries* és *T. contraversa* elkülönítésére; amelynek az alapja egy 106 kDa méretű *T. contraversa* faj-specifikus fehérje kimutatása reprodukálható módon. Ennek a munkának a során bizonyítottuk a PBS puffer hatékonyságát a 2x Laemmli pufferrel szemben.
5. Hirst-típusú térfogatos spóracsapdával hazánkban első alkalommal vizsgáltuk a vidéki és központi gabonaraktárok belső levegőjének *Tilletia*-teliospóra tartalmát. Vizsgálataink során a *T. caries* dominált a levegőmintákban. Szoros korrelációt mutattunk ki a por- és a levegőminták teliospóra-tartalma, valamint a búza- és a levegőminták teliospóra-tartalmai között, de nem volt összefüggés a búza- és porminták teliospóra-koncentrációi között. Megállapítottuk továbbá, hogy az adott helyszínen korábban tárolt fertőzött gabona által is megfertőződhet az ott később raktározott, egészséges tétel, mivel a leülepedett gabonaporban is kimutathatók a teliospórák.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Az őszi búza gazdaságilag jelentős növényünk, világviszonylatban vetésterülete körülbelül 245-250 millió hektár. Legfontosabb kenyérgabona-növényünk, és fontos megélhetési forrás. Termesztését az egyes kórokozók, mint a rozsda- és üszöggombák, nagymértékben befolyásolják, megjelenésük rontja a gabona minőségét és csökkenti a termés mennyiségét. A csíranövény-fertőző *Tilletia*-fajok világszerte az egyik legveszélyesebb kórokozóknak számítanak.

Hazánkban a gazdasági jelentőséggel bíró üszögök a törpeüszög, *Tilletia contraversa*, és a két kőüszög- vagy bűdösüszög, *T. caries* és *T. laevis*. Általánosságban ugyanakkor elmondható, hogy az üszögbetegségek ma kevesebb gazdasági kárt okoznak, mint ötven évvel ezelőtt, köszönhetően az agrotechnika és a kémiai védekezési módszerek fejlődésének. Azonban napjainkban némi visszalépést tapasztalhatunk az 1970-es és 1980-as évekhez képest mind a termelés színvonalát, mind az agrotechnikai igényességet illetően: mivel a termelés bizonyos szegmensei kiestek a gazdasági szakirányítás hatásköréből (kis és gazdaságtalan üzem- és táblaméret, csávázás elhagyása, kényszergazdálkodás, stb.), így a gabonaüszög a 90-es években ismét felütötte a fejét.

Munkánk során 2007-től napjainkig követtük nyomon a Magyarországon gazdaságilag jelentős *Tilletia*-fajok elterjedését, az eredményeket dokumentáltuk és térképen rögzítettük, valamint leírtuk a fajok előfordulásának és az időjárás alakulásának lehetséges összefüggéseit. A tapasztalataink szerint a *T. caries* 2008-tól kezdve minden évben megjelent hazánk területén. A *T. laevis* 2009-ben, 2011-ben és 2012-ben a *T. caries*szel együttesen, kevert fertőzőként is kimutattuk 1-1 mintából, valamint 2009-ben a *T. laevis* önállóan is jelent volt egy búzamintában. A *T. contraversa*t két alkalommal, 2011-ben és 2013-ban detektáltuk. Az azonosításhoz kétféle hagyományos mikológiai módszert alkalmaztunk, a fénymikroszkópos és a fluoreszcens fénymikroszkópos módszert. A mikroszkópos fajhatározás hátránya, hogy a *T. caries* és *T. controversa* teliospórák nagyfokú hasonlóságot mutatnak, paramétereikben jelentős átfedések figyelhetők meg, ezért a fajsztípus határozás időigényes, nem mindig megbízható és gyakorlott szemzet igényel.

Az előzőekből következően célul tűztük ki egy vagy több molekuláris módszer fejlesztését, adaptálását a munka gyorsabbá és hatékonyabbá tételére.

A DNS-alapú molekuláris módszer kutatására irányuló törekvéseink eredményeként sikeresen adaptáltuk és alkalmazzuk rutinvizsgálatainkhoz a KOCHANOVA és munkatársai (2004) által leírt módszert, mely a TILf és TILr primerpár felhasználásával egy 361 bp

hosszúságú *Tilletia* nemzetség-specifikus terméket szaporít fel. A GAO és munkatársai (2010) által publikált új, SCAR-marker alapú ISSR-módszert is eredményesen átvettük a laboratórium diagnosztikai eljárásai közé. Ezen technika a SCAR-primerek (TCKSF3/TCKSR3) segítségével egy 419 bp méretű fajspecifikus DNS-fragmentumot szaporít fel a *T. contraversa* izolátumokból.

A *Tilletia*-fajok fehérje összetételükben lévő különbségek alapján történő elkülönítésére sikeresen kifejlesztettünk egy új SDS gél-elektroforézisen alapuló módszert. A teliospórák vastag falát feltörtük, és PBS-alapú protein extrakciót követően az izolátumokból reprodukálható, jól elkülöníthető sávokat tartalmazó fehérjemintázatot nyertünk. Homogén géleket alkalmazva, a teliospórákból származó fehérjemintákból 14-110 kDa mérettartományban detektáltunk fehérjéket. A *T. caries* és *T. contraversa* minták egydimenziós gél-elektroforézis (1D SDS-PAGE) analízise során nyert fehérjemintázatokban egy 106 kDa méretű *T. contraversa* fajspecifikus különbségfehérjét mutattunk ki. Emellett az egyik lengyel *T. contraversa* izolátumban két további, 73 és 85 kDa méretű fehérjét is kimutattunk, melyek semelyik másik izolátumban sem voltak jelen.

Összefoglalva - az adott laboratórium felszereltségének függvényében - mind a fehérje-, mind a DNS-alapú módszer alkalmazása javasolt. Manapság a DNS-alapú technikák térhódítása figyelhető meg, de nem szabad megfeledkeznünk a fehérje-alapú módszerekről sem, melyek nem csak néhány amplikont szaporítanak fel, hanem nagyszámú génterméket, azaz fehérjét hasonlíthatunk össze segítségükkel egy gélen, tehát ezek bármelyikében jelentkező változás diagnosztikai értékű lehet. Limitáló tényezőként jelentkezik a fertőző anyag mennyisége, kis mennyiségű minta esetén a DNS-vizsgálat elvégzése az indokoltabb.

A gabonatárházakban tárolt búzatételek és a tárházak levegőjének vizsgálata során a *Tilletia*-fajok előfordulását vizsgáltuk. A Hirst-típusú levegő-mintavevővel két központi (Budapest és Jászapáti) és 14 db vidéki gabonaraktár levegőjét mintáztuk (a tárolt őszi búza tétélekből is vettünk mintát). Zárlati károsítókat (*T. contraversa* és *T. indica*) nem tudtunk kimutatni a mintákból. A levegőmintákban a *T. caries* kórokozó dominált, míg a *T. laevis* csak alacsony koncentrációban, kizárólag a Budapesten gyűjtött mintákban, volt kimutatható. A budapesti tárházban a kilenc emeleten, a félig zárt cellákat tartalmazó helyiségek két legtávolabbi pontján mért teliospóra koncentrációt összehasonlítva, nem találtunk szignifikáns különbséget az értékek között ($P=0,16$). Hasonlóképpen a betárolt őszi búza mennyisége nem befolyásolja szignifikánsan a levegőben mért spórkoncentrációt ($P=0,64$, $U=3,00$). A búzatételekből kimutatott teliospóra mennyisége pozitív összefüggést mutatott a búzatétel felett mért teliospóra-koncentrációval ($n=12$, $r_s=0,581$, $P<0,05$). Budapesten azt tapasztaltuk, hogy a rendszeres, napi anyagmozgatás következtében a tároló helyiségek és emeletek között gyorsan végbemegy a levegő keveredése a nyitott tetejű cellás tároló rendszeren és a beömlőnyílásokon

keresztül. Így magas a kockázata annak, hogy a bekerült *Tilletia*-fajokkal fertőzött tételek átfertőzik a már betárolt egészséges tételeket. Emellett annak a veszélye is fennáll, hogy az adott helyszínen korábban tárolt fertőzött gabona által is megfertőződhet az ugyanott később raktározott tétel, mivel mi is találtunk teliospórákat a nem-*Tilletia* gazdanövényt (napraforgó, kukorica) tároló referencia helyiségekben. Tehát a leülepedett por a repülő teliospórák fontos forrása lehet. Közepes korrelációt mutattunk ki a por-, és a levegőminták teliospóra-tartalma, valamint a búza-, és a levegőminták teliospóra-tartalmai között, de nem volt összefüggés a búza-, és porminták teliospóra-koncentrációi között. Amennyiben a légkör gyakran, ill. hosszabb ideig és nagy mennyiségben telített spórákkal, ahogy az a központi gabonatárházakban rendszeresen előfordul, a légzőszervi megbetegedések kockázata fokozott mértékű, ezért javasolt a légutakat védő felszerelés használata a munka során.

A dolgozatban ismertetett eredmények főként gyakorlati jellegűek, melyekkel reményeink szerint egyrészt hozzájárulunk a *Tilletia*-fajok laboratóriumi diagnosztikájában használt módszerek palettájának bővítéséhez; másrészt hozzájárulhatunk a gabonatárházak tároló-rendszerének fejlesztéséhez, valamint a növény- és humán-egészségügyi körülmények javításához.

7. SUMMARY

Winter wheat is one of our economically most important crops. The acreage sown worldwide is approximately 240-250 million hectares. Wheat is our substantial bread crop and a significant source of living to many people. Wheat production is mainly influenced by some pests, such as rusts and smuts, which lower the quality and quantity of the grain. Seedling infecting *Tilletia* species are amongst the most dangerous fungal pathogens in the world.

In Hungary the economically important bunts/smuts of wheat are dwarf bunt (*T. contraversa*) and common or stinking smuts (*T. caries* and *T. laevis*). In general, European wheat smuts are nowadays less damaging than they were 50 years ago, because large-scale seed treatments and cultural techniques are widely applied. In contrast to the 1970-1980s recently, wheat production, like agriculture as a whole, fell out of authorised control (for example the size of cultivated fields reduced, large estates fell apart, chemical treatments diminished, etc.). Consequently, since the middle of 1990s sporadic spread of common bunt infections could have been observed.

During our studies we have surveyed the economically important *Tilletia* species in Hungary since 2007. The results have been documented, mapped and, in addition, we described the possible relation between the presence of the *Tilletia* spp. and the weather conditions. According to our findings *T. caries* has been detected every year since 2008. We found one mixed infection of *T. caries* and *T. laevis* in 2009, 2011 and again in 2012. In one wheat sample we detected only *T. laevis* in 2009. We found *T. contraversa* in two of the wheat samples in 2011 and in 2013. For the morphological identification we applied two different classical mycological methods: light microscopy and fluorescent microscopy. The morphological similarity of the two species (*T. caries* and *T. contraversa*) makes the differentiation difficult, because considerable overlaps still exist in the characteristics of *T. caries* and *T. contraversa*. So the identification on species level is time consuming, not always reliable and requires a practised expert.

Based on these facts we decided to develop and/or adopt one or more molecular methods for distinguishing these two species to make the routine diagnostic work faster and more efficient.

By searching for DNA-based molecular approaches, we were able to successfully adopt and apply a method published by KOCHANOVA et al. (2004) which uses the TILf - TILr primer pair to gain a 361 bp *Tilletia* genus-specific band. In addition, we also adopted the new SCAR marker based ISSR method of GAO et al. (2010). In this case, the SCAR primers (TCKSF3/TCKSR3) amplified a 419 bp *Tilletia contraversa* species-specific fragment.

For the protein-based identification of the two *Tilletia* species, the rupturing of the thick wall of the teliospores of *Tilletia* spp. was successful, and after the PBS-based protein extraction we gained reproducible protein patterns. We developed a new SDS electrophoresis method which separates distinct protein bands for both species. We applied homogenous gels, and detected proteins in the range of 14-110 kDa. The electrophoretic pattern showed consistent species-related differences in a 106 kDa polypeptide that appeared in each extract of *T. contraversa*, but was not present in the protein extracts of *T. caries*. Furthermore, one of the Polish *T. contraversa* isolates showed two additional bands at 73 and 85 kDa which could not be detected either in the other Polish, or in the Hungarian *T. contraversa* isolates. These two bands were not present in any of the *T. caries* protein extracts.

To sum up, the application of DNA and protein based molecular methods are both recommended depending on the facilities of the laboratories. Nowadays the DNA-based molecular techniques are more popular, but we have to bear in mind the protein based methods, too, because they amplify not just some amplicons, but detects bigger numbers of gene products, namely proteins. With the use of SDS electrophoresis we can compare huge numbers of proteins in one gel. Only one difference of the protein pattern of two species is of diagnostic value. The only limiting factor is the amount of the infected material: if we have only a small amount of sample, the application of the DNA-based method is more justified.

To find out the occurrence of *Tilletia* species in post-harvest wheat grain and in the air of warehouses, seed and air samples (with a portable Hirst type volumetric impaction sampler) were collected in two central grain warehouses in Budapest and Jászapáti and in 14 farm warehouses. It is important to emphasize that quarantine organisms (*T. contraversa* and *T. indica*) were not detected in any of the samples. *Tilletia caries* dominated in the air and seed samples, while *T. laevis* were present only in a low concentration in the samples collected in Budapest, but this fungus was absent both in Jászapáti and in all of the farm warehouses. The amount of teliospore levels at two different sites of wheat storage rooms in Budapest were compared, but no significant difference was found between these sites ($P=0.16$). Similarly, the volume of stored wheat did not significantly affect the *Tilletia* spp. concentrations ($P=0.64$, $U=3.00$) in the air. Teliospore levels in seed samples positively correlated with those in the air samples which were collected from above the wheat heaps ($n=12$, $r_s=0.581$, $P<0.05$). In Budapest, teliospore dispersal took place rapidly between storage rooms and floors via open-top walls and spouts. Consequently, there was a higher risk of cross contamination between the healthy and infected lots. Furthermore, teliospores could be distributed from deposits originating from previous crops, since during our experiments teliospores were unexpectedly found in the reference rooms containing the seed of non-*Tilletia* host plants (sunflower, corn). Moreover, it is

also supposed that the warehouses could be contaminated with the airborne teliospores before the room is being loaded with the grain of the host plant. Apparently, the source of the airborne teliospores could be the settled dust. There was a medium correlation between the teliospore content of dust and air as well as the teliospore content of seed and air, but no correlation was found between the teliospore content of seed and dust. If the air in the warehouses often or for long periods is highly saturated with teliospores, which is general in the central warehouses, the risk of pulmonary diseases will rise. Consequently to wear proper masks during work is highly recommended.

Our results are considered mainly practical for two reasons. We hope on the one hand to contribute to improve the number and quality of the *Tilletia* spp. diagnostic methods used in the laboratories, and to develop the quality and safety of health (plant and human) and storage conditions of the grain warehouses on the other.

M1. Irodalomjegyzék

- ABD-ELSALAM K. A., ALY I. N., ABDEL-SATAR M. A., KHALIL M. S. és VERREET J. A. (2003): PCR identification of *Fusarium* genus based on nuclear ribosomal-DNA sequence data. *African Journal of Biotechnology*, 2(4): 82-85.
- ALLEN R. C., SARAVIS C. A., és MAURER H. R. (1984): Gel electrophoresis and isoelectric focusing of proteins: selected techniques. *Walter de Gruyter Inc.:* Berlin, pp. 255.
- ANDERSEN A. A. (1958): New sampler for the collection, sizing and enumeration of viable airborne particles. *J. Bacterial.*, 76: 471-484.
- ANDREWS A. T. (1986): Electrophoresis: Theory, Techniques, and Biochemical and Clinical Applications. 2nd ed. *Oxford Science Publications Clarendon Press:* Oxford, pp. 452.
- ANONYMOUS (1983): U.S. Quarantine of Mexican wheat: dilemma for researchers and exporters. *Diversity*, 5: 13-14.
- APPEL O. és RIEHM E. (1911): Versuch über die Keimfähigkeit verfütterter Steinbrandsporen. *Mitt. Biol. Land Forstwirtsch.*, 11: 12.
- ARORA D. K., HIRSCH P. R. és KERRY B. R. (1996): PCR-based molecular discrimination of *Verticillium chlamydosporum* isolates. *Mycol. Res.*, 100: 801-809.
- ÁGOSTON T. (2009): Az évjárat hatása az őszi búzafajták agronómiai tulajdonságaira. Doktori disszertáció. Debreceni Egyetem, Debrecen. pp. 31.
- BANOWETZ G. M., TRIONE E. J. és KRYGIER B. B. (1984): Immunological comparison of teliospores of two wheat bunt fungi, *Tilletia* species, using monoclonal antibodies and antisera. *Mycologia*, 76: 51-62.
- BANOWETZ G. M. és DOSS R. P. (1994): A comparison of polypeptides from teliospores of *Tilletia controversa* (Kuhn) and *Tilletia tritici* (Bjerk) Wint. *J. Phytopathol.*, 140: 285-292.

- BANSAL R., SINGH D. V. és JOSHI L. M. (1984): Effect of Karnal bunt pathogen [*Neovossia indica* (Mitra) Mundkur] on weight and viability of wheat seed. *Indian J. Agric. Sci.*, 54: 663-666.
- BAUDYS E. (1921): Die Sporen der Getreidebrandpilze sind nicht giftig. *Zeitschr. Pflanzenkr.*, 31: 24-27.
- BÁN R. (2006): Növénykórtan – A fontosabb szántóföldi és kertészeti növények betegségei. Egyetemi jegyzet, Szent István Egyetem, Gödöllő, 15–17.
- BÁNHEGYI J., TÓTH S., UBRIZSY G. és VÖRÖS J. (1985): Magyarország mikroszkópikus gombáinak határozókönyve 1-2. *Akadémiai Kiadó*, Budapest, pp. 1151.
- BEATTIE S. E., STAFFORD A. E. és KING A. D. (1993): Triacylglycerol profiles of *Tilletia controversa* and *Tilletia tritici*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 1054-1057.
- BECHTEL D. B., WILSON J. D., EUTACE W. D., BEHNKE K. C., WHITAKER T. B., PETERSON G. L. és SAUER D. B. (1999): Fate of dwarf bunt fungus teliospores during milling of wheat to flour. *Cereal Chemistry*, 76: 270-275.
- BECKLAKE M. R. (1980): Grain dust and health: state of the art. In: DOSMAN J. A. és COTTON D. J. (eds.): Occupational pulmonary disease. Focus on grain dust and health. *Academic Press*: Toronto, 189-200.
- BLACK J. A. és FOARDE K. K. (2007): Comparison of four methods for extraction of *Stachybotrys chartarum* spore DNA and verification by real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 70: 75-81.
- BONDE M. R., PETERSON G. L., SCHAAD N. W. és SMILANICK J. L. (1997): Karnal bunt of wheat. *Plant Disease*, 81: 1370–1377.
- BORSOS J., PUSZTAI P., RADICS L., SZEMÁN L. és TOMPOSNÉ L. V. (1995): Szántóföldi növénytermesztés. Kertészeti és Élelmiszeripari Egyetem jegyzete. Budapest.

- BOWEN B., STEINBERG J., LAEMMLI U. K. és WEINTRAUB H. (1980): The detection of DNA-binding proteins by protein blotting. *Nucleic Acid Research*, 8(1): 1-20.
- BOYD M. L., CARRIS L. M. és GRAY P. M. (1998): Characterization of *Tilletia goloskokovii* and allied species. *Mycologia*, 90: 310-322.
- BÖHMER M., COLBY T., BÖHMER C., BRÄUTIGAM A., SCHMIDT J. és BÖLKER M. (2007): Proteomic analysis of dimorphic transition in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Proteomics*, 7(5): 675-685.
- BRENNAN J. P., WARHAM E. J., HERNÁNDEZ J., BYERLEE D. és CORONEL F. (1990): Economic losses from Karnal bunt of wheat in Mexico. *CIMMYT Economics Working Paper* 90/02.
- BRIDGE P. D., KOKUBUN T. és SIMMONDS M. S. J. (2004): 5. Protein extraction from fungi. In: CUTLER P. (ed.): *Methods in Molecular Biology*. 244: Protein Purification Protocols (2nd edition). *Humana Press Inc.*: Totowa, NJ, 37-46.
- BRYAN G. T., DANIELS M. J. és OSBOURNE A. E. (1995): Comparison of fungi within the *Gaeumannomyces-Phialophora* complex by analysis of ribosomal DNA sequence. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 681-689.
- BURGE H. A. (1985): Fungus allergens. *Clin. Rev. Allergy*, 3: 319-329.
- BURGESS T., WINGFIELD M. J. és WINGFIELD B. W. (2001): Simple sequence repeat markers distinguish among morphotypes of *Sphaeropsis sapinea*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 354-362.
- BURY A. F. (1981): Analysis of protein and peptide mixtures. Evaluation of three SDS-PAGE buffer systems. *J. Chromatogr.*, 213: 491-500.
- CAB (COMMONWEALTH AGRICULTURAL BUREAUX) (1981): CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. No. 719, *Tilletia caries*.
- CADHAM F. T. (1924): Asthma due to grain rusts. *J A M A*, 83: 27.

- CANDIANO G., BRUSCHI M., MUSANTE L., SANTUCCI L., GHIGGERI G. M., CARNEMOLLA B., ONECCHIA P., ZARDI L. és RIGHETTI P. G. (2004): Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*, 25: 1327-1333.
- CARPENTIER S. C., WITTERS E., LAUKENS K., DECKERS P., SWENNEN R. és PANIS B. (2005): Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: an evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. *Proteomics*, 5(10): 2497-2507.
- CHANNELL S., BLYTH W., LLOYD M., WEIR D. M., AMOS W. M. G., LITTLEWOOD A. P., RIDDLE H. F. V. és GRANT I. W. B. (1969): Allergic alveolitis in malt workers: a clinical, mycological and immunological study. *Quart. J. Med.*, 38: 351-376.
- CHEUNG S.-S. C. és GERRARD J. W. (1980): Airborne fungal spores in grain elevators of Saskatchewan. In: DOSMAN J. A. és COTTON D. J. (eds.): Occupational pulmonary diseases. Focus on grain dust and health. *Academic Press*: Toronto, 463-468.
- CFIA (CANADIAN FOOD INSPECTION AGENCY) (2009): Policy directive D-99-01: Barley, Oats, Rye, Triticale and Wheat - Phytosanitary Requirements on Import, Transshipped, In-Transit and Domestic Movement. 5th revision.
- COHEN V. L. és OSGOOD H. (1953): Disability due to inhalation of grain dust. *J. Allergy*, 24: 193.
- COLLINS C. M. és CUNNINGHAM C. O. (2000): Characterisation of the *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957 (Platyhelminthes: Monogenea) ribosomal intergenic spacer (IGS) DNA. *Parasitology*, 121: 555–563.
- COOK R. J. és VESETH R. J. (1991): Wheat Health Management. *APS Press*: St. Paul, MN, pp. 152.
- COOPER F. E. (1983): Wheat from Mexico. Plant Protection and Quarantine, Animal and Plant Inspection Station, U.S.D.A.

- COX C.S. (1987): The aerobiological pathway of microorganisms. *Wiley InterScience*: New York, pp. 298.
- CROTZER V. és LEVETIN E. (1996): The aerobiological significance of smut spores in Tulsa, Oklahoma. *Aerobiologia*, 12: 177-184.
- CUMMING R. H. és ICETON G. (2001): 5. Cell disintegration and extraction techniques. In: ROE S. (ed.): Protein Purification Techniques, 2nd edition. A Practical Approach. *Oxford University Press*: Oxford, 91-107.
- CZEMBOR P. C., és ARSENIUK E. (1999): Study of genetic variability among monopycnidial and monopycnidiospore isolates derived from single pycnidia of *Stagonospora* spp. and *Septoria tritici* with the use of RAPD-PCR, MP-PCR and rep-PCR techniques. *J. Phytopathol.*, 147: 539-546.
- DARKE C. S., KNOWELDEN J., LACEY J. és WARD A. M. (1976): Respiratory disease of workers harvesting grain. *Thorax*, 31: 294-302.
- EBSTRUP T., SAALBACH G. és EGSGAARD H. (2005): The proteomics study of *in vitro* cyst germination and appressoria formation in *Phytophthora infestans*. *Proteomics*, 5(11): 2839-2848.
- EDEL V., STEINBERG C., AVELANGE I., LAGUERRE G. és ALABOUVETTE C. (1995): Comparison of three molecular methods for the characterization of *Fusarium oxysporum* strains. *Phytopathology*, 85: 579-585.
- EFSA PANEL ON PLANT HEALTH (PLH) (2010): Scientific opinion on a quantitative pathway analysis of the likelihood of *Tilletia indica* M. introduction into EU with importation of US wheat. *EFSA Journal*, 8(6): 1621-1709.
- EIBEL P., WOLF G. A. és KOCH E. (2005): Detection of *Tilletia caries*, casual agent of common bunt of wheat, by ELISA and PCR. *Phytopathology*, 153: 297-306.

- ELENA ESTRADA M., CAMACHO M. V. és BENITO C. (2007): The molecular diversity of different isolates of *Beauveria bassiana* (BALS) VUILL. as assessed using intermicrosatellites (ISSRs). *Cell Mol. Biol. Lett.*, 12: 240–252.
- FAO/IPGRI (1995): Technical guidelines for the safe movement of germplasm. 24-27.
- FARANT J.-P., MOORE C. J. és WINDISH J. P. (1973): Airborne fungal spores in Canadian grain elevators. *Health and Welfare Canada Report No. HHAW*, 73-2.
- FAZEKAS DE ST. GROTH S., WEBSTER R. G. és DATYNER A. (1963): Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoresis strips. *Biochim. Biophys. Acta*, 71: 377-391.
- FERNÁNDEZ-ACERO J., JORGE I. és CALCO E. (2006): Two-dimensional electrophoresis protein profile of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Proteomics* 6(Suppl I.): S88-S96.
- FORSTER R. L. és GOATES B. J. (1997): Karnal bunt. University of Idaho. CIS 1067. <http://www.cals.uidaho.edu/edComm/pdf/CIS/CIS1067.pdf>. Hozzáférés: 2010. május 10.
- FREDERICK R. D., SYNDER K. E., TOOLEY P. W., BERTHIER-SCHAAD Y., PETERSON G. L., BONDE M. R., SCHAAD N. W. és KNORR D. A. (1998): An improved PCR method utilizing TaqMan for the detection and differentiation of *Tilletia indica*, the casual organism of Karnal bunt of wheat, and a related ryegrass smut. *Phytopathology*, 88: S29.
- FUENTES-DAVILA G. (1996): 3. Karnal bunt of wheat. In: WILCOXSON R. D és SAARI E. E.: Bunt and smut diseases of wheat: Concepts and methods of disease management. *CIMMYT*: Mexico, 26-32.
- GAIR R., JENKINS J. E. E. és LESTER E. (1983): Cereal Pests and Diseases. 3. Wheat Diseases. *Farming Press Ltd.*: Suffolk, 133-134.
- GANG D. R. és WEBER D. J. (1995): Preparation of genetic DNA for RAPD analysis from thick-walled dormant teliospores of *Tilletia* species. *BioTechniques*, 19: 93-97.

- GANG D. R. és WEBER D. J. (1996): Using random amplified polymorphic DNA to analyze the genetic relationships and variability among three species of wheat smut (*Tilletia*). *Bot. Bull. Acad. Sinica*, 37(3): 173-180.
- GAO L., CHEN W. Q. és LIU T. G. (2010): Development of a SCAR marker by inter-simple sequence repeat for diagnosis of dwarf bunt of wheat and detection of *Tilletia controversa* Kühn. *Folia Microbiol.*, 55(3): 258-264.
- GARFIN D. E. (2009): 29. One-Dimensional Gel Electrophoresis. In: BURGESS R. R. és DEUTSCHER M. P. (eds.): *Methods in enzymology* Vol. 43. Guide to protein purification, 2nd edition. *Elsevier Inc.*: London, 497-514.
- GOATES B. J. (1996): Common Bunt and Dwarf Bunt. In: WILCOXSON R. D és SAARI E. E.: *Bunt and smut diseases of wheat: Concepts and methods of disease management. CIMMYT: Mexico*, 12-25.
- GONZALEZ-FERNÁNDEZ R., PRATS E. és JORRIN-NOVO J. V. (2010): Proteomics of plant pathogenic fungi. *Journal of Biomedicine and Biotechnology. Hindawi Publishing Corporation* Vol. 2010, Article ID 932527, 36 p.
- GRABSKI A. C. (2009): 18. Advances in preparation of biological extracts for protein purification. In: BURGESS R. R. és DEUTSCHER M. P. (eds.): *Methods in enzymology* Vol. 43. Guide to protein purification, 2nd edition. *Elsevier Inc.*: London, 285-304.
- GREGORY P. H. és LACEY M. E. (1963): Mycological examination of dust from mouldy hay associated with farmer's lung disease. *J. Gen. Microbiol.*, 30: 75-88.
- GREY W. E., MATHRE D. E., HOFFMAN J. A., POWELSON R. L. és FERNANDEZ J. A. (1986): Importance of seedborne *Tilletia controversa* for infection of winter wheat and its relationship to international commerce. *Plant Disease*, 70: 122–125.
- GRINYER J., MCKAY M., HERBERT B. és NEVALAINEN H. (2004): Fungal proteomics: mapping the mitochondrial proteins of a *Trichoderma harzianum* strain applied for biological control. *Current Genetics*, 45(3): 170-175.

- HAJÓS GY. (1993): Elektroforézis és alkalmazása az élelmiszerfehérjék elválasztásában. *Élelmiszervizsgálati közlemények*, 39(1): 6-25.
- HALÁSZ Á. (2012): A *Tilletia* fajok felderítése Magyarországon – a *Tilletia contraversa* újbóli megjelenése. *Növényvédelem*, 45(5): 193-202.
- HALWAGY M. H. (1989): Seasonal airspora at three sites in Kuwait 1977-1982. *Mycol. Res.*, 93: 208-213.
- HAMES B. D. (1982): An introduction to polyacrilamide gel electrophoresis. In: HAMES B. D. és RICKWOOD D. (eds.): *Gel Electrophoresis of proteins: a practical approach*. IRL Press Limited: Oxford and Washington DC, 1-92.
- HAMILTON E. D. (1959): Studies in the air spora. *Acta Allergol.*, 13: 152-153.
- HANTULA J., DUSABENYAGASANI M. és HAMELIN R. C. (1996): Random amplified microsattellites (RAMS) – a novel method for characterizing genetic variation within fungi. *Eur. J. Forest Pathol.*, 26: 159–166.
- HARRIS L. H. (1939): Allergy to grain dusts and smuts. *J. Allergy*, 10: 327.
- HARRISON S. T. L. (1991): Bacterial cell disruption: A key unit operation in the recovery of intracellular products. *Biotechnol. Adv.*, 9: 217–240.
- HERNÁNDEZ-MACEDO M. L., FERRAZ A., RODRIGUEZ J., OTTOBONI L. M. L. és DE MELLO M. P. (2002): Iron-regulated proteins in *Phanerochaete chrysosporium* and *Lentinula edodes*: differential analysis by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis profiles. *Electrophoresis*, 23(4): 655-661.
- HESS W. M. és FRIONE E. J. (1986): Use of electron microscopy to characterize teliospores of *Tilletia caries* and *T. controversa*. *Plant Dis.*, 70: 458-460.
- HIBBETT D. S. (1992): Ribosomal RNA and fungal systematics. *Trans. Mycol. Soc.*, 33: 533-556.

- HIRST J. M. (1952): An automatic volumetric spore trap. *Ann. Appl. Biol.*, 39: 257-265.
- HIRST J. M. (1953): Changes in atmospheric spore content: diurnal periodicity and the effects of weather. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 36: 375-393.
- HOFFMAN J. A. és PURDY L. H. (1964): Germination of dwarf bunt teliospores after ingestion by earthworms. *Phytopathology*, 54: 878-879.
- HOFFMAN J. A. (1982): Bunt of wheat. *Plant Disease*, 66: 979–986.
- HOPKINS T. R. (1991): Physical and chemical cell disruption for the recovery of intracellular proteins. In: SEETHARAM R. és SHARMA S. K. (eds.): Purification and Analysis of Recombinant Proteins. *Marcel Dekker Inc.*: New York, 57-83.
- HORVÁTH J. (1995): Búza (*Triticum aestivum* L.) In: A szántóföldi növények betegségei. *Mezőgazda Kiadó*: Budapest. 15–43.
- HULEA A. (1947): The species of *Tilletia* causing wheat bunt. *Publ. Inst. Cerc. agron. Romaniei*, 99: 178.
- JEDRYCZKA M., ROUXEL T. és BALESSENT M-H. (1999): Rep-PCR based genomic fingerprinting of isolates of *Leptosphaeria maculans* from Poland. *Eur. J. Plant Pathol.*, 105: 813-823.
- JIA W. M., ZHOU Y. L., DUAN X. Y., LUO Y., DING S. L., CAO X. R. és FITT B. D. L. (2013): Assessment of Risk of Establishment of Wheat Dwarf Bunt (*Tilletia controversa*) in China. *Journal of Integrative Agriculture*, 12(1): 87-94.
- JIMENEZ-DIAZ C., LAHOZ C. és CANTO G. (1947): The allergens of mill dust. *Ann. Allergy*, 5: 519-525.
- JONES D. R. (2009): Towards a more reasoned assessment of the threat to wheat crops from *Tilletia indica*, the cause of Karnal bunt disease. *Eur. J. Plant. Pathol.*, 123: 247-259.

- JOSEFSEN L. és CHRISTIANSEN S. K. (2002): PCR as a tool for the early detection and diagnosis of common bunt in wheat, caused by *Tilletia tritici*. *Mycol. Res.*, 106: 1287-1292.
- JOSHI L. M., SINGH D. V., SRIVASTAVA K. D. és WILCOXSON R. D. (1983): Karnal bunt: A minor disease that is now a threat to wheat. *Bot. Rev.*, 49: 309-330.
- KAUSERUD H. (2003): Widespread vegetative compatibility groups in the dry-rot fungus *Serpula lacrymans*. *Mycologia*, 96: 232–239.
- KAUSERUD H. és SCHUMACHER T. (2003): Regional and local population structure of the pioneer wood-decay fungus *Trichaptum abietinum*. *Mycologia*, 95: 416–425.
- KAWCHUCK L. M., KIM W. K. és NIELSEN J. (1988): A comparison of polypeptides from the wheat bunt fungi *Tilletia laevis*, *T. tritici*, and *T. controversa*. *Can. J. Bot.*, 66: 2367-2376.
- KELLERER T., SEDLMEIER M., RABENSTEIN F. és KILLERMANN B. (2006): Development of immunochemical and PCR methods for qualitative detection of *Tilletia* species in organic seeds. *Czech J. Genet. Plant Breed.*, 42: 72-74.
- KOCHANOVA M., ZOUHAR M., PROKINOVA E. és RYSANEK P. (2004): Detection of *Tilletia controversa* and *Tilletia caries* in wheat by PCR method. *Plant Soil Environ.*, 50(2): 75-77.
- KÖVICS GY. (1997): A búza kőüszög betegségei (*Tilletia laevis* Kühn, *Tilletia caries* DC. Tul., *Tilletia contraversa* Kühn) és a hagymafélék *Sclerotium cepivorum* Berk. okozta fehérrothadása. *Növényvédelem*, 33(7): 343-344.
- KÖVICS GY. (2000): Növénybetegséget okozó gombák névtára. *Mezőgazda Kiadó*, Budapest, 110-111.
- LACEY J. (1971): The microbiology of moist barley storage in unsealed silos. *Ann. Appl. Biol.*, 69: 187-212.

- LACEY J. és DUTKIEWICZ J. (1976): Methods for examining the microflora of mouldy hay. *J. App. Bacteriol.*, 41: 13-27.
- LACEY J. (1980): 41. The Microflora of Grain Dusts. In: DOSMAN J. A. and COTTON D. J. (eds.): Occupational Pulmonary Diseases. Focus on Grain Dust and Health. *Academic Press*: Toronto, 417-440.
- LACEY J. (1981): 13. The Aerobiology of Conidial Fungi. In: COLE C. T. és KENDRICK B. (eds.): The Biology of conidial fungi Vol. I. *Academic Press*: New York, 370-416.
- LACEY J. (1990): Grain dust and health. *Post harvest News Infor.*, 1(2): 113-117.
- LACEY J. és VENETTE J. (1995): Outdoor air sampling techniques. In: C.S. COX and C.M. WATHES (eds.): Bioaerosol Handbook. *CRC Lewis Publications*: Boca Raton, FL, 407-471.
- LAEMMLI U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259): 680-685.
- LEE S. B. és TAYLOR J. W. (1990): 34: Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. In: PCR Protocols: A guide to methods and applications. *Academic Press, Inc.* 282-287.
- LEVETIN E. (1995): Fungi. In: BURGE H. (ed.): Bioaerosols. *Lewis*: Boca Raton, FL, 87-120.
- LIANG H., PENG Y. L., ZHANG G. Z., CHEN W. Q. és LIU T. G. (2006): Amplification and sequence analysis of the rDNA in tergenic spacer (rDNA 2 IGS) from three *Tilletia* species. *Acta Phytopathologica Sinica*, 36: 407-412.
- LIANG Z., GUO Y., ZHU Y. és SONG Y. (1982): Statistic analysis based on the teliospores morphological characters in differentiating dwarf smut from stinking smut. *Acta Phytopylacica Sin.*, 9: 243-250.

- LIU J. H., GAO L., LIU T. G. és CHEN W. Q. (2009): Development of a sequence-characterized amplified region marker for diagnosis of dwarf bunt of wheat and detection of *Tilletia controversa* Kühn. *Letters in Applied Microbiology*, 49: 235-240.
- LOWTHER C V. (1950): Chlamydospore germination in physiologic races of *Tilletia caries* and *Tilletia foetida*. *Phytopathology*, 40: 590-603.
- MAGAN N. és LACEY J. (1988): Ecological determinants of mold growth in stored grain. *Int. J. Food Microbiol.*, 7: 245-256.
- MAGYAR D. (2005): Gombafaj együttesek vizsgálata levegőbiológiai módszerekkel. Doktori értekezés. Szent István Egyetem, Gödöllő.
- MAGYAR D., SZÓKE C., KONCZ Z., SZÉCSI Á. és BOBVOS J. (2012): Identification of airborne propagules of the *Gibberella fujikuroi* species complex during maize production. *Aerobiologia*, 28(2): 263-271.
- MALDONADO A. N. A. M., ECHEVARRA-ZOMENO S., JEAN-BAPTISTE S., HERNÁNDEZ M. és JORRIN-NOVO J. V. (2008): Evaluation of three different protocols of protein extraction for *Arabidopsis thaliana* leaf proteome analysis by two-dimensional electrophoresis. *Journal of Proteomics*, 71(4): 461-472.
- MARTIN C. R. és SAUER D. B. (1975): Physical and biological characteristics of grain dust. *Am. Soc. Agric. Eng.*, paper no. 75-4060.
- MATTHAIS-MASER S., OBOLKIN V., KHODZER T. és JAENICKE R. (2000): Seasonal variation of primary biological aerosol particles in the remote continental region of Lake Baikal/Siberia. *Atmospheric Environment*, 34: 3805-3811.
- MATHUR S. B. és KONGSDAL O. (2003): Washing test. In: Common Laboratory Seed Health Testing Methods for Detecting Fungi. *International Seed Health Testing Association: Bassersdorf, Switzerland*, 74.
- MAY K. R. (1945): The cascade impactor: an instrument for sampling coarse aerosols. *J. Sci. Instrum.*, 22: 187-195.

- McCARTNEY H. A., FOSTER S. J., FRAAIJE B. A. és WARD E. (2003): Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. *Pest Manag Sci.*, 59: 129-142.
- McDONALD J. G., WONG E. és WHITE G. P. (2000): Differentiation of *Tilletia* species by rep-PCR genomic fingerprinting. *Plant Dis.*, 84(10): 1121-1125.
- McNEIL M, ROBERTS A. M. I., COCKERELL V. és MULHOLLAND V. (2004): Real-time PCR assay for quantification of *Tilletia caries* contamination of UK wheat seed. *Plant Pathol.*, 53(6): 741-750.
- MENG X. és CHEN W. (2001): Applications of AFLP and ISSR techniques in detecting genetic diversity in the soybean brown stem rot pathogen *Phialophora gregata*. *Mycol. Res.*, 105: 936–940.
- MENNINGER K. (1965): A hétköznapi matematikája. Titokzatos játék a térfogat és a felület között. *Gondolat Kiadó*: Budapest, 186-189.
- MENZIES J. G., BAKKEREN G., MATHESON F., PROCUNIER J. D. és WOODS S. (2003): Use of inter-simple sequence repeats and amplified fragment length polymorphisms to analyze genetic relationships among small grain infecting species of *Ustilago*. *Phytopathology*, 93: 167-175.
- MIDDELBERG A. P. J. (1995): Process-scale disruption of microorganisms. *Biotechnol. Adv.*, 13: 491–551.
- MIHAIL G., MIHAILA D., BRANISTEANU D., NESTOR L. és OSTAP B. (1969): Researches concerning the lung professional pathology of the workers from cereal stores. *Proc. 4th Int. Congr. Rural Med.*, 268-269.
- MISHRA R. P. (1987): Studies on seasonal and diurnal variations in the occurrence of airborne spores of basidiomycetes. *Perspect. Mycol. Res.*, 1: 243-252.
- MISHRA S. K., AJELLO L., AHEARN D. G., BURGE H. A., KURUP V. P., PIERSON D. L., PRICE D. L., SAMSON L. A., SANDHU R. S., SHELTON B., SIMMONS R. B. és

- SWITZER K. F. (1992): Environment mycology and its importance to public health. *J. Med. Vet. Mycol.*, 30: 287-305.
- MISHRA P. K., TEWARI J. P., CLEAR R. M. és TURKINGTON T. K. (2004): Molecular genetic variation and geographical structuring in *Fusarium graminearum*. *Ann. Appl. Biol.*, 145: 299–307.
- MORALES J., GONZÁLEZ-MINERO F. J., CARRASCO M., OGALLA V. M. és CANDAU P. (2006): Airborne basidiospores in the atmosphere of Seville (South Spain). *Aerobiologia*, 22: 127-134.
- MULLHOLLAND V. és McEWAN M. (2000): PCR-based diagnostics of *Microdochium nivale* and *Tilletia tritici* infection of winter wheat seeds. *OEPP/EPPO Bulletin*, 30: 543-547.
- MUNJAL R. L. (1975): Status of Karnal bunt (*Neovossia indica*) of wheat in Northern India during 1968-69 and 1969-70. *Indian J. Mycol. Plant Path.*, 5: 185-187.
- MURRAY T. D., PARRY D. W. és CATTILIN N. D., (eds.) (1998): Bunts/smuts. In: A Colour Handbook of Diseases of Small Grain Cereal Crops. *Manson Publishing*, London, 9-11.
- NANDAKUMAR M. P. és MARTEN M. R. (2002): Comparison of lysis methods and preparation protocols for one- and two-dimensional electrophoresis of *Aspergillus oryzae* intracellular proteins. *Electrophoresis*, 23(14): 2216-2222.
- NANDAKUMAR M. P., SHEN J., RMAN B. és MARTEN M. R. (2003): Solubilization of trichloroacetic acid (TCA) precipitated microbial proteins via NaOH for two-dimensional electrophoresis. *Journal of Proteome Research*, 2(1): 89-93.
- NEUHOFF V., AROLD N., TAUBE D. és EHRHARDT W. (1988): Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*, 9(6): 255-62.
- OEPP/EPPO (1982): Data sheets on quarantine organisms No. 83, *Tilletia controversa* Kühn. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 12: 137–142.

- OEPP/EPPO (2007): *Tilletia indica*. Diagnostics PM 7/29 (2). *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 37: 503-520.
- O'FARRELL H. P. (1975): High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 250(10): 4007-4021.
- OGDEN E. C. és RAYNOR G. S. (1967): A new sampler for airborne pollen: the roto-slide. *J. Allergy*, 40: 1-11.
- OLGYAY M. (1935): Vizsgálatok a kőszögspóra csirázási és fertőzési viszonyairól mesterséges fertőzés esetén. *Bot. Közl.*, 32/1-6, 52-74.
- O'NEIL K., DAMOGLU A. P. és PATTERSON M. F. (1991): Sensitivity to some common grain fungi to irradiation on grain and in phosphate buffer saline. *Lett. Appl. Microbiol.*, 12: 180-183.
- PANDIT T., SINGH S. és SINGH A. B. (1995): Prevalence of culturable and non-culturable airborne fungi in a grain store in Delhi. *Aerobiologia*, 11: 177-182.
- PERKINS W. A. (1957): The rotorod sampler. *2nd Semiannual Rept. Aerosol. Lab., Dept. Chemistry and Chem. Engng., Stamford Univ., CML., USA*, 186: 66.
- PETERSON G. L., WHITAKER T. B., STEFANSKI R. J., PODLECKIS E. V., PHILLIPS J. G., WU J. S. és MARTINEZ W. H. (2009): A risk assessment model for importation of United States milling wheat containing *Tilletia controversa*. *Plant Disease*, 93: 560-573.
- PÉCS M. (2011): 3. Sejtfeltárás. In: Fermentációs feldolgozási műveletek (egyetemi tananyag). BME Vegyészmérnöki és Biomérnöki Kar, Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék, 47-79.
- PIMENTEL G. (a), CARRIS L. M., LEVY L. és MEYER R. J. (1998): Genetic variability among isolates of *Tilletia barclayana*, *T. indica* and allied species. *Mycologia*, 90: 1017-1027.

- PIMENTEL G. (b), CARRIS L. M. és PEEVER T. L. (1998): Characterization of interspecific hybrids between *Tilletia controversa* and *Tilletia bromi*. *Mycologia*, 92(3): 411-420.
- PIMENTEL G. (2000): Genetic variation among natural populations of *Tilletia controversa* and *T. bromi*. *Phytopathology*, 90: 376-383.
- PODHRADSKY J. (1962): Búzaköüszög és törpeüszög. *Mezőgazdasági Kiadó*: Budapest, pp. 187.
- PODHRADSKY J. (1968): A kalász, a buga és a szemtermés betegségei. In: UBRIZSY G. (ed.): Növényvédelmi enciklopédia. *Mezőgazdasági Kiadó*: Budapest. 262–264.
- POPESCU I. G., CAPETTI E., GALALAIIE C. és SPIEGLER J. (1975): Study of atmospheric fungi in a big cereal silo over a period of one year. *Rev. Roum. Med. Int.*, 13: 221-226.
- PRIEKULE I. (2007): First report of dwarf bunt caused by *Tilletia controversa* in Latvia. *Plant Pathology*, 56(6): 1042.
- RABIEN H. (1928): Über Keimungs- und Infektionsbedingungen von *Tilletia tritici*. *Arbeiten aus der Biologischen Reichsanstalt für Land- und Forstwirtschaft*, 5: 297-353.
- RABILLOUD T. (1996): Solubilization of proteins for electrophoretic analyses. *Electrophoresis*, 17: 813-829.
- RABILLOUD T. és CHARMONT S. (2000): Detection of proteins on two-dimensional electrophoresis gels. In: RABILLOUD S. (ed.): Proteome Research: Two dimensional gel electrophoresis and identification methods. *Springer Verlag*: Berlin, Heidelberg, 107-126.
- RAI R.C., és A. SINGH A. (1978): A note on the viability of wheat seeds infected with Karnal bunt. *Seed Res.*, 6: 188-190.
- RAMANAN R. N., LING T. C. és ARIFF A. B. (2008): The performance of a glass bead shaking technique for the disruption of *E. coli* cells. *Biotechnol. Bioproc. Eng.*, 13: 613–623.

- RAMAZZINI B. (1713): De Morbis Artificum Diatriba. In: CONSALTUS J. B. (ed.), Padua. Fordította: WRIGHT W. C.. *Hafnes Publishing Co.*: New York, 1964.
- RIDDLE H. F. V., CHANNELL S., BLYTH W., WEIR D. M., LLOYD M., AMOS W. M. G. és GRANT I. W. B. (1968): Allergic alveolitis in a malt worker. *Thorax*, 23: 271-280.
- ROSENBERG I. M. (2004): The Bradford method. In: Protein analysis and purification: Benchtop Techniques. *Birkhäuser*: Boston, 111-114.
- RUBULIS J. (1984): Airborne fungal spores in Stockholm and Eskilstuna, Central Sweden. *Nordic Aerobiology*, 85-93.
- RUSH C., STEIN J., BOWDEN R., RIEMENSCHNEIDER R., BORATYNSKI T. és ROYER M. (2005): Status of Karnal bunt of wheat in the United States 1996 to 2004. *Plant Disease*, 89: 212–223.
- RUSSEL B. W. és MILLS D. (1993): Electrophoretic karyotypes of *Tilletia caries*, *T. controversa*, and their F1 progeny: further evidence for conspecific status. *Mol. Plant Microbe Interact*, 6(1): 66-74.
- RUSSEL B. W. és MILLS D. (1994): Morphological, physiological, and genetic evidence in support of a conspecific status for *Tilletia caries*, *T. controversa* and *T. foetida*. *Phytopathology*, 84: 576-582.
- SANSFORD C., BAKER R., BRENNAN J., EWERT F., GIOLI B., INMAN A., KINSELLA A., MAGNUS H., MIGLIETTA F., MURRAY G., PORTA-PUGLIA A., PORTER J., RAFOSS T., RICCIONI L. és THORNE F. (2008): The new pest risk analysis for *Tilletia indica*, the cause of Karnal bunt of wheat, continues to support the quarantine status of the pathogen in Europe. *Plant Pathol*, 57: 603–611.
- SANTILLI J., ROCKWELL W. J. és COLLINS R. P. (1985): The significance of the spores of the basidiomycetes (mushrooms and their allies) in bronchial asthma and allergic rhinitis. *Ann. Allergy*, 55: 469-471.

- SATTAYASAI N. (2012): Protein Purification, Chemical Biology, Prof. Deniz Ekinçi (Ed.), ISBN: 978-953-51-0049-2, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/chemical-biology/protein-purification>
- SAVINO E. és CARETTA G. (1992): Airborne fungi in an Italian rice mill. *Aerobiologia*, 8: 267-275.
- SCOPES R. (1982): Protein purification: Principles and practice. *Springer-Verlag*: Berlin, Heidelberg and New York, pp. 282.
- SEKHON K. S., SAXENA A. K., RANDHAWA S. K. és GILL K. S. (1980): Effect of Karnal bunt disease on quality characteristics of wheat. *Bull. Grain Tech.*, 18: 208-212.
- SHAHEEN I. (1992): Aeromycology of Amman area, Jordan. *Grana*, 31: 223-228.
- SHAPIRO A. L., VINUELA E., és MAIZEL J. V. JR. (1967): Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 28:(5) 815-820.
- SHI Y. L., LOOMIS P., CHRISTIAN D., CARRIS L. M. és LEUNG H. (1996): Analysis of the genetic relationships among the wheat bunt fungi using RAPD and ribosomal DNA markers. *Phytopathology*, 86(3): 311-318.
- SINGH D. V. (1980): A note on the effect of Karnal bunt infection on the vigour of wheat seed. *Seed Res.*, 8: 81-82.
- SINHA R., N. (1995): The fungal community in the stored grain ecosystem. In: CARROLL G. C. és WICKLOW D. T. (eds.): *The Fungal Community*. *Marcel Dekker Inc.*: New York, 797-815.
- SMILANICK J. L., DUPLER M., GOATES B. J., HOFFMANN J. A., CLARK D. és DOBSON D. (1986): Germination of teliospores of Karnal, dwarf, and common bunt fungi after ingestion by animals. *Plant Dis.*, 70(3): 242-244.

- STERUD E., MO T. A., COLLINS C. M. és CUNNINGHAM C. O. (2002): The use of host specificity, pathogenicity, and molecular markers to differentiate between *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957 and *G. thymalli* Zitnan, 1960 (Monogenea: Gyrodactylidae). *Parasitology*, 124: 203–213.
- STOCKWELL V. O. és TRIONE E. J. (1986): Distinguishing teliospores of *Tilletia controversa* from those of *T. caries* by fluorescence microscopy. *Plant Disease*, 70: 924-926.
- STOLL V. S. és BLANCHARD J. S. (2009): 6. Buffers: Principles and Practice. In: BURGESS R. R. és DEUTSCHER M. P. (eds.): *Methods in enzymology* Vol. 43. Guide to protein purification, 2nd edition. *Elsevier Inc.*: London, 43-56.
- SWITZER R. C. 3RD, MERRIL C. R. és SHIFRIN S. (1979): A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem.*, 98(1): 231-7.
- SZAMOS J., REZESSYNE SZAB Ó J. és VERECZKEY G. (1994): Glükózo oxidázt termelő *Aspergillus niger* feltárhatóságának vizsgálata. *Élelmezési ipar XLVIII*, (1): 8-12.
- SZEPESSY I. (1977): Növénybetegségek. *Mezőgazdasági Kiadó*: Budapest, 200–203.
- SZUNICS L., SZUNICS LU. ÉS VEISZ O. (1996): Egy régi kórokozó, a kőüszög, ismét támad. *Agrofórum*, 7(6): 4-6.
- SZUNICS LU. és SZUNICS L. (1990): Adatok a búzafajták kőüszög fertőzöttségéről. *Növénytermelés*, 39: 297–304.
- TAN S. C. és YIAP B. C. (2009): DNA, RNA and protein extraction: the past and the present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, Article ID 574398, 1-10.
- TAN M.-K., BRENNAN J. P., WRIGHT D. és MURRAY G. M. (2013): A review of the methodology to detect and identify Karnal bunt – a serious biosecurity threat. *Australasian Plant. Pathol.*, 42: 95-102.
- TÓTH Á. (2006): A gabonafélék üszögbetegségei régen és ma. *Agronapló* (2006/9). www.agronapló.hu

- TRAIL E. és MILLS D. (1990): Growth of haploid *Tilletia* strains *in planta* and genetic analysis of a cross of *Tilletia caries* x *T. controversa*. *Phytopathology*, 62: 1096-1097.
- TRIONE E. J. és KRYGIER B. B. (1977): New tests to distinguish teliospores of *Tilletia controversa*, the dwarf bunt fungus, from spores of other *Tilletia* species. *Phytopathology*, 67: 1166-1172.
- TSE K. S., CRAVEN N. és CHERNIACK R. M. (1980): 32. Allergy to saprophytic fungi in grain workers. In: DOSMAN J. A. and COTTON D. J. (eds.): Occupational pulmonary disease. Focus on grain dust and health. *Academic Press*: Toronto, 335-346.
- UBRIZSY G. (1965): Gombás megbetegedések, virágos élősködők károsítói. In: Növénykórtan II. *Akadémiai Kiadó*: Budapest, 537–566.
- USDA, Agricultural Marketing Grain Division Service (1974): Examination of the spores of *T. controversa* (dwarf bunt).
- VAN DER MERWE N. A., WINGFIELD B. D. és WINGFIELD M. J. (2003): Primers for the amplification of sequence-characterized loci in *Cryphonectria cubensis* populations. *Molecular Ecology Notes*, 3: 494-497.
- VÁNKY K. (1994): *Tilletia caries*, *Tilletia controversa*. In: European Smut Fungi. *Gustav Fischer Verlag*: Stuttgart – Jena – New York, 245–247.
- VÁNKY K. (2012): Smut Fungi of the World. *APS Press*: St Paul, MN, pp. 1480.
- VEISZ O., SZUNICS LU. ÉS SZUNICS L. (1997) (a): Őszi búzafajták fagy- és télállóságának csökkenése kőszögfertőzés hatására. *Növénytermelés*, 46(2): 115-123.
- VEISZ O., SZUNICS LU. ÉS SZUNICS L. (1997) (b): Effect of bunt infection on the frost resistance of wheat varieties and of lines containing Bt genes. *Plant Breeding*, 116:123-126.

- VEISZ O, SZUNICS L ÉS SZUNICS L. 2000. Effect of common bunt on the frost resistance and winter hardiness of wheat (*Triticum aestivum* L.) lines containing Bt genes. *Euphytica*, 114: 159-164.
- VERREAULT D., MOINEAU S. és DUCHAINE C. (2008): Methods for sampling of airborne viruses. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 72(3): 413-444.
- WARD W. W. és SWIATEK G. (2009): Protein purification. *Current Analytical Chemistry*, 5(2): 1-21.
- WARMBRUNN K. (1952): Untersuchungen über den Zwergsteinbrand. *Phytopath. Z.*, 19(4): 441-482.
- WEBER K. és OSBORN M. (1969): The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, 244: 4406-4412.
- WEBER G. és SCHAUZ K. (1985): Characterization of spore protein patterns in *Tilletia controversa* and *Tilletia caries* with gel electrophoretic methods. *Z. Pflkrankh. Pflschutz.*, 92: 600-605.
- WIESE M. V. (1998): Smuts. Common Bunt (Stinking Smut); Dwarf Bunt. In: Compendium of Wheat Diseases (2nd edition). *APS Press*: Minnesota, 18-21.
- WILDGRUBER R., REIL G., DREWS O., PARLAR H. és GÖRG A. (2002): Web-based two-dimensional database of *Saccharomyces cerevisiae* proteins using immobilized pH gradients from pH 6 to pH 12 and matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *Proteomics*, 2(6): 727-732.
- WILLIAMS N., SKOULAS A. és MERRIMAN J. E. (1964): Exposure to grain dust. I. A survey of the effects. *J. Occup. Med.*, 6: 319-329.
- YAJIMA W. és KAV N. N. V. (2006): The proteome of the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Proteomics*, 6(22): 5995-6007.

- YUAN Q., NIAN S., YIN Y., LI M., CAI J. és WANG Z. (2009): Development of a PCR-based diagnostic tool specific to wheat dwarf bunt, caused by *Tilletia controversa*. *Eur. J. Plant. Pathol.*, 124: 585-594.
- ZERUCHA T. és KIM W. W. (1970): The location and nucleotide sequence of the 5SrRNA gene of bunt of wheat. *Crop Sci.*, 100: 703-704.
- ZOUHAR M., MAZAKOVA J., PROKINOVA E., VANOVA M. és RYSANEK P. (2010): Quantification of *Tilletia caries* and *Tilletia controversa* mycelium in wheat apical meristem by real-time PCR. *Plant. Protect. Sci.*, 46(3): 107-115.
- ZUPUNSKI V., IGNJATOVIC-MICIC D., NIKOLIC A., STANKOVIC S., JEVTIC R., LEVIC J. és IVANOVIC D. (2011): Identification of *Tilletia* species using rep-PCR fingerprinting technique. *Genetika*, 43(1): 183-195.
- ZHANG Z., ZHANG C. R. és WANG Z. Z. (1995): Plant quarantine significance of dwarf bunt of wheat to China. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 25: 665–671.

M2. Fényképmelléklet

A levegő-mintavételezés során mintázott gabonátárolók felépítése

Budapest, Központi gabonátárház



35. ábra Budapesti 13 emeletes gabonátároló (Tárolókapacitás 35 000 t).



36. ábra Cellás tároló rendszer.



37. ábra Cellás tároló rendszer.



38. ábra Cellás tároló rendszer be- és kitároló szerkezete.



39. ábra Cellás tároló rendszer betároló szerkezete.

Bács-Kiskun megye

Dunavecse



40. ábra Felsőpályás betároló rendszer.

Szalkszentmárton



41. ábra 2000 t kapacitású gabonatároló (síktároló).



42. ábra Betárolás pótkocsis géppel.

Jász-Nagykun-Szolnok megye

Jászapáti



43. ábra Négyemeletes gabonatárház.



44. ábra Cellás tároló rendszer.



45. ábra Jászapáti második helyszín: siktároló felső betároló rendszerrel.

Békés megye

Békésszentandrás



46. ábra Síktároló, betárolás homlokrakodó géppel. (Tároló kapacitás 4000 t.)



47. ábra Újépítésű síktároló (Tároló kapacitás 5000 t.).



48. ábra Újépítésű siktároló, betárolás homlokrakodó géppel.

Telekgerendás



49. ábra Siktároló, tárolókapacitás 5000 t.



50. ábra Siktároló, betárolás teleszkópos rendszerrel történt.

Csongrád megye
Hódmezővásárhely



51. ábra 6000 tonnás tárolókapacitású síktároló.

M3. Hirst-típusú térfogatos spóracsapdával végzett mintavételek

Budapest - központi gabonatárház

Sor-szám	Dátum	Szint	Időtartam	Időtartam (perc)	törött <i>Tilletia</i> teliospórák (db)	Összes <i>Tilletia</i> teliospóra (db)	<i>Tilletia caries</i> teliospórák (db)	<i>Tilletia laevis</i> teliospórák (db)	Egyéb <i>Tilletia</i> spp. teliospórák (db)
1	2008.10.02	I.	9:58-10:08	10	13	25	25	0	23
2	2008.10.02	I.	10:15-10:25	10	47	48	41	7	19
3	2008.10.02	II.	10:33-10:43	10	12	8	8	0	24
4	2008.10.02	II.	10:52-11:02	10	19	34	31	3	21
5	2008.10.02	III.	11:12-11:22	10	10	20	18	2	10
6	2008.10.02	III.	11:28-11:38	10	0	0	0	0	0
7	2008.10.02	III.	11:45-11:55	10	43	29	29	0	20
8	2008.10.02	tető XIII.	12:04-12:14	10	11	3	2	1	14
9	2008.10.02	udvar	12:33-12:43	10	9	4	4	0	7
10	2008.11.03.	I.	9:19-9:24	5	16	12	12	0	10
11	2008.11.03.	I.	9:29-9:34	5	27	27	27	0	19
12	2008.11.03.	II.	9:40-9:55	15	43	48	43	5	28
13	2008.11.03.	II.	9:48-9:53	5	33	6	5	1	1
14	2008.11.03.	III.	10:01-10:06	5	56	29	26	3	23
15	2008.11.03.	III.	10:16-10:21	5	43	22	19	3	18
16	2008.11.03.	IV.	10:27-10:32	5	136	43	43	0	39

Sor-szám	Dátum	Szint	Időtartam	Időtartam (perc)	törött <i>Tilletia</i> teliospórák (db)	Összes <i>Tilletia</i> teliospóra (db)	<i>Tilletia caries</i> teliospórák (db)	<i>Tilletia laevis</i> teliospórák (db)	Egyéb <i>Tilletia</i> spp. teliospórák (db)
17	2008.11.03.	VIII.	10:39-10:44	5	44	53	48	5	13
18	2008.11.03.	tető XIII.	10:55-11:05	10	9	7	7	0	4
19	2008.11.03.	VII.	11:11-11:16	5	74	24	24	0	23
20	2008.11.03.	VII.	11:19-11:24	5	48	16	15	1	17
21	2008.11.03.	VI.	11:28-11:33	5	42	43	43	0	36
22	2008.11.03.	VI.	11:37-11:42	5	61	35	33	2	37
23	2008.11.03.	V.	11:46-11:51	5	32	35	35	0	21
24	2008.11.03.	V.	11:55-12:00	5	24	39	39	0	26
25	2008.11.03.	udvar	12:17-12:27	10	6	12	8	4	6
26	2009.10.20.	külső, tető	8:26-8:36	10	13	8	7	1	2
27	2009.10.20.	X.	8:43-8:46	3	21	14	12	2	7
28	2009.10.20.	X.	8:43-8:46	3	14	14	10	4	6
29	2009.10.20.	IX.	8:53-8:58	5	11	9	9	0	4
30	2009.10.20.	IX.	8:53-8:58	5	12	4	4	0	0
31	2009.10.20.	VII.	9:10-9:15	5	13	15	15	0	8
32	2009.10.20.	VII.	9:10-9:15	5	32	44	44	0	13
33	2009.10.20.	IV.	9:20-9:25	5	26	23	23	0	17
34	2009.10.20.	IV.	9:20-9:25	5	25	32	31	1	11
35	2009.10.20.	Fsz.	9:54-9:59	5	14	15	15	0	13
36	2009.10.20.	Fsz.	9:54-9:59	5	22	17	16	1	8
37	2009.10.20.	IV.	9:31-9:36	5	12	17	15	2	13
38	2009.10.20.	IV.	9:31-9:36	5	24	13	11	2	11

Sor-szám	Dátum	Szint	Időtartam	Időtartam (perc)	törött <i>Tilletia</i> teliospórák (db)	Összes <i>Tilletia</i> teliospóra (db)	<i>Tilletia caries</i> teliospórák (db)	<i>Tilletia laevis</i> teliospórák (db)	Egyéb <i>Tilletia</i> spp. teliospórák (db)
39	2009.10.20.	külső	10:06-10:16	10	1	5	5	0	3
40	2009.10.20.	IV.	9:45-9:50	5	6	5	5	0	4

Jászapáti - központi gabonatárház

Sorszám	Dátum	Helyszín	Szint	Időtartam	Időtartam (perc)	törött <i>Tilletia</i> teliospórák (db)	Összes <i>Tilletia</i> teliospóra (db)	<i>Tilletia caries</i> teliospórák (db)	<i>Tilletia laevis</i> teliospórák (db)	Egyéb <i>Tilletia</i> spp. teliospórák (db)
1	2012.01.25.	Jászapáti - központi raktár	1.emelet, 1.fülkesor	12:03-12:13	10	0	0	0	0	0
2	2012.01.25.	Jászapáti - központi raktár	1.emelet, 4.fülkesor	12:17-12:27	10	1	0	0	0	1
3	2012.01.25.	Jászapáti - központi raktár	2.emelet, 4.fülkesor	12:33-12:43	10	0	1	1	0	0
4	2012.01.25.	Jászapáti - központi raktár	kültér	12:49-12:59	10	0	0	0	0	0

Vidéki síktárolók

Sor-szám	Dátum	Helyszín	Szint	Időtartam	Időtartam (perc)	törött <i>Tilletia</i> teliospórák (db)	Összes <i>Tilletia</i> teliospóra (db)	<i>Tilletia caries</i> teliospórák (db)	<i>Tilletia laevis</i> teliospórák (db)	Egyéb <i>Tilletia</i> spp. teliospórák (db)
1	2009.07.27.	Hajdúszoboszló	I. tároló	14:38-14:48	10	1	0	0	0	7
2	2009.07.27.	Hajdúszoboszló	I. tároló	14:56-15:06	10	0	0	0	0	2

Sor-szám	Dátum	Helyszín	Szint	Időtartam	Időtartam (perc)	törött <i>Tilletia</i> teliospórák (db)	Összes <i>Tilletia</i> teliospóra (db)	<i>Tilletia caries</i> teliospórák (db)	<i>Tilletia laevis</i> teliospórák (db)	Egyéb <i>Tilletia</i> spp. teliospórák (db)
3	2009.07.27.	Hajdúszoboszló	II. tároló	15:12-15:22	10	0	0	0	0	0
4	2009.07.27.	Hajdúszoboszló	II. tároló	15:25-15:30	5	0	2	2	0	0
5	2009.07.27.	Hajdúszoboszló	külső	15:45-15:55	10	0	0	0	0	0
6	2009.07.27.	Hajdúszoboszló	I. tároló	14:39-14:49	10	0	0	0	0	1
7	2009.07.27.	Hajdúszoboszló	külső	15:45-15:55	10	0	0	0	0	1
8	2009.07.27.	Hajdúszoboszló	I. tároló	14:54-15:04	10	0	0	0	0	0
9	2009.07.27.	Hajdúszoboszló	II. tároló	15:12-15:22	10	0	1	1	0	0
10	2009.07.27.	Hajdúszoboszló	II. tároló	15:25-15:30	5	0	0	0	0	0
11	2012.01.18	Dunavecse	1szintes	9:48-9:58	10	0	0	0	0	0
12	2012.01.18	Dunavecse	1szintes	10:04-10:14	10	0	0	0	0	0
13	2012.01.18	Dunavecse	1szintes	10:15-10:25	10	0	0	0	0	0
14	2012.01.18	Dunavecse	kültér	10:29-10:39	10	0	0	0	0	0
15	2012.01.18	Szalkszentmárton	1szintes	11:12-11:22	10	0	0	0	0	0
16	2012.01.18	Szalkszentmárton	1szintes	11:25-11:35	10	0	0	0	0	0
17	2012.01.18	Szalkszentmárton	1szintes	11:40-11:50	10	0	0	0	0	0
18	2012.01.18	Szalkszentmárton	kültér	11:56-12:06	10	0	0	0	0	0
19	2012.01.25.	Jászárokszállás	1szintes	10:31-10:41	10	0	0	0	0	0

Sorszám	Dátum	Helyszín	Szint	Időtartam	Időtartam (perc)	törött <i>Tilletia</i> teliospórák (db)	Összes <i>Tilletia</i> teliospóra (db)	<i>Tilletia caries</i> teliospórák (db)	<i>Tilletia laevis</i> teliospórák (db)	Egyéb <i>Tilletia</i> spp. teliospórák (db)
20	2012.01.25.	Jászárokszállás	1szintes	10:45-10:55	10	0	0	0	0	0
21	2012.01.25.	Jászárokszállás	kültér	11:02-11:12	10	0	0	0	0	0
22	2012.01.25.	Jászapáti 2.	1szintes	13:33-13:43	10	0	0	0	0	0
23	2012.01.25.	Jászapáti 2.	1szintes	13:47-13:57	10	1	0	0	0	0
24	2012.01.25.	Jászapáti 2.	kültér	14:02-14:12	10	0	0	0	0	0
25	2012.03.01.	Békésszentandrás	1szintes	9:41-9:51	10	0	0	0	0	0
26	2012.03.01.	Békésszentandrás	1szintes	9:55-10:05	10	0	0	0	0	0
27	2012.03.01.	Békésszentandrás	1szintes	10:11-10:21	10	0	0	0	0	0
28	2012.03.01.	Békésszentandrás	1szintes	10:26-10:36	10	0	4	4	0	0
29	2012.03.01.	Békésszentandrás	1szintes	10:49-10:59	10	0	0	0	0	0
30	2012.03.01.	Békésszentandrás	1szintes	11:03-11:13	10	0	2	2	0	0
31	2012.03.01.	Békésszentandrás	kültér	11:22-11:32	10	0	0	0	0	0
32	2012.03.01.	Telekgerendás	1szintes	12:45-12:55	10	0	0	0	0	0
33	2012.03.01.	Telekgerendás	1szintes	12:59-13:09	10	0	0	0	0	0
34	2012.03.01.	Telekgerendás	1szintes	13:13-13:23	10	0	0	0	0	0
35	2012.03.01.	Telekgerendás	1szintes	13:26-13:36	10	0	0	0	0	0
36	2012.03.01.	Telekgerendás	kültér	13:44-13:54	10	0	0	0	0	0

Sorszám	Dátum	Helyszín	Szint	Időtartam	Időtartam (perc)	törött <i>Tilletia</i> teliospórák (db)	Összes <i>Tilletia</i> teliospóra (db)	<i>Tilletia caries</i> teliospórák (db)	<i>Tilletia laevis</i> teliospórák (db)	Egyéb <i>Tilletia</i> spp. teliospórák (db)
37	2012.03.21.	Hódmezővásárhely 1.	1szintes	10:12-10:22	10	0	1	1	0	0
38	2012.03.21.	Hódmezővásárhely 1.	1szintes	10:25-10:35	10	2	0	0	0	0
39	2012.03.21.	Hódmezővásárhely 1.	kültér	10:42-10:52	10	0	0	0	0	0
40	2012.03.21.	Hódmezővásárhely 2.	1szintes	11:07-11:17	10	0	0	0	0	0
41	2012.03.21.	Hódmezővásárhely 2.	1szintes	11:21-11:31	10	0	0	0	0	0
42	2012.03.21.	Hódmezővásárhely 2.	kültér	11:35-11:45	10	0	0	0	0	0
43	2012.03.21.	Hódmezővásárhely 3.	1szintes	12:19-12:29	10	1	5	5	0	0
44	2012.03.21.	Hódmezővásárhely 3.	1szintes	12:33-12:43	10	4	3	3	0	1
45	2012.03.21.	Hódmezővásárhely 3.	1szintes	12:47-12:57	10	12	10	10	0	1
46	2012.03.21.	Hódmezővásárhely 3.	kültér	13:01-13:11	10	0	0	0	0	8

Búzaminták (50 g mintára vonatkoztatva)

Sorszám	Dátum	Helyszín	Szint			törött <i>Tilletia</i> teliospórák (db)	Összes <i>Tilletia</i> teliospóra (db)	<i>Tilletia caries</i> teliospórák (db)	<i>Tilletia laevis</i> teliospórák (db)	Egyéb <i>Tilletia</i> spp. teliospórák (db)
1	2009.10.20	Budapest - központi raktár	X.			15	15	10	5	10
2	2009.10.20	Budapest - központi raktár	VII.			10	25	25	0	25

Sor-szám	Dátum	Helyszín	Szint		törött <i>Tilletia</i> teliospórák (db)	Összes <i>Tilletia</i> teliospóra (db)	<i>Tilletia caries</i> teliospórák (db)	<i>Tilletia laevis</i> teliospórák (db)	Egyéb <i>Tilletia</i> spp. teliospórák (db)
3	2012.01.25	Jászapáti - központi raktár	I.		10	0	0	0	0
4	2012.01.25	Jászapáti - központi raktár	I.		0	5	5	0	0
5	2012.01.25	Jászapáti - központi raktár	II.		10	20	20	0	0
6	2012.01.18	Dunavecse	1 szintes		5	5	5	0	0
7	2012.01.18	Szalkszentmárton	1 szintes		0	0	0	0	0
8	2012.01.25	Jászárokszállás	1 szintes		0	0	0	0	0
9	2012.01.25	Jászapáti 2.	1 szintes		0	125	125	0	0
10	2012.03.01	Békésszentandrás	1 szintes		5	0	0	0	0
11	2012.03.01	Békésszentandrás	1 szintes		0	15	15	0	0
12	2012.03.01	Békésszentandrás	1 szintes		0	55	55	0	0
13	2012.03.01	Békésszentandrás	1 szintes		0	10	10	0	0
14	2012.03.01	Telekgerendás	1 szintes		0	10	10	0	0
15	2012.03.01	Telekgerendás	1 szintes		0	5	5	0	0
16	2012.03.21	Hódmezővásárhely 1.	1 szintes		5	20	20	0	0
17	2012.03.21	Hódmezővásárhely 2.	1 szintes		30	50	50	0	0
18	2012.03.21	Hódmezővásárhely 3.	1 szintes		1025	960	810	150	0

Porminták

Sorszám	Dátum	Helyszín	Szint					<i>Tilletia caries</i> teliospórák (db)
1	2009.06.23	Budapest - központi raktár	kukorica tároló helyiség					22
2	2010.11.03	Budapest - központi raktár	III.					16
3	2010.11.03	Budapest - központi raktár	V.					32
4	2012.01.25	Jászapáti - központi raktár	I.					5
5	2012.01.18	Szalkszentmárton	1 szintes					0
6	2012.01.18	Dunavecse	1 szintes					0
7	2012.01.25	Jászárokszállás	1 szintes					0
8	2012.01.25	Jászapáti 2.	1 szintes					0
9	2012.01.25	Jászapáti 2.	1 szintes					4
10	2012.03.01.	Békésszentandrás	1 szintes					0
11	2012.03.01	Telekgerendás	1 szintes					0
12	2012.03.22	Hódmezővásárhely 1.	1 szintes					1
13	2012.03.22	Hódmezővásárhely 3.	1 szintes					0

M4.1 A *Tilletia*-fajok országos felderítése (2008-2013): fertőzött minták (a kórokozó, őszi búza fajta és csávázószer feltüntetésével)

Mintavétel helye		Év	Kórokozó	Őszi búza fajta	Csávázószer	
Település	Megye					
1	Bánk	Nógrád	2008	<i>Tilletia caries</i>	Mv Verbunkos	-
2	Dávod	Bács-Kiskun	2008	<i>Tilletia caries</i>	Mv Suba	-
3	Dudar	Veszprém	2008	<i>Tilletia caries</i>	Capo	-
4	Fornád	Tolna	2008	<i>Tilletia caries</i>	Quebon	-
5	Gönc	Borsod-Abaúj-Zemplén	2008	<i>Tilletia caries</i>	-	-
6	Gyékényes	Somogy	2008	<i>Tilletia caries</i>	Mv Suba	-
7	Ipacsfa	Baranya	2008	<i>Tilletia caries</i>	-	-
8	Kiskunfélegyháza	Bács-Kiskun	2008	<i>Tilletia caries</i>	Lupus II. fok	-
9	Köröstetlen	Főváros és Pest	2008	<i>Tilletia caries</i>	Mv Magdaléna	-
10	Kisgyalán	Somogy	2008	<i>Tilletia caries</i>	-	-
11	Rum	Vas	2008	<i>Tilletia caries</i>	Josef	-
12	Szászvár	Baranya	2008	<i>Tilletia caries</i>	-	-
1	Apagy	Szabolcs-Szatmár-Bereg	2009	<i>Tilletia caries</i>	Mv Csárdás I. fok	-
2	Berettyóújfalu	Hajdú-Bihar	2009	<i>Tilletia caries</i>	Mv Magdaléna	-
3	Gérce	Vas	2009	<i>Tilletia caries</i>	Mv Suba	-
4	Halimba	Veszprém	2009	<i>Tilletia caries</i>	Mv Ködmön	-
5	Heréd	Heves	2009	<i>Tilletia caries</i>	Lupus	Vitavax 2000
6	Heves	Heves	2009	<i>Tilletia caries</i>	Mv Koló	-
7	Kisújszállás	Jász-Nagykun-Szolnok	2009	<i>Tilletia caries</i>	Mv Koló	-
8	Kutasó	Nógrád	2009	<i>Tilletia caries</i>	Mv Csárdás	-
9	Makó	Csongrád	2009	<i>Tilletia caries</i>	-	-
10	Nagylózsa	Győr-Moson-Sopron	2009	<i>Tilletia caries</i>	Capo	csávázatlan
11	Sajókápolna	Borsod-Abaúj-Zemplén	2009	<i>Tilletia caries</i>	GK Petur II. fok	Vitavax 2000
12	Szendrő	Borsod-Abaúj-Zemplén	2009	<i>Tilletia caries</i>	-	-
13	Tardos	Komárom-Esztergom	2009	<i>Tilletia caries</i>	-	-
14	Zagyvarékas	Jász-Nagykun-Szolnok	2009	<i>Tilletia caries</i>	Mv Magvas	-
15	Döge	Szabolcs-Szatmár-Bereg	2009	<i>Tilletia laevis</i>	GK Békés	-
16	Fényeslitke	Szabolcs-Szatmár-Bereg	2009	<i>Tilletia caries</i>	Mv Suba	-

	Település	Megye	Év	Kórokozó	Őszi búza fajta	Csávázószer
17	Fényeslitke	Szabolcs-Szatmár-Bereg	2009	<i>Tilletia caries</i> + <i>Tilletia laevis</i>	Mv Magdaléna	-
1	Bajna	Komárom-Esztergom	2010	<i>Tilletia caries</i>	Mv Magdaléna	Vitavax 2000
2	Balatonszentgyörgy	Somogy	2010	<i>Tilletia caries</i>	Mv Magdaléna II. fok	Raxil 060 F
3	Bátor	Heves	2010	<i>Tilletia caries</i>	Lupus	-
4	Bodony	Heves	2010	<i>Tilletia caries</i>	Mv Marsall	-
5	Érd	Pest	2010	<i>Tilletia caries</i>	Mv Verbunkos	Vitavax 2000
6	Heves	Heves	2010	<i>Tilletia caries</i>	Mv Vekni II. fok	-
7	Jánoshalma	Bács-Kiskun	2010	<i>Tilletia caries</i>	GK Békés	Vitavax 2000
8	Kánya	Somogy	2010	<i>Tilletia caries</i>	Mv Suba II. fok	Vitavax 2000
9	Kápolna	Heves	2010	<i>Tilletia caries</i>	Mv Magdaléna I. fok	Vitavax 2000
10	Magyarkeszi	Tolna	2010	<i>Tilletia caries</i>	Quebon	-
11	Mezőkeresztes	Borsod-Abaúj-Zemplén	2010	<i>Tilletia caries</i>	Walter I. fok	Vitavax 2000
12	Mezőszentgyörgy	Fejér	2010	<i>Tilletia caries</i>	Soisson II. fok	-
13	Nemeskolta	Vas	2010	<i>Tilletia caries</i>	Mv Csárdás II. fok	-
14	Nyírtét	Szabolcs-Szatmár-Bereg	2010	<i>Tilletia caries</i>	Mv Csárdás	csávázatlan
15	Olaszfa	Veszprém	2010	<i>Tilletia caries</i>	Mv Magdaléna I. fok	csávázatlan
16	Pusztavacs	Pest	2010	<i>Tilletia caries</i>	Lupus	Vitavax 2000
17	Somogyjád	Somogy	2010	<i>Tilletia caries</i>	GK Petur II. fok	Vitavax 2000
18	Szabadbattyán	Fejér	2010	<i>Tilletia caries</i>	GK Békés II. fok	-
19	Szatmárcseke	Szabolcs-Szatmár-Bereg	2010	<i>Tilletia caries</i>	Mulan	Vitavax 2000
20	Szeghalom	Békés	2010	<i>Tilletia caries</i>	GK Békés	csávázott
21	Szeghalom	Békés	2010	<i>Tilletia caries</i>	GK Ati	csávázott
22	Székesfehérvár	Fejér	2010	<i>Tilletia caries</i>	Mv Ködmön	-
23	Tatabánya	Komárom-Esztergom	2010	<i>Tilletia caries</i>	Mv Toborzó	Vitavax 2000
24	Zalaegerszeg	Zala	2010	<i>Tilletia caries</i>	Antonius	Vitavax 2000
1	Baja	Bács-Kiskun	2011	<i>Tilletia caries</i>	-	-
2	Chernelházadamonya	Vas	2011	<i>Tilletia caries</i>	Balaton II. fok	-
3	Cserhátsurány	Nógrád	2011	<i>Tilletia caries</i>	Antonius	Vitavax 2000
4	Halimba	Veszprém	2011	<i>Tilletia caries</i>	Dunai	csávázatlan
5	Jászkisér	Jász-Nagykun-Szolnok	2011	<i>Tilletia caries</i>	-	-
6	Kiskunlacháza	Pest	2011	<i>Tilletia caries</i>	MF Boglya	csávázott
7	Körmend	Vas	2011	<i>Tilletia caries</i>	Mv Suba	-

	Település	Megye	Év	Kórokozó	Őszi búza fajta	Csávázószer
8	Lébény	Győr-Moson-Sopron	2011	<i>Tilletia caries</i> + <i>Tilletia laevis</i>	Sixtus	-
9	Mezőtúr	Jász-Nagykun-Szolnok	2011	<i>Tilletia caries</i>	GK Fény	Biosild top
10	Miske	Bács-Kiskun	2011	<i>Tilletia caries</i>	Lupus	-
11	Nak	Tolna	2011	<i>Tilletia caries</i>	Mv Suba	-
12	Pölöske	Zala	2011	<i>Tilletia contraversa</i>	-	-
13	Püspökszilágy	Pest	2011	<i>Tilletia caries</i>	Lupus	-
14	Rábagyarmat	Vas	2011	<i>Tilletia caries</i>	-	-
15	Ramocsaháza	Szabolcs-Szatmár-Bereg	2011	<i>Tilletia caries</i>	GK Öthalom	
16	Szolnok	Jász-Nagykun-Szolnok	2011	<i>Tilletia caries</i>	-	-
17	Terény	Nógrád	2011	<i>Tilletia caries</i>	Ámon	Vitavax 2000
18	Törökszentmiklós	Jász-Nagykun-Szolnok	2011	<i>Tilletia caries</i>	-	-
1	Abádszalók	Jász-Nagykun-Szolnok	2012	<i>Tilletia caries</i>	Mv Béres I. fok	Vitavax 2000
2	Chernelházadamonya	Vas	2012	<i>Tilletia caries</i>	Mv Süveges	-
3	Dánszentmiklós	Pest	2012	<i>Tilletia caries</i>	GK Csillag	csávázott
4	Encs	Borsod-Abaúj-Zemplén	2012	<i>Tilletia caries</i>	Mv Magvas II. fok	-
5	Eplény	Veszprém	2012	<i>Tilletia caries</i>	Astardo	-
6	Jászkisér	Jász-Nagykun-Szolnok	2012	<i>Tilletia caries</i>	(étkezési)	Vitavax 2000
7	Kistelek	Csongrád	2012	<i>Tilletia caries</i>	-	-
8	Kistelek	Csongrád	2012	<i>Tilletia caries</i>	-	-
9	Mezőkeresztes	Borsod-Abaúj-Zemplén	2012	<i>Tilletia caries</i>	Mv Kolompos I. fok	Biosild top
10	Nemescsó	Vas	2012	<i>Tilletia caries</i>	Antonius	
11	Pásztó	Nógrád	2012	<i>Tilletia caries</i>	Cornelius	csávázott
12	Pusztahencse	Tolna	2012	<i>Tilletia caries</i> + <i>Tilletia laevis</i>	Mv Ködmön	-
13	Putnok	Borsod-Abaúj-Zemplén	2012	<i>Tilletia caries</i>	Antonius	-
14	Szentes	Csongrád	2012	<i>Tilletia caries</i>	GK Élet	Vitavax 2000
15	Tiszaalpár	Bács-Kiskun	2012	<i>Tilletia caries</i>	GK Csillag	-
16	Tunyogmatolcs	Szabolcs-Szatmár-Bereg	2012	<i>Tilletia caries</i>	Mv Csárdás	Rancona 15 ME
1	Báta	Tolna	2013	<i>Tilletia caries</i>	Mv Koló	-
2	Demecser	Szabolcs-Szatmár-Bereg	2013	<i>Tilletia caries</i>	Antonius	csávázott
3	Győr	Győr-Moson-Sopron	2013	<i>Tilletia caries</i>	Mv Magvas	-
4	Izsák	Bács-Kiskun	2013	<i>Tilletia caries</i>	-	-
5	Jászkisér	Jász-Nagykun-Szolnok	2013	<i>Tilletia caries</i>	Mv Béres II. fok	-

	Település	Megye	Év	Kórokozó	Őszi búza fajta	Csávázószer
6	Kiskunhalas	Bács-Kiskun	2013	<i>Tilletia caries</i>	-	-
7	Körösladány	Békés	2013	<i>Tilletia caries</i>	Mv Toldi	-
8	Ludányhalászi	Nógrád	2013	<i>Tilletia contraversa</i>	Antonius	Vitavax 2000
9	Nagylózs	Győr-Moson-Sopron	2013	<i>Tilletia caries</i>	Capo	-
10	Novaj	Heves	2013	<i>Tilletia caries</i>	Saturnus	-
11	Patvarc	Nógrád	2013	<i>Tilletia caries</i>	Lupus	Vitavax 2000
12	Újdombrád	Szabolcs-Szatmár-Bereg	2013	<i>Tilletia caries</i>	Lupus	Buvisild

M4.2. A *Tilletia*-fajok országos felderítése (2008-2013) során ugyanazon a településen, eltérő évben talált pozitív minták

Mintavétel helye		Év	Kórokozó	Őszi búza fajta	Csávázószer	Megjegyzés	
Település	Megye						
1	Chernelháza-damonya	Vas	2011	<i>Tilletia caries</i>	Balaton II. fok	-	Répcévölgye 2001 Kft., ugyanaz a cég, de nem ugyanaz a tábla
2	Chernelháza-damonya	Vas	2012	<i>Tilletia caries</i>	Mv Süveges	-	Répcévölgye 2001 Kft., ugyanaz a cég, de nem ugyanaz a tábla
3	Fényeslitke	Szabolcs-Szatmár-Bereg	2009	<i>Tilletia caries</i>	Mv Suba	-	Tiszagyönyge Mg. Kft., 0171 hrsz
4	Fényeslitke	Szabolcs-Szatmár-Bereg	2009	<i>Tilletia caries</i> + <i>Tilletia laevis</i>	Mv Magdaléna	-	Tiszagyönyge Mg. Kft., 0167 hrsz.
5	Halimba	Veszprém	2009	<i>Tilletia caries</i>	Mv Ködmön	-	Mohos Bálint, Halimba 011/13
6	Halimba	Veszprém	2011	<i>Tilletia caries</i>	Dunai	csávázatlan	Mohos Bálint, Halimba 011/15
7	Heves	Heves	2009	<i>Tilletia caries</i>	Mv Koló	-	Hemag Kft., n. a.
8	Heves	Heves	2010	<i>Tilletia caries</i>	Mv Vekni II. fok	-	Hemag Kft., C-3 tábla
9	Jászkisér	Jász-Nagykun-Szolnok	2011	<i>Tilletia caries</i>	-	-	Jászkiséri Agrárszöv. Zrt., Jászkisér E-8
10	Jászkisér	Jász-Nagykun-Szolnok	2012	<i>Tilletia caries</i>	(étkezési)	Vitavax 2000	Jászkiséri Agrárszöv. Zrt., Szűcs Telep
11	Jászkisér	Jász-Nagykun-Szolnok	2013	<i>Tilletia caries</i>	Mv Béres II. fok	-	Jászkiséri Agrárszöv. Zrt.
12	Kistelek	Csongrád	2012	<i>Tilletia caries</i>	-	-	ismeretlen, Agropark 4
13	Kistelek	Csongrád	2012	<i>Tilletia caries</i>	-	-	ismeretlen, Ópusztaszer 035/31
14	Mezőkeresztes	Borsod-Abaúj-Zemplén	2010	<i>Tilletia caries</i>	Walter I. fok	Vitavax 2000	Aranykalász 1955 Mg. Kft., GPS kkoordináták
15	Mezőkeresztes	Borsod-Abaúj-Zemplén	2012	<i>Tilletia caries</i>	Mv Kolompos I. fok	Biosild top	Aranykalász 1955 Mg. Kft., n. a.
16	Nagylózs	Győr-Moson-Sopron	2009	<i>Tilletia caries</i>	Capo	csávázatlan	Ferkis Szabolcs, A1 07
17	Nagylózs	Győr-Moson-Sopron	2013	<i>Tilletia caries</i>	Capo	-	Növény Kft., n. a.
18	Szeghalom	Békés	2010	<i>Tilletia caries</i>	GK Békés	csávázott	Nánási Agro Kft., n. a.
19	Szeghalom	Békés	2010	<i>Tilletia caries</i>	GK Ati	csávázott	Nánási Agro Kft., n. a.

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik hozzájárultak a doktori értekezésem létrejöttéhez.

Mindenekelőtt köszönettel tartozom témavezetőmnek Dr. Virányi Ferencnek, aki hasznos szakmai tanácsokkal segítette munkámat és emberileg is támogatott. Külön köszönettel tartozom Dr. Szécsi Árpádnak és Dr. Vánky Kálmánnak szakmai segítségéért, konzultációjáért. Nagyon hálás vagyok Dr. Magyar Donátnak és Dr. Szamos Jenőnek a levegőbiológiai illetve a fehérjevizsgálatokban nyújtott elméleti és gyakorlati útmutatásaikért, és, hogy mindig mellettem álltak az évek során. Valamint kollégámnak, Bozsó Miklósnak is hálás vagyok a DNS-alapú vizsgálatokban való segítségéért.

Köszönöm a Megyei Kormányhivatalok Növény-, és Talajvédelmi Igazgatóságain dolgozó növényvédelmi felügyelőknek és Varga András növényvédelmi mikológus kollégának az őszi búza minták begyűjtését, hálás vagyok Grazyna Szkutának és Dr. Révay Ágnesnek a fehérje és DNS kutatásokban is felhasznált *Tilletia* spp. izolátumok biztosításáért, valamint az Országos Meteorológiai Szolgálatnak és Lőrinczné Izsányi Gizellának az időjárás adatokért.

Köszönöm munkatársamnak, Böszörményi Edének az angol nyelvű dokumentumaim lektorálását, valamint biztatását, támogatását.

Köszönöm munkahelyemnek, a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal Növény-, Talaj- és Agrárkörnyezet-védelmi Igazgatóságának, hogy biztosította a PhD dolgozatom elkészítésének tárgyi és anyagi hátterét.