

XXXI. OTDK Biológia Szekció

Toxintermelő *Fusarium* fajok és antagonistáik előfordulása hazai kukoricatermő területeken

TDK Dolgozat

Szerző: Pálfi Xénia

Biológus MSc. II. évfolyam

Intézmény: Szegedi Tudományegyetem,
Gabonakutató Nonprofit Közhasznú Kft.

Témavezető: Prof. Dr. Mesterházy Ákos
Dr. Tóth Beáta

2012



TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK.....	2
1. BEVEZETÉS	4
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	5
2.1. A kukorica és a hazai kukoricatermesztés bemutatása	5
2.1.1. A kukorica származása, rendszertana.....	5
2.1.2. A kukoricatermesztés hazánkban.....	5
2.1.3. A kukoricatermesztés jelentősége	6
2.1.4. A kukorica legfontosabb betegségei.....	7
2.2. A <i>Fusarium</i> nemzetség bemutatása	9
2.2.1. A <i>Fusarium</i> nemzetség általános jellemzése.....	9
2.2.2. <i>Fusarium</i> taxonómia	9
2.2.3. <i>Fusarium</i> toxinok	10
2.3. Korábbi adatok kukorica <i>Fusarium</i> spp. általi csőbetegségére hazánkban	11
2.4. Potenciális antagonista fajok toxintermelő mikróbák ellen.....	13
2.4.1. <i>Acremonium</i> (<i>Sarocladium</i>) <i>zeae</i>	13
2.4.2. <i>Clonostachys rosea</i>	13
3. PROBLÉMA FELVETÉSE, CÉLKITŰZÉSEK.....	14
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	15
4.1. A vizsgált kukoricahibridek <i>Fusarium</i> rezisztenciája.....	15
4.2. Mintavételezés és feldolgozás	15
4.2.1. Felületi fertőtlenítési módszerek.....	16
4.2.2. Alkalmazott táptalajok.....	16
4.3. Morfológiai meghatározás	18
4.4. Molekuláris azonosítási módszerek.....	18
4.4.1. DNS-izolálás és PCR-hez történő előkészítés.....	18
4.4.2. A <i>Fusarium</i> izolátumok szekvencia alapú molekuláris azonosítása	19
4.4.3. A <i>Fusarium graminearum</i> izolátumok molekuláris módszerekkel történő taxonómiai besorolása.....	19
4.4.4. <i>Sarocladium</i> és <i>Clonostachys</i> izolátumok molekuláris azonosítása	20
4.4.5. A PCR-termék tisztaságának ellenőrzése, tisztítása és szekvenálása.....	20
4.5. Toxinanalízis.....	21

4.5.1. Fumonizinek mérése magmintákból	21
4.5.2. Deoxinivalenol (DON) mérése magmintákból	21
4.5.3. <i>F. graminearum</i> törzsek toxintermelésének vizsgálata	22
4.6. Antagonista vizsgálatok csésze tesztekben <i>S. zeae</i> izolátumokkal.....	23
5. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK.....	24
5.1. A <i>Fusarium</i> nemzetség tagjainak előfordulása kukorica magmintán.....	24
5.1.1. A morfológiai meghatározás eredménye	24
5.1.2. A molekuláris azonosítás eredménye	29
5.1.3. Az eredmények összevetése az 1974/75-ös adatokkal	29
5.2. A különböző ellenállóságú kukoricahibridekről származó <i>Fusarium</i> fajok előfordulási arányának és toxintermelő képességének összehasonlítása....	30
5.2.1. A kukoricahibridek <i>Fusarium</i> fertőzöttsége a két vizsgált évben	30
5.2.2. A fajspektrum eloszlása termőhelyek szerint.....	31
5.2.3. A toxinanalízis eredménye	32
5.3. A <i>F. graminearum</i> izolátumok taxonómiai meghatározása, fajkomplexein belüli eloszlása, toxintermelő képességének vizsgálata	32
5.3.1. Taxonómiai meghatározás, fajkomplexein belüli eloszlás	32
5.3.2. A <i>F. graminearum</i> törzsek toxintermelő képessége.....	33
5.4. Potenciális biokontroll izolátumok toxintermelő gombák ellen	34
6. AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA	35
7. FELHASZNÁLT IRODALOM	36
7.1. Könyvek, egyetemi jegyzetek.....	36
7.2. Publikációk	36
8. FÜGGELÉK	41
8.1. Táblázatok.....	41
8.2. Ábrák.....	47
A TÉMÁBÓL KÉSZÜLT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	49
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	50
NYILATKOZAT	51

1. BEVEZETÉS

A klímaváltozás a 21. században egy világszerte ismert probléma, főleg az időjárási szélsőségek kialakulása miatt (extrém száraz vagy extrém csapadékos évjárás). Hatása erősen eltér a bolygó egyes területein. Ebből következik, hogy az élelmiszerellátásra gyakorolt hatásai is eltérőek, így regionális alapon kell kezelni. A globalizáció miatt pedig az egyes területeken fellépő változások hatással vannak más, földrajzilag távoli területek élelmiszerellátására is, ami miatt a problémák interdiszciplináris megközelítésére is szükség lenne.

A növénytermesztés az élelmiszer ellátás és biztonság sebezhető területe a klímaváltozás tükrében. Erre abiotikus (például az időjárási szélsőségek, a légköri CO₂ koncentráció növekedése) és biotikus tényezők, mint rovarkártevők, patogén mikróbák is hatással vannak. A termesztés körülményeinek javítása műtrágyákat, egyéb kiegészítőket, valamint a kártevők, gyomok és kórokozók irtása végett, növényvédőszereket (inszekticidek, herbicidek, fungicidek, stb.) alkalmazunk, ezek pedig hatással vannak a talaj minőségi romlására, kémiai szennyezettségére (például az szermaradványok, nehézfémek jelenléte miatt), a kártevők migrációjára, és rezisztens gyomok, kártevők kialakulására.

Gondot jelentenek még a patogén mikróbák által termelt fito- és mikotoxinok. Előbbi a növényt károsítja, közvetve vagy közvetlenül a mikrobiális fertőzés folyamatát segítve, míg utóbbi az állatok takarmányozásában és a humán élelmiszerellátásban, illetve biztonságban okoz gondot. Így a mikotoxint termelő gombák, például a *Fusarium*, az *Aspergillus* és a *Penicillium* nemzetség tagjai, hatalmas gazdasági károkat okoznak a gabonafélékben (Miraglia és mtsai, 2009).

Fontos lenne megismerni a hazai gabonafélék mikroba fajspektrumát és ezek toxintermelő képességét felmérni, hogy tudjuk, mivel állunk szemben. A problémák hosszabb távú megoldása a molekuláris genetika valamint a hagyományos nemesítés eszközeit ötvöző rezisztencianemesítésben, és/vagy géntechnológiai eljárások alkalmazásában található, de még rengeteg kérdés, akadály és megoldandó feladat van ezen a területen.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A kukorica és a hazai kukoricatermesztés bemutatása:

2.1.1. A kukorica származása, rendszertana:

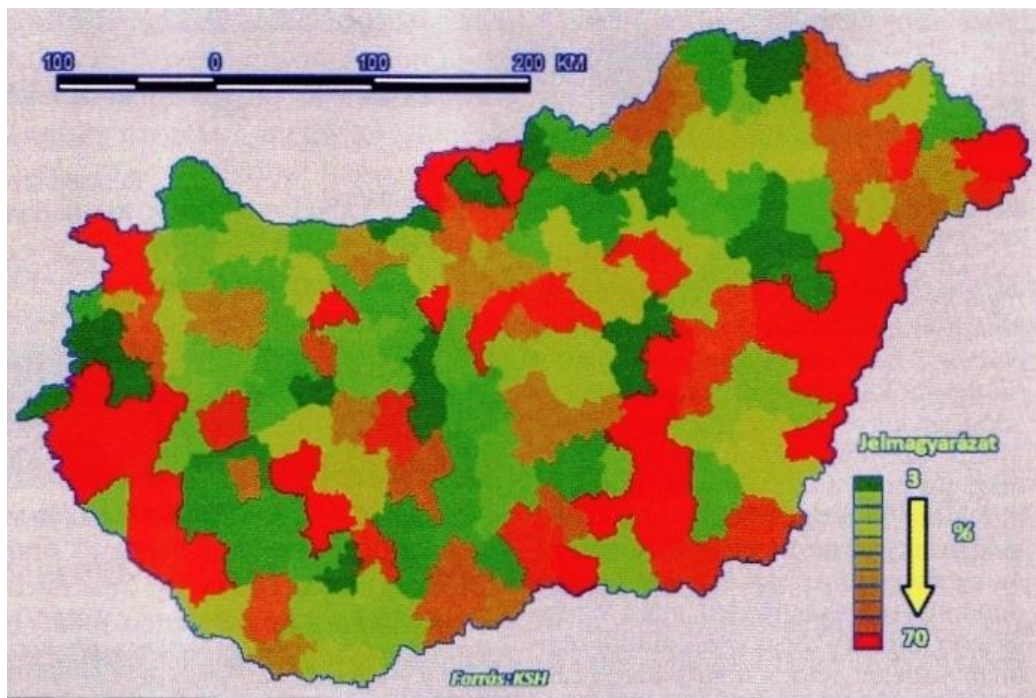
Dél-Amerikában őshonos növény, származásának pontos helye vitatott. Géncentruma valószínűleg Mexikó, Guatemala, Kolumbia és Peru hegyes vidékein található. A kukorica (*Zea mays*) a pázsitfűfélék (*Poaceae*) családjába, az egytagú kukorica (*Zea*) nemzetségbe tartozik; egyszikű, egynyári, lágyszárú, meleg- és vízigényes növény. Szemtermésének jellegzetességei alapján több változata van, közülük az alábbiak vannak köztermesztésben:

1. *Lófogú kukorica* (*Zea mays* L. *convar. dentiformis*): a fontosabb régi kukoricafajták ide tartoznak és a hibridkukoricák nagyobb része is lófogú. Ezt a változatot termesztik a legnagyobb területen.
2. *Simaszemű kukorica* (*Zea mays* L. *convar. vulgaris*): termesztésben kisebb a jelentősége, mint az előzőnek. Kukoricalisztet készítenek belőle.
3. *Csemegekukorica* (*Zea mays* L. *convar. saccharata*): felhasználásuk közvetlenül és konzerviparban történik. Cukortartalma ennek a legnagyobb.
4. *Pattogatni való kukorica* (*Zea mays* L. *convar. microsperma*): termesztésük nem jelentős (Menyhért, 1985).

2.1.2. A kukoricatermesztés hazánkban:

A kukoricát Kolumbusz hozta 1493-ban Európába. Hazánkba Olaszországból, és a törökök közvetítésével került. Jelenleg a legnagyobb szántóterületen, 2000 és 2010 között átlagosan 1,169 millió hektáron termesztett növényünk **(1. ábra)**. Az EU kukoricatermelésében Franciaország után a második-negyedik helyen áll hazánk Romániával és Olaszországgal osztozva, világviszonylatban az USA (41%) áll az első helyen.

A kukorica vetőmag termesztésében és forgalmazásában leginkább az amerikai Pioneer, Syngenta és a Monsanto cégek termékeinek van szerepe, de jelentősek a martonvásári és szegedi hibridek is (Nagy és Ványiné, 2011; Varga és Potori, 2011). A kukorica termesztése teljesen gépesíthető. A beltenyésztéses hibridkukoricák megjelenése az 1960-as években teljesen kiszorította a köztermesztésből a szabad levirágzású kukoricafajtákat. A vetésterület túlnyomó részét kétvonalas hibridkukoricák foglalják el.



1. ábra: A kukorica termesztésének fontosabb területei Magyarországon
(Forrás: Nagy, 2007)

2.1.3. A kukoricatermesztés jelentősége:

A kukorica keményítőben gazdag szemtermését sokoldalúan lehet felhasználni, hazánkban 62%-a takarmány, 8%-a élelmiszer, 18%-a ipari nyersanyag, és további 12%-a export (Jolánka, 2011).

1. Ipari felhasználás:

Korábban többnyire csak szeszt és keményítőt, de jelenleg az élelmiszeripar főként izocukrot állít elő belőle. Ezeken kívül üzemanyag felhasználású bioetanolt, keményítőt, finomszeszt és egyéb készítményeket is készítenek ebből a növényből, melyeket az élelmiszer-, gyógyszer-, textil- és papíripar használ fel.

2. A kukorica, mint takarmánynövény:

Hazánkban az abraktakarmány 65-70%-a kukoricából áll. Szemtermését dara formájában, vagy takarmánytápokba keverve használják fel. A teljes növény is értékes, melyet silózva (belőle készült szilázs etetése), zölden vagy érett kukoricaszár formájában adnak a haszonállatoknak.

3. Emberi felhasználás:

Hazánkban nem igazán elterjedt élelmiszer. A söripar hasznosítja leginkább, ahol az alapanyag 20-50%-a kukoricadara, sörféleségtől függően. Egy másik növekvő iparág a sörkészítés mellett a kukoricapehely gyártás, amihez szintén kukoricadarát használnak (Nagy és Ványiné 2011; Varga és Potori, 2011).

2.1.4. A kukorica legfontosabb betegségei:

A kukoricát kártevői mellett (például kukoricamoly) igen sok betegséget kiváltó **kórokozó** is megtámadja. Néhány példa: a vetőmag penészesedését és a csíranövény pusztulását a *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Helminthosporium* és egyéb fajok válthatják ki. A gyökérzet és szártő korhadását *Nigrospora oryzae*, a gyökérrothadást *Macrophomina phaseoli* és különféle *Fusarium* fajok okozzák. A zöld részeket kukorica golyvás üszög (*Ustilago maydis*), a kukorica rozsdá (*Puccinia sorghi*), valamint a levélfoltosság és levélszáradás kórokozója (*Helminthosporium* sp) támadhatja meg. A virágzatot és a termést főleg *Fusarium* spp, *Helminthosporium* (*Bipolaris*) *maydis*, *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp., és *Ustilago maydis* (**2. ábra**) károsítja (Menyhárt, 1985).



2. ábra: Golyvás üszög (*Ustilago maydis*) kukoricán (saját kép)

A *Fusarium* fajok által kiváltott kórképet **fuzariózis**nak nevezzük. A gombák micéliumai a növénybe a bibeszálon keresztül (1), vagy különböző okból keletkező sebzési felületeken át (2) jutnak be, illetve szisztémikus fertőzést idézhetnek elő (3), mint például a *Fusarium verticillioides*. A *Fusarium* fajok a növény bármely részét, minden fejlődési állapotban képesek fertőzni megfelelő időjárási feltételek esetén. Az első jel általában a hiányos kelés és csíranövény pusztulás. Amelyik növény ezt túléli, annál később antociános elszíneződés (**3. ábra**) jelentkezik a levélen, száron, levélhüvelyen a virágzás alatt. A fuzariózis leggyakoribb, legismertebb megjelenési formája a csőpenész és a szártörés, mely a virágzás után alakul ki. Kétféle fő csőpenészesedés létezik, melyek megjelenésben némileg eltérnek: a *Gibberella* típusú csőfuzariózis (**5. ábra**) okozója a *Fusarium graminearum*, a *Fusarium* típusút (**6. ábra**) a *F. verticillioides*, és kisebb mértékben

a *Fusarium subglutinans* és *Fusarium proliferatum* váltja ki. A *F. graminearum* a csövek végén jelenik meg először rózsaszínes penésztelepek formájában, főleg csapadékosabb időjárás esetén, majd lassan terjed a csövön lefelé, akár a csuhélevelekre is. Azok a fajták vannak leginkább veszélyben, ahol a csuhélevelek takarják a csövet. A *Fusarium* típusú csőpenész bárhol kialakulhat rovarrágás, mechanikai sérülés esetén, a száraz, meleg időjárás kedvez neki. A pamutszerű fehér gombatelepek különálló kukoricaszemeken jelennek meg korlátozott számban, erős fertőzés esetén összeolvadhatnak.



4. ábra: Egészséges szárkeresztmetszet ↓



3. ábra: Antociános elszíneződés
(saját kép)

5. ábra: Gibberella típusú csőpenész
(Készítette: Mesterházy Ákos, 2007)



6. ábra: Fusarium típusú csőpenész
(Készítette: Mesterházy Ákos, 2007)



7. ábra: Fusarium-os szártőkorhadás
(Készítette: Mesterházy Ákos, 2007)

Az **4. ábrán** egy egészséges szár keresztmetszete látható (Készítette: Mesterházy Á., 2007). A fuzáriumos szártőkorhadás (**7. ábra**) tüneteit főleg a *Fusarium culmorum*, a *F. verticillioides* és a *F. graminearum* okozza, ami sokáig rejtve maradhat, bár a csövek fejlődése lelassul (Mesterházy és mtsai, 2012).

Kísérletek igazolták, hogy a szártőkorhadás jelentősen csökkenti a csőpenész fertőzőtséget, a csőpenész ugyanakkor visszahat a szártőkorhadásra, csökkentve annak mértékét. Ezt a kapcsolatot figyelembe kell venni a kukorica *Fusarium* fajok ellen történő rezisztencianemesítése során (Mesterházy, 1984a).

2.2. A *Fusarium* nemzetség bemutatása:

2.2.1. A *Fusarium* fajok általános jellemzése:

A *Fusarium*-ok fonalas gombák, néhányan a talajban szaprofitaként, növényi maradványokon vagy növényekben parazitaként találhatók meg. Ezek a fajok más mikrobákkal együtt a kukorica csőpenészeit, a szárkorhadásért és gyökérgyökérkárosodásért is felelősek. A *Fusarium* fajok többsége heterothallikus (Kevei és Kucsera, 2004).

A *F. graminearum*, és *F. culmorum* fajoknál korábban azt gondolták, hogy különböző specializált rasszok vannak jelen (Tu, 1930), de ez hibás eredményértelmezésnek bizonyult a gazdanövény-izolátum kölcsönhatás helytelen értelmezése miatt. E két faj esetében ugyanis nem áll fenn stabil és jól ismételhető kölcsönhatás, mint a rozsdarasszoknál (Mesterházy, 1995). Egyedül a *F. graminearum*-nál fedeztek fel homothallikus és heterothallikus változatokat, de ma már az utóbbiak külön fajba tartoznak (*Fusarium pseudograminearum*). A *Fusarium oxysporum* esetében azonban vannak valódi specializált rasszok is.

Minden *Fusarium* faj igen jelentős variabilitást tartalmaz a különböző tulajdonságok terén, például ilyen a teleptípus, a telep színe, a konídiumok alakja és mennyisége. A molekuláris vizsgálatok számos genetikai eltérést hoztak a világra, ezek által maguk után vonva a rendszertani változásokat is (Mesterházy, 2006).

2.2.2. *Fusarium* taxonómia:

Phylum (törzs): *Ascomycota* – aszkuszos gombák

Classis (osztály): *Euscomycetes* – valódi aszkuszos gombák (fonalas *Ascomyceták*)

Subclassis (alosztály): *Pyrenomycetes* – a termőtest (peritécium) sztómá(n)ban keletkezik, az aszkuszok általában bazális klusztereken fordulnak elő; az aszkospórák tojásdadok vagy tűszerűek, rendezett tetrádokban találhatók

Ordo (rend): *Hypocreales* – inoperculate típusú (pórussal nyíló) aszkusz

Familia (család): *Nectriaceae* – a konidiofór (konídiumtartó) álparenchima, erről fűződnek le az egy- vagy kétsejtes ragadós konídiumok

Genus (nemzetség): *Fusarium* – a teleomorfi alakok vannak ebbe a törzsbe sorolva (*Gibberella*, *Nectria* illetve *Haematonectria* nemzetség tagjai)

Wollenweber és Reinking (1935) a *Fusarium* nemzetséget 12 különböző szekcióra osztották (**Függelék 8.1, 1. táblázat**). Az imperfekt *Fusarium* fajok ivartalan (anamorf) alakjai a *Deuteromycota* törzsbe tartoznak. Számos anamorfnek van ivaros formája is például a *Gibberella* és *Nectria* (illetve *Haematonectria*) nemzetségben, melyek az *Ascomycota* törzsbe lettek sorolva (**Függelék 8.1, 3. táblázat**). Néhány gombát párosodási módja (mating type) alapján csoportokba sorolhatunk, például a *Gibberella fujikuroi* fajkomplex tartalmaz ilyen formákat, ahova többek közt a *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, és a *F. verticillioides* fajok tartoznak.

2.2.3. *Fusarium* toxinok:

Néhány *Fusarium* faj mikotoxinokat termel, melyek veszélyeztetik az emberek egészségét. Közülük legjelentősebbek a fumonizinek, a trichotecének és a zearalenon.

A *Fusarium* mikotoxinok csoportosítása:

1. *Poliketidek*: moniliformin, fumonizinek, zearalenon
2. *Aminosav származékok*: enniatin, beauvericin
3. *Terpén származékok*: trichotecének, taxol, gibberellinek
4. *Hibrid másodlagos metabolitok*: fusarin-C, equisetin
5. *Szent-Györgyi-Krebs-ciklus intermedierjeiből származtatható másodlagos metabolitok*: fuzárium-sav

Részletes jellemzés a *Fusarium* toxinokról a **Függelék 8.1.** részben található (**2. táblázat**) Varga és munkatársai (2009) alapján.

A mikotoxinok termelése nagymértékben függ a gombatörzs genetikai toxintermelő képességétől, környezeti faktoroktól, legfőképp a hőmérséklettől és a relatív páratartalomtól. A *Fusarium* mikotoxin tartalom a gabonafélékben függ az adott gabonafajta tulajdonságaitól (például mennyire rezisztens az illető gombára), az érés-aratás körüli időjárástól, a termelés, tárolás és feldolgozás típusától.

A mikotoxikózist okozó gombákat szántóföldi és raktári eredetű csoportokra lehet felosztani. Azonban a jellegzetes szántóföldi kórokozónak tartott *Fusarium* nemzetség fontos raktári betegséget is tud okozni. Egyébként a két csoport sokkal közelebb van egymáshoz, mint korábban gondolták (Mesterházy és Vojtovics, 1977). Az ételminőség egészségügyi kockázatot főleg a szennyezett tételek előfordulásának mértéke, annak mikotoxin tartalma és az adott termék fogyasztásának gyakorisága és mennyisége jelenti. Az Európai Unió által

megszabott toxin egészségügyi határértékek (**1. táblázat**) mellett fontos tényező a tolerálható napi bevitel (TDI) is (**2. táblázat**).

Toxin egészségügyi határértékek (µg/kg)	
Aflatoxin (összes)	4
Fumonizin (FB ₁ + FB ₂)	4000
Ochratoxin A	3
Dezoxinivalenol (DON)	1250

1. táblázat: A legfontosabb toxinok egészségügyi határértékei (Európai Unió)

(Forrás: Szeitzné, 2009)

A TDI az a toxinmennyiség, amely a szervezetbe naponta bejut (**5. táblázat**). Ha időszakonként meghaladjuk ezt az értéket, nem feltétlenül jelenti azt, hogy meg is betegszünk, de huzamosabb ideig történő túllépése esetén az egészségkárosodás nem zárható ki (Lásztity, 2009).

Fusarium toxinok SCF által megállapított eltűrhető napi beviteli értékei	
Mikotoxinok TDI (µg/ttkg/nap)	
DON (dezoxinivalenol)	1
nivalenol	0,7 (*)
zearalenon	0,2 (*)
fumonizin B ₁ , B ₂ és B ₃	2 (**)
T-2 és HT-2	0,06 (*)

Magyarázat:

(*): Ideiglenes TDI, a T-2 és a HT-2 toxinoknál kombinált ideiglenes TDI.

(**): Fumonizin esetén a TDI-t a B₁, B₂ és B₃ együttesen határozza meg.

2. táblázat: TDI mennyiségek Fusarium toxinok esetében

(Forrás: Szeitzné, 2009)

2.3. Korábbi adatok kukorica Fusarium spp. általi csőbetegségére hazánkban:

Irodalmi adatok alapján a csőfuzariózis legfontosabb kórokozója a *F. graminearum*, a *F. culmorum* és a *F. moniliforme* (Koehler, 1954 és Focke, 1966). A hazai kutatások (Békési és Hinfner, 1970) leírták az eddig előforduló fajokat; jelentőségüket általában a fentiekhez hasonlóan ítélték meg. Más fajokat is azonosítottak (Békési és Hinfner, 1970; Bíróné, 1975), de ezek előfordulási gyakorisága a fentiekhez képest nem volt mérvadó.

A kutatást **Mesterházy és Vojtovics (1977)** fontosnak tartotta a fent említett kukorica felmérések *Fusarium* fertőzöttségi eredményei miatt, ezért folytatásként 1972-1975 közt nagyszámú természetesen fertőzött növényanyagot vizsgáltak meg. A magminták 22 illetve 27 termőhelyről származtak (**Függelék 8.2, 1. ábra**), mindenhol 4-5 hibridet választottak ki, de ezek többnyire nem ugyanazok voltak. A magvakat vizsgálat előtt felületileg fertőtlenítették (Mesterházy, 1974b), majd a Papavizas (1967) által kidolgozott *Fusarium* szelektív táptalajra helyezték őket (meghatározás: Booth 1972 alapján).

Megjegyzés: a *F. moniliforme*-t ma már *F. verticillioides*-nek (Seifert, 2003), a *F. moniliforme* var. *subglutinans* alfajt pedig *F. subglutinans*-nak hívják (Nelson, 1983).

Eredmények: Az országos magfertőzöttségi vizsgálatok a száraz időjárású 1974-ben és a csapadékos 1975-ben azt mutatták, hogy a kukoricát károsító legfontosabb 2 faj a *F. graminearum* és a *F. moniliforme*. A *F. graminearum* meglepő állandóságról tett tanúbizonyságot mind a két évben (25,5% és 29,6%), a *F. moniliforme* a *F. moniliforme* var. *subglutinans* alfajával együtt előretört 1975-ben (64,75 és 4,5 %) a száraz időjárás miatt. Az egyéb fajok országosan mindkét évben háttérbe szorultak, 1974-ben leginkább a *F. moniliforme* miatt. Szárban és gyökérben is a *F. graminearum*, *F. moniliforme* és a *F. culmorum* volt a legjelentősebb. Utóbbi csőben nem igazán, csak 4,33%-os (1974) és 0,47%-os (1975) fertőzöttséget mutatva fordult elő. A domináns fajok eloszlásában az egyes tájegységek között nem volt lényeges eltérés, mivel a fertőzöttség leginkább helyi tényezők végett alakult ki, az esetleges differenciát az egyéb fajok előfordulásának mértéke és változatossága jelentheti. Egyéb előfordult fajok többek között: *Fusarium tricinctum*, *Fusarium avenaceum*, *F. oxysporum*, *Fusarium poae*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium semitectum*, és *Fusarium acuminatum*.

Egyéb vizsgálatok: Érdekes lehet még a búza *Fusarium* fertőzöttsége, hiszen ez a növény a kukoricával együtt alkot vetésforgót. **Mesterházy és munkatársai** (1984b) felmérést végeztek Dél-Magyarországon 1970 és 1983 között a búzát fertőző *Fusarium* fajspektrumról, és megállapították, hogy a két legjelentősebb faj a *F. graminearum* (58,58%) és *F. culmorum* (26,13%) volt. Részben hasonló eredményre jutottak **Hornok és munkatársai** is (2005), akik 2001-2004-ben 15 helyszínen gyűjtöttek össze 2-2 búzafajtáról kalászmintát, majd kiválasztottak 6 gombafajt (*F. avenaceum*, *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. poae*, és 2 *Microdochium nivale*-t), melyek jelenlétét molekuláris módszerek segítségével kutatták. Összességében (45 mintában) a szárazabb időjárást preferáló *F. poae*-t és a kiváló alkalmazkodó képességű *F. graminearum*-ot találták legnagyobb arányban, a *F. culmorum* jelentősen visszaszorult a fajok versenyében búzán is.

2.4. Potenciális antagonista fajok toxintermelő mikrobák ellen:

2.4.1. *Acremonium (Sarocladium) zeae*:

Az *Acremonium* nemzetséget korábban a *Cephalosporium*-hoz sorolták, 1971-ben lett elkülönítve illetve átnevezve (Gams és Summer, 1971), mai szinonimája pedig a *Sarocladium*. Rendszertanuk morfológiai változatosságuk miatt bonyolult. Az imperfekt gombák közé, a *Hypomycetes* osztályba tartoznak ivaros formáik, számos anamorf pedig megtalálható a *Basidiomycota* és *Ascomycota* törzsben (például a *Sordariales* és a *Hypocreales* rendekben). Extrém lassan növekednek, morfológiailag hasonlóak első ránézésre a *Penicillium* nemzetséghez, de más a konídiumképzés mechanizmusa (Peberdy, 1987).

Irodalmi adatok alapján a *Sarocladium zeae* faj a *F. verticillioides* és az *Aspergillus flavus* antagonistája. Ez a faj potenciális biokontroll ágens lehet patogén mikrobák ellen, és mikotoxin degradáló enzimek lehetséges forrása is egyben. Ezek pyrrocin A-t és B-t termelnek, melyek poliketid-aminosav származék antibiotikumok. Az előbbi szignifikánsan magasabb *in vitro* antibiotikus aktivitást mutat a másikkal szemben. A Gram-pozitív baktériumok aktivitását nagymértékben gátolja a pyrrocin A (Wicklow és mtsai 2005).

2.4.2. *Clonostachys rosea*:

Gyakori talajlakó, szaprofita gomba, szerepe van a növényi maradványok lebontásában, ezáltal a növénypatogén mikrobák szaporító képleteinek (például konídiumok) és nyugvó alakjainak (például klamidospórák) elpusztításában. *Penicillium*- és/vagy *Verticillium*-szerű konídiumtartói vannak (**8. ábra**).



Először a *Clonostachys rosea*-nál fedezték fel (Barnett és Lilly, 1962) a mikroparazita tulajdonságot. Újabb kutatások alapján a gomba az ösztrogénanalóg zearalenon biodegradációjában vesz részt – hasítható, ösztrogénhatást nem mutató terméké konvertálja (Hideaki, 2002).

8. ábra: *Clonostachys rosea* fénymikroszkóp alatt

(Forrás: Schroers, 1999)

3. PROBLÉMA FELVETÉSE, CÉLKITŰZÉSEK

I. A *Fusarium* nemzetség tagjainak előfordulása kukorica magmintán:

Hazánkban 1977 óta nem publikáltak adatot a kukorica *Fusarium*-os fertőzöttségének mintázatáról. Kétéves felmérést végeztünk (2010-ben és 2011-ben) Hódmezővásárhelyről és Kétsopronyból származó 6-6 kukoricahibrid magmintáin található *Fusarium* fajspektrumról, melyek meghatározása morfológiai és molekuláris bélyegek alapján történt. Az adatokat összehasonlítottunk a 35 évvel ezelőtti felmérés eredményeivel (Mesterházy és Vojtovics, 1977).

II. A különböző ellenállóságú kukoricahibridekről származó *Fusarium*-ok előfordulási arányának és toxintermelésének összehasonlítása:

Korábbi kísérletek alapján az NK Cobalt, az NK Lucius és a DKC5190 hibridek a *Fusarium*-mal szemben jobb szántóföldi ellenállóságot mutattak, míg a DA Scipio, a Surreal, és a DKC3705 hibridek *Fusarium*-ra fogékonyak voltak. Célunk a gyengébb, illetve a jobb ellenállóságú hibridcsoport *Fusarium* fertőzöttségi százalékanak és a magmintákból HPLC-MS technikával detektált toxinmennyiségek összevetése.

III. A *Fusarium graminearum* izolátumok taxonómiai meghatározása, fajkomplexen belüli eloszlása:

Amerikai kutatók, O'Donnell és munkatársai a *F. graminearum* faj globális variabilitását vizsgálták több génszakasz szekvenciaanalízisével. A kukoricáról származó hazai *F. graminearum* populáció hasonló jellegű vizsgálatát terveztük, az eredményeket pedig összehasonlítjuk a hazai búzamintákról származó izolátumokra kapott eredményekkel. Ezt kiegészítjük az *F. graminearum* izolátumok *in vitro* toxintermelő képességének vizsgálatával.

IV. Potenciális antagonista fajok előfordulásának felmérése:

Munkánk célja egy átfogó, Magyarország kukoricatermő területeire kiterjedő, a toxintermelő penészgombák jelenlétét tisztázó vizsgálat sorozat elvégzése, mely során a hazai 2011-es kukoricáról több endofita *S. zeae* és *C. rosea* törzset izoláltunk és azonosítottunk molekuláris módszerekkel. A *S. zeae* izolátumokkal antagonista vizsgálatokat végeztünk különböző *Fusarium* fajokkal és *A. flavus* izolátumokkal szemben, a hazai populáció genetikai variabilitásának és antagonista aktivitásának feltérképezése céljából.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. A vizsgált kukoricahibridek *Fusarium* rezisztenciája:

Hazánkban leginkább a FAO 200-599 besorolású kukoricákat termesztjük. Hat hibridet vizsgáltunk felmérésünk során, ezek a Syngenta, Monsanto, Saaten Union és Dow AgroSciences cégek termékei. Kereskedelmi okokból római számmal jelöltük őket; a I-III-as hibridek az ellenállóbb, a IV-VI.-os számmal jelöltek pedig a fogékonyabb csoportba tartoznak.

Korábbi szántóföldi kísérletek alapján lett a hibridek *Fusarium* rezisztencia viszonya felmérve. Ebből az egyik a **GOSZ-VSZT Kukorica Posztregisztrációs Fajta Kísérletek (2010)** volt, mely alapján a II. és III. hibrid rezisztensnek bizonyult, az előbbi a főleg csak a csőfuzáriummal ellen, az utóbbi pedig a *Fusarium*-os szártőkorhadással szemben is toleránsnak bizonyult. A IV. hibrid viszont ebben a kísérlet sorozatban csőfuzáriumra érzékenyben bizonyult, de a szártőkorhadással szemben rezisztenciát mutatott. A 2010-es **MycoRed** (az EU által támogatott konzorciális) **pályázat** keretében vizsgált I. hibrid *Fusarium* rezisztenciát mutatott, viszont a V. hibrid *Fusarium*-mal szemben mérsékelten ellenálló, VI. fajta pedig fogékony volt.

A **Függelék 8.1.** részben mellékeltem egy táblázatot a kukoricák érési idő alapján történő csoportosításáról és jellemzéséről (**4. táblázat**).

4.2. Mintavételezés és feldolgozás:

A magmintákat csövestül vagy morzsoltan 4-5 csőnek megfelelő minta) vettük át, 1-1 homogén parcelláról lettek véletlenszerűen vételezve. Ezt összekevertük, kivettünk egységes számú (hibridenként 50 db) szemet és felületi fertőtlenítés után PCNB táptalajra helyeztük őket (**9. ábra**). Az izolált törzseket először PDA-ra, majd SNA táptalajra oltottuk. Ezt követte a morfológiai meghatározás.



Megjegyzés: a második évben (2011) Kétsoprony helyett Ceglédre szarmaztak a minták, mert abban az évben nem vetették el azokat a kukoricahibrideket Kétsopronyban, amelyekkel dolgoztunk.

9. ábra: Kukorica magok PCNB táptalajon (saját ábra)

4.2.1. Felületi fertőtlenítési módszerek:

1%-os háztartási Hypo-oldatot (NaOCl) hígítás nélkül használtuk (hasonlóan, mint Mesterházy és Vojtovics, 1977), fél órán keresztül ráztuk a magokat benne. Az idő leteltével a magokat kétszer átmostuk steril desztillált vízzel, szárítás után PCNB táptalajra helyeztük őket. A Hypo előnye, hogy alaposabb felületi fertőtlenítést tesz lehetővé és nem hatol a szövetekbe.

4.2.2. Alkalmazott táptalajok:

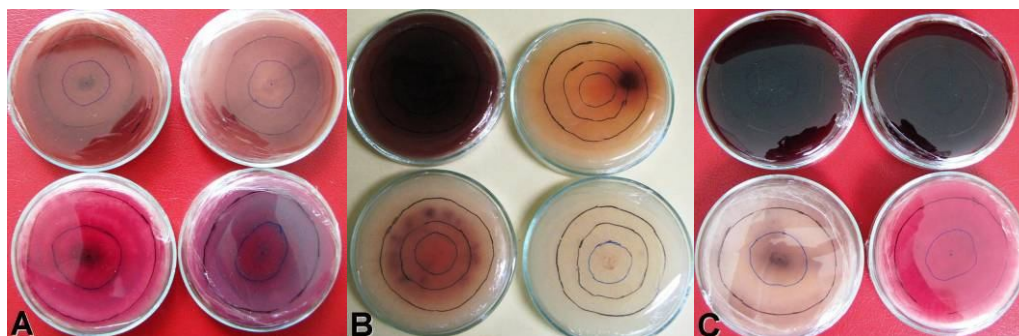
A táptalajok készítése kuktában történt, kb. 5 perc maximális fokozaton történő forralás után 20 perces, közepes fokozaton főztük (sterilizáltuk) őket.

1. PCNB (PPA vagy Nash-Synder Medium):

Fusarium-szelektív táptalaj, melyet Nash és Synder írt le először 1962-ben, majd Nelson és munkatársai (1983) módosították. A pepton lebontásával ammónia keletkezik, ezt csak a *Fusarium* fajok és néhány *Aspergillus*, *Penicillium* faj tolerálja, a *Zygomycetes* faj tagjai nem képesek növekedni rajta. A *Fusarium*-ok is lassan növekednek rajta, sporulációjuk szegényes.

2. Potato Dextrose Agar (PDA):

A telep növekedésének mértékének meghatározására használjuk a burgonya agart (Stamets és Chiltons, 1983). A telepek morfológiáját (pl. légmicéliumok), pigmentációját is vizsgálhatjuk itt (**10. ábrák**), ami fontos másodlagos határozási bélyegként szolgál az egyes *Fusarium* fajok elkülönítésének céljából.

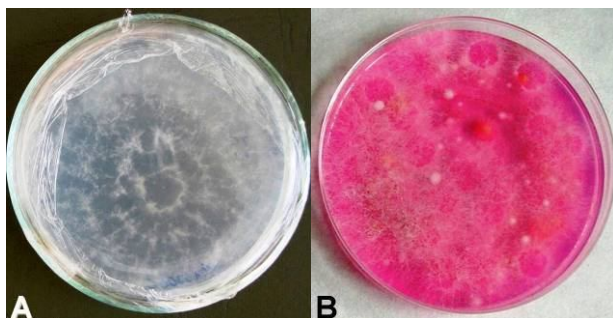


10. ábrák: A PDA táptalajon növekvő telepek pigmentációja megfigyelhető
(saját ábra)

3. Spezielle Nährstoffarmer Agar (SNA):

Teleomorf forma nem fejlődik ezen (**11. ábra, A**). Sporuláció, konídiumképzés jól működik az SNA táptalajon (Nirenberg, 1976b), ami alapján meghatározhatóak a fajok. A makrokonídiumok és mikrokonídiumok nem egységes megjelenésűek, mivel a sporodochium mennyisége limitált, nem igazán tud kialakulni. A

klamidospóra képzés végbemegy, melynek jelenléte és tulajdonságai is határozó bélyegként szolgálnak.



11. ábrák: *Fusarium* izolátum SNA táptalajon (A) és Dichloran Rose Bengal agarra leoltott talajminta (B) - ebből izoláltuk pl. a *Clonostachys rosea*-t (saját ábra)

4. Dichloran Rose Bengal Agar (DRBA):

A *S. zeae* és *Clonostachys roseae* elkülönítésére használtuk ezt a táptalajt (**11. ábra, B**). A DRBA-t Douglas King és munkatársai (1979) dolgozták ki a toxintermelő mikróbak szelektív izolálására. A PCNB táptalajhoz hasonlóan ez a táptalaj is a *Zygomycota* gombák (főleg a *Mucor* és a *Rhizopus* nemzetség tagjainak) növekedését gátolja. Az izolált törzseket PDA táptalajon növesztettük tovább a molekuláris vizsgálatokig. A **Függelékben (8.1.)** megtalálható az **1-4 pontban** jellemzett táptalajok elkészítésének receptje (**5. táblázat**).

5. DNS kivonást megelőzően használt Yeast Malata táptalaj (YMA):

YMA - Yeast Malata Agar	
1 literhez	g
Maláta kivonat (MALOX)	5
Élesztő kivonat (Yeast extr.)	5
Glükóz	5
Agar	24

Az YMA táptalajt agar nélkül (YMB) használtunk (**3. táblázat**) folyékony táplevesként (Vincent, 1970) a molekuláris azonosításra váró *Fusarium* izolátumok felszaporítására.

3. táblázat: YMA táptalaj receptje (saját ábra)

5. Rizses táptalaj (Széchi, 2005):



20-25 g Uncle Ben's rizst kimértünk egy lombikba, majd 40-50 ml desztillált vizet adtunk hozzá, kuktával megfőztük. Ezen a táptalajon növesztettük 2-3 hétig a *F. graminearum* törzseket, melyek toxintermelő képességét megvizsgáltuk (**12. ábra**).

12. ábra: Rizses táptalajon növekvő *F. graminearum* izolátumok (saját ábra)

4.3. Morfológiai meghatározás:

Az izolált *Fusarium* fajok morfológiai azonosítása a hazánkban korábban is előforduló fajokra koncentrálva (Mesterházy és Vojtovics 1977) történt.

A morfológiai meghatározás során vizsgált paraméterek		
PDA táptalajon megfigyelhető képletek		
Vizsgált tulajdonságok	Tulajdonságok jellemzése	
növekedés sebessége	gyorstól extrém lassúig bármilyen lehet, adott fajtól függően és izolátumra jellemzően	
légmicéliumok morfológiája	lehet ritka és sűrű, aprótól nagy méretűig fajra és izolátumra jellemzően	
légmicéliumok színe	fehér, sárgás, barna, lila lehet, fajtól és izolátumtól függően	
agar színeződése	színtelentől sötét violáig, feketéig bármilyen lehet	
SNA táptalajon megfigyelhető képletek		
Vizsgált tulajdonságok	Tulajdonságok jellemzése	
Makrokonídium	van	nincs
alak	egyenes, ívelt, sarló, hold alakú lehet	
szeptátság	3-8 szeptum között variálhat	
bazális sejt	láb formájú, V-alakban bevágott, stb.	
apikális sejt	kúp/ormány alakú, ívelt, pontban végződő lehet	
Mikrokonídium	van	nincs
alak	kerek, körte, ovális, bunkósbot alak	
szeptátság	0-2 szeptumos lehet	
előfordulási hely	egyesével vagy csoportban (láncok, álféjek, aggregátumok)	
Mezokonídium	van	nincs
alak	általában ovális	
szeptátság	1-4 szeptum, de nem szeptált is lehet	
Konídiumtartó (konidiofór)	monofialidos	polifialidos
	elágazó	nem elágazó

4. táblázat: A morfológiai meghatározás során vizsgált paraméterek és rövid jellemzésük (saját táblázat)

A meghatározáshoz főleg a *Fusarium* Laboratory Manual (Leslie, Summerell, 2006), és a *Fusarium* Species - An Illustrated Manual for Identification (Szerk.: Nelson, Tousson, 1990), valamint a The Genus *Fusarium* – a Pictorial Atlas (Gerlach und Nirenberg, 1982) könyveket használtuk. Az izolátumokat *Leica DM 3000 Microsystem* fénymikroszkóppal vizsgáltuk, fényképeket készítettünk 10x, 20x és 40x nagyításban a tárgylemezre preparált konídiumokról és *in vivo*, a kivágott agarlemezében látható képletekről (**4. táblázat**).

4.4. Molekuláris azonosítási módszerek:

4.4.1. Előkészítés:

A molekuláris vizsgálatokra kiválasztott gombákat YMB táplevesben felszaporítottuk, 3-5 nap elteltével leszűrtük, liofilizáltuk egy napig, majd egy kis

mintából kivontuk a DNS-t EPICENTRE Biotechnologies DNS-kivonó kit segítségével. A minták DNS-koncentrációját Nanodrop ND-1000 Spektrofotométerrel határoztuk meg, majd a további munkákhoz 10 ng/μl-es koncentrációra hígítottuk steril desztillált vízzel.

A DNS-minta amplifikálásához az **5. táblázatban** feltüntetett PCR reakcióelegyet állítottuk össze **minden esetben**.

PCR reakcióelegy összeállítása		Koncentráció
Master Mix	25 μl	? (<i>Fermentas</i>)
1. primer	5 μl	10 pM
2. primer	5 μl	10 pM
DNáz-mentes víz	10 μl	-
DNS minta	5 μl	10 ng/μl

5. táblázat: PCR reakcióelegy összeállítása (saját táblázat)

4.4.2. A *Fusarium* izolátumok szekvencia alapú molekuláris azonosítása:

A *Fusarium* fajok molekulárisan diverzek, nem mindig adnak a morfológiai módszerek egyértelmű és pontos meghatározást. Erre a problémára kínál megoldást a szekvencia alapú molekuláris azonosításuk. Identifikálásuk az 1-α transzlációs elongációs factor (TEF) parciális szekvenciája alapján történik, kb. 700 bp-nyi termék amplifikálódik (Geiser és mtsai, 2004) a PCR reakció folyamán. Lehetőség van az ITS (Internal Transcribed Spacers – nem funkcionális riboszómális RNS) szekvenciák alapján történő azonosításuk is, bár ez nem olyan specifikus, mint az előző.

Primerek (O'Donnell és mtsai, 1998):

- **ef1** - forward primer; 5'-ATGGGTAAGGA(A/G)GACAAGAC-3'
- **ef2** - reverse primer; 5'-GGA(G/A)GTACCAAGT(G/C)ATCATGTT-3'

A PCR készülék beállítása: inicializáció: 94 °C – 5 perc; PCR ciklus (45x):

[denaturáció: 94 °C – 1 perc; annealing: 56 °C – 1 perc; elongáció: 72 °C – 2 perc];
polimerizáció: 72 °C – 2 perc.

4.4.3. A *F. graminearum* izolátumok molekuláris módszerekkel történő taxonómiai besorolása:

A kukoricáról származó hazai *F. graminearum* izolátumok (42 db) molekuláris vizsgálatát a TRI101 (trichotecén bioszintézisért felelős) gén parciális szekvencia adatai alapján végeztük el, mivel a *F. graminearum* törzsek elkülöníthetők a trichotecén kemotípus szerint is. A gén egyébként a 3-O-acetil-transzferázt kódolja.

Primerek:

- **AT1** - forward primer; 5'-AAAATGGCTTTCAAGATACAGC-3'
- **AT2** - reverse primer; 5'-C(A/G)TA(C/T)TGCGC(A/G)TA(A/G)TTGGTCCA-3' (Malhipour, 2010)

A PCR készülék beállítása az előző módszernél **(4.4.2.)** leírt módon történt.

Az eredmények alapján készített molekuláris törzsfát a MEGA 5.05 (Tamura és mtsai, 2011) program segítségével hoztuk létre, **neighbor joining** algoritmus alkalmazásával ábrázoltuk a szekvenciáink rokonsági viszonyait az irodalomban feltüntetett 15 *F. graminearum* faj szekvenciáival összevetve.

4.4.4. Sarocladium és Clonostachys izolátumok molekuláris azonosítása:

Az izolált *S. zeae* és *Clonostachys* törzsek azonosítása ITS (Internal Transcribed Spacers – nem funkcionális riboszómális RNS) szekvenciák alapján történt. A PCR készülék beállítása a **4.4.2. pontban** leírt módon történt.

Primerek:

- **ITS1** – forward primer; 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'
- **ITS4** – reverse primer; 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3' (White és mtsai, 1990)

4.4.5. A PCR-termék tisztaságának ellenőrzése, tisztítása és szekvenálása:

Agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük a PCR-termékek tisztaságát. Az 1xTBE puffer és agarózból, méretnek megfelelően arányban, összemért gélhez még folyékony állapotban GelStar (Lonza) gélfestéket adtunk (1/10000 koncentrációban), majd a gél megszilárdulása után (kb. 20 perc) felvittük a DNS-mintákat (1 µl-t) a hozzáadott 7 µl-nyi Loading Buffer (LB) mintafestékkel együtt. A molekulásúly referenciából (Gene Ruler Mix vagy Gene Ladder, Fermentas; 0,1 µg/µl) 4 µl-t tettünk a zseb(ek)be. A megfelelő minőségű PCR terméket BioBasic Inc. EZ-10 Spin Colume PCR Purification Kit-tel tisztítottuk ki szekvenáltatás előtt.

A tisztított PCR terméket ABI (Applied Biosystem by Life Technologies) készülék segítségével megszekvenáltattuk, majd az eredményt összevetettük a NCBI (National Center for Biotechnology Information) GenBank adatbázisával.

4.5. Toxinanalízis:

Mindkét év magmintáiból mértünk fumonizineket és dezoxinivalenolt (DON).

4.5.1. Fumonizinek mérése magmintákból:

Fumonizin B₁ és B₂ mennyiséget mértünk LC/MS/MS módszerrel. Egy gramm kukoricamag őrleményt extraháltunk 5 cm³ acetonitril/víz 75/25 (v/v %) arányú keverékével vertikális rázó gép segítségével (2,5 óra). Az extraktumot centrifugáltuk (10 000 rpm, 10 perc). GF/B üvegszál szűrőn 1,5 cm³ felülúszót HPLC-fiolába szűrtünk. Az álló fázis Polaris C18-A (5 µm, 150 x 3 mm-es oszlop) és (5 µm, 10 x 2mm -es előtétoszlop) volt.

A mérés első fázisa **HP 1090 nagyhatékonyságú folyadékkromatográf**fall történt, „A” (0,1% hangyasavat tartalmazó víz) és „B” (0,1% hangyasavat tartalmazó acetonitril/metanol /75/25/) oldószerek alábbi gradienseivel:

1. 0 perc - 1 perc: 30% „B”
2. 1 perc - 10 perc: 100% „B”
3. 10 perc - 15 perc: 100% „B”
4. 15 perc - 20 perc: 30% „B”
5. 20 perc - 25 perc: 30% „B”

Áramlási sebesség: 0,25 cm³/perc

Injektált térfogat: 1 µl

Oszlop hőmérséklete: 40 °C

MS/MS fázisban **Varian 500MS ioncsapdás tömegspektrométer**t használtunk, mely elektronporlasztásos ionforrással rendelkezik. Pozitív ionizációval történt a mérés.

Az azonosításra használt fragmens-ionok a fumonizin B₁: m/z 721,8 > 686,6 és fumonizin B₂: m/z 705,8 > 512,6 voltak. Fumonizineknél a kalibráció mátrixszal hígított külső standard módszerrel történt.

4.5.2. Dezoxinivalenol (DON) mérése magmintákból:

Acetil-DON-glükozidot (AcDON), 15'-acetil-DON-t (15'-AcDON), 3'-AcDON és DON szintet mértünk, de ebből nekünk a DON mennyisége volt fontos.

Egy gramm kukoricamag őrleményt extraháltunk 5 cm³ acetonitril/víz 84/16 (v/v %) arányú keverékével vertikális rázó gép segítségével (2,5 óra). Az extraktumot centrifugáltuk (10 000 rpm, 10 perc). Laborban készített Al₂O₃/aktív szén keverékét tartalmazó szilárd fázisú extrakciós oszlopon (SPE; Al₂O₃/C=20/1) 1 cm³ extraktumot átengedtünk, majd az oszlopot 2 cm³ extrakciós oldószerekkel mostuk. Az oszlopon áthaladó extraktum és oldószer elegyét centrifugális bepárlóban bepároltuk. Visszaoldottuk 500 µl acetonitril/víz 20/80 (v/v%) elegyében és HPLC-fiolába pipettáztuk.

Az állófázis Polaris C18-A (5 µm, 100 x 4,6 mm-es oszlop) és (5 µm, 10 x 3 mm-es előtétoszlop) volt.

A mérés 219 nm-en, HPLC/DAD-ral történt, „A” (víz) és „B” (acetonitril) oldószerek alábbi gradienseivel:

1. 0 perc - 5 perc: 15% „B”
2. 5 perc - 8 perc: 15% „B”
3. 8 perc - 10 perc: 5% „B”
4. 10 perc - 12 perc: 5% „B”

Áramlási sebesség: 1 cm³/perc

Injektált térfogat: 10 µl

Oszlop hőmérséklete: 40 °C

A detekciót diódasoros detektorral (DAD), a kalibrációt egyszerű külső standard módszerrel végeztük el.

4.5.3. A *F. graminearum* törzsek toxintermelésének vizsgálata:

A *F. graminearum* izolátumokat (42 db) rizses táptalajra oltottuk. Egy és fél hétig szobahőmérsékleten tartottuk a lombikokat, majd újabb egy és fél hétre betettük 4 °C-ra a zearalenon (ZEA) termelés indukciója végett (Széchi, 2005 - módosítva). Ezt követően 2-3 kiskanálnyi mintát liofilizáltunk, majd ledaráltuk.

1. DON (dezoxinivalenol) és NIV (nivalenol) mérés:

A minták előkészítése és a mérés (HPLC/DAD) is a **4.5.2. fejezetben** leírt módon történt, azzal a kis különbséggel, hogy nem egy gramm mintával dolgoztunk, hanem csak fél gramm őrleményt extraháltunk 6 cm³ acetonitril/víz 84/16 (v/v %) arányú keverékével vertikális rázóógép segítségével (2,5 óra).

2. ZEA (zearalenon) mérés:

Fél gramm őrleményt extraháltunk 6 cm³ acetonitril/víz 75/25 (v/v %) arányú keverékével vertikális rázóógép segítségével (2,5 óra). Az extraktumot centrifugáltuk (10 000 rpm, 10 perc), majd GF/B üvegszál szűrőn 1,5 cm³ felülúszót HPLC-fiolába szűrtünk. A mérés LC/MS/MS módszerrel történt.

Az első mérési fázisban HP 1090 nagyhatékonyságú folyadékkromatográffal, víz („A”) és metanol („B”) oldószerek gradiensével:

1. 0 perc - 1 perc: 10% „B”
2. 1 perc - 7 perc: 100% „B”
3. 7 perc - 10 perc: 100% „B”
4. 10 perc - 12 perc: 10% „B”
5. 12 perc - 15 perc: 10% „B”

Áramlási sebesség: 0,3 cm³/perc

Injektált térfogat: 5 µl

Oszlop hőmérséklete: 40 °C

A mérés második szakaszában Varian 500MS ioncsapdás elektronporlasztásos ionforrással rendelkező tömegspektrométerrel mértünk, negatív ionizációval. Az azonosításra használt fragmens-ion: m/z 317,4>273,3. A kalibráció mátrixszal hígított külső standard módszerrel történt.

Megjegyzés: az általunk mért toxinok kimutatási határértéke minden esetben az egészségügyi határérték töredéke volt (például: DON-nál 1250 helyett 90 µg/kg).

4.6. Antagonista vizsgálatok csésze tesztekben *S. zeae* izolátumokkal:

Csésze tesztekben PDA táptalajon antagonizmus vizsgálatot végeztünk három különböző helyről származó *S. zeae* izolátummal; 2-2 *F. graminearum* (2011-es kukoricamagból származik), *F. culmorum* (búzáról lett izolálva, Mesterházy Ákos gyűjteménye), *F. verticillioides* (hazai kukoricáról lett izolálva 2008-ban) és *Aspergillus flavus* izolátummal szemben, két ismétlésben.

Az első teszt eredményei alapján 1-1,5 hét után a *F. graminearum* és *F. culmorum* esetében nem tapasztaltunk gátlási zónát, ezért most csak 2 db *F. verticillioides* (2011-es kukoricáról lettek izolálva) és 2 db *A. flavus* izolátummal párosítottuk a *S. zeae* törzseket (a többi izolátummal is: összesen 10 db), ugyanúgy két ismétlésben (**6. táblázat**).

A *S. zeae* törzsek mind a két kísérletben 2011-es brucki (B), dalmandi (D), hódmezővásárhelyi (H) és szegedi (Sz) kukoricáról, az *Aspergillus* izolátumok pedig 2008-as kiszombori kukoricáról származnak.

Csésze-tesztek PDA táptalajon			
<i>Sarocladium zeae</i> törzsek		Toxintermelő gombák	
Csésze-kód	Izolátum száma	Csésze-kód	Izolátum száma
Első tesztben		<i>F. graminearum</i>	
1	H232	1	Sz 46.06
2	Sz331	2	13.05
3	B331	<i>F. culmorum</i>	
Második tesztben		1	12551
1	B231	2	12375
2	B331	<i>F. verticillioides</i>	
3	B431	1	18 TÉ
4	B442	2	25 TÉ
5	B551	3	Sz 1.1.1.
6	D231	4	Sz 5.3.1.
7	H232	<i>Aspergillus flavus</i>	
8	H331	1	Af 126
9	Sz331	2	Af 171
10	Sz621	3	Af 137
Világosszürke: 1. kísérlet		4	Af 191

6. táblázat: Csésze tesztek PDA táptalajon –a vizsgált fajok listája
(saját táblázat)

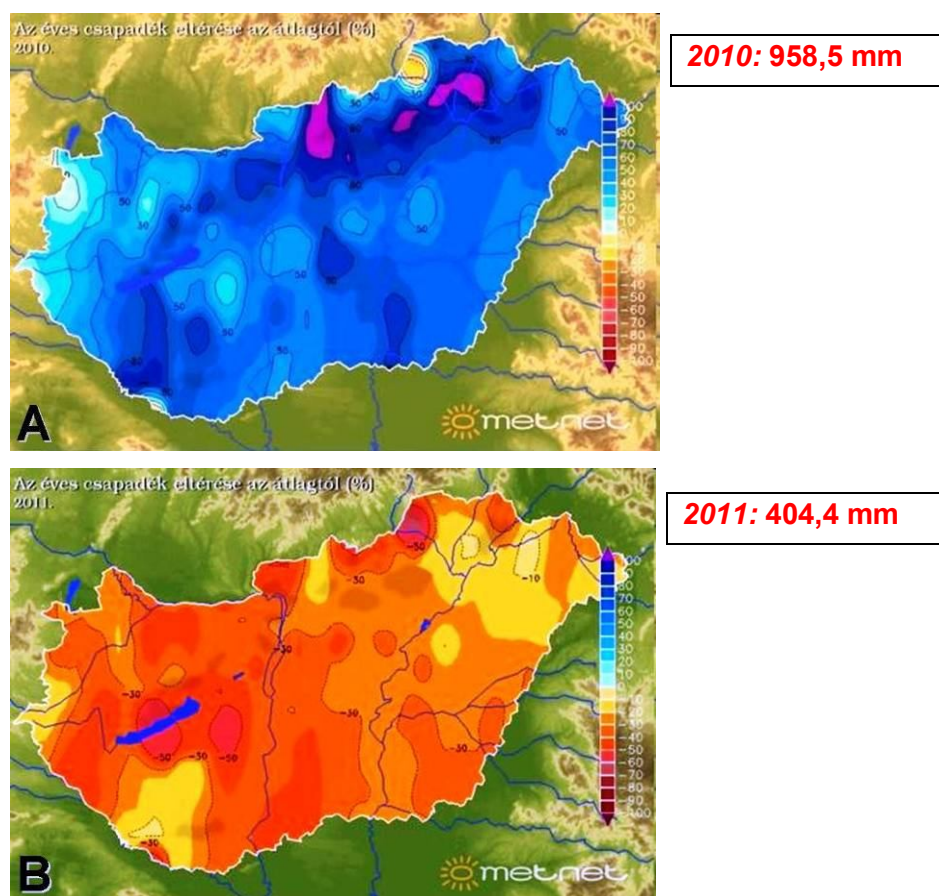
5. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

5.1. A *Fusarium* nemzetség tagjainak előfordulása kukorica magmintán:

5.1.1. A morfológiai meghatározás eredménye:

2010-ben összesen 104 *Fusarium* törzset izoláltunk kukoricaszemekről: a kétsopronyi mintákon 65 *Fusarium*-ot találtunk, a hódmezővásárhelyin 39-et. 2011-ben csak 45-öt: a ceglédi mintákon 11; a hódmezővásárhelyin 34 *Fusarium* telepet azonosítottunk. A két évben a 600 lerakott szemből (2x6x50) összesen 148 *Fusarium*-ot izoláltunk az alábbi fajeloszlásban: 47 db *F. graminearum*, 51 db *F. subglutinans*, 36 db *F. verticillioides* és 14 db *F. proliferatum*. A **Függelék 8.1.** részben található egy összesítő táblázat erről (**7. táblázat**).

A két évben talált *Fusarium* izolátumok száma közötti differencia az eltérő időjárási viszonyoknak volt köszönhető. 2010-ben csapadékosabb volt az időjárás a kukorica tenyészideje alatt a 2011-es szárazsághoz képest, ami a gombák növekedéséhez, terjedéséhez megfelelőbb környezetet szolgáltatott (**13. ábrák**).



13. ábrák: Az éves csapadék eltérése az átlagtól 2010-ben (A) és 2011-ben (B), mellettük az **évi átlagos csapadékmennyiség értéke** lett feltüntetve (Forrás: OMSZ)

Néhány fénymikroszkópos kép az izolált fajok közül (saját képek):

Megjegyzés: a kisebb képek egy adott részlet kinagyításai, ezért nem szerepel rajta méretskála.



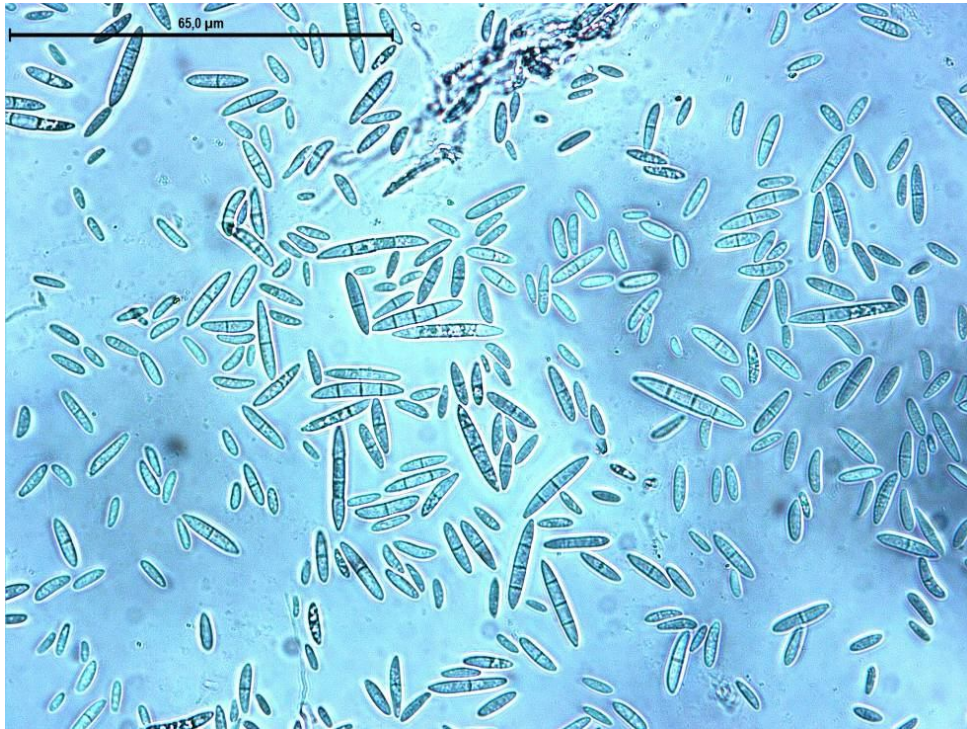
14. ábra: *F. graminearum* makrokonídiumok - tárgylemez

A *F. graminearum* makrokonídiumai egyenesek és közepesen sarló alakúak, általában 3-5 szeptumosak. A bazális sejt lábalakú, az apikális sejt kúpos (**14. ábra**). A konídiumok sporodochiumokban fejlődnek (**15. ábrák**).

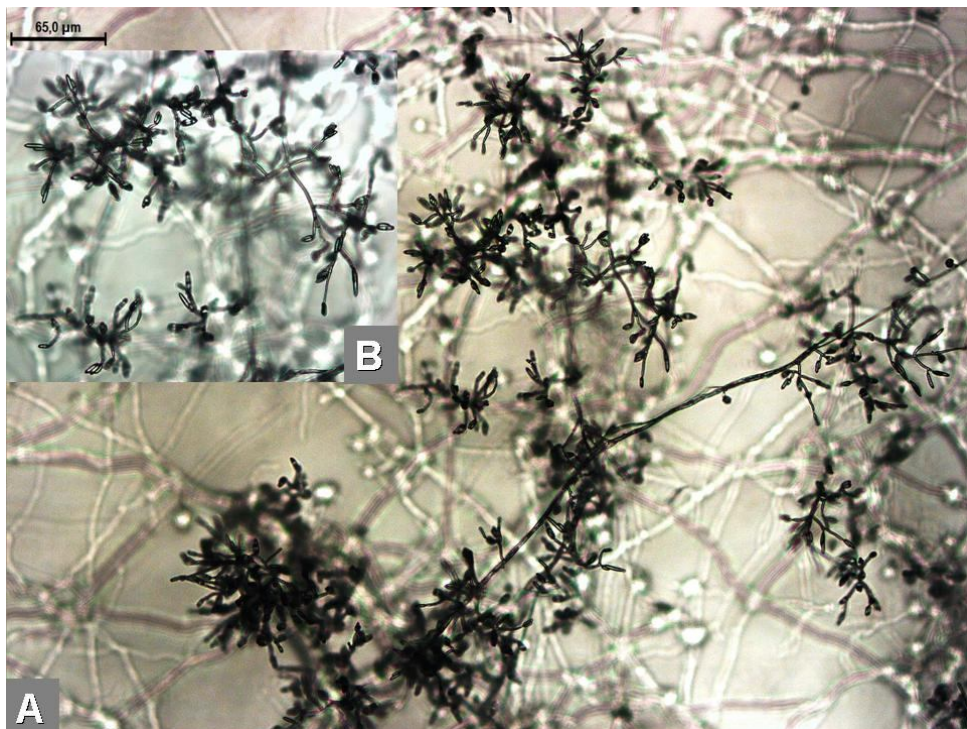


15. ábrák: *F. graminearum* szétesett sporodochiumok (A) és ép sporodochium (B) - in vivo

A *F. subglutinans* nagy mennyiségben termel mikro- és mezokonídiumokat, ezek ovális alakúak, az előbbi általában 0-, az utóbbi 1-3 szeptumos (**16. ábra**). Makrokonídiumot nem találtunk. A mikro és mezokonídiumok polifialidokon, álfejekben keletkeznek, a konídiofórok (konídiumtartók) elágazó/nem elágazó mono- és polifialidosak (**17. ábrák**).

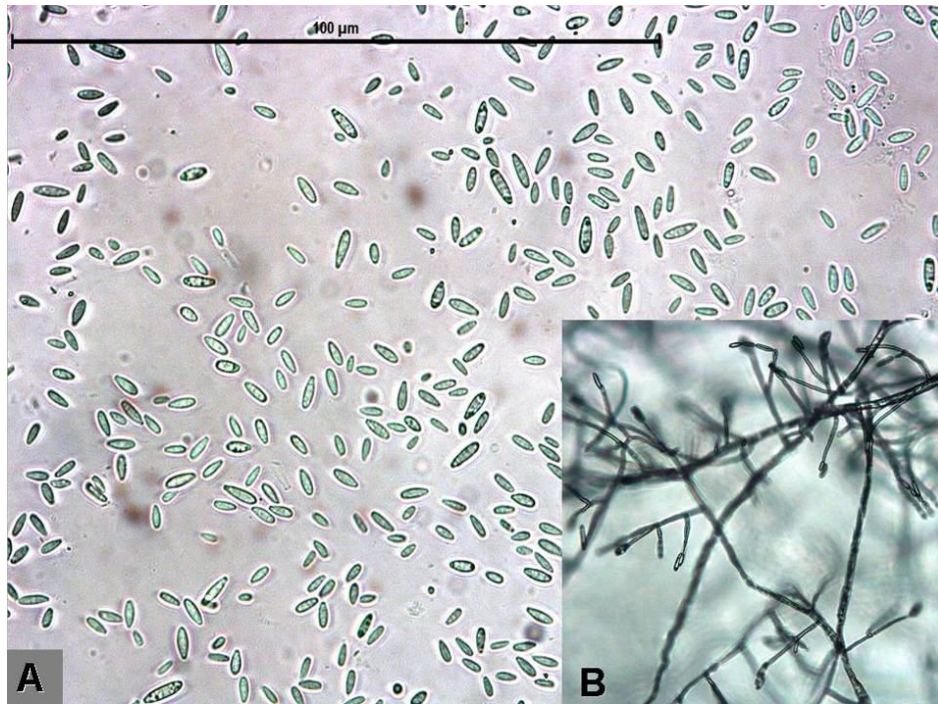


16. ábra: *F. subglutinans* mikro- és mezokonídiumok - tárgylemez

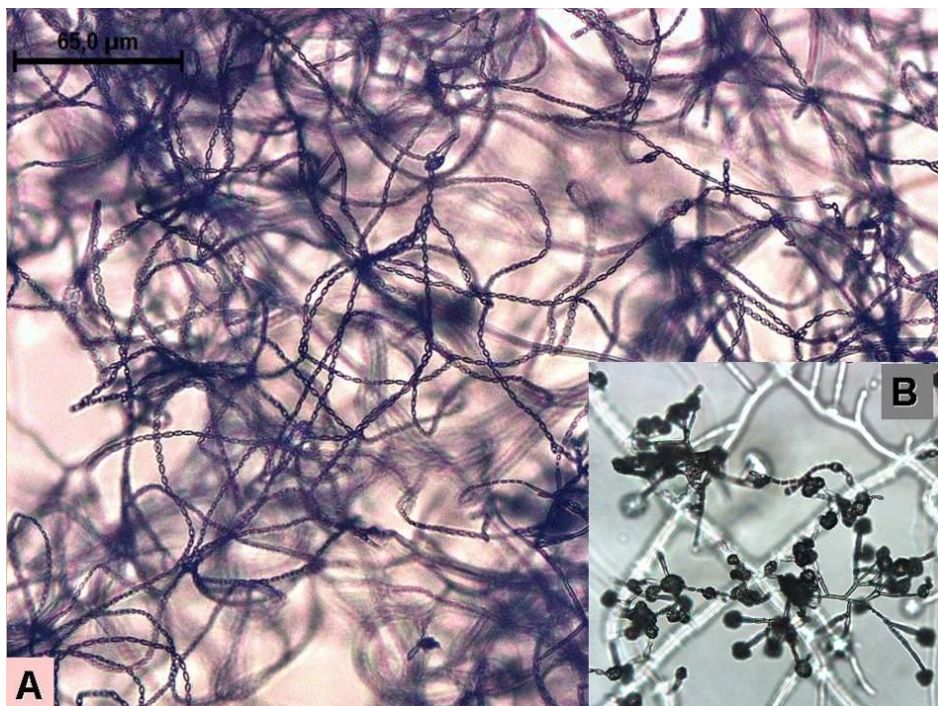


17. ábrák (A, B): *F. subglutinans* konídiumtartók (konídiofórok) – in vivo

A *F. verticillioides* rengeteg mikrokonídiumot termel az elágazó/nem elágazó monofialidokon, ezek 0 –szeptumosak és jellemzően bunkósbot alakúak lapított alappal (**18. ábrák**). Makrokonídium általában ritkán fordul elő, mi nem is találtunk. Hosszú láncokat és/vagy álfejeket formálnak, mikrokonídium aggregátumok is jelen lehetnek (**19. ábrák**).

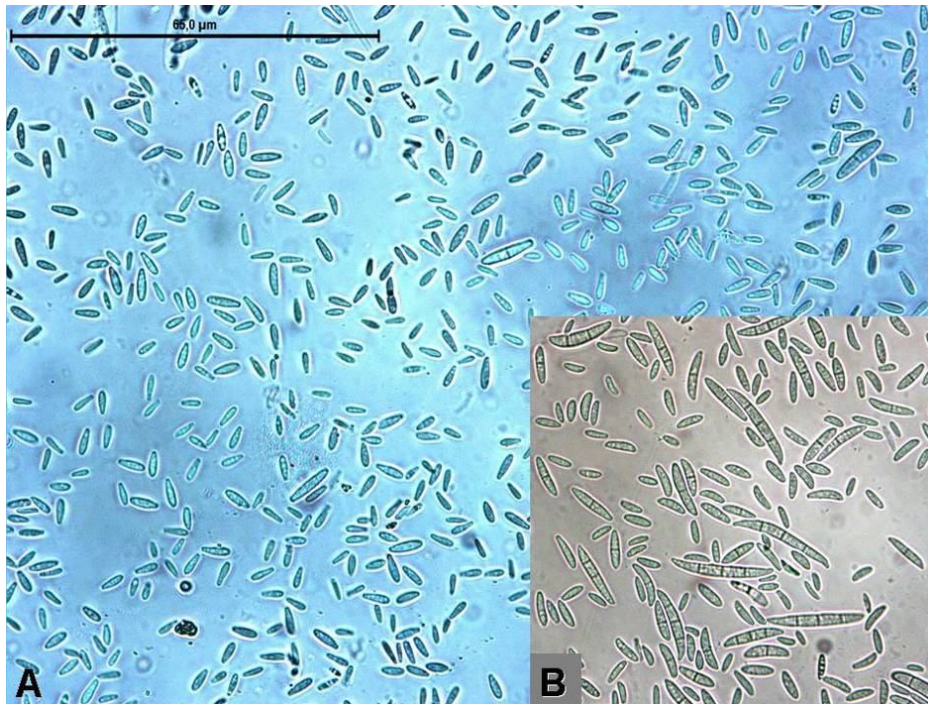


18. ábrák: *F. verticillioides* mikrokonídiumok (A - tárgylemez) és mikrokonidiofórok (B – *in vivo*)

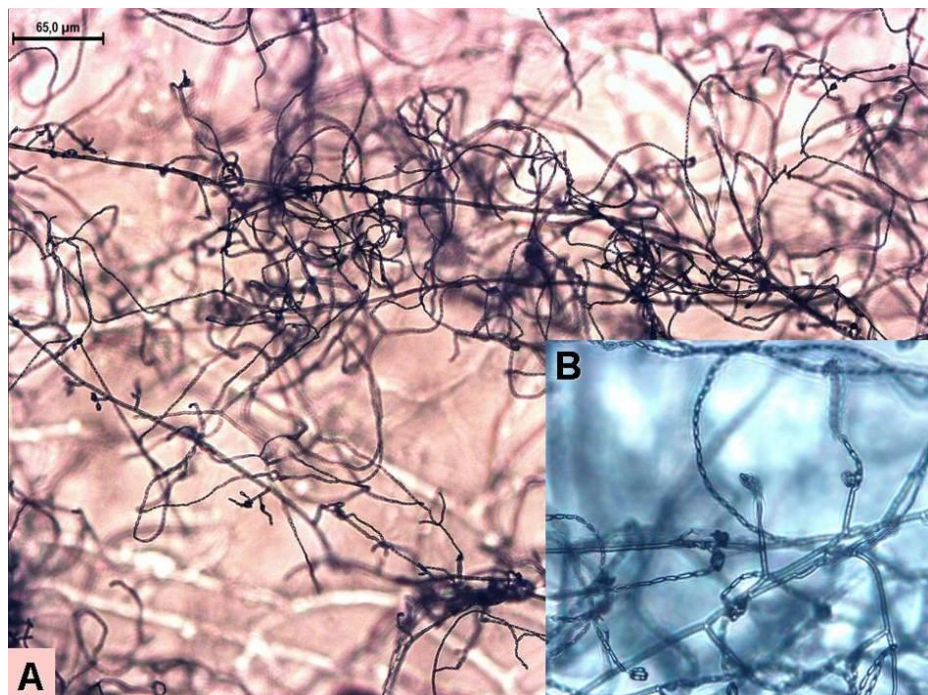


19. ábrák: *F. verticillioides* mikrokonídium láncokban (A) és álfejekben (B) – *in vivo*

A *F. proliferatum* nagy mennyiségben termel mikrokonídiumokat, ezek általában lapított alapú bunkósbot formájúak és 0-szeptumosak. A makrokonídiumok kissé sarló alakúak, 3-szeptumosak, ívelt apikális és lábformájú bazális sejttel (**20. ábrák**). A mikrokonídiumok eltérő hosszúságú elágazó/nem elágazó polifialidos láncokban és gyakran álfejekben fordulnak elő (**21. ábrák**).



20. ábrák: *F. proliferatum* mikrokonídiumok (A) és makrokonídiumok mikrokonídiummal (B) - tárgylemez



21. ábrák: *F. proliferatum* mikrokonídium láncok, álfejek és aggregátumok- in vivo

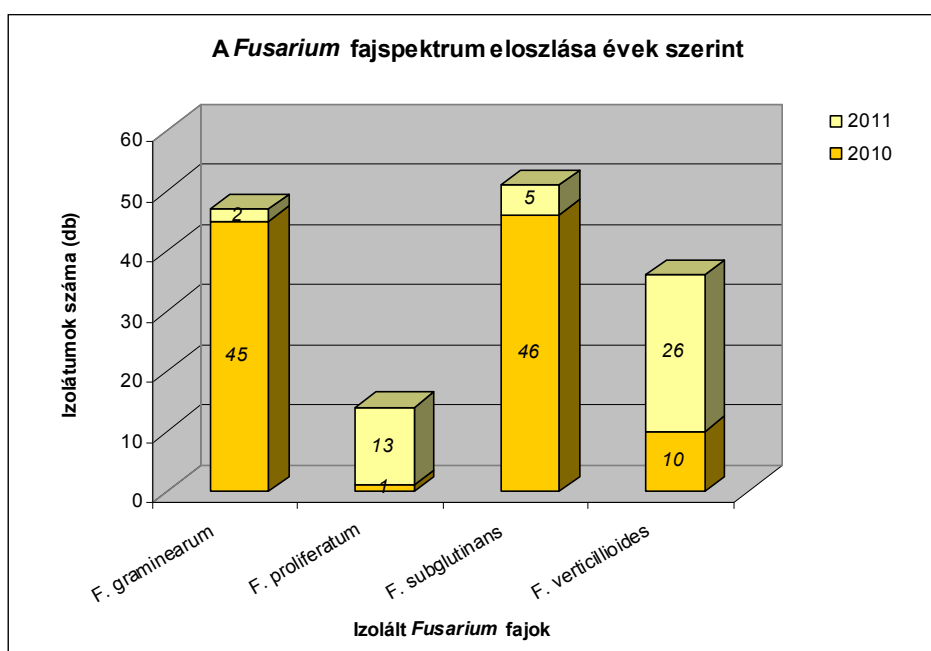
5.1.2. A molekuláris azonosítás eredménye:

2010-ben 54 *Fusarium* izolátumot választottunk ki molekuláris ellenőrzés céljából, 2011-ben 25-öt. 2010-ben ebből 40 igazolta molekulárisan a morfológiai meghatározás eredményét, 2011-ben pedig 19 gomba izolátumra volt ugyanez elmondható. A *Fusarium*-ok morfológiai elkülönítése, meghatározása nehéz és pontatlan, ezért volt szükség szekvencia alapú molekuláris azonosításra a GenBank adatbázis alapján. Ezt PCR reakcióval készítettük elő, a speciálisan *Fusarium*-ok identifikálására szolgáló 1- α transzlációs elongációs factor (TEF) parciális szekvenciáját amplifikáltuk megfelelő primerekkel.

Összességében nem volt nagy különbség a morfológiai és a molekuláris meghatározás között.

5.1.3. Az eredmények összevetése az 1974/75-ös felmérés adataival:

Kétéves felmérésünk eredményei részben hasonlóak az 1974-75-es felmérés adataihoz. 2010-ben csapadékosabb volt az időjárás (hasonlóan 1974-hez), ekkor a *F. graminearum* és a *F. subglutinans* előfordulási aránya volt a legnagyobb (46 és 44%), bár az utóbbi százalékos megoszlása kissé megnőtt a korábbi felmérés adataihoz képest, valószínűleg a számára kedvezőbb időjárási feltételek miatt. A szárazabb időjárású 2011-es évben (mint 1975-ben) a *F. verticillioides* (26%) került előtérbe (**22. ábra**). Összességében elmondható, hogy a korábbi felméréshez képest találtunk némi eltérést a domináns *Fusarium* fajok eloszlásában.

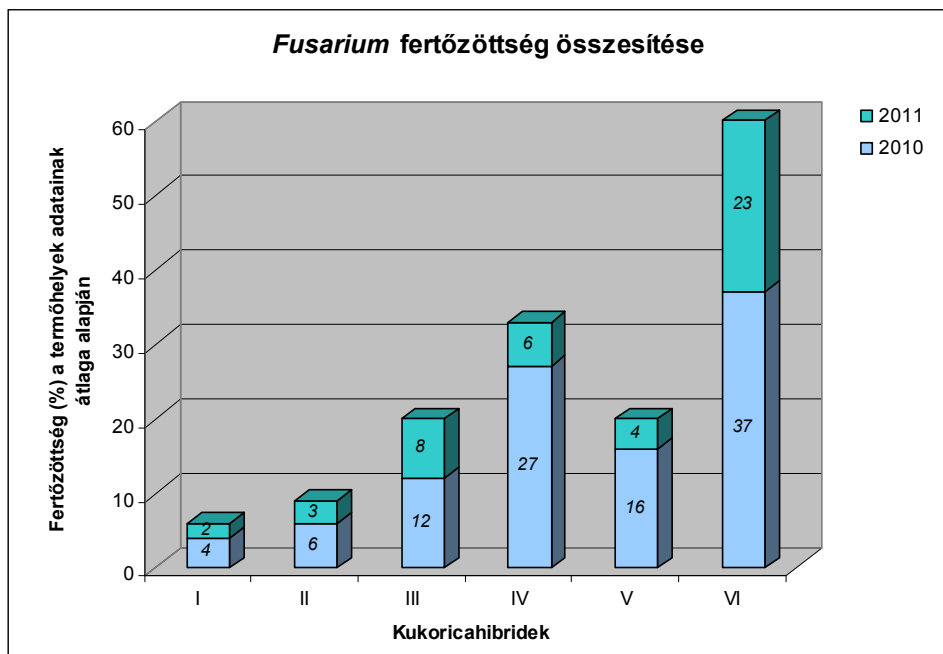


22. ábra: A *Fusarium* fajok eloszlása évek szerint (saját ábra)

5.2. A különböző ellenállóságú kukorica hibridekről származó *Fusarium* fajok előfordulási arányának és toxintermelésének összehasonlítása:

5.2.1. A kukorica hibridek *Fusarium* fertőzöttsége a két vizsgált évben:

Megállapítható, hogy az első három rezisztens hibrid a csoportjának megfelelően kevésbé fertőződött meg, mint az érzékenyebb fajták (23. ábra).

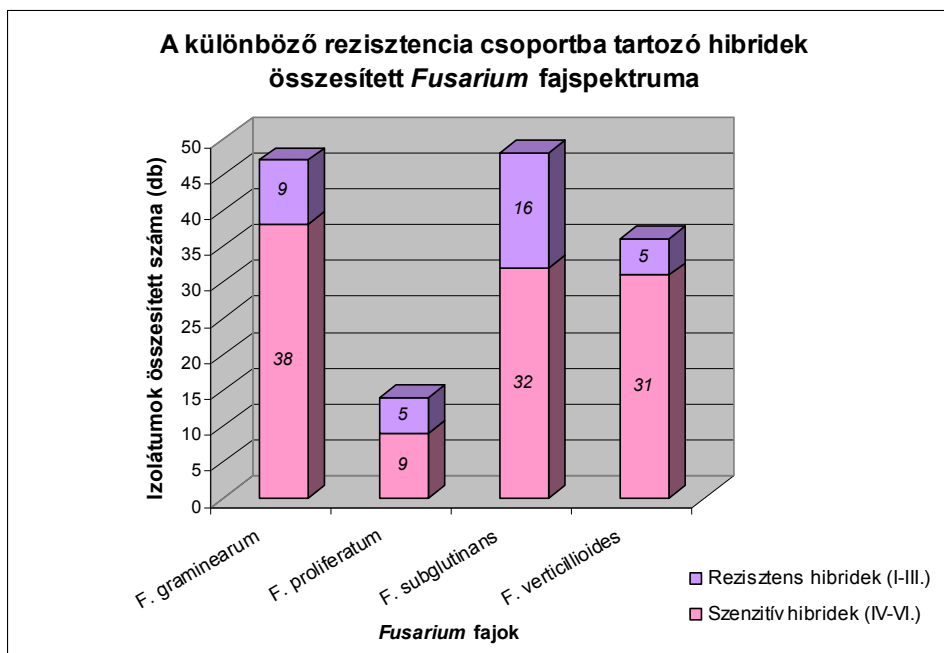


23. ábra: *Fusarium* fertőzöttségi összesítése szerint (saját ábra)

A szenzitív csoportból kivételt képez a V. hibrid, ami a *Fusarium*-ra ellenállóbb III. hibridhez hasonlóan viselkedett. Ez azonban nem jelenti még azt, hogy rezisztens lenne, a rezisztenciaviszonyok megállapításához további kísérletekre lenne szükség, több termőhelyen.

Összességében látható, hogy a I. hibrid 3%-ban, a II. 4,5%-ban, a III. 10%-ban, a IV. 16,5%-ban, a V. szintén 10%-ban és a VI. pedig 60%-ban volt *Fusarium* fertőzött a vizsgált két évben.

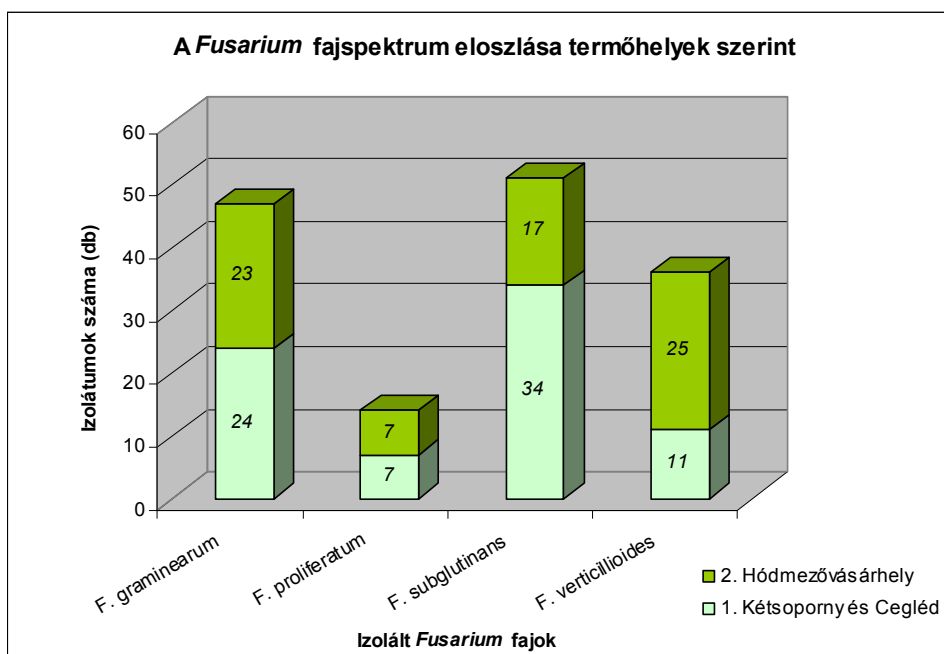
A különböző rezisztencia csoportba tartozó hibridek *Fusarium* fajspektrumát összevetve: eddigi eredményeink alapján nem volt lényeges eltérés a *Fusarium* fajok arányában a rezisztens és fogékony hibridek között (24. ábra). De további vizsgálatokra lenne szükség, mivel kevés mintaszám (csak két termőhelyet vizsgáltunk) miatt a fogékonyabb hibridekről többszörös mennyiségű izolátumot kaptunk a két év alatt, mint az ellenállóbbakról, így a fajspektrumbeli eltérések nem igazán értékelhetők.



24. ábra: A különböző rezisztenciacsoportba tartozó hibridek összesített *Fusarium* fajspektruma (saját ábra)

5.2.2. A fajspektrum eloszlása termőhelyek szerint:

A 35 évvel korábbi felméréssel megegyezően nem tapasztaltunk termőhelyenként jelentős különbséget a domináns *Fusarium* fajok eloszlásában (25. ábra).



25. ábra: A *Fusarium* fajspektrum eloszlása termőhelyek szerint (saját ábra)

A vizsgált helyeken mindenhol egyenlő mértékben fordult elő a *F. graminearum*, a *F. proliferatum*. A *F. subglutinans* izolátumok előfordulása a

duplája volt az első termőhely csoportnál, mint a másodiknál, ugyanez igaz a *F. verticillioides*-re, csak fordítva és egy kicsit nagyobb arányban.

5.2.3. A toxinanalízis eredménye:

2010-ben a Hódmezővásárhelyről származó II. és III. hibrid kukorica magmintájából, és Kétsopronyból származó III. hibrid esetében sem detektáltunk a kimutatási határérték felett toxinokat. Ugyanez volt igaz a 2011-es Ceglédről származó II., III., IV. és VI. hibrid kukorica mintájára, valamint a Hódmezővásárhelyről származó I., II., IV. és V. hibrid esetében is. A **Függelék 8.1.** részben találhatóak a toxinanalízis pontos eredményei (**6. táblázat**).

Összességében elmondható, hogy nem találtunk lényeges fumonizin (B_1 és B_2) és dezoxinivalenol (DON) szennyezettséget a többi kukoricahibrid magmintájában sem, mennyiségük jóval az EU egészségügyi határérték alatt volt mind a két évben.

5.3. A *Fusarium graminearum* izolátumok taxonómiai meghatározása, fajkomplexen belüli eloszlása, toxintermelő képességének vizsgálata:

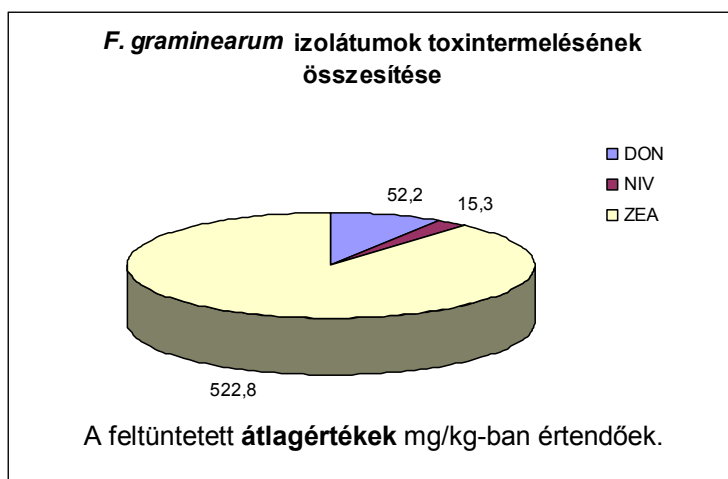
5.3.1. Taxonómiai meghatározás, fajkomplexen belüli eloszlás:

Amerikai kutatók, O'Donnell és munkatársai (2000), Ward és munkatársai (2002), valamint Sarver és munkatársai (2011) a *F. graminearum* faj globális variabilitását vizsgálták több génszakasz szekvenálási analízisével. A kutatók többek között az ammónia liáz, foszfát permeáz, 3-O-aciltranszferáz, a translációs elongációs faktor alfa ($ET-1\alpha$), a β -tubulin és egy feltételezett reduktáz gén szakaszait vizsgálták. Munkájuk során a faj 15 genetikailag eltérő és földrajzilag elkülönülő populációját azonosították. Ezeket később önálló fajokként írták le; így jelenleg 15 faj tartozik a *F. graminearum* fajkomplexbe. Kukoricán, nemzetközi adatok alapján, a *F. boothi*, a *F. graminearum sensu stricto* és *F. meridionale* volt jellemző.

A kukoricáról származó hazai *F. graminearum* izolátumok (42 db) hasonló jellegű vizsgálatát végeztük el a TRI101 gén parciális szekvencia adatai alapján. Eredményeink alapján ezek a törzsek a *F. graminearum sensu stricto* fajba tartoznak, a molekuláris törzsfák ábrája megtalálható a **Függelék 8.2.** részben (**2. ábra**). A 40-42-es izolátumok azonosítása még folyamatban van. Hazánkban búzán eddig Tóth és munkatársai (2005) a *F. graminearum sensu stricto*, a *F. boothi*, és a *F. vörösi* (első leírás: Starkey, 2007) fajba tartozó izolátumokat azonosították.

5.3.2. A *F. graminearum* törzsek toxintermelő képessége:

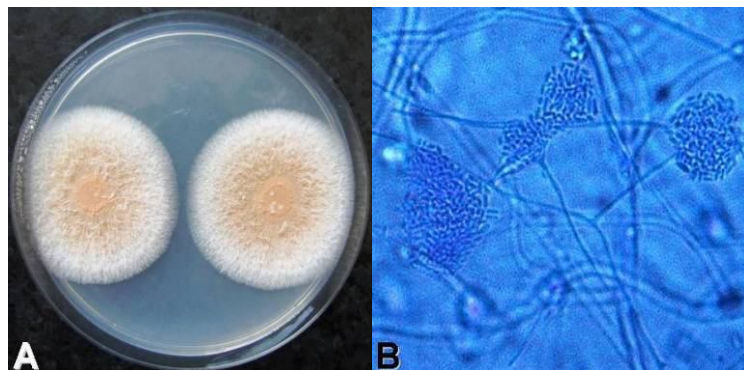
A kapott toxinadatok megállapítható, hogy a *F. graminearum sensu stricto* izolátumok legnagyobb mennyiségben zearalenont termeltek (39 minta átlaga alapján), ezt a dezoxinivalenol (24 minta átlaga alapján) követte, majd elenyésző mennyiségben a nivalenol, csupán öt izolátumnál tudtuk a jelenlétét kimutatni (**26. ábra**). A DON esetében az adatok 400-0,8 és ZEA-nál 1200-6 közötti skálán mozogtak. A legtöbb dezoxinivalenolt (323,1 mg/kg) és nivalenolt (51,3) a 2010-es kétsopronyi VI.-os hibridről izolált 4-es törzs, zearalenont pedig legnagyobb mennyiségben (1188,1 mg/kg) a hódmezővásárhelyi VI.-os mintán talált 42-es izolátum termelt. A **Függelékben** található a kapott toxineredményeket összefoglaló részletes **8. táblázat**.



26. ábra: A *F. graminearum* izolátumok toxintermelő (DON, NIV, ZEA) képessége
(saját ábra)

5.4. Potenciális biokontroll izolátumok toxintermelő gombák ellen:

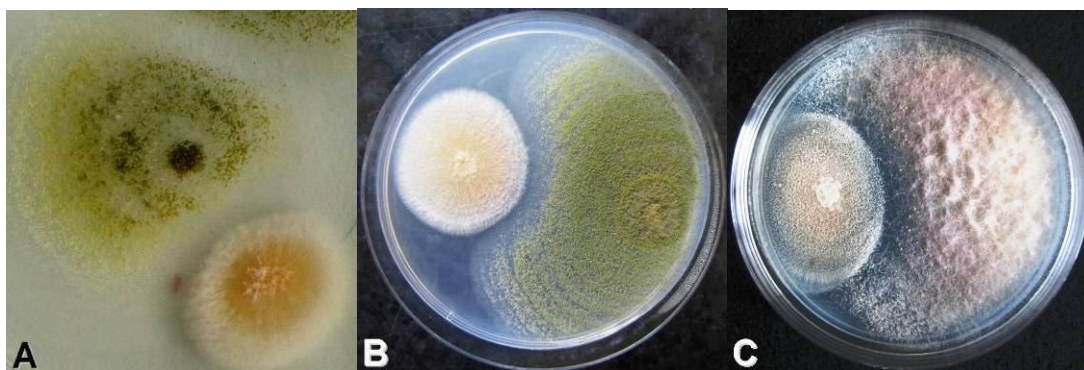
Munkánk során 2011-es brucki, dalmandi hódmezővásárhelyi és szegedi termőterületekről származó mintákból azonosítottunk több endofita ***Sarocladium zeae* (*Acremonium zeae*)** izolátumot (**27. ábrák**). Ez az első adat hazai előfordulásáról.



27. ábrák: *Sarocladium zeae* izolátum PDA táptalajon (A) és a konídiumtartók fénymikroszkópos képe (B) (saját kép)

Csésze tesztekben antagonista vizsgálatokat végeztük a *Sarocladium* izolátumokkal PDA táptalajon. Irodalmi adatok alapján a *F. verticillioides* általában elfedi a *S. zeae* jelenlétét. Az első kísérletben 1-1,5 hét után ugyanezt tapasztaltuk a vizsgált *F. verticillioides* mellett a *F. culmorum* és *F. graminearum* esetében is. Gátlási zónát csak a B331-es *Sarocladium* izolátum esetében, az *A. flavus* 171-es törzse ellen láttunk **(28. ábra, A)**.

A vizsgálatot a többi *S. zeae* (10 db) törzs, valamint további kettő *F. verticillioides* és kettő *A. flavus* izolátum bevonásával megismételtük. Eredményeink alapján, 1-1,5 hét elteltével, a *S. zeae* D231-es törzse az *A. flavus* 137-es és 191-es törzsét is akadályozta a növekedésben, míg a B551-es törzs az *A. flavus* 191-es izolátumát gátolta **(28. ábra, B)**. A *F. verticillioides* izolátumok esetében ismételten nem tapasztaltunk igazi gátlási zónát 1,5 hét elteltével sem. Azonban a csészéket tovább figyelve, újabb 1,5-2,5 hét elteltével a *F. verticillioides* Sz531-es törzse esetében is megjelentek ezek, a B551-es *S. zeae* kivételével, mind a tíz *Sarocladium* izolátum hatásaként. A Sz111-es *Fusarium*-ot csak a B331-es *S. zeae* gátolta. A később kialakult gátlási zónák feltűnése valószínűleg annak volt köszönhető, hogy a *S. zeae* extrém lassan növekvő faj, így gátló ereje (feltehetően a pyrrocidin antibiotikumok termelése miatt) csak később tudott megnyilvánulni az agresszív növekedésű *F. verticillioides*-sel szemben.



28. ábra: A *S. zeae* B331 gátlási zónája *A. flavus* 171-es (A) és a *S. zeae* B551 *A. flavus* 191-es törzse (B), valamint *F. verticillioides* Sz531-es törzse (C) esetében (saját kép)

Sikerült kimutatni talajmintából *Clonostachys rosea* jelenlétét is, mely szintén fontos szerepet játszhat a toxintermelő mikróbák visszaszorításában, a zearalenon biodegradációja révén (irodalmi adatok alapján). Tervezzük a későbbiekben ezen gombák tanulmányozását is.

6. AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

Hazánkban 1977 óta nem publikáltak adatot a kukorica *Fusarium*-os fertőzöttségéről és fajspektrumáról. Kétéves felmérést végeztünk két termőhelyről származó 6-6 kukoricahibrid (I-III: ellenálló és IV-VI: fogékony) magmintáiból. Az izolátumok meghatározása morfológiai bélyegek és molekuláris módszerek segítségével történt, a magminták fumonizin és DON tartalmát megmértük. Felmérésünk eredményei részben hasonlóak a 35 évvel ezelőtti munka adataihoz, a csapadékos 2010-ben a *F. subglutinans*, és *F. graminearum*; a száraz 2011-ben a *F. verticillioides* előfordulása volt a mérvadó. Azonban a domináns fajok eloszlásában tapasztaltunk némi különbséget: 2010-ben a *F. subglutinans* előfordulási aránya megnőtt a korábbi adatokhoz képest, a *F. graminearum* előfordulása nem volt állandó (valószínűleg mindkét változás az időjárási feltételeknek köszönhető). Az 1974/75-ös felméréshez képest *F. culmorum*-ot nem tudtunk kimutatni, de találtunk mind a két évben *Fusarium proliferatum*-ot, amelyre 35 évvel ezelőtt nem volt példa. A fogékonyabb hibridekről többszörös mennyiségű izolátumot kaptunk a két év alatt, mint az ellenállóbbakról, így ez utóbbi alacsony izolátumszáma miatt a fajspektrumbeli eltérések nem voltak értékelhetőek, bár eddigi eredményeink alapján nem találtunk eltérést a különböző rezisztencia csoportú hibridek *Fusarium*-os fertőzöttsége között. A magmintákból kimutatott fumonizin (B₁ és B₂) és dezoxinivalenol (DON) mennyisége az egészségügyi határérték alatt volt mind a két évben.

A kukoricáról származó hazai *F. graminearum* populáció molekuláris vizsgálata alapján az izolátumok a *F. graminearum sensu stricto* fajba tartoznak. A kapott toxinadatokból megállapítható, hogy ezek a legnagyobb mennyiségben zearalenont termeltek (39 minta átlaga alapján), ezt a dezoxinivalenol (24 minta átlaga alapján) követte, majd elenyésző mennyiségben a nivalenol, csupán öt izolátumnál tudtuk a jelenlétét kimutatni. Hazánkban búzáról elsősorban a *F. graminearum sensu stricto*, a *F. boothii*, és a *F. vörösi* fajt izolálták.

Munkánk során azonosítottunk több endofita *Sarocladium (Acremonium) zeae* izolátumot is. Ez a faj a mikotoxinogén *F. verticillioides* és az *A. flavus* antagonistája, ez az első adat hazai előfordulásáról. Találtunk talajmintában *Clonostachys rosea*-t is, ami a zearalenon biodegradációjában játszik szerepet irodalmi adatok alapján.

7. FELHASZNÁLT IRODALOM

7.1. Könyvek, egyetemi jegyzetek:

- Booth C: The Genus *Fusarium*, Commonwealth Mycology Inst., Surrey, England, 237 pp., 1971
- John F. Leslie, Brett A. Summerell: The *Fusarium* Laboratory Manual, Blackwell Publishing, 2006
- John F. Peberdy (Editor): *Penicillium and Acremonium*, Springer, 1987
- Kevei Ferenc, Kucsera Judit: Mikrobiológia I., JATEPress, 2004
- Menyhért Zoltán (szerk): A kukoricatermesztés kézikönyve, Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, 1985
- Mesterházy Ákos: A betegségekkel szembeni rezisztencianemesítés genetikai alapjai, Szegedi Gabonatermesztési Kutató Kht., 2006
- Nagy János: Kukoricatermesztés. Budapest, Akadémiai Kiadó, 2007
- Paul E. Nelson, T. A. Toussoun, and W. F. O. Marasas (Editors): *Fusarium* Species - An Illustrated Manual for Identification, 1990
- Robert W. Jugenheimer: Corn Improvement, Seed Production, and Uses, A Wiley-Interscience Publication, 1976
- Vajna László (szerk): Növénypatogén gombák, Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, 1987
- Varga János, Téren József, Tóth Beáta, Kocsubé Sándor, Rigó Krisztina: Gombák másodlagos anyagcseretermékei: mikotoxinok, gombamérgek, JATEPress, 2009
- Wolfgang Gerlach, Helgard Nirenberg: The Genus *Fusarium* – a Pictorial Atlas, Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, 1982

7.2. Publikációk:

- Békésy P, Hinfner K (1970): Adatok a kukorica fuzáriumos megbetegedésének ismeretéhez (Data on the *Fusarium* spp. in maize). *Növényvédelem*, 6:13-18
- Bíróné GM (1975): Kukoricán károsító *Fusarium* fajok elterjedése és toxikológiai vizsgálata. *Kandidátusi disszertáció*, Gödöllő
- Douglas King A (Jr), Hocking AD, Pitt J (1979): Dichloran Rose Bengal Medium for Enumeration and Isolation of Molds from Foods. *Applied and Environmental Microbiology*, 37(5):959-964.

- Focke I (1966): *Fusarium culmorum* (W. G. Dm.) Sacc. und *F. moniliforme* Sheld. Als Erreger von Kolbenfäulen des Maises (*Zea mays* L.) im Mitteldeutschen Raum. *Wiss. Z. Univi, Rostock, Mat. – Natwiss. Reihe*, 15:219-227.
- Geiser MD, Jiménez-Gasco M, Kang S, Makalowska I, Ward TJ, O'Donnel K and et al (2004): Fusarium-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology*, 110:473-479.
- Hideaki K, Naoko T-A, Makoto K, Rie O, Isamu Y ad Hiroyuki O (2002): Biotransformation of the Mycotoxin, Zearalenone, to a Non-estrogenic Compound by a Fungal Strain of *Clonostachys* sp. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 66 (12):2723-2726.
- Hornok L, Békési P, Giczey G, Jeney A, Nicholson P, Parry DRA, Xu X (2005): Kalászfuzariózis kórokozók előfordulása és mikotoxin szennyeződés mértéke magyarországi őszibúza állományokban 2001-2004 között. *Növénytermelés*, 54:217-235.
- Jolánka M (2011): A kukorica változatlanul a figyelem középpontjában. *Agrofórum extra* 42, 5-7.
- Koechler B (1954): Some conditions influencing the results from corn seed treatment tests. *Phytopathology*, 44:575-583.
- Lamprecht SC, Tewoldemedhin YT, Botha WJ, and Calitz FJ (2011): *Fusarium graminearum* Species Complex Associated with Maize Crowns and Roots in the KwaZulu-Natal Province of South Africa. *Plant Disease*, 95:1153-1158.
- Lásztity R (2009): A *Fusarium* és a mikotoxinok (Mit kell tudnia a gabonatermelőnek és feldolgozónak?). *Sütőiparosok és pékek* 5.
- Malhipour A (2010): Genetic analysis of resistance to *Fusarium* head blight in wheat (*Triticum* spp.) using phenotypic characters and molecular markers. By A thesis submitted to the *Faculty of Graduate Studies* of the University of Manitoba in partial fulfilment of the requirements of the degree of DOCTOR of PHILOSOPHY, Winnipeg
- Marton LCs, Pintér J, Hadi G, Árendás T és Bónis P (2011): Szemesnek korait, silómak későbbi hibridet válasszunk. *Agrofórum extra* 42, 84-88.
- Matsushima T (1971): Microfungi of the Solomon Islands and Papua-New Guinea. *Nippon Printing Publication Co.*, Kobe, Japan
- Mesterházy Á (1974b): *Fusarium* diseases of wheat and tritcale in South-East Hungary. *Cereal Research Communications*, 2:167-173.

- Mesterházy Á, Vojtovics M (1977): A kukorica *Fusarium* spp. okozta fertőzöttségének vizsgálata 1972-1975-ben (Rate of *Fusarium* spp. infection in maize 1972-1975). *Növénytermelés* 26, 5:367-378.
- Mesterházy Á (1984a): Új eljárás a kukorica fuzarózissal szembeni nemesítésében és a rezisztencia vizsgálatokban. *Növényvédelem* 20, 269.
- Mesterházy Á (1984b): *Fusarium* species of wheat in South Hungary, 1970-1983. *Cereal Research Communications*, 12:167-170.
- Mesterházy Á (1995): Types and components of resistance against *Fusarium* head blight of wheat. *Plant Breeding*, 114:377-386..
- Mesterházy Á, Lemmens M, Reid ML (2012): Breeding for resistance to ear rots caused by *Fusarium* spp. in maize – a review. *Plant Breeding* 131, 1-19.
- Miraglia M, Marvin HJP, Kleter GA, et al (2009): Climate change and food safety: An emerging issue with special focus on Europe. *Food and Chemical Toxicology* 47, 1009–1021.
- Nagy J, Ványiné SzA (2011): A hazai kukoricatermesztés nemzetközi összehasonlításban. *Agrofórum 42 extra*, 8-13.
- Nash SN, Synder WC (1962): Quantitative estimations by plate counts of propagulus of bean rot *Fusarium* in field soils. *Phytopathology*, 73:462-485.
- Nelson PE, Tousson TA, Marasas WFO (1983): *Fusarium* Species: An Illustrated Manual for Identification. *Pennsylvania State University Press*, Pennsylvania
- Nirenberg HI (1976a): Untersuchungen über die morphologische und biologische Differenzierung in der *Fusarium* Sektion *Liseola*. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt Für Land- und Forstwirtschaft* (Berlin – Dahlem) 169: 1-117.
- Nirenberg HI (1976b): Untersuchungen über die morphologische und biologische Differenzierungen in der *Fusarium* Sektion *Liseola*. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt Für Land- und Fortwissenschaft* (Berlin-Dahlem) 209, 1-405.
- O'Donnel K, Kistler HC, Cigelnik E, Ploetz RC (1997): Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings by the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95:2044-2049.
- O'Donnel K, Kistler HC, Tacke KB. and Howard HC (2000): Gene genealogies reveal global phylographic structure and reproductive isolation among

- lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. *PNAS* 97, 14:7905-7910.
- Papavizas G (1967): Evaluation of various media and antimicrobial agents for isolation of *Fusarium* of soil. *Phytopathology*, 57:848-852.
- Sarver AJB, Ward TJ, Gale RL, Broz K, Kistler HC, Takayuki A, Nicholson P, Carter J, O'Donnell K (2011): Novel *Fusarium* head blight pathogens from Nepal and Louisiana revealed by multilocus genealogical concordance. *Fungal Genetics and Biology*, (Article in press).
- Schroers HF, Samuels G, Seifert, Gams W SCHIMMELCULTURES (1999): Classification of the mycoparasite *Gliocladium roseum* in *Clonostachys* as *C. rosea*, its relationship to *Bionectria ochroleuca*, and notes on other *Gliocladium*-like fungi. *Mycologia*, 91(2):365–385.
- Seifert KAT, Aoki RP, Baayen D, Brayford LW, Burgess SCh, Gams WD, Geiser, DJ, Leslie JF, Logrieco A, Marasas WFO, Nirenberg HI, O'Donnell K, Rheeder JP, Samuels GJ, Summerell BA, Thrane U, and Waalwijk C (2003): The name *Fusarium moniliforme* should no longer be used. *Mycological Research* 107: 643-644.
- Snyder WC, Hansen HN (1940): The species concept in *Fusarium*. *American Journal of Botany* 27: 64-67.
- Snyder WC, Hansen HN (1941): The species concept in *Fusarium* with reference to section *Martiella*. *American Journal of Botany* 28: 738-742.
- Snyder, WC, Hansen HN (1945): The species concept in *Fusarium* with reference to *Discolor* and other sections. *American Journal of Botany* 32: 657-666.
- Snyder, WC, Hansen HN (1954): Variation and speciation in the genus *Fusarium*. *Annals of the New York Academy of Sciences* 60: 16-23.
- Stamets P, Chilton JS (1983): The Mushroom Cultivator. A Practical Guide to Growing Mushrooms at Home. *Agarikon Press*, Olympia, WA.
- Starkey D.E, Ward TJ, Aoki,T, Gale LR, Kistler HC, Geiser DM, Suga,H, Tóth B, Varga J, O'Donnell K (2007): Novel *Fusarium* Head Blight species and trichothecene toxin chemotype diversity within the United States, Europe, Asia and Australia revealed by multilocus gene genealogies. *Fungal Genetics and Biology*, 44: 1191-1204.

- Szeitzné SzM (szerk.): Gabonalapú élelmiszerek fuzáriumtoxin szennyezettségének csökkentési lehetőségei. *Magyar Élelmiszer-biztonsági Hivatal*, 2009.
- Széchi Á, Bartók T, Varga M, Magyar M, Mesterházy Á (2005): Determination of Trichothecene Chemtypes of *Fusarium graminearum* Strains Isolated in Hungary. *Phytopathology*, 153:445-448
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
- Tóth B, Mesterházy Á, Horváth Z, Bartók T, Varga M, Varga J. (2005): Genetic variability of Central European isolates of the *Fusarium graminearum* species complex. *European Journal of Plant Pathology*, 113: 35-45.
- Tu C (1930): Physiologic specialization in *Fusarium* spp. causing head blight in small grains. University of Minesota, Agric. Expt. Stat, Tech. Bul. No. 74.
- Varga E, Potori R (2011): Kukoricapiaci összefoglaló, ismét rekordok dőlnek. *Agrofórum extra* 42, 20-22.
- Vincent JM (1970): A Manual for the Practical Study of the Root Nodule Bacteria. *Blackwell, Oxford*.
- Ward TJ, Bielwiski PJ, Kistler HC, Sullivan E, O'Donnel K (2002): Ancestral polymorphism and adaptive evolution in the trichothecene mycotoxin gene cluster of phytopathogenic *Fusarium*. *PNAS* 14, 99:9278-9283.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA gene for phylogenetics. *Pages 315-322 in: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* by Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, and White TJ, eds. *Academic Press*, New York.
- Wicklow DT, Roth Dh, Deyrup TS, Gloer BJ (2005): A protective endophyte of maize: *Acremonium zeae* antibiotics inhibitory to *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. *Mycological Research* 109, 5:610-618.
- Wollenweber HW, Reinking OA (1935): *Die Fusarien*, ihre Beschreibung, Schadwirkung und Bekämpfung. *Verlag Paul Parey, Berlin*, Germany.

8. FÜGGELÉK

8.1. Táblázatok:

<i>Fusarium</i> taxonómia		
Synder és Hansen által leírt fajok	Wollenweber és Reinking által leírt szekciók	<i>Fusarium</i> fajok Leslie és Nelson munkássága alapján
<i>F. episphaeria</i>	Eupionnotes Macroconia	<i>F. dimerum</i> , <i>F. merismoides</i> , <i>F. aquaeductum</i>
<i>F. lateritium</i>	Lateritium	<i>F. lateritium</i>
<i>F. moniliforme</i>	Liseola	<i>F. anthophilum</i> , <i>F. circinatum</i> , <i>F. proliferatum</i> , <i>F. subglutinans</i> , <i>F. thapsinum</i> , <i>F. verticillioideus</i> , és más fajok a <i>Gibberella fujikuroi</i> komplexből
<i>F. nivale</i>	Arachnites	nem tartják már <i>Fusarium</i> -nak, ma a <i>Microdochium</i> -nak hívják
<i>F. oxysporum</i>	Elegans	<i>F. oxysporum</i>
<i>F. rigidiuscula</i>	Spicarioides	<i>F. decemcellulare</i>
<i>F. roseum</i>	Discolor	<i>F. sambucinum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. pseudo-graminearum</i> , <i>F. crookwellense</i> (vagy <i>F. cerealis</i>), <i>F. torulosum</i>
	Gibbosum	<i>F. equiseti</i> , <i>F. acuminatum</i> , <i>F. longipes</i> , <i>F. compactum</i> (<i>F. equiseti</i> var. <i>compactum</i>), <i>F. armeniacum</i> (<i>F. acuminatum</i> spp. <i>armeniaceum</i>)
	Roseum	<i>F. heterosporum</i> (szinonímák: <i>F. graminum</i> , <i>F. reticulatum</i>), <i>F. avenaceum</i>
	Arthrosporiella	<i>F. semitectum</i> , <i>F. camptoceras</i>
<i>F. solani</i>	Martiella, Ventricosum	<i>F. solani</i>
<i>F. tricinctum</i>	Sporotrichiella	<i>F. clamydosporum</i> , <i>F. poe</i> , <i>F. sporotrichoides</i> , <i>F. tricinctum</i>

1. táblázat: A *Fusarium* nemzetség taxonómiája; a vastagon kiemelt *Fusarium* fajok

Nelson és mtsai által lettek az adott helyre sorolva

(Forrás: Nelson és mtsai, 1990; Leslie és mtsai, 2006)

Megjegyzések:

A táblázatban szerepel a Synder és Hansen által az 1940-es és 1950-es években leírt 9 összevont faj is. a kiemelt fajok Nelson és munkatársai munkássága (1990) alapján lett az adott szekcióba sorolva. A ***Martiella***, ***Ventricosum*** és ***Elegans*** szekció tagjai pedig elsősorban talajlakó szaprofiták, de növénypatogének is lehetnek. A *F. sambucinum* a *Fusarium bactridioides*-t, a *F. oxysporum* pedig a *Fusarium udum* és a *Fusarium redolens* fajokat is magába foglalja.

Fusarium fajok által termelt mikotoxinok				
Mikotoxin	Típus	Hatástípus, -mechanizmus	Tünetek	Termelő faj
Moniliformin	diketid	gátolja a piruvát-dehidrogenázt, cito- és fitotoxikus	állatok: izomgyengeség, légzésbénulás, szívizomdegeneráció, kóma	<i>F. avenaceum</i> , <i>F. proliferatum</i> , <i>F. sporotrichoides</i> , <i>F. culmorum</i>
Fumonizinek (B₁, B₂, B₃, B₄, stb),	nonaketid	szfingozin analóg - zsírsav anyagcserére hat	sértés tüdővízenyő, lovak agylágyulása, májrák egérben és patkányban, gerincvelőzáródási rendelleneségek, akut mikotoxikózis (India)	<i>F. verticillioides</i>
Zearalenon (ZEA vagy F-2 toxin)	nonaketid	ösztrogén mikotoxin	gombákban szexhormon, állatokban vulvovaginitist okoz, ember - korai nemi érés	<i>F. graminearum</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F. culmorum</i>
TRICHOTECÉNEK szeszkviterpén típusúak				
T-2 toxin	"A" típusú egyszerű tetraciklikus	fő target: csontvelő sejtjei, limfociták, placenta	szédélgés, fejfájás, látászavar, hányás, stb	<i>F. sporotrichoides</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. tricinctum</i>
deoxynivalenol (DON vagy vomitoxin)	"B" típusú egyszerű tetraciklikus	emetikus (hánytató), immunszuppresszív	karcinogén, vese-, májkárosító, fekélyek, bélgyulladás, magzatelhalás	<i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i>
nivalenol (NIV)	trichotecének			<i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i>
TAXOL	diterpén szárm.	sejtosztódást gátol	tumorellenes hatású	<i>Fusarium sp.</i>
GIBBERELLINEK	diterpénsav származék	növényi hormon	szármegnyúlás, virágzásindukció, stb	<i>Gibberella fujikuroi</i>
Fusarin-C	hibrid másodlagos metabolit: 2-pirrolidon származék		mutagén, karcinogén	<i>F. verticillioides</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F. sporotrichoides</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. poe</i> , <i>F. heterosporum</i>
Equisetin	hibrid másodlagos metabolit	gyenge antibiotikus hatás, fitotoxikus és a HIV integráz potens inhibitora	G+ baktériumok ellen, nekrotikus léziókat okoz a növényen	<i>F. heterosporum</i> , <i>F. equiseti</i> , <i>F. semitectum</i>
Fuzárium-sav	Szt.-Gy.-Krebs-ciklus interm.-ből származtatható 2. metabolit: 5-butil-pikolinsav	gátolja a sejtosztódást és a DNS-szintézist, antivirális a herpesz szemben	sértés: hányás, letargia, hasmenés, csökkent immunválasz, vérnyomás-csökkentő	<i>F. oxysporum</i> , <i>F. verticillioides</i> , <i>F. heterosporum</i> , <i>F. subglutinans</i> , <i>F. crookwellense</i>
Beauvericin Enniatin	hexadepszi-peptidek	antibiotikus, rákellenes, inszekticid, ionofór (kation transzportot indukál)		<i>Fusarium sp.</i> , <i>Beauveria brassica</i>

2. táblázat: A Fusarium fajok által termelt mikotoxin típusok bemutatása és jellemzésük

(Forrás: Varga és mtsai, 2009)

Néhány <i>Fusarium</i> faj anamorf teleomorf neve	
Teleomorf	<i>Fusarium</i> fajok
<i>Gibberella</i> fajok	
<i>G. acuminata</i>	<i>F. acuminatum</i>
<i>G. avenacea</i>	<i>F. avenaceum</i>
<i>G. intermedia</i>	<i>F. proliferatum</i>
<i>G. moniliformis</i>	<i>F. verticilloides</i>
<i>G. pulicaris</i>	<i>F. sambucinum</i>
<i>G. subglutinans</i>	<i>F. subglutinans</i>
<i>G. tricincta</i>	<i>F. tricinctum</i>
<i>G. zeae</i>	<i>F. graminearum</i>
<i>Haematonectria</i> fajok	
<i>H. haematococca</i>	<i>F. solani</i>

3. táblázat: *Fusarium* fajok ivaros (teleomorf) alakjai
(Forrás: Leslie és mtsai, 2006)

Kukorica hibridek érési ideje alapján történő csoportosítása (FAO-számok)						
FAO	Érési csoport	Típus	Tenyésztési idő hossza (nap)	Átlag hőmérséklet-igény FAO alapján (°C)	Érési idő	Termeszthető
100-199	extra korai					
	igen korai	szemes és silóhibrid	130 - 140	14,5 - 15,5	augusztus utolsó harmada, szeptember első harmada, közepe	az ország északi és nyugati tájréseinek főnövény
200-299						
	korai	szemes és silóhibrid	140 - 150	16,5 - 17,5	szeptember második harmada, közepe, második fele	az ország északkeleti és nyugati tájrészek nagy részén
300-399						
	középkorai	szemes és silóhibrid	150 - 160	19,5	szeptember második fele, utolsó harmada és október eleje	az ország középső és déli (fő kukorica-termesztő régiókban) részében
400-499						
	középérésű	szemes és silóhibrid	160 - 170	20,5	október első harmada, közepe, második fele	nagyobb rész az ország déli részein
500-599						
600-699	középkésői	hazánkban termesztésben lévőek				Megjegyzés az igen korai és korai típus termesztéséhez: máshol búza előveteményként vagy korai másodveteményként termesztendő.
700-799	késői					
800-899	igen késői					
900-999	extra késői					

4. táblázat: Kukorica hibridek érési idő alapján történő csoportosítása
(Forrás: Menyhért, 1985)

Táptalaj receptek			
Fusarium törzsek izolálásához		Meghatározáshoz	
PCNB (PPA/Nash-Synder Medium)		PDA	1 literhez (g)
1 literhez	g		
pepton	15,0	Dextróz	20,0
KH ₂ PO ₄	1,0	Agar	20,0
MgSO ₄	0,5	Burgonya	250,0
PCNB (pentakloronitro-benzén)	0,8	SNA	1 literhez (g)
Agar	20,0	KH ₂ PO ₄	1,0
Kézmelegre történő lehűlés után mértük bele:		KNO ₃	1,0
Streptomycin	20 ml	MgSO ₄	0,5
Neomycin	12 ml	KCl	0,5
Antibiotikum törzsoldat (100 ml steril deszt. vízben)		Glükóz	0,2
Streptomycin-szulfát	5,0	Szacharóz	0,2
Neomycin	1,0	Agar	20,0
Sarocladium és Clonostachys törzsek izolálásához		Az izolált S. zeae telepek	
DRBA (DRBC Agar base, Fluka)		növesztése PDA táptalajon	
1 literhez	g	történt, a molekuláris	
Dichloran Rose bengal Agar	31,5	meghatározásig.	

5. táblázat: A morfológiai meghatározás során alkalmazott táptalajok receptje

(Forrás: Leslie és mtsai, 2006)

Toxinanalízis - magmintákról					
Mintavételi hely	Minta	Fumonizin			Trichotecének
		FB ₁	FB ₂	Össz F.	DON
(év)	(hibrid)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)
Hódmezővásárhely (2010)	I.	0,79	0,07	0,86	
	IV.	0,11		0,11	0,27
	V.				4,13
	VI.				0,45
Kétsoprony (2010)	I.	0,12		0,12	0,49
	II.				0,73
	IV.	0,12		0,12	0,49
	V.				1,63
	VI.				3,07
Hódmezővásárhely (2011)	III.	1,46	0,44	1,90	
	VI.	0,27		0,27	
Cegléd (2011)	I.	0,12		0,12	
	V.				0,39
2010-ben a Hódmezővásárhelyről származó II. és III. hibrid kukorica mintájában, és Kétsopronyból származó III. hibrid esetében sem detektáltak a kimutatási határérték felett toxinokat. Ugyanez látható 2011-ben a Ceglédről származó II., III. és VI. hibrid kukorica mintája, valamint a Hódmezővásárhelyről származó II. és V. hibrid mintája esetében is.					

6. táblázat: A magminták toxinanalízisének eredménye (saját táblázat)

Magyarázat: Az üresen hagyott helyeken nem detektáltunk toxint a kimutatási határérték felett.

2010-es <i>Fusarium</i> fajlista morfológiai meghatározás alapján										2011-es <i>Fusarium</i> fajlista morfológiai meghatározás alapján										Színek jelentése
Kétsoprony					Kétsoprony					Cegléd					2010-ben eltérő izolátumok. 2011-ben minden minta el lett tárolva.					
VI. hibrid		IV. hibrid			II. hibrid		III. hibrid			I. hibrid		VI. hibrid								
1	<i>F. graminearum</i>	2-I	<i>F. subglutinans</i>		1	<i>F. verticillioides</i>	1	<i>F. graminearum</i>		1	<i>F. graminearum</i>	1	<i>F. graminearum</i>							
2	<i>F. subglutinans</i>	3-I	<i>F. sporotrichioides</i>		2	<i>F. subglutinans</i>	2	<i>F. subglutinans</i>		2	<i>F. subglutinans</i>	2	<i>F. verticillioides</i>							
3	<i>F. sporotrichioides</i>	3-II	<i>F. sporotrichioides</i>		3	<i>F. subglutinans</i>	4	<i>F. subglutinans</i>		4	<i>F. subglutinans</i>	8	<i>F. sporotrichioides</i>							
4	<i>F. subglutinans</i>	4	<i>F. sporotrichioides</i>		4	<i>F. proliferatum</i>	Hódmezővásárhely													
5	<i>F. verticillioides</i>	7	<i>F. subglutinans</i>			I. hibrid		III. hibrid			I. hibrid		VI. hibrid							
7	<i>F. subglutinans</i>	8	<i>F. graminearum</i>			1	<i>F. sporotrichioides</i>	1	<i>F. graminearum</i>		1	<i>F. graminearum</i>	2	<i>F. verticillioides</i>						
8	<i>F. subglutinans</i>	10	<i>F. graminearum</i>			2	<i>F. subglutinans</i>	2	<i>F. graminearum</i>		2	<i>F. graminearum</i>	3	<i>F. proliferatum</i>						
9	<i>F. verticillioides</i>	14	<i>F. graminearum</i>			3-I	<i>F. graminearum</i>	3	<i>F. subglutinans</i>		2	<i>F. verticillioides</i>	5	<i>F. verticillioides</i>						
10	<i>F. subglutinans</i>	15	<i>F. subglutinans</i>			4-II	<i>F. graminearum</i>	4	<i>F. graminearum</i>		6	<i>F. verticillioides</i>	6	<i>F. verticillioides</i>						
11	<i>F. subglutinans</i>	16	<i>F. graminearum</i>			II. hibrid		VI. hibrid			I. hibrid		VI. hibrid							
12	<i>F. graminearum</i>	18	<i>F. graminearum</i>			1	<i>F. subglutinans</i>	7	<i>F. graminearum</i>		1	<i>F. verticillioides</i>	2	<i>F. proliferatum</i>						
13	<i>F. graminearum</i>	21	<i>F. subglutinans</i>			2	<i>F. graminearum</i>	8	<i>F. graminearum</i>		3	<i>F. verticillioides</i>	3	<i>F. verticillioides</i>						
14	<i>F. graminearum</i>	25	<i>F. subglutinans</i>			V. hibrid		VI. hibrid			1	<i>F. verticillioides</i>	4	<i>F. proli v. verti</i>						
15	<i>F. sporotrichioides</i>	27	<i>F. graminearum</i>			1A	<i>F. graminearum</i>	9	<i>F. sporotrichioides</i>		5	<i>F. verticillioides</i>	5	<i>F. verticillioides</i>						
16	<i>F. proliferatum</i>	30	<i>F. graminearum</i>			1B-1	<i>F. graminearum</i>	1	<i>F. proliferatum</i>		6	<i>F. verticillioides</i>	6	<i>F. proliferatum</i>						
17	<i>F. graminearum</i>	31A	<i>F. graminearum</i>			1B-2	<i>F. graminearum</i>	4	<i>F. graminearum</i>		7	<i>F. subglutinans</i>	7	<i>F. proli v. verti</i>						
18	<i>F. verticillioides</i>	31B	<i>F. graminearum</i>			2	<i>F. subglutinans</i>	5	<i>F. sporotrichioides</i>		8	<i>F. proliferatum</i>	8	<i>F. proli v. verti</i>						
19	<i>F. subglutinans</i>	32	<i>F. subglutinans</i>			3	<i>F. graminearum</i>	6	<i>F. graminearum</i>		9	<i>F. subglutinans</i>	9	<i>F. verticillioides</i>						
20	<i>F. graminearum</i>	37	<i>F. subglutinans</i>			4	<i>F. graminearum</i>	7	<i>F. graminearum</i>		10	<i>F. subglutinans</i>	10	<i>F. verticillioides</i>						
1A	<i>F. subglutinans</i>	38	<i>F. graminearum</i>			5	<i>F. graminearum</i>	8	<i>F. subglutinans</i>		11	<i>F. subglutinans</i>	11	<i>F. verticillioides</i>						
2B	<i>F. subglutinans</i>	40	<i>F. graminearum</i>			6	<i>F. proliferatum</i>	9	<i>F. subglutinans</i>		12	<i>F. verticillioides</i>	12	<i>F. verticillioides</i>						
3C	<i>F. sporotrichioides</i>	41	<i>F. subglutinans</i>			7	<i>F. graminearum</i>	11	<i>F. subglutinans</i>		13	<i>F. verticillioides</i>	13	<i>F. verticillioides</i>						
4D	<i>F. subglutinans</i>	44	<i>F. subglutinans</i>			8	<i>F. graminearum</i>	IV. hibrid		V. hibrid		14	<i>F. verticillioides</i>							
5E	<i>F. subglutinans</i>	46	<i>F. sporotrichioides</i>			9	<i>F. sporotrichioides</i>	1	<i>F. graminearum</i>		15	<i>F. verticillioides</i>	15	<i>F. verticillioides</i>						
6F	<i>F. subglutinans</i>	V. hibrid			10	<i>F. graminearum</i>	5	<i>F. graminearum</i>		16	<i>F. verticillioides</i>	16	<i>F. verticillioides</i>							
7G	<i>F. graminearum</i>	1.	<i>F. subglutinans</i>		11	<i>F. graminearum</i>	7	<i>F. verticillioides</i>		17	<i>F. verticillioides</i>	17	<i>F. verticillioides</i>							
8H	<i>F. verticillioides</i>	2.	<i>F. graminearum</i>		9	<i>F. graminearum</i>		IV. hibrid		VI. hibrid		18-19	<i>F. verticillioides</i>							
9i	<i>F. subglutinans</i>	3C-I.	<i>F. graminearum</i>		9	<i>F. graminearum</i>		IV. hibrid		VI. hibrid		20	<i>F. verticillioides</i>							
10J	<i>F. graminearum</i>	3C-II.	<i>F. graminearum</i>		9	<i>F. graminearum</i>		IV. hibrid		VI. hibrid		21	<i>F. verticillioides</i>							

A tisztítás, iB. elkülönítés során kettőszórt izolátumok, ezek egynek számítanak.
Ezeknek az izolátumoknak a morfológiai adatai eltérnek a molekuláris azonosítás adatoktól.
A táblázatban még a morfológiailag meghatározott fajnév szerepel.

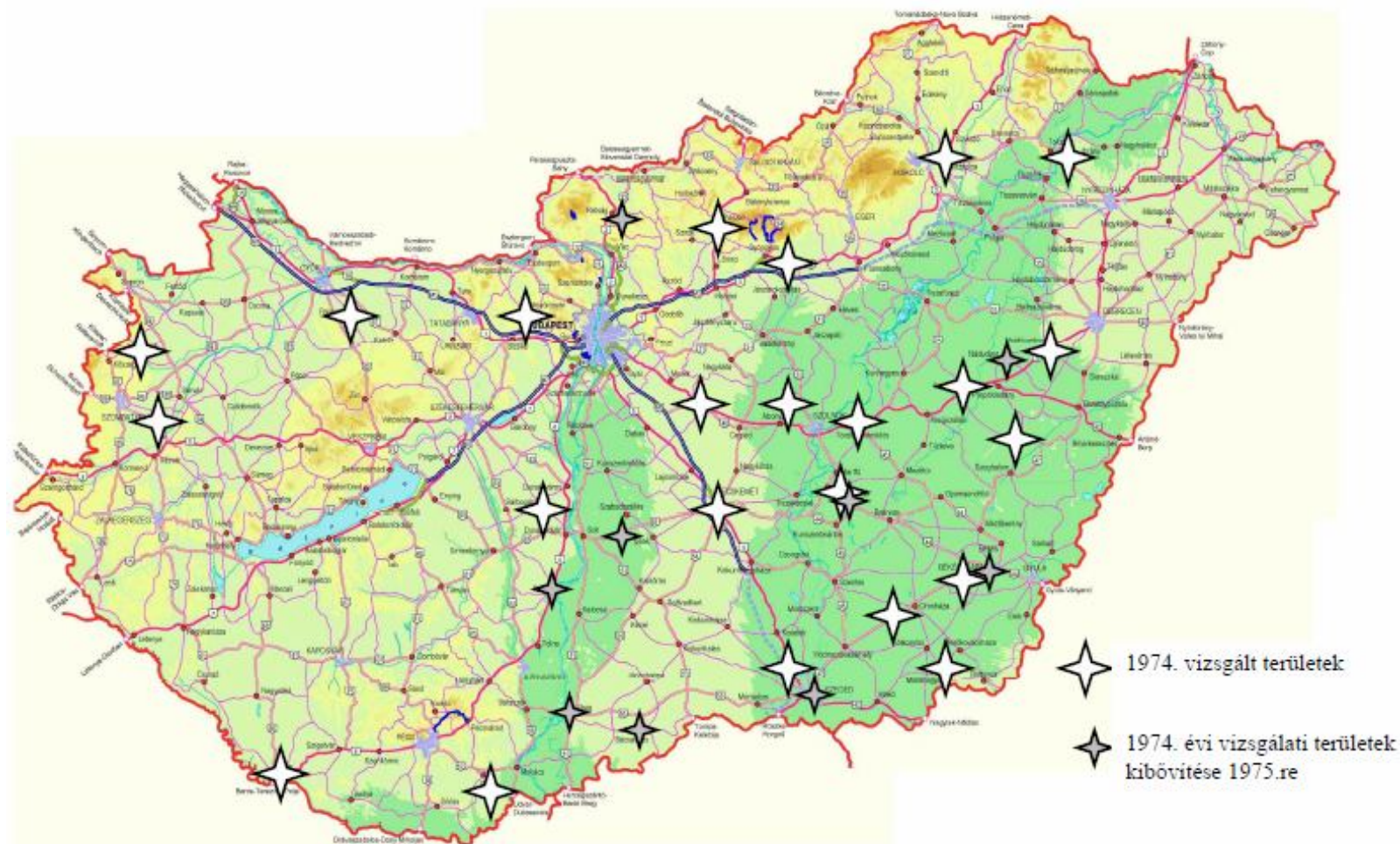
7. táblázat: A morfológiai meghatározás eredménye (saját táblázat)

A <i>F. graminearum</i> törzsek toxintermelésének vizsgálata					
Hely, hibrid	Izolátum száma	Szekvenálás kódja	Toxinmérés		
			DON	NIV	ZEA
H, V	3	1	189,5		119,2
H, IV	5	2		10,1	
	9	3	5,5		876,2
KS, VI	14	4	323,1	51,3	15,5
KS, IV	18	5			463,3
KS, V	2	6	202,8		222,3
KS, IV	3II-B	8	0,8		334,3
	3II-A	9		2,7	449,6
H, II	2	10	168,5		809,7
KS, VI	12	11			652,4
KS, IV	31B	12	2,3		845,8
KS, VI	1	13			6,2
KS, IV	31A	14	4,8		683,4
KS, VI	20	15	4,8		557,9
H, III	7	16	17,0		652,2
KS, IV	27	17	8,6		109,4
KS, VI	17	18			337,8
H, I	3-I	19	70,9	6,5	218,8
H, IV	1	20			788,6
H, VI	4	21	28,8		862,3
KS, VI	13	22	14,9		740,3
	11	23			394,6
	07G	24	1,7		813,3
H, III	2	25	40,2		
H, V	8	26			184,0
KS, IV	14	27	71,7		229,9
H, V	10	28			1129,5
KS, V	3C-I	29			366,6
	3c-II	30			408,3
H, III	1	31	13,9		890,4
	8	32	1,7		132,3
H, V	1A	33	22,3		786,2
	1B-I	34	25,4		628,0
	1B-II	35		5,9	28,9
	4	36			266,5
	5	37	1,7		509,1
C, I	1	38			353,2
C, VI	1	39	13,9		971,1
KS, VI	10J	40			410,4
H, VI	6	41	17,0		955,3
	7	42			1188,1
A világosszürke minták 2011-es kukoricáról származnak.		Átlag	52,2	15,3	522,8
		Szórás	83,30	20,30	323,68
		Korrigált szórás (SEM)	12,85	3,13	49,95

8. táblázat: A *F. graminearum* törzsek toxintermelésének vizsgálata (saját táblázat)

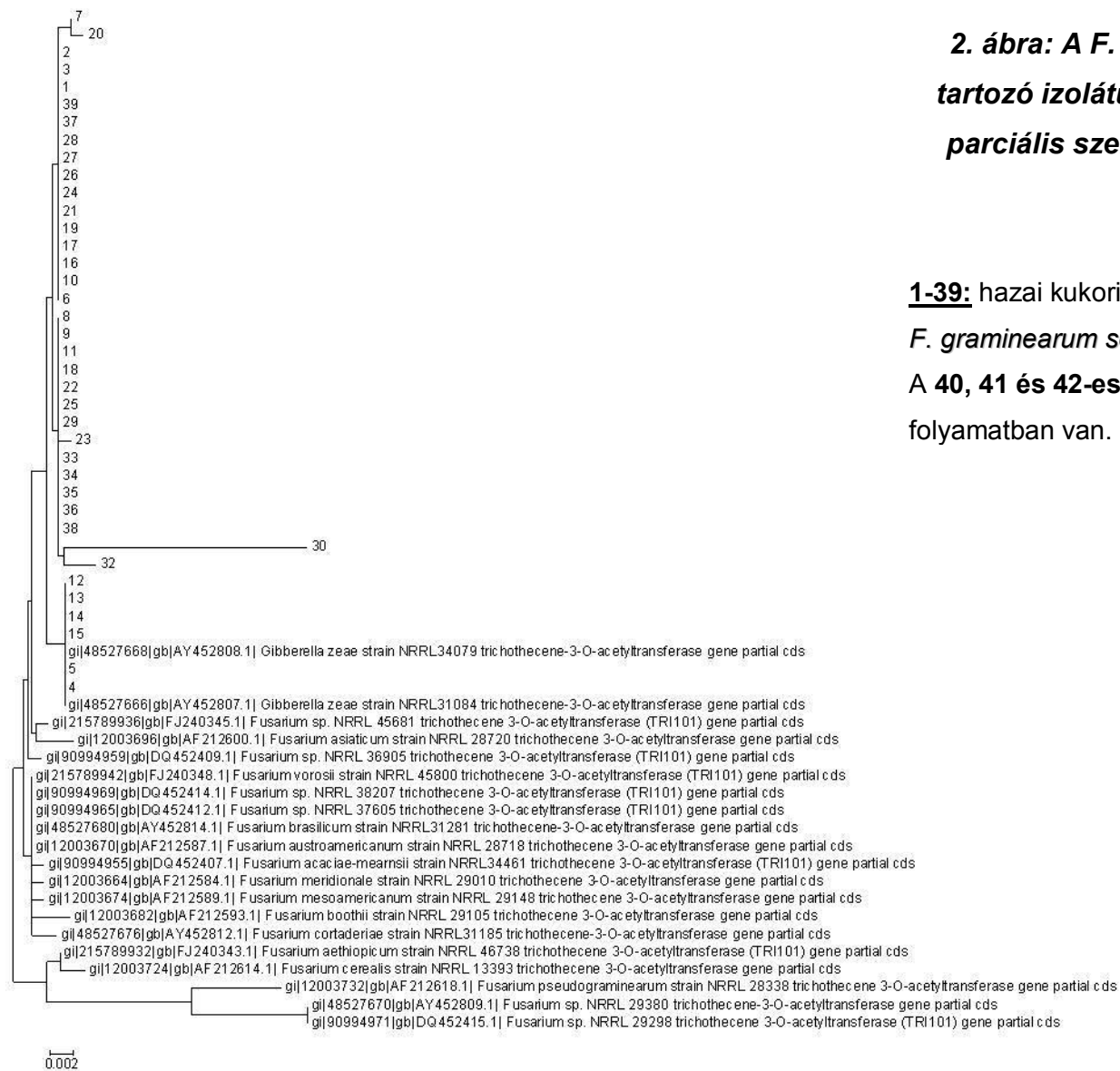
Magyarázat: Az üresen hagyott helyeken nem detektáltunk toxint a kimutatási határérték felett. A *szekvenálási kódok* megegyeznek a molekuláris törzsfán (Függelék, 2. ábra) található számokkal.

8.2. Ábrák:



1. ábra: Mesterházy és munkatársai által vizsgált termőhelyek 1974-1975-ben

(Forrás: Mesterházy és Vojtovics, 1977)



2. ábra: A *F. graminearum* fajkomplexben tartozó izolátumok törzsfája a TRI 101 gén parciális szekvencia adatai alapján (saját ábra)

1-39: hazai kukoricamintákról származó izolátumok a *F. graminearum sensu stricto* fajba tartoznak.
A **40, 41 és 42-es** minta molekuláris vizsgálata még folyamatban van.

A TÉMÁBÓL KÉSZÜLT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Tóth B, Török O, Kótai É, Varga M, Toldiné Tóth É, **Pálfi X**, Háfra E, Varga J, Téren J, Mesterházy Á (2012): *Aspergillus* és *Penicillium* fajok szerepe a kukorica szántóföldi mikotoxin szennyeződésében. XVIII. Növénynevelési Tudományos Napok, 2012. március 20, Budapest, Abstract book p. 34.

Konferenciákra benyújtott abstractok listája:

Tóth B, Török O, Kótai É, Varga M, Toldiné Tóth É, **Pálfi X**, Háfra E, Varga J, Téren J, Mesterházy Á (2012): Kukorica mikrobiótája és mikotoxin szennyezettsége hazánkban. V. Magyar Mikológiai Konferencia, Budapest, 2012. május 23-25.

Tóth B, Kótai É, Toldiné Tóth É, Török O, Háfra E, **Pálfi X**, Mesterházy Á, J. Varga J (2012): Identification of potential biocontrol agents of mycotoxigenic fungi in Hungarian agricultural fields. International Conference on Science and Technique in the Agri-Food Business, ICoSTAF 2012, június 7.

Baranyi N, Szigeti Gy, Kocsubé S, Győri T, Tóth B, Török O, Háfra E, **Pálfi X**, É. Kótai É, Varga J (2012): Occurrence of mycotoxigenic *Aspergillus* species on agricultural products in Hungary. International Conference on Science and Technique in the Agri-Food Business, ICoSTAF 2012, június 7.

Tóth B, **Pálfi X**, Toldiné Tóth É, Varga M, Varga J, Mesterházy Á (2012): Occurrence of *Fusarium* Species and their Mycotoxins in Maize Kernel in Hungary, International Symposium on *Fusarium* Head Blight, This work was supported by OTKA grant Nos. K84122 and K84077, by the János Bolyai Research Scholarship of the Hungarian Academy of Sciences (B. Tóth) and by Mycored FP7 project.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom a témavezetőimnek (Prof. Dr. Mesterházy Ákos és Dr. Tóth Beáta) a csoport jelenlegi (Dr. Varga Mónika és Dr. Toldiné dr. Tóth Éva, Kótai Éva), valamint volt munkatársainak (Kontra Levente, Zentai Beáta, Kocsonyi Dezsőné és Kapitányné Dóda Katalin), belső konzulensemnek (Dr. Csiszár Jolán), a családomnak és a barátaimnak, akik megfelelő háttérrel biztosítottak számomra munkám alatt, biztatásukkal és ötleteikkel elősegítették a dolgozatom elkészülését.

NYILATKOZAT

Alulírott, Pálfi Xénia, Biológus MSc szakos hallgató, kijelentem, hogy a TDK dolgozatban foglaltak egyéni munkám eredményei, és csak a hivatkozott forrásokat (szakirodalom, eszközök, stb.) használtam fel.

Aláírás:

pályázó

2012. április 14.