

BUDAPESTI CORVINUS EGYETEM

KERTÉSZETTUDOMÁNYI KAR

Zöldség- és Gombatermesztési Tanszék



Tudományos diákköri dolgozat

Gomba törzsgyűjteményi micélium regenerációjának mérése kétféle táptalajon

Tóth Ádám András

Kertészmérnök BSc III. évfolyam

Konzulens: Dr. Geösel András egyetemi tanársegéd

Dr. Győrfi Júlia, egyetemi docens

Szabó Anna

Budapest, 2012

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	3
2. A gombatermesztés jelentősége, törzstenyészetek fenntartási módszerei	4
2.1. A gombatermesztés története	4
2.2. Gombatermesztés a világban	4
2.3. Gombatermesztés Európában	5
2.4. Gombatermesztés Magyarországon.....	5
2.5. Élő gombák tárolásának története	7
2.6. A folyamatos átoltás veszélyei	7
2.7. Fenntartási módok.....	8
2.7.1. Fagyasztás nélküli tárolás	9
2.7.2. 0°C alatti tárolás	11
2.7.3. Folyékony nitrogénnel történő tárolás	12
3. Céltűzés	16
4. Anyag és módszer	17
4.1. Felhasznált táptalajok	17
4.2. Táptalajok előkészítése.....	17
4.3. A regenerált tenyészet átoltása és értékelése	18
5. Eredmények	20
6. Következtetések	29
7. Összefoglalás	31
8. Felhasznált irodalom	31

1. Bevezetés

Hazánkban a kertészeti ágazatok között jelentős gazdasági súlyt képvisel a zöldségfélék termesztése. Ennek speciális ágazata a gombatermesztés, amelyben hazánknak jelentős történelmi hagyományai vannak. A két világháború között a magyar gombatermesztés fénykorát élte, ekkor három kiemelkedő cég volt meghatározó hazánkban. Az 1950-es évektől a Gombatermelési Vállalat végezte a nemesítést és a csíragyártást is, amely jelentős faj- és tételszámban kezdte el összegyűjteni a vadon termő *Agaricus* fajokat nemesítési céllal (Györfi, 2003). Hazánkban jelentős technológiai fejlesztések és kutatások folytak a gombatermesztés majd minden területén. A Gyurkó Pál által nemesített hibrid laskafajták még mindig keresettek és nagy mennyiségben termesztettek világszerte. A száraz hőkezeléses laska-szubsztrátum előállítás technológiája (szintén hazai szabadalom) megalapozhatta a nagyüzemi laskatermesztés elterjedését. A hazai gombatermesztés a 2000-es évek elejétől a megtermelt gombamennyiséget tekintve csökkenő pályára állt, amelyből úgy tűnik 2009. óta sikerült újra emelkedő tendenciára váltani. Jelentős fejlesztések történtek a használt csiperke komposztban (III. fázis terjedése) és számos új technológiai újítás is átkerült a termesztésbe.

A sikeres termesztés jelentős mértékben a kiemelkedő hozamú, stabil fajták biztosítják. A nemesítési munkához jól dokumentált, bőséges információval rendelkező törzsgyűjteményi anyagok szükségesek, amelyek keresztezésekhez, szelekciós munkákhoz alkalmasak. A BCE-Zöldség- és Gombatermesztési Tanszéke egy közel 200 tételből álló gomba törzsgyűjteményt kezel, amely nagyrészt ehető nagygombákból és gombapatogénekből áll. A törzsgyűjteményes anyag jelenlegi fenntartása +4°C-on, sterilizált vízben történik, amelyben a micéliumok agarkorongokon kerülnek elhelyezésre. A gyűjteményt 2-3 évente „frissíteni” és szelektálni szükséges: ilyenkor eltávolításra kerülnek a kontaminálódott, életképtelen, nem fajra jellemző tételek. A laboratóriumi munka a tenyészetek kioltását követően azok szelektálásával, értékelésével folytatódik, majd a törzseket ismét előkészítjük a hosszú távú tárolásra. Dolgozatomban az irodalmi adatok és közölt módszerek alapján a teljes törzsgyűjteményi anyag átoltását és értékelését tűztem ki célul. A naprakész adatok előállításához újszerű adattárolási módszert terveztünk bevezetni, hogy a törzstenyészeti adatok bármikor könnyedén elérhetőek legyenek. Távlati célunk a törzsgyűjteményes anyag bekapcsolása a nemzetközi gomba-génbanki hálózatba, és stabil háttér biztosítása a termesztési kísérletekhez, amelyhez az első lépés a gyűjtemény stabil alapokra helyezése.

2. A gombatermesztés jelentősége, törzstenyészetek fenntartási módszerei

2.1. A gombatermesztés története

A gombatermesztés kezdetéről nincsenek pontos adatok, de az biztos, hogy gombát évezredekkel ezelőtt is fogyasztottak (Somos et Angeli 1963). Az első jelentősebb feljegyzések a gombafogyasztásról a görög és római időkből maradtak fenn (Kóthay 1943). Az első komolyabb gombatermesztési feljegyzések a császári Kínából származnak. A modern termesztés viszont Franciaországból eredeztethető így őket tekintjük a termesztés atyjainak. Elsőként a Párizs környéki kőbányák üregeiben, majd hasonló színvonalú barlangokban és pincékben, Franciaország más tájain is megkezdtek a termesztést (Somos et Angeli 1963). Az első feljegyzések a trágya komposztálásáról és micéliummal való átszövetéséről a 17. század végéről származnak, ezek közül is Tournefort-é kiemelendő 1707-ből, amely szerint a lótrágyát érlelni kell majd bakhátakba rakni és a vadon gyűjtött gomba micéliumával átszövetni (Atkins 1955). Természetesen ekkor még nem voltak tisztában a ténnyel, hogy a begyűjtött „szaporítóanyag” tartalmazhat más micéliumot és baktériumokat is (Bohus et al. 1961). Később a 19. század közepén építették az első fűtött házat, amelyben egész éven át lehetett gombát termesztetni, ez volt az Oldacre típusú-üvegház (Somos et Angeli 1963). A ma is használt, steril gombacsíra üzemszerű előállítása 1920-ban kezdődött meg Franciaországban és az Egyesült Államokban (Somos et Angeli 1963). A termesztés Magyarországon körülbelül a 19. század közepén kezdődött meg, Franciaországhoz hasonlóan a főváros körüli kőbányákban kialakított pincékben, majd a nagyobb városokban hasonló körülmények között. Az első világháborúig kezdetleges és inkább kedvtelésből végzett termesztés volt, majd később az 1920-s évek folyamán vált elterjedtebbé a gombafogyasztás, és ez által a termesztés, a nagy húshiány miatt. A második világháború után egyenletes fejlődés figyelhető meg, mind a termesztésben, mind a korszerűsítésben, új technikák kidolgozásában és vad fajok termesztésbe vonásában (Somos et Angeli 1963). A fogyasztás növekedésével a termésátlag növelésére való törekvésre fordították a fejlesztési erőket. A lótrágyát lecserélték csirketrágyára, bevezették a tömeghőkezelést és a bakhátas termesztés helyett a zsákos termelést, ezzel körülbelül kétszeresére növelték a termésátlagot. A ma is használt technológiák egy részét 1989-1999 között vezették be világszerte, így Magyarországon is (Rácz et Koronczy 2001).

2.2. Gombatermesztés a világban

A világon a fent említett technológiai fejlődésnek köszönhetően napjainkra közel 30 gombafajt termesztenek, ebből azonban nagyobb mennyiségben csupán 10 fajt. Ezen belül a termés megoszlási eléggé szélsőséges, ugyanis a termelt fajok 38%-át a kétspórás csiperke (*Agaricus bisporus*) és a négyspórás csiperke (*Agaricus bitorquis*) adja, utána következik a shiitake (*Lentinula*

edodes) 17%-kal, majd nem sokkal elmaradva a laskagombafélék (*Pleurotus spp.*) 16%-kal, és elenyésző százalékokkal főleg a távol keleten használt gombák zárják a sort (Györfi 2003, 2010). A FAOSTAT hivatalos adatai szerint a világ ehető gomba és fűszergomba (szarvasgombafélék) termelése 2005-ben elérte az 5,2 millió tonnát, majd egyre növekvő tendenciával 2010-re meghaladta a 7,3 millió tonnát, amely szám biztatón hat a jövőre nézve (Internet 1). A legnagyobb volument Kína termeszti, az összes megtermelt mennyiség 63%-át, utána következnek az európai országok 14%-kal, majd Észak-Amerika 7%-kal és a többi ország együttesen 16%-kal részesedik. Kína a termesztés legnagyobb részét a feldolgozó- azon belül is a konzerviparra koncentrálja, mivel így tudja a legtöbbet exportálni, főleg Amerikába és Európába (Györfi 2003).

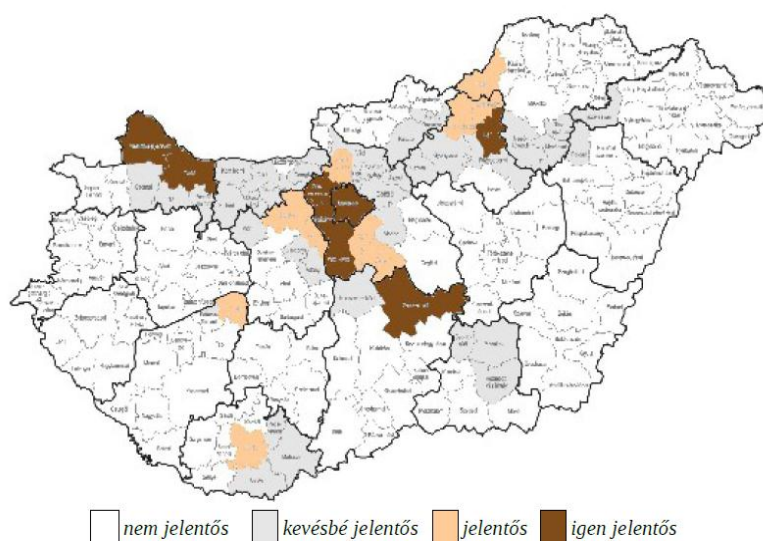
2.3. Gombatermesztés Európában

Európában több ország is foglalkozik nagyüzemi gombatermesztéssel, amelynek szinte egészét a csiperketermesztés teszi ki. Több ország alig foglalkozik termesztéssel, viszont a felvevőpiacon jelentős szerepük van, ilyenek például Ausztria, Svédország vagy Finnország. Európában első helyen állt Hollandia az 1990-s évek óta körülbelül 2009-ig, amelyet Franciaország és Olaszország követett. Az EU csatlakozást követően dinamikus fejlődésen ment keresztül a lengyel gombatermesztési ágazat is. A lengyelországi termelés 1990-től 2001-ig közel 4szerez növekedést mutatott, amellyel a későbbi években utolérte majd lehagyta Hollandiát. A lengyel gomba teret nyert a nyugat-európai és oroszországi piacon, így válva az Európai Unió legnagyobb exportőrévé (FruitVeb 2012). Jelentős csökkenés figyelhető meg Franciaországban, Angliában, Dániában, Olaszországban és Írországban. Ezekben az országokban a csökkenés oka főleg az olcsóbb munkaerő kelet-európai országok, mint Magyarország és Lengyelország betörése és fejlődése, vagy a magasabb minőségű termékek térhódítása. Az Európai Unió tagállamaiban általánosan véve növekedés figyelhető meg a megtermelt gomba mennyiségében, melynek több mint a felét friss fogyasztásra használják, a maradék 40%-k körüli mennyiséget pedig a konzervipar hasznosítja (Györfi 2003).

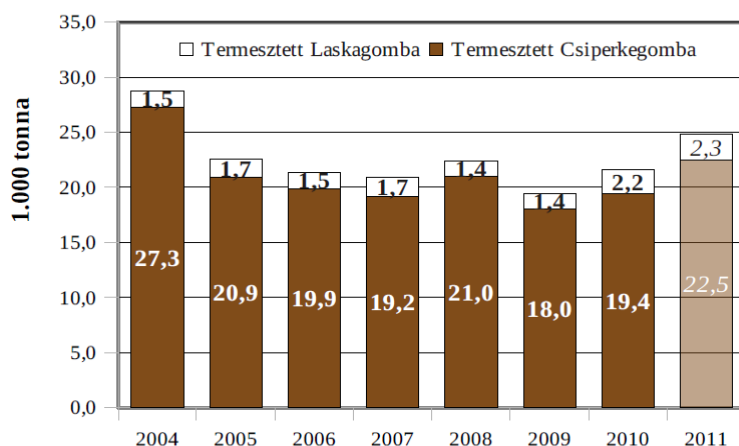
2.4. Gombatermesztés Magyarországon

A Magyarországi termesztés ugrásszerűen megnőtt az 1989-es és 1999-s évek között. Ezt több technológiai fejlesztés segítette elő. Megjelentek az új hibrid fajták, elkezdték a CO₂ mennyiséget szabályozni, borzolni, erősebben öntözni, hazánkban gombacsíra labort nyitottak, és elkezdték tömegben gyártani az átszövetett III. fázisú komposztot, amellyel a hozamokat 28-36 kg friss gomba/100 kg komposztra lehetett növelni (Rácz-Koronczy 2001). Ebben az időszakban a hétszeresére nőtt az itthoni termesztés (Györfi 2005). Ezután egy jelentősebb visszaeséssel csökkent az export és a termesztés is egészen a 2003-2004-es évekig, amikor is egy jelentősebb beruházás

kezdődött meg hazánkban. A fajtanemesítést támogatandó Demjénben molekuláris biológiai labor létesült, Máriakálnokon megépült Magyarország első holland-típusú gombatermesztő háza, majd az ápokai és töki komposztüzemekben történtek jelentősebb fejlesztések. 2007-ben Dunavarsányban, majd Ócsán két újabb holland típusú termesztő ház létesült, és az ápokai komposztüzemben történt bővítések után több új hőkezelő kezdte meg a működését. Hazánkban 2004 óta 20 ezer tonna körüli gombát termesztenek, amelynek 92%-a csiperkegomba, 7%-a laskagomba és 1%-a shiitake. A termesztés 45%-át a közép-magyarországi régió végzi, de a Győr-Moson-Sopron megyei is jelentős (**1. ábra**). A hazai termesztés az ezredforduló előtti ugrásszerű növekedés után, sajnálatos visszaesést mutatott a 2008-ig, de azóta ismét növekvő értékeket mutat (**2. ábra**) (FruitVeb 2012).



1. ábra: Magyarország jelentősebb gombatermesztési körzetei (FruitVeb 2012)



2. ábra: A hazai gombatermesztés alakulása 2004-2011 között (FruitVeb 2012)

2.5. Élő gombák tárolásának története

Korábban a gombák tárolása főként tapasztalati úton fejlődött és sokáig hasonlított a növényekére, mivel nem tekintették különbözőnek a kettőt (Balázs 1994). Hosszú időbe telt mire rájöttek, mely táptalajokon nő a kívánt minőségben a gomba vegetatív micéliuma. A módszer legnagyobb hátránya természetesen a gyakoriság, mivel a gombákat nem lehet megállítani a fejlődésben, csak lassítani. Így szükségszerűen az átoltások közötti időt kellett növelni. Ezt több módszerrel is próbálták elérni. Elsőként hűtéssel és olaj alatt tartással próbálkoztak, majd jobb eredményeket hozott a spórák szárítása és vákuum alatt tartása. A legnagyobb sikert azonban a liofilizálás aratta, amelyet az amerikaiak használtak először a második világháború idején vérszállításra (Creager 1999). A technológia egyszerű, mélyhűtik a spórákat és a lehető legkevesebb sérülést okozva a szerkezetükben elszublimáltatják a plazmában megfagyott vizet. Ezzel a módszerrel fiatal gombákból készítenek szárítmányt és a spórák így nyugalmi állapotban maradnak addig, amíg nincs rájuk szükség. Napjainkban mindegyik módszert használják, attól függően, hogy az adott fenntartó személy vagy intézmény melyik módszert tartja költséghatékonyának, illetve saját céljaira megfelelőnek (Onions 1971).

2.6. A folyamatos átoltás veszélyei

Élő gombatenyészetek, törzsgyűjtemények tárolása bonyolult, időigényes és korszerű labort igénylő feladat. Tökéletes sterilitásra van szükség, mert a baktériumok és az atkák igen könnyen befertőzhetik az egész gyűjteményt. Nagyszámú kolóniáknál az átoltás több hetet, vagy akár hónapot is igénybe vehet. A gombák morfológiája a hosszú tárolás és a rendszeres átoltás következtében megváltozhat, a természetben produkált viselkedéseik átalakulhatnak, ezért időről időre ki kell őket termesztetni, majd a termőtestekből újra mintát venni és visszaizolálni a micéliumot (Kirsop et Snell 1984). Makrogombáknál ez termőtestképzési hajlamban vagy ivaros

szaporodásukban, kórokozó gombáknál sporulálási hajlamban, esetleg a patogenitásukban mutatkozhat meg. Ez a veszély legkönnyebben az átoltások közötti időtartamok maximalizálásával érhető el (Kirsop et Snell 1984). Gyakorlatból ismert megfigyelés, hogy a farontó gombák (például: laska, shiitake) hosszabb idejű tárolása faanyagon magasabb vigort eredményez, mint a folyamatos átoltás faanyag nélkül (Hajdú 2008). Néhány tenyészetnél a micélium könnyen elvékonyodhat, vagy nyúlós masszává válhat, amelynek fő oka olyan belső baktériumos fertőzés vagy parazita lehet, amelytől nagyon nehéz mentesíteni a kultúránkat (Simmons 1963). Természetesen arra is figyelni kell, hogy az élő gomba tárolása hosszú távú, így akár több mikológus is foglalkozhat ugyanannak a gyűjteménynek a fenntartásával, ezért a pontos leírásokra és jegyzőkönyvekre mindenképpen szükség van, a keveredések elkerülése érdekében (Onions 1971).

2.7. Fenntartási módok

A fenntartási módszerek a hőmérséklet szempontjából három kategóriára oszthatók: a fagyasztás nélküli; a 0°C alatti; és a folyékony nitrogénben történő tárolás extrém alacsony hőmérsékleten. Ezek a kategóriák több rész módszerre oszthatóak, amelyek számos előnnyel és hátránnyal rendelkeznek (Humber 1997). Elsődleges szempont minden módszernél a fokozott sterilitás, és a steril, izolált szaporítóanyag. Minden esetben valamilyen szintetikus vagy természetes táptalajon teszik el tárolásra a mintákat, kivéve a liofilizálásnál ahol magát a gombát szárítják és teszik vákuumozott tárolókba. Ez a táptalaj lehet valamilyen agarral szilárdított táptalaj, amelybe különböző fehérjéket és cukrokat tesznek, hogy tápanyagul szolgáljanak a spóráknak vagy micéliumnak (Nakasone et al. 2004). Főként a fákon élő gombáknál (néhány *Basidiomycetes* és *Ascomycetes*) alkalmaznak a gombának megfelelő faanyagból készült fapálcákat, ha nagyon jól sikerül a párosítás, akkor akár 10 évig is eltárolható vitálisan a gomba micéliuma. Különböző gabona magvakon is lehet tárolni hosszabb távon, bár ezt az eljárást inkább a csíragyártásban használják (Nakasone et al. 2004). Különleges táptalajként megemlíthető, hogy néhány patogén gombánál a növényi részekon illetve rovarokon szárítás és fagyasztás eredményre vezetőbb lehet, mint agaros táptalajon (Nakasone et al. 2004). A *Rhizoctonia*, *Septoria* és *Pseudocercospora* nemzetségek eredményesen tarthatóak egy igen költséghatékony módszerrel egyszerű földön vagy homokon (Kirsop et Snell 1984). Olyan üzemekben ahol nem megoldott a liofilizálás, vagy a tárolni kívánt gomba nem alkalmas a folyékony nitrogénben tárolásra ott szilikagél is használnak (Nakasone et al. 2004).

2.7.1. Fagyasztás nélküli tárolás

Az alacsony, de 0°C fölötti tárolási módszerek főként a hosszabb tárolás előkészítésére és a fajok izolálására szolgálnak, hosszabb távon alkalmazásuk költséges és jelentős eszközigényű (Humber 1997).

A tenyészetek sorozatos átoltása agarral szilárdított táptalajra, rövidtávon működtethető és maximum 1-2 hónapig eltarthatóak az így előállított tenyészetek. Ennyi idő alatt a táptalaj víztartalma csökkenhet, amely a micélium vigorát is csökkenti (Humber 1997). A tárolás +4°C körüli hőmérsékletet igényel. Ezt a módszert akkor alkalmazzák, ha meg akarják figyelni a kultúrát és fenotípus alapján szelektálni. Előnye, hogy egyszerű technológia és könnyen lehet követni a gombák fenotípusait és változásait. Hátrányaként főleg az eszköz és munkaigénye említendő, mivel nagyobb számú kultúráknál ez szinte folyamatos, odafigyelő és monoton munkát igényel. Ennél a technikánál ügyelni kell arra, hogy egyes trópusi gombafajok nem bírják a tartós hideget (Humber 1997).

Az egyik legrégebbi és legolcsóbb módja a tárolásnak az ásványi olaj alatt agaros táptalajon tartás. Ez a módszer nem feltétlenül kíván hűtést (de növelhető vele az eltartás időtartama) vagy sorozatos átoltást, mivel az olaj véd a kiszáradástól és gátolja a gázcserét, így csökkentve az anyagcsere folyamatokat. Ez a módszer akár évtizedekig is életben tarthatja a gombákat (Cavalcanti 1991), de eltérő leírásokat találunk arra nézve, hogy évek elmúltával a sporulálási képesség mennyivel változott. A módszer egyszerű, mivel nem kíván mást, minthogy a kémcsövek és az olaj legyen teljesen steril, ami egy autoklávval kétszeri sterilizálással kivitelezhető. Viszonylag nagy a helyigénye, mert a kémcsöveket állítva kell tárolni (Humber 1997). Onions szerint, hogy vigyázni kell a gumitömítéses kupakú kémcsövekkel, mert az olaj kioldhat belőle olyan anyagokat, amelyek károsak lehetnek a gombákra (Onions 1971).

Széleskörűen alkalmazott módszer a steril desztillált víz alatti tárolás agaros táptalaj kockákon. Ez a technológia a legtöbb gombánál alkalmazható, olyan laboratóriumokban, amelyeknél nem megoldható a liofilizálás (Clark et Dick 1974). Az eddigi leghosszabb idő, amit ezzel a módszerrel egy gombatenyészet túlélt, 20 év volt, de a legtöbb gombafaj ennél sokkal korábban elkezd elveszteni az életképességét, ami átlagban 2 év (Hartung de Capriles et al. 1989). Előnye az egyszerűség és az alacsony költség, azonban ügyelni kell a kémcsövekben levő víz szintjére, mert a víz könnyen párologhat, főleg, ha nem kellően van lezárva a kémcső. Ezt a tenyészetet is lehet hűtőben vagy szobahőmérsékleten tárolni, de az eltarthatósági idő itt is hosszabb hűtéssel. Az előkészítés és végrehajtás itt is hasonló, mint az olajos módszernél, de itt nem kell kétszer autoklávozni a desztillált vizet a teljes fertőtlenítéshez (Humber 1997).

Különleges módja a tárolásnak a talajban vagy homokban tárolás. Hőálló üvegcséket kétharmadig töltünk kerti földdel vagy homokkal és legalább kétszer sterilizáljuk 121°C-on 20 percig autoklávban (Mehtra 1977). 5 milliliter sterilizált desztillált vízbe tesszük a kívánt faj spóráját, vagy ha éppen nem sporulál akkor micéliumát, majd 1 milliliteres kis üvegcsékbe osztjuk szét steril körülmények között. Ezeket a kis mennyiségeket rácsepegtetjük a korábban sterilizált talajra vagy homokra steril fülkében, majd megvárjuk, amíg a gomba teljesen átszővi az alapanyagot. Ez egyes gombáknál 2-3 napot, más fajoknál akár heteket is igénybe vehet. Ezután hűtőben tárolhatjuk +4-7°C-on és egyszerűen felhasználhatjuk a táptalaj segítségével. Hátránya, hogy az ilyen tenyészet a talajszemcsék miatt korlátozottan felhasználhatóak és a talaj tulajdonságai nagyban befolyásolják a fenntartást (Kirsop et Snell 1984).

Napjainkban széles körben használt módszer a liofilizálás, amely nagy felkészültséget és steril körülményeket igényel, a többhasznú gyűjteményeknél alkalmaznak. Ezt az eljárást a legtöbb konídiumos gombánál (*Deuteromycota*) lehet alkalmazni, kivéve azoknál, amelyeknél nagyméretű a vakuólum és így nehéz belőlük kinyerni a vizet (Humber 1997). Tároló edénynek szinte bármilyen eszköz alkalmazható, amit sterilen és vízmentesen lehet tartani. Ilyenek lehetnek a jól záródó kémcsövek, vagy centrifuga csövek, de léteznek kifejezetten erre a célra kifejlesztett liofilizáló ampullák is. Egyes cégek vákuum alatt csomagolják ezeket a liofilizált gombákat, így tartva meg a frissességüket (Humber 1997). Általában sporuláló alakról szoktak nyersanyagot gyűjteni, mivel a spóra életképesebb marad, mint a hifa, de az is használható. Ezt követően hirtelen le kell hűteni a kultúrát például folyékony nitrogénben vagy száraz jég és etanol keverékében, majd a steril ampullákba helyezett gombát vákuumba kell helyezni, ahol a jéggé fagyott víz távozik a sejtekből a lehető legkevesebb károsodást okozva. Ezután következhet a hűtés, amely +4°C-on történik és így éveken túl is eltartható a tenyészet. A tenyészet „felélesztése” egyszerű, steril körülmények között kell kibontani a csomagot vagy ampullát, és steril vizet hozzáadni. A rehidratálódott spóra vagy micélium táptalajra tehető és ezután tovább szaporítható. Legfőbb hátránya ennek a módszernek a magas energiaköltsége, előnye hogy egységes végtermékeket kapunk és különösebb sérülés nélkül szállíthatóak maradnak a tenyészetek (Humber 1997).

A nyálkagombák (*Myxomycota*) tárolásának legegyszerűbb módja a szklerócium képzés, pontosabban a gomba készítése a szklerócium képzésre, így akár 3 évet is élélhetnek ezek a gombák. Ennek alkalmazzák egy igen egyszerű módját, mely szerint egy petri csészébe agaros táptalajt tesznek, erre ráoltják a gombát majd lefedik celofánnal. 24 óra múlva a fólián megjelennek a szkleróciumok, és ezeket már csak le kell szedni és üvegcsékben eltárolni (Nakasone et al. 2004).

A gombaipar csíragyártásában és törzstenyészet fenntartásában régóta használt rövid- és középtávú tenyészet fenntartási mód a kémcsőben ferde-agaros technológia. Ilyenkor a táptalajt (PDA, MA, egyéb felszintetikus táptalajok) kémcsővekbe töltik, majd vattadugóval zárják és autoklávban sterilizálják. A még folyékony táptalajt megdöntve asztalra fektetik, így a táptalaj "ferdén" szilárdul meg és nagyobb felületet képez. A kémcsővekre a micélium oltása lamináris fülkében történik a kupak levételével, majd annak visszazárásával. Az ilyen ferde-agaros tenyészet fél-egy évig (a táptalaj kiszáradásától függően) hűtőben eltárolható. Hátránya, hogy a zárókupak miatt nagy a fertőzés veszélye és sűrű átoltást és ellenőrzést igényel (Szili 2008).

2.7.2. 0°C alatti tárolás

Bár a háztartásokban is használt mélyhűtők, amelyek -20°C-os hőmérsékletet tartanak, nem tűnnek megfelelőnek élő tenyészetek tartós tárolására, korábban pepton-élesztős táptalajon különböző penészfajokat sikerült hosszabb távon is eltartani (Carmichael 1962). A magas víztartalmú gombasejtek tárolása fagypont alatt különös technológiát igényel, ezért nehezen kivitelezhető (Humber 1997).

A kötött vizet nem tartalmazó szilikagél-t főként mélyhűtési tárolásra használják, mert szobahőmérsékleten nagyon gyorsan el kezd csökkenni az így tárolt gombák életképessége. Ezzel a technikával eltárolt kultúrák több, mint tíz évig és megőrzik életképességüket (Windels et al. 1993), emellett olcsó és nagyon sok gombafajra alkalmazható eljárás (Smith 1993). Ezt az eljárást főként levegőben terjedő baktériumoknál és puha táptalajt igénylő kultúráknál alkalmazzák, mert a nagy vakuólummal és citoplazmával rendelkező szervezetek (például: *Oomycetes* és *Entomophthorales*) nem bírják a szárazon hűtve tárolást. Sokféle szilikagél gyártanak, de a legmegfelelőbb a nagy kristály méretű, színezetlen, mert például a kék indikátor festék, amely rózsaszínné válik, ha víz éri, toxikus lehet a gombák számára (Perkins 1962). Az eljárás egyszerű és költséghatékony: sporuláló termőtestből készítünk preparátumot és ezt tesszük bele a hidratáló tejbe és rázzuk össze. Közben 160-180°C-on 1-6 órán keresztül sterilizáljuk a szilikagél, amit hőálló kémcsővekbe tettünk. Miután a szilikagél kihűlt, rácsöppentünk 1 millilitert a gombás szuszpenzióból, majd ezt is erősen megrázzuk. Ezután jégfürdőbe tesszük az üvegséket, amíg a jég meg nem olvad, mert a szilikagél vízfelvétele exoterm folyamat, és a micélium sérülése kerülendő (Humber 1997). Pár napig szobahőmérsékleten tartjuk a tenyészetet, majd időnként kevergetjük, utána lehet mélyhűtőben tárolni -20°C-on. Az újraélesztéshez csak pár szem kristályt kell táptalajra helyezni (Humber 1997). Kirsop és Snell leír egy hasonló módszert, amely nagyrészt egyezik az előzővel, csak annyiban van eltérés, hogy a szilikagélre tett dehidratált micéliumot nem mélyhűtik, hanem szárítják a kultúrákat

és később 4°C-on tárolják hosszútávon (Kirsop et Snell 1984). Ennek a módszernek nagy előnye, hogy sterilizálás és szárítás után a szilikagél újrahasználható.

Említésre méltó eljárás az agaron mélyhűtve tárolás is. A -20°C-os hűtésre nincs különösebben szükség, mert nem hatásosabb a 4°C-os hűtésnél, ezért pozitívként csak az elérhetősége hozható fel. Csak a szilikagél tárolásánál van rá szükség, viszont ügyelni kell a táp energia ellátásra, mert egy áramkimaradás súlyos károkat okozhat. A -80°C és -120°C közötti hőmérséklet azért alkalmazható, mert általában minden laboratóriumban elérhető és nem kell folyékony nitrogént használni. Ellenben a kultúráknak pótolni kell a nitrogén veszteségét, itt is figyelni kell a folyamatos áramellátásra és sajnos ez a hőmérséklet kedvez a jégkristályok kialakulásának, amely ronthatja szöveteket (Humber 1997).

2.7.3. Folyékony nitrogénnel történő tárolás

A kriogén, azaz mélyhűtés a legmodernebb és legsikeresebb módja a törzstenyészetek fenntartásának. Így sikerült elérni a leghosszabb tárolást az életképesség megőrzésével. Ez a legdrágább és legtöbb odafigyelést igénylő módszer, mert folyamatos folyékony nitrogén utánpótlásra van szükség. Ezzel az eljárással elméletben minden gombafaj tárolható, ezért a nagyobb költségvetéssel rendelkező laboratóriumok alkalmazzák, mivel igen költséges műveletről van szó (Humber 1997). A megfelelő tárolás érdekében nagyon kell ügyelni a krioprotektor kiválasztásakor és a hűtés mértékének beállításakor (Tan et al. 1995). A mélyhűtés folyamán a sejtekben lévő víz két fázisban fagyhat meg. Az egyik fázisban üvegszerű lesz és nem nő jelentős mértékben a térfogata, de a másik fázisban kristályokat képez, amelyek növekedése kárt tehet a sejtek falában. Ezért alkalmaznak különféle védőanyagokat, krioprotektorokat mélyhűtésnél, hogy a víz ultra mélyhűtésnél is üveges fázisban fagyjon meg, így óvva meg a tenyészeteket a ronszolódástól. Amikor a víz már fagyott és üveges fázisban van, akkor már jelentősebb térfogat növekedés nélkül tud a kristályos fázisba lépni, és ezt nevezik jég nukleációnak (Humber 1997). A krioprotektorok széles körben használt változatai főként glicerolt, dimetilsulfoxidot, polietilént glikolt és propilén glikolt tartalmaznak. Ezeknek a védőanyagoknak a kiválasztása kulcsfontosságú, mert különböző hőmérséklet alatt engedik csak a jég nukleációját (Humber 1997). Ehhez az eljáráshoz modern, szabályozhatóan hűthető (-1°C/perc) berendezésre van szükség, mert az átalakulás egy erősen exoterm folyamat, amelynél vigyázni kell, hogy a hőmérséklet ingadozása ne legyen túl nagy (Humber 1997). Az erre alkalmas tároló edények listája napjainkban már elég széles, mert a technológia széleskörűen elterjedt és a laboreszközöket gyártó cégek folyamatosan fejlesztik ezen termékeiket. A módszer használatának kezdetén Challen és Elliott 1986-ban talált egy olcsó és mégis hatékony megoldást. Ők polipropilén szívószálakat zártak le hőálló kupakkal és

ebben tárolták mélyhűtve a gombákat. Folyékony nitrogén használatánál ügyelni kell annak kirekesztésére a tároló edények belsejéből (erre csak vizes alapú tárolásnál van szükség, mert a párás tárolásnál nem tud keveredni a hordozó anyaggal), mivel ez az anyag nagyon hajlamos a szivárgásra. Ha ez bekövetkezik és bejut a gombánkhoz, akkor nagy valószínűséggel beszennyezi a mintánkat, vagy rosszabb esetben felengedés közben fel is robbanthatja azt (Humber 1997). Ezt a módszert alkalmazhatjuk valamilyen táptalajon vagy folyékony hordozóban tárolt gombáknál is. A táptalajos hordozónál több mint 40:1-hez arányban kell autoklávban sterilizált védőanyagot adni a kultúrához, míg a vizes alany esetében meghatározott mennyiségű krioprotektort kell közvetlenül a vízhez adni és elkeverni, és vigyázva az ozmotikus sérülések elkerülésére. Ezután 4°C-on 2-48 óráig kell inkubálni a tenyészeteket, majd mélyhűteni -40 és -50°C közé. Ezen a hőmérsékleten 30-120 percet tartózkodik a kultúra és innen viszik a tároló edényekbe, amelyek folyékony nitrogénhűtést alkalmaznak. A kinyerés csak annyiból áll, hogy a mélyhűtőből kivett kémcsöveket 37°C-os meleg vízbe tesszük addig, amíg a jég meg nem olvad, ezután a gombák már tenyésztethetők is (Humber 1997). Miután sikeresen tároltuk a tenyészeinket ügyelnünk kell az állandó hőmérséklet tartására, mert minél kisebb a hőingadozás annál kevésbé áll fenn a lehetősége a jégkristályok növekedésének.



3. ábra: Folyékony nitrogénnel működő tartályok a Növényélettan és Növényi Biokémia Tanszéken

Napjainkban egyes arbuszkuláris mikorrhiza-képző gombákat tenyészetekben csak növényen tudnak fenntartani. Ez sok helyet és időt igényel, sőt a nem kívánt fertőzéseket sem tudják biztosan elkerülni, mert tiszta tenyészet e fajokból nem, vagy csak igen nehezen nyerhető (Douds et Schenck 1990). Az elmúlt években kidolgoztak egy módszert, amelynél egyes gomba fajokat alga golyókba „csomagolnak” és szukrózban dehidratálják. Ezután steril levegő áram alatt vagy szilikagélben szárítják 20%-os víztartalomig (Fabre et Dereuddre 1990). Jelenleg is folynak kísérletek annak tisztázására, hogy ez a módszer a tenyészetek „öregedésébe” milyen módon szól bele, illetve a szárítás és mélyhűtés optimális értékének meghatározására (Lalaymia et al. 2012). A különböző tárolási módok előnyeit és hátrányait az **1. táblázat** foglalja össze.

1. táblázat: Gombatenyészetek tárolási módjainak összehasonlítása (Humber 1997)

Tárolási mód megnevezése	Előny	Hátrány
Fagyasztás nélküli tárolás		
Sorozatos áttöltés	• Egyszerű technológia • Folyamatos megfigyelést tesz lehetővé	• Alap fenotípusos tulajdonságok változhatnak • Néhány gomba nem bírja a hűtést • Folyamatos utánpótlást igényel az alapanyagokból
Ásványi olaj	• Egyszerű technológia • Olcsó	• Helyigényes, mert a kémcsöveknek folyamatosan függőlegesen kell állnia • Folyamatosan ellenőrizni kell a fertőzéseket
Steril desztillált víz	• Egyszerű technológia • Olcsó • Kis kémcsövek esetén kis helyigényű	• Folyamatosan figyelni kell a megfelelő vízszintet és a szennyeződést
Liofilizálás	• A legtöbb gombafajra alkalmazható • Könnyen szállítható a kultúra	• Az eszközök viszonylag drágák • Energia-igényes
0°C alatti tárolás		
Szilikagél	• Olcsó • Technológiailag egyszerű • Egyszerű mélyhűtőt igényel • Elég egy kémcső/fajta • -20°C-on vagy szobahőmérsékleten is tárolható	• A hosszú tárolás nagyban függ a csavarzár minőségétől
-20°C	• Olcsó • Könnyen kivitelezhető	• Nem szükségszerű (csak a szilikagélnél) • Áramkimaradásnál fennállhatnak veszteségek a kultúrában

-80°C és -120°C	• A legtöbb laborban elérhető • Hosszú távú tárolás folyékony nitrogén nélkül	• A hőmérséklet kedvez a jégkristályok kialakulásának • Áramkimaradásnál fennállhatnak veszteségek a kultúrában • Nitrogént pótolni kell a tenyészeteknél
Folyékony nitrogén hűtők	• A leghosszabb tárolási mód • Minden termesztendő gomba tárolható így	• Magas befektetési és fenntartási költség • Folyamatos folyékony nitrogén ellátást igényel
Por frakcióban -120°C és -196°C között	• A folyékony nitrogén szivárgás nem képes szennyezni a mintákat • Nem robbanhatnak fel a kémcsövek	• Hőmérséklet nehezen stabilizálható • Folyékony nitrogénszintjét folyamatosan figyelni kell • Folyamatos elektromos ellátás szükséges a megfigyelő berendezésekhez
Folyékony frakcióban -196°C-on	• Nincs hatással az áramkimaradás • Alig kell figyelni a folyékony nitrogén szintjét • Kedvező vízkristály formációk	• A műanyag tárolóedényekbe könnyen beszívárogathat a folyékony nitrogén • A tenyészetek könnyen fertőződhetnek a folyékony nitrogéntől • Amelyik tárolóba bejut a nitrogén, felolvadáskor könnyen felrobbanhat

3. Célkitűzés

A gomba törzsgyűjtemények fenntartásának sok módszere ismeretes, amelyet a 2. fejezetben részletesen ismertettem. A szakirodalomban a fenntartási módszerek több-kevesebb részletességgel kerülnek ismertetésre, de a gombafajok „regenerációs” képességéről alig találunk adatokat. Az egyes tárolási módszerek komplex összehasonlítása eddig nem történt meg.

A Budapesti Corvinus Egyetem Zöldség- és Gombatermesztési Tanszéke egy közel 200 tételből álló ehető nagygomba törzsgyűjteményt tart fent, amelyben a termesztésből ismert főbb patogéngombák egy-egy tételét is tartalmazzák. A tételek egy része Dr. Györfi Júlia korábbi gyűjtéséből (génbanki és egyéb) származnak, nagyobb részét pedig Dr. Jan Lelley a krefeldi (Németország) gombakutató laboratórium igazgatója adományozta számunkra 2009-ben. Az utóbbi években tucatnyi új faj és fajta került a gyűjteményi anyagba, a Növényteni Tanszékkal folytatott együttműködés keretében. A hosszú távú fenntartás eddig sterilizált ioncserélt vizes kémcsövekben, maláta-agaros korongokon történt, +4°C-on hűtőszekrényben (**4. ábra**). A gyűjteményi anyag szelekciója, az esetleg sérült tenyészetek eltávolítása és az életképes vonalak regenerációja és újabb visszaoltása steril vízbe képezte a kutatási munka nagy részét. Mivel a törzsgyűjtemény 2009-ben volt utoljára „megújítva”, ezért nincsenek információink az egyes tételek vitalitásáról, regenerációs képességükről, a 3 éve tartó hűtőtárolás esetleges káros hatásáról. Az átoltások aktuális és fontos fenntartási műveletet jelentenek a gyűjtemény további hasznosításához, a helyes génbanki információk birtokában pedig nemzetközi törzsgyűjteményi hálózathoz való csatlakozásunkat teszi lehetővé. Az átoltással kapcsolatban az alábbi célkitűzéseket fogalmaztuk meg:

1. Annak megállapítása, hogy PDA (burgonya-dextróz-agar) vagy MA (maláta-agar) táptalaj alkalmasabb az egyes gomba nemzetségek/fajok/fajták regenerálására.
2. A regenerálódott fajazonos, ám különböző törzsek jellemzése és szelektálása a növekedési erélyük szerint.
3. Annak felmérése, hogy mely jelentősebb termesztett gombanemzetségek alkalmasak a steril vízben maláta-agar korongos hűtve tárolásra.
4. A gyűjteményes anyag korszerű és pontos dokumentálása QR-kód rendszer bevezetésével.

4. Anyag és módszer

4.1. Felhasznált táptalajok

A kísérlet során két táptalajt használtam, amelyről tudjuk, hogy gombák fenntartására és in vitro nevelésére alkalmasak (Jakucs 2011). A tömegi mennyiségeket laboratóriumi mérleggel mértem, az ioncserélt vizet Crist Ministil típusú ioncserélő oszloppal készítettem hálózati csapvízből.

Maláta-agar (malt-agar, MA) táptalaj (Szili 1994, módosítva):

1.000 milliliter ioncserélt víz

15 gramm maláta extraktum (Micro media)

18 gramm bakteriológiai poragar (Reanal)

Burgonya-dextróz agar (potato-dextrose-agar, PDA) táptalaj (Szili 2008, módosítva):

1.000 milliliter ioncserélt víz

3 gramm burgonyakeményítő (Roth)

10 gramm D-(+)-glükóz-1-hidrátot (3D–Spektrum)

37 gramm bakteriológiai poragar (Reanal).

4.2. Táptalajok előkészítése

A vizes táptalaj oldatokat hőálló Schott-Duran üvegekbe öntöttem és a gőz szabad áramlása érdekében csak enyhén csavartam rá a kupakokat. A páralecsapódás csökkentése miatt alufóliával fedtem az üvegeket, majd megjelöltem azokat. A jelölt üvegeket autoklávba (Raypa 80) tettem és +121°C-on 1,2 bar nyomáson 20 percig sterilizáltam. A program lejártával hőálló kesztyűben egyesével kiemelttem az üvegeket és a forró táptalajt, majd összetevők keveréséhez egyszer-kétszer fejre fordítottam (visszazárt kupakkal). A táptalajt lamináris fülkében előre kikészített steril, 9 cm átmérőjű műanyag petri-csészékbe (Deltalab) öntöttem 2-3 milliméter vastagon. A kihűlt és megdermedt táptalajt sterilen becsomagoltam és elraktároztam. Két-három nap múlva szemmel ellenőriztem a táptalajok esetleges kontaminációját, majd felhasználtam a kémcsövekből kioltáshoz.

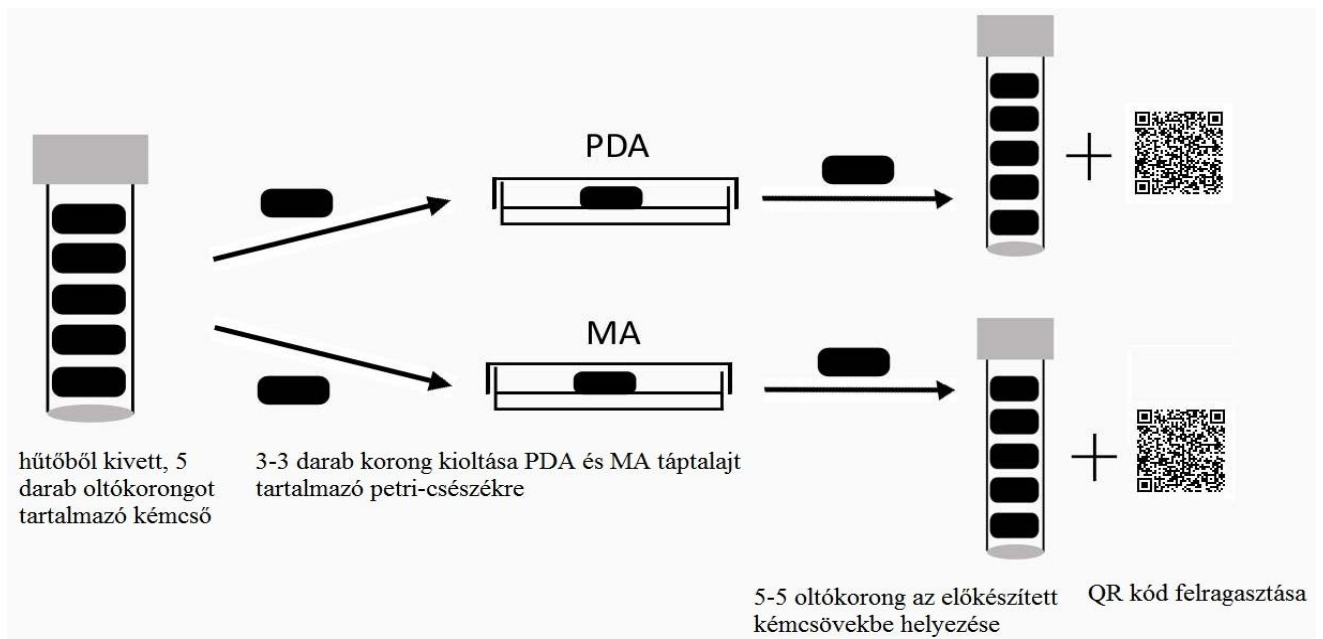
4.3. A regenerált tenyészet átoltása és értékelése

A törzstenyészeti kémcsöveket, hűtőszekrényben tároljuk, amely ellenőrzött +4°C-os hőmérsékleten tartja a mintákat (**4. ábra**). A kémcsőállványokban eddig minden gombafajból 5-5 kémcső volt eltárolva és minden kémcsőben 5 táptalaj korong micéliummal átszövetve. Ezek közül egy, ránézésre egészséges micéliumot tartalmazó kémcsövet véletlenszerűen kiválasztva a táptalaj korongokat 3 db PDA és 3 db MA táptalajos petri-csészére tettem, sterilizált oltókacs segítségével, amelyet előzőleg 70%-os etanolban áztattam majd gázégővel lelángoltam. A pontos azonosításhoz minden petri-csészét megjelöltem, amelyen a dátumot is feltüntettem. A tenyészeteket ezután szobahőmérsékleten inkubáltam, majd 10 nappal később minden tenyészetet lefotóztam és 10-es skálán bonitáltam a növekedésüket (0-nincs növekedés, 10-teljesen kolonizált petri-csésze), majd az eredményeket a 3-3 petri-csésze bonitált átlagából számítva tüntettem fel. Az eredményeknél (5. fejezet) látható, hogy néhány tenyészet egyáltalán nem nőtt az inkubációs időszak alatt, ezeket továbbra is szobahőmérsékleten tartva addig inkubáltam, amíg el nem érték a visszaoltáshoz szükséges telepátmérőt. A visszaoltáshoz a fejlődő telepeket morfológiájuk és növekedési erélyük szerint szelektáltam, visszaoltásra csak olyan micélium került, amely fajra jellemző habitussal és intenzív növekedéssel rendelkezett. A kioltás és értékelés közti időben a kiürült kémcsöveket kitisztítottam és ioncserélt vízzel autoklávoztam 20 percig +121°C-on. A qr-kod.hu honlapon készítettem telefonos programmal olvasható QR kódot és olvasható feliratot (faj és fajtanév, oltás dátum, származási hely, táptalaj típusa, oltó személy) minden kémcsőre fajonként. Ezeket egy sablonnal ellátott word dokumentumba szerkesztettem és nyomtattam ki ragasztható etikett papírra, majd felragasztottam a kémcsövekre. Ezután 70%-os alkoholban áztatott és lelángolt, steril dugófúróval (átmérő: 8 mm) korongokat vágtam az új tenyészetekből és 5-5 korongot tettem minden kémcsőbe. 3-3 kémcsövet készítettem mindkét táptalajból, így a későbbi



4. ábra: Törzstenyészet tárolása +4°C-on hűtőszekrényben

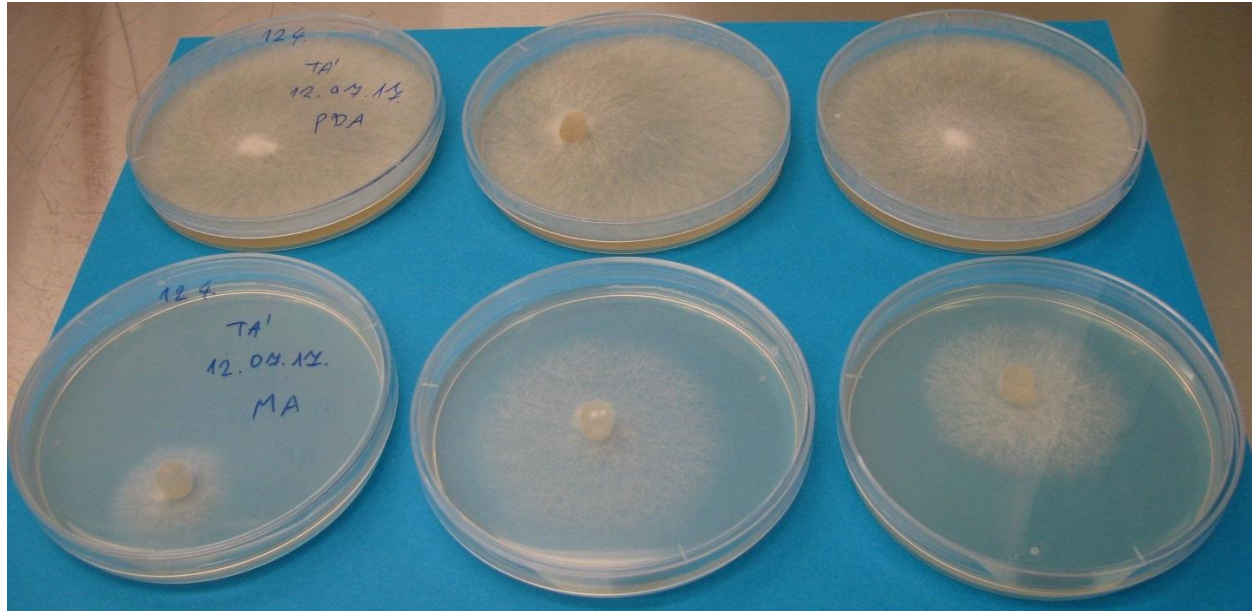
átoltásoknál is vizsgálható a regenerációs képesség a táptalaj függvényében. Ezután kémcsőállványokba helyeztem a visszaizolt tenyészeteket, majd 2-3 napig inkubáltam szobahőmérsékleten a micélium hidratálásához. Az így előállított kémcsöveket feliratozott állványokban helyeztem vissza a hűtőbe. Az átoltás és szelekció gyakorlati vázlatát az **5. ábra** szemlélteti.



5. ábra: Törzstenyészetek átoltásának vázlatos rajza

5. Eredmények

Minden törzsről fényképet készítettem (**6. ábra**), majd a növekedés intenzitását bonitálva 3-3 petri-csésze átlagából kiszámította az átlagértékeket, amelyet a **2. táblázatban** foglaltam össze.



6. ábra: *Psilocybe cubensis* 'Psi 2', 10 nappal az oltást követően (felső sor PDA, alsó sor MA táptalaj)

2. táblázat: A törzsgyűjteményi fajok és törzsek regenerációjának értékelése bonitálással MA és PDA táptalajon

Sorszám	Faj	Törzs	PDA	MA
1.	Agaricus bisporus	U 3	2	3
2.	Agaricus bisporus	X 20	2	2
3.	Agaricus blazei	F-CA-276-0905	2	0
4.	Agaricus blazei	838	10	10
5.	Agaricus blazei	Mycelia-MaHen-1005	1	3
6.	Agaricus blazei	Klon-NiWi-MaHe-1005	6	2
7.	Agaricus blazei	v.Gr.-Bras-1105	4	4
8.	Agaricus blazei	v.Gr.-Si 2.2-0206	7	6
9.	Agaricus campestris		2	2
10.	Agrocybe aegerita		8	8
11.	Agrocybe aegerita	Aa 4	10	3
12.	Agrocybe aegerita	Aa 5	8	3
13.	Auricularia polytricha	Ap 1	2	1

14.	Auricularia polytricha	Ap 2	2	1
15.	Buna shimeji	TOT-2000	3	4
16.	Coprinus comatus	C 1	1	1
17.	Coprinus comatus	C 10	4	0
18.	Coprinus comatus	CC 95	2	2
19.	Coprinus sp.	Acemyan 1997	1	0
20.	Coriolus versicolor	M 1905	3	3
21.	Coriolus versicolor	M 1910	10	10
22.	Dactylium dendroides	D	3	2
23.	Dactylium dendroides	Dd1CA	10	9
24.	Flammulina velutipes	Fl 1	6	6
25.	Flammulina velutipes		8	7
26.	Flammulina velutipes	Fl 2	6	6
27.	Fomitopsis pinicola	Fo3	10	6
28.	Ganoderma lucidum	HSchäfer 081106	7	0
29.	Ganoderma lucidum	HSchäfer 090107	7	3
30.	Ganoderma lucidum	IScharfe4906	6	7
31.	Ganoderma lucidum	APN 140903	9	10
32.	Ganoderma lucidum	CMünch 081106/GP	10	3
33.	Ganoderma lucidum	CMünch 081106/KP	10	10
34.	Ganoderma lucidum	Dr-Ing.DJurzitza 081106	1	3
35.	Ganoderma lucidum	ESchlüter 180107GP	10	10
36.	Ganoderma lucidum	ESchlüter 180107KP	10	10
37.	Ganoderma lucidum	EStahl4906	10	7
38.	Ganoderma lucidum	HDrobny 170107	10	7
39.	Ganoderma lucidum	HDrobny 191206/GP	6	2
40.	Ganoderma lucidum	HDrobny 191206/MGP	10	10
41.	Ganoderma lucidum	TOT Stw 0904	9	9
42.	Ganoderma lucidum	V.Gr.-690/I-0206	3	3
43.	Ganoderma lucidum	V.Gr.-690/II-0206	0	3
44.	Ganoderma lucidum	WSchlüter 107/64372	6	3
45.	Ganoderma lucidum	WSchlüter 107/64853	10	2
46.	Ganoderma lucidum	WSchlüter 251006	9	10
47.	Ganoderma lucidum	WSchlüter 071206/I	10	6
48.	Ganoderma lucidum	WSchlüter 071206/II	6	3
49.	Ganoderma lucidum	WSchlüter 071206/III	9	7
50.	Ganoderma lucidum	AEsche 071206/GP	10	7
51.	Ganoderma lucidum	AEsche 071206/KP	6	3
52.	Ganoderma lucidum	HObenauer 191006	7	10
53.	Ganoderma lucidum	HWiesner 251006	2	3

54.	Ganoderma lucidum	TBulkow14906	1	8
55.	Ganoderma lucidum	UDStumpf 251006	3	7
56.	Ganoderma lucidum	M 1720	4	1
57.	Ganoderma lucidum	Qingyuan-5	7	2
58.	Ganoderma lucidum	GA04	10	10
59.	Ganoderma lucidum	GA06	10	10
60.	Ganoderma lucidum	Iföller 27603	9	1
61.	Ganoderma lucidum	Wblech 2603	10	2
62.	Ganoderma lucidum	Iföller 2573	9	0
63.	Ganoderma pfeifferi	Linde 17703	4	1
64.	Ganoderma resinaceum	Aki 220903	10	8
65.	Grifola frondosa	astabrey-14102002	9	9
66.	Grifola frondosa	chrhempel-07102002	8	6
67.	Grifola frondosa	dgerres-28092002	8	5
68.	Grifola frondosa	dlöffler-21092002	9	3
69.	Grifola frondosa	M 1821	9	8
70.	Grifola frondosa	M 1822	5	5
71.	Grifola frondosa	UN -B	8	9
72.	Grifola frondosa	UN -B4	8	7
73.	Grifola frondosa	UN - K	9	10
74.	Grifola frondosa	UN - M	9	9
75.	Grifola frondosa	UN - SZ	9	9
76.	Grifola frondosa	UN - V	10	8
77.	Grifola frondosa	wblech-18092002	8	3
78.	Grifola frondosa	vbrehm	9	5
79.	Grifola frondosa	WC 828	9	5
80.	Grifola frondosa	wweißmann-13102002	8	7
81.	Grifola frondosa	kgumbinger-20092002	8	4
82.	Grifola frondosa	vbrehm-10102002	10	5
83.	Grifola frondosa	rconrad-13102002	6	3
84.	Grifola frondosa	jeckstein-07102002	7	6
85.	Grifola frondosa	imöllenkamp-17102002	9	7
86.	Grifola frondosa	imöllenkamp-12102002	3	3
87.	Grifola frondosa	herten-27092002	7	5
88.	Grifola frondosa	handers-16102002	6	2
89.	Grifola frondosa	fgröger-27092002	9	5
90.	Grifola frondosa	ehinz-3-08102002	10	8
91.	Grifola frondosa	ehinz-2-08102002	9	8
92.	Grifola frondosa	dlöffler-19102002	8	5
93.	Grifola umbellata	M 1825	10	10

94.	<i>Hericium erinaceus</i>	820	0	5
95.	<i>Kuehneromyces mutabilis</i>	E 15	3	2
96.	<i>Kuehneromyces mutabilis</i>	Pn 521	10	9
97.	<i>Laetiporus sulphureus</i>	Yasser	10	10
98.	<i>Langermannia gigantea</i>	Bovist 1	1	1
99.	<i>Langermannia gigantea</i>	Bovist 2	0	0
100.	<i>Langermannia gigantea</i>	Bovist 3	2	1
101.	<i>Langermannia gigantea</i>	GHH	1	0
102.	<i>Lentinula edodes</i>	310	3	0
103.	<i>Lentinula edodes</i>	314	6	3
104.	<i>Lentinula edodes</i>	A 221	5	2
105.	<i>Lentinula edodes</i>	B 3770	4	5
106.	<i>Lentinula edodes</i>	Chi-Luo 135	6	4
107.	<i>Lentinula edodes</i>	Chi-Luo 868	5	0
108.	<i>Lentinula edodes</i>	Chi-Luo 939	2	0
109.	<i>Lentinula edodes</i>	CS 235	3	1
110.	<i>Lentinula edodes</i>	CS-252	7	3
111.	<i>Lentinula edodes</i>	CS-321	3	2
112.	<i>Lentinula edodes</i>	CS-41	4	3
113.	<i>Lentinula edodes</i>	Finnland	3	0
114.	<i>Lentinula edodes</i>	GHH-Kultur	5	1
115.	<i>Lentinula edodes</i>	Hüttenhofkultur	2	2
116.	<i>Lentinula edodes</i>	LE 5	8	0
117.	<i>Lentinula edodes</i>	Le1MeNL	3	0
118.	<i>Lentinula edodes</i>	Le2MeNL	3	1
119.	<i>Lentinula edodes</i>	LEM	3	0
120.	<i>Lentinula edodes</i>	Lou-1	5	7
121.	<i>Lentinula edodes</i>	Lou-2	6	1
122.	<i>Lentinula edodes</i>	Mori	3	0
123.	<i>Lentinula edodes</i>	MS 20	3	2
124.	<i>Lentinula edodes</i>	Qingyuan-1	7	4
125.	<i>Lentinula edodes</i>	PLS/3	9	6
126.	<i>Lentinula edodes</i>	Qingyuan-3	5	1
127.	<i>Lentinula edodes</i>	S-600	7	6
128.	<i>Lentinula edodes</i>	TAI	6	5
129.	<i>Lepista nuda</i>	Ln 97	1	0
130.	<i>Marcolepiota procera</i>	Ma 1	4	3
131.	<i>Marcolepiota procera</i>	Ma 2	3	2
132.	<i>Metarrhizium anisopliae</i>	Bayer	3	0
133.	<i>Penicillium</i> sp.	P	4	4
134.	<i>Phaenerochaete</i>	Phc	10	10

	chrysosporium			
135.	Pholiota nameko	TOT-2000	5	3
136.	Pholiota sp.	S 2	7	8
137.	Piptoporus betulinus	Pip 1	6	8
138.	Piptoporus betulinus	Pip 2	2	0
139.	Pleurotus columbinus	Au 63 KB	9	3
140.	Pleurotus cornucopiae	Pc	3	0
141.	Pleurotus eryngii	SZM	9	5
142.	Pleurotus eryngii	P	5	3
143.	Pleurotus eryngii	S	6	2
144.	Pleurotus eryngii	LA	6	7
145.	Pleurotus eryngii	Pe	0	1
146.	Pleurotus eryngii	Pe Ch 0405	6	0
147.	Pleurotus eryngii	TOT-2000	5	0
148.	Pleurotus ostreatus	Au 85	3	3
149.	Pleurotus ostreatus	Aust. a. Florida	1	2
150.	Pleurotus ostreatus	Aust. a. Siegen	4	2
151.	Pleurotus ostreatus	PLS/3	3	5
152.	Pleurotus ostreatus	VG6/15	10	7
153.	Pleurotus ostreatus	VL6/5	10	9
154.	Pleurotus ostreatus	Aust. a. Syrien	10	7
155.	Pleurotus ostreatus	G 24	9	10
156.	Pleurotus ostreatus	H 7	6	4
157.	Pleurotus pulmonarius	3014	8	10
158.	Pleurotus pulmonarius	Au 74	10	10
159.	Pleurotus saca	Ps	8	6
160.	Pleurotus sajor-caju	Ps c	10	6
161.	Pleurotus salmoneo-stramineus	Ps-st	8	0
162.	Pleurotus sp.	HK 35	5	5
163.	Psilocybe cubensis	Psi 2	10	4
164.	Stropharia rugoso-annulata	D-Hoppe 1005	9	1
165.	Stropharia rugoso-annulata	M 511	6	4
166.	Stropharia rugoso-annulata	myblaak0304	2	3
167.	Stropharia rugoso-annulata	St 2	3	1
168.	Stropharia rugoso-annulata	Sy 610	6	2
169.	Stropharia rugoso-annulata	T 54	1	1
170.	Stropharia rugoso-annulata	T 55	6	5
171.	Stropharia rugoso-annulata	T 57	0	2
172.	Stropharia rugoso-annulata	Winnetou	6	4
173.	Trichoderma viride	Tv1CA	10	9

174.	Trichoderma harzianum	Th1CA	1	2
175.	Trichoderma sp.	T	0	0
176.	Trichoderma viride	Tv	10	10
177.	Trichoderma hamatum		10	10
178.	Tricholoma populinum		0	0
179.	Verticillium fungicola	V1	2	2
180.	Verticillium fungicola	Vf1CA	4	5
181.	Volvariella bombycina	Vb	10	10

Sajnos nem minden tenyészetet tudtunk regenerálni, egyes tételek a 3 éves hűtve tárolást követően nem fejlesztettek micéliumot, többszöri kioltás után sem. Ezeket a törzseket a **3. táblázatban** foglaltam össze.

3. táblázat: Nem vitális tenyészetek törzsgyűjteményi adatai

Sorszám	Faj	Törzs
1.	Agaricus blazei	WC 853
2.	Agaricus blazei	v. Gr.-NL-CC256-1205
3.	Agaricus blazei	v.Gr.-H2-0206
4.	Agaricus blazei	7700
5.	Agaricus blazei	837
6.	Agaricus blazei	1105
7.	Agaricus blazei	Brazil
8.	Agaricus blazei	658
9.	Agaricus blazei	2603
10.	Ganoderma lucidum	GA05
11.	Lentinula edodes	Chi-Luo 7925
12.	Pleurotus eryngii	F
13.	Pleurotus ostreatus	L125/5
14.	Pleurotus ostreatus	P80

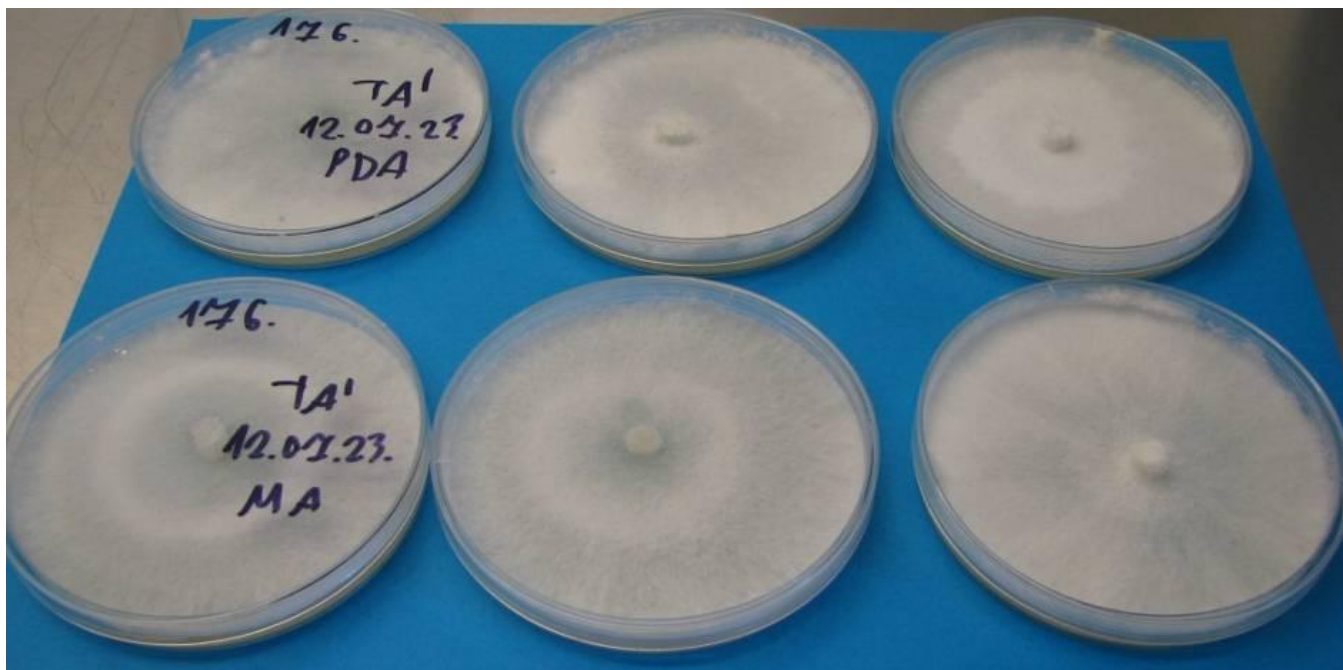
Az átoltás előtt a tenyészeteket egyszerű számokkal kódoltuk és ez alapján azonosítottuk. Az egyes tételek azonosítását így kissé nehézkesen lehetett elvégezni. Ennek a problémának a kezelésére az ipar más területein használt QR kódok bevezetését gondoltuk ideálisnak. A Quick Response (QR) egyik legfontosabb tulajdonsága, hogy gyorsan és nagy hibatűréssel lehet értelmezni, dekódolni a bele rejtett információt (Internet 2). A QR-kód szöveges adattá alakításához a mobiltelefonokra is letölthető ingyenes alkalmazás szükséges, amely ma már bárhol elérhető az ismert internetes áruházakban (Internet 3). Legfőbb előnye, hogy ingyenesen előállíthatóak és olvashatóak ezek a kódok. Másik előnyük, a nagy szöveges kapacitás, amely akár több ezer karakter is lehet, így minden, az oltással kapcsolatos adat visszakereshető és közvetlenül a kémcsöveken elérhető. Emellett igen korszerű eljárásról lévén szó, a nemzetközi adatbázisba vonást is elősegíti (Internet 3). Minden kémcsőre egyenként ragasztottam fel a kódokat, illetve a biztonság kedvéért egy rövid,

kevesebb információt tartalmazó felirat is került a faj/törzs nevével és oltási dátumával. Ezáltal a gyűjtemény korszerű, könnyen kezelhető és felhasználható lett (7. ábra).



7. ábra: QR kóddal és felirattal ellátott kémcsövek

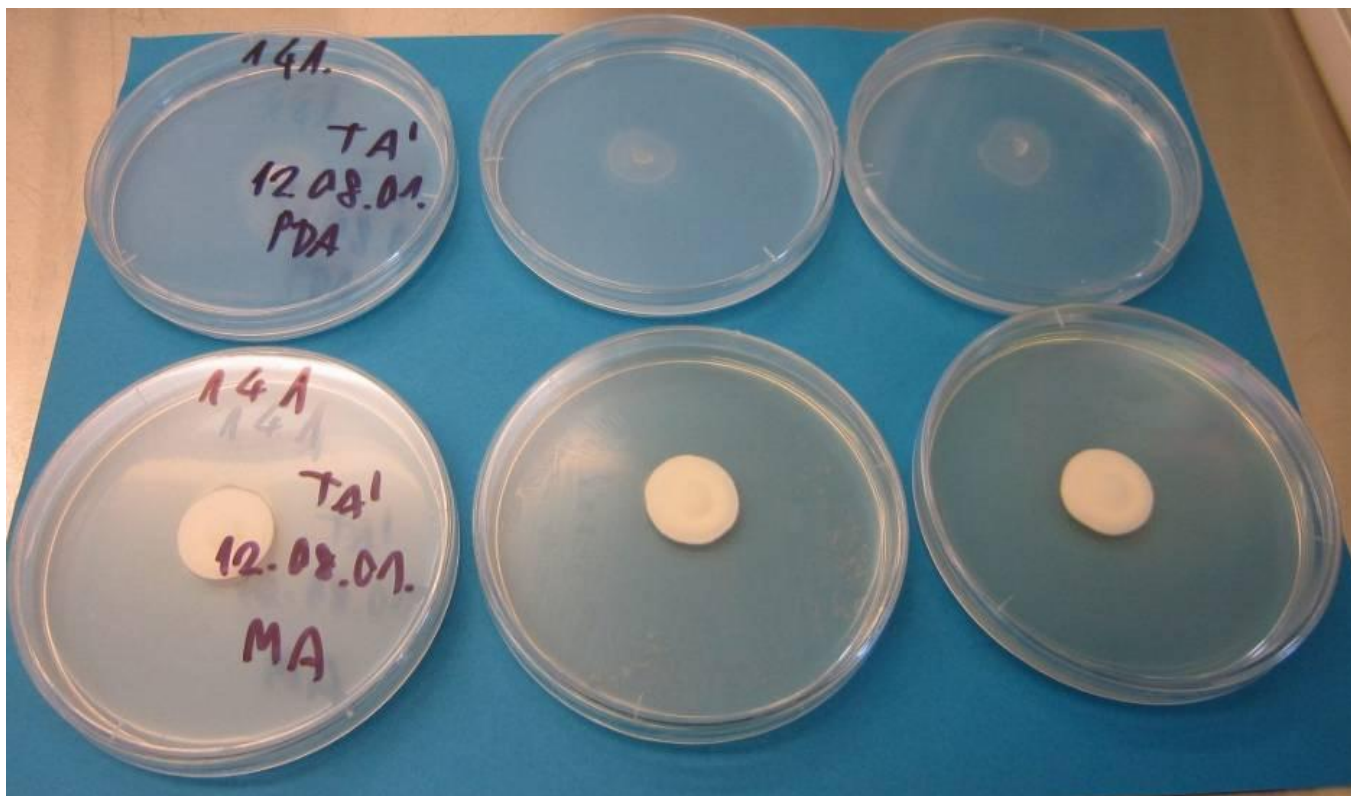
Egyazon gombafaj különböző törzsei hasonló morfológiájú telepeket fejlesztettek, közülük csak néhány, micélium képződési formát és eltérő eseteket emelnék ki. Hangsúlyozva, hogy a bemutatott telepek nem elváltozás eredményei, hanem faji sajátosságok. A nagy vigorral rendelkező törzseknél sűrűn előfordult légmicélium megjelenése, amelyet a petri-csésze falán és közepén egyaránt lehetett látni (8. ábra). Egyes bokrosgomba-fajoknál (*Grifola* sp.) és pecsétviaszgomba-fajoknál (*Ganoderma* sp.) sugaras kolonizálás figyelhető meg (9. ábra), amelyet a szakirodalom is említ (Stamets 2000). A patogén gombák többségénél kompakt, egybefüggő telepek alakultak ki (10. ábra).



8. ábra: Légmicéliumot képző *Coriolus versicolor* 'M 1910' törzs (felső sor PDA, alsó MA táptalaj)

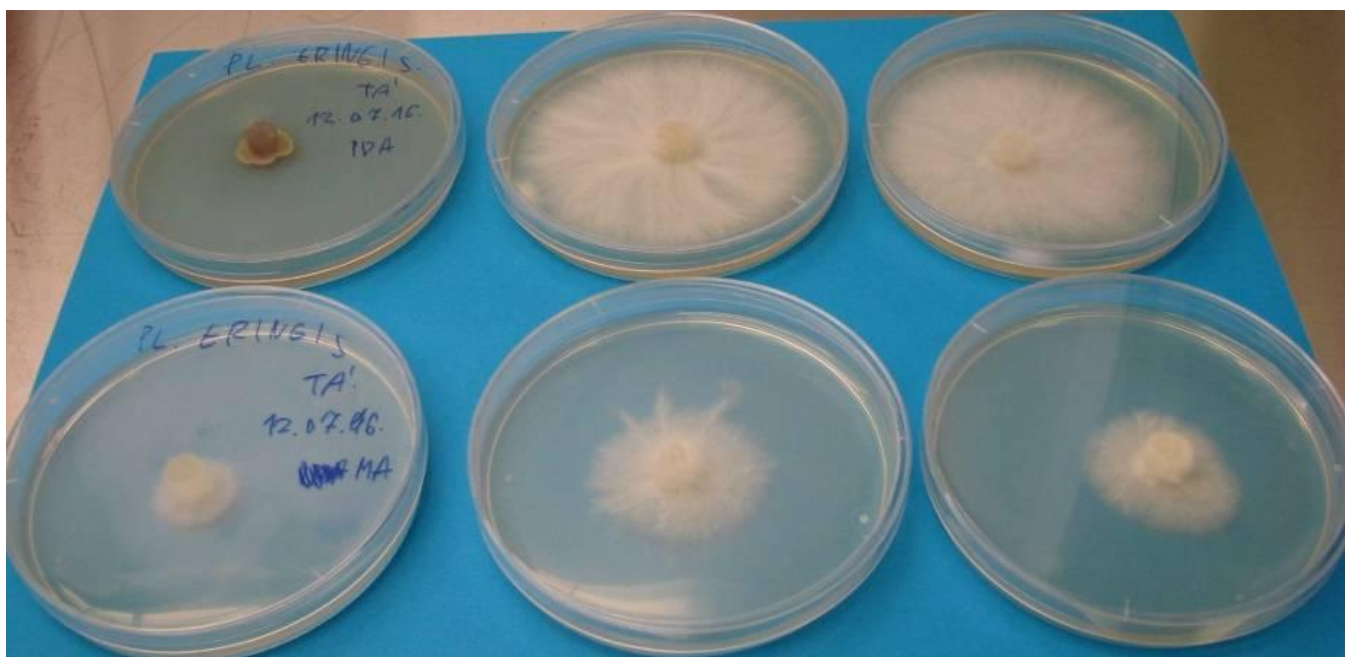


9. ábra: Sugaras telepet alkotó *Grifola frondosa* 'fgröger-27092002' törzs (felső sor PDA, alsó MA táptalaj)



10. ábra: Kompakt telepet fejlesztő *Verticillium fungicola* 'VI' törzs (felső sor PDA, alsó MA táptalaj)

A törzsgyűjteményi szelekciós munka alkalmával eltávolítottuk azokat a korongokat és megsemmisítettük azokat a petri-csészéket, amelyekről micélium nem tudott fejlődni (**11. ábra**). Jelen esetben valamilyen bakteriális fertőzés okozhatott kontaminációt.



11. ábra: *Pleurotus eryngii* 'S' törzsnél talált fertőzött oltókorong a bal felső petri-csészében

6. Következtetések

Az eredményeket összefoglalva megállapítható, hogy a 3 évig tartó hűtőtárolás hatására a steril vízből kioltott micéliumkorongok többsége jó-közepes regenerációval rendelkezett. A kioltást követő 10. napra a telepek a legtöbb gombafajnál elérték a visszaoltáshoz szükséges telepátmérőt. Az értékeléskor az adatok kezelhetősége miatt csak a telepátmérőt vettük figyelembe. Általánosságban megállapítottuk, hogy a telepek intenzívebb növekedést mutatnak a PDA táptalajon, mint MA táptalajon. Saját laboratóriumi megfigyeléseink alapján maláta-agar táptalajon az ehető nagygombák növekedése általában jobb, noha ismert, hogy minden faj táptalaj-preferenciája más (Jakucs 2003). A szintetikus táptalajok közös jellemzője, hogy reprodukálható és minden összetevője ismert, ezért használtunk jelen vizsgálatban is ilyen táptalajokat. Az MA és a PDA táptalaj egyaránt tartalmazza azokat a gomba számára felvehető szén- és nitrogénforrásokat, amelyek a telep növekedéséhez szükséges. Statisztikai értékelést és összehasonlítást nem végeztünk az egyes telepek növekedési intenzitásáról, de annyit megállapítottunk, hogy a telepek általában jobban regenerálódtak a PDA táptalajon. A maláta-agon fejlődő telepek általában kisebb átmérővel rendelkeztek, és a telepek morfológiájában nem volt lényegi eltérés a két táptalajon, amely esetleg indokolná az eltérést. Minden esetben a fajra jellemző micéliumtelepek fejlődtek, amely a korábbi pontos adminisztrációra utal.

Jelentős génbanki tételszámmal rendelkezünk pecsétviaszgombából (*Ganoderma lucidum* – 34 tétel), amelyek növekedése törzstől erősen függő intenzitást mutatott. Néhány törzs (például: CMünc 081106/KP; ESchlüter 180107GP; HDrobny 191206/MGP; GA04; GA06) mindkét táptalajon teljesen kolonizálta a petri-csészét 10 nap alatt, amely alapján valószínűsíthető, hogy termesztési körülmények között is intenzív növekedéssel rendelkezhetnek. A továbbiakban ezeket a törzseket tartjuk termesztési kísérletekben perspektivikusnak. Szintén jelentős a bokrosgomba (*Grifola frondosa*) törzsgyűjtemény, amely jelenleg 27 tételből áll. Ezek regenerációs képessége általában jónak mondható, egyetlen anyag (imöllenkamp-12102002) mutatott jelentősen lassabb növekedést. A világ különböző pontjairól származó shiitake (*Lentinula edodes*) törzsek gyengébb növekedéssel (általában 5 alatt) bírtak, de itt is igaz, hogy PDA táptalajon a növekedés erőteljesebb. A termesztési szempontból jelentős kései laskagomba (*Pleurotus ostreatus*) és hibridjei általában jól viselik a hosszabb tárolást (Hajdú, 2008). Gyakorlatból ismert tapasztalat, hogy a fehérkorhasztó életmódot folytató laskafajok jobban megőrzik termőképességüket, vitalitásukat, hogyha a fenntartásuk faanyagot is tartalmazó természetes vagy mesterséges tápközegen történik. A Korona Gombaipari Egyesülés csíralaboratóriumában ezért sterilizált fapálcikákon is fenntartják a törzseket hűtve tárolva (Hajdú 2008). Adataink szerint a gyűjteményünkben lévő törzsek elég nagy szórást mutattak a regenerálódási képességben, 10-es és 1-es érték egyaránt előfordul. Ezért célszerűnek

tartanánk a gyengébb növekedési eréllyel rendelkező fajtákat/törzseket kitermeszteni, és onnan vegetatív módon visszaizolálni a micéliumot, hogy a vitalitásukat visszanyerjék.

Négy gombanemzetség néhány törzse nem mutatott egyáltalán növekedést, a többszöri újabb kioltások ellenére sem (**3. táblázat**). Ezen fajok egy részét a nemzetközi és hazai génbankokból tudjuk pótolni, ám a '*Ganoderma lucidum* GA05' jelű törzse valószínűleg véglegesen elveszett. Az *Agaricus blazei* (syn. *Agaricus subrufescens*) törzsekről ismert, hogy trópusi származásúak és alacsony hőmérsékleten a vitalitásuk erősen csökken (Stamets 2000). A nagyobb mértékű termesztésének egyik gátja az is, hogy csíráját (szaporítóanyagát) nem lehet +2°C-on tárolni (mint más fajokat), mert a micélium károsodik ezen a hőmérsékleten (Erdei, szem.közl.). Ezt a megfigyelést erősítik meg a saját adataink is, ugyanis a faj 9 tételét sem tudtuk az agarkorongokról regenerálni. Ebben az esetben tételvesztés nem történt, mert párhuzamosan ferde-agaron is fenntartjuk ezeket a törzseket, és onnan pótolhatóak.

Tapasztalataim szerint a pecsétviaszgombafajok (*Ganoderma* sp.) micéliuma olyan sűrű, kompakt, hogy a dugófűró használata nehézkessé válik. Későbbiekben ezért javasolható, hogy szikével metsszük ki a táptalaj-korongokat, mert így a micélium sérülése elkerülhető.

7. Összefoglalás

A technika és tudomány fejlődésének köszönhetően napjainkra sokféle gomba törzsfenntartási módot ismerünk. A tárolási módokat a hőmérséklet, vívmennyiség szerint is csoportosíthatjuk, illetve megkülönböztetünk rövid és hosszú távú konzerválást. Jelenleg az egyik legkorszerűbb eljárás a folyékony nitrogénnel történő hűtés, amely speciális eszközöket és magas állandó ráfordítási költséget igényel. Széles körben alkalmazott technológia a micélium táptalajkorongokon történő hűtve tárolása sterilizált vízben is. A Budapesti Corvinus Egyetem Zöldség- és Gombatermesztési Tanszék termesztető gomba törzsgyűjteményét is ilyen körülmények között tárolják. A közel 30 gombanemzetség mintegy 200 törzsét tartalmazó törzsgyűjtemény közel 90%-a gazdasági jelentőségű nagygomba, a maradék 10%-ot olyan patogének alkotják, amelyek rendszeresen károsítanak a termesztésben. A gyűjtemény „frissítése”, felmérése és szelekciója 2012-ben vált esedékessé. A dolgozatomban bemutatom a törzsgyűjteményi anyag átvételét és közlöm az egyes törzsek regenerációs képességét, amelyet két különböző (PDA és MA) táptalajon vizsgáltam a tanszék gombalaboratóriumában. A törzsek kioltását követően 10 napos inkubálás után fényképes dokumentációt készítettem a telepekről, majd bonitálással értékeltem azokat. Amennyiben a telepátmérő megfelelő méretű volt, a micéliumot visszaoltottam 5-5 táptalajt is tartalmazó oltókoronggal, steril desztillált vizet tartalmazó kémcsövekbe. Ezen kémcsövekre újszerű eljárással QR-kódba generált etikettet ragasztottam, az egyes tételek azonosításához szükséges információval. Ezzel az újítással modernizáltam a kémcsövek rendszerezését és felkészítettem a nemzetközi génbanki hálózatba való bekapcsolását.

A kapott eredményeim alapján megállapítottam, hogy az egyes törzsek regenerációs értékei nagy szórást mutatnak. A gombatörzsek nagyobb része a PDA táptalajon mutatott gyorsabb fejlődést, így a későbbiekben javasolható e táptalaj használata. A telepek a 3 éves hűtve tárolást követően jó-közepes eredménnyel regenerálódtak és a gyűjtemény elenyésző hányada, mindössze 2,5%-a semmisült meg véglegesen. Noha ez a szám nem túl magas, a továbbiakban ezt is csökkentenünk kell. Megállapítottuk, hogy az *Agaricus subrufescens* faj nem őrizhető meg biztonságosan ilyen eljárással. Az eredmények alapján a steril vízben történő micélium-korong tárolás az ehető gombák számára kielégítő konzervációs eljárásnak bizonyult.

8. Felhasznált irodalom

1. Atkins F. C.: Mushroom growing to-day. Cousens Press, London, 1955
2. Balázs S.: Zöldségtermesztők kézikönyve. Mezőgazda Kiadó, Budapest, 1994
3. Bohus G., Koronczy I.-né, Uzonyi S.-né: A termesztett csiperke, *Psalliota bispora* (Lange) Treschow. Magyarország kultúrflórája. 1. Kötet 11. füzet Budapest, 1961
4. Carmichael J. W.: Viability of mold cultures stored at -20°C. Mycologia 54, 432-436 o. 1962
5. Cavalcanti M. A. D. Q.: Viability of *Basidiomycotina* cultures preserved in mineral oil. Rev. Latinoam. Microbiol. 32, 265-268 o. 1991
6. Challen M. P., Elliott T. J.: Polypropylene straw ampoules for the storage of microorganisms in liquid nitrogen. J. Microbiol. Methods 5, 11-22 o. 1986
7. Clark G., Dick M. W.: Long-term storage and viability of aquatic *Oomycetes*. Trans. Br. Mycol. Soc. 63, 611-612 o. 1974
8. Creager A. N. H.: 'What Blood Told Dr Cohn': World War II, Plasma Fractionation, and the Growth of Human Blood Research. Studies in History and Philosophy of Science Part C: Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences, Volume 30, Issue 3, 377-405 o. 1999
9. Douds D. D., Schenck N. C.: Cryopreservation of spores of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. New Phytologist 115, 667-674 o. 1990
10. Fabre J., Dereuddre J.: Encapsulation-dehydration: A new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot-tips. CryoLetters 11, 413-426 o. 1990
11. FruitVeb: A zöldség és gyümölcs ágazat helyzete Magyarországon. Magyar Zöldség-Gyümölcs Terméktanács, Budapest, 2012
12. Győrfi J.: Csiperketermesztés nem csak vállalkozóknak. Szaktudás Kiadó Ház, Budapest, 2003
13. Győrfi J.: Csiperketermesztés Európában. Kertgazdaság 37 (4): 5-9 o. 2005

14. Györfi J. (szerk.): Gombabiológia, gombatermesztés. Mezőgazda Kiadó, Budapest, 2010
15. Hajdú Cs.: A termesztett *Pleurotus ostreatus* hibridek tulajdonságainak javítása és új hibridek előállítása vadon termő törzsek alkalmazásával. Doktori (PhD) értekezés, Budapesti Corvinus Egyetem, Budapest, 2008
16. Hartung de Capriles C., Mata S., Middelveen M.: Preservation of fungi in water (Castellani): 20 years. Mycopathologia 106, 73-80 o. 1989
17. Humber A. R.: Fungi: Preservation of cultures. Manual techniques in insect pathology 269-279 o. USA 1997
18. Jakucs E.: A mikológia alapjai. ELTE Eötvös Kiadó, Budapest, 2011
19. Jakucs E., Vajna L.: Mikológia. Agroinform Kiadó, Budapest, 411-418 o. 2003
20. Kirsop B. E., Snell J. J. S.: Maintenance of Microorganisms. Academic Press, London, 1984
21. Kóthay I.: A gyakorlati gombatermesztés. Csokonai könyvterjesztő vállalat, Budapest, 1943
22. Lalaymia I., Cranenbrouck S., Draye X., Declerck S.: Preservation at ultra-low temperature of in vitro cultured arbuscular mycorrhizal fungi via encapsulation-drying. Fungal Biology Volume 116, Issue 10, 1032–1041 o. 2012
23. Nakasone K. K., Peterson W. S., Shung-Chang J.: Preservation and distribution of fungal cultures. Biodiversity of Fungi Inventory and Monitoring methods Chapter 3, 38-48 o. USA 2004
24. Onions A. H. S.: Preservation of fungi. in: Booth C.: Methods in microbiology Chapter 4, London, 1971
25. Perkins D. D.: Preservation of *Neurospora* stock cultures with anhydrous silica gel. Can. J. Microbiol. 8, 591-594 o. 1962
26. Rác J., Koronczy I.-né: Hogyan termesszünk csiperkegombát? Korona Országos Gombaipari Egyesülés, Eger, 2001
27. Simmons E. G.: In "Culture collections. Perspectives and problems", University of Toronto Press, Toronto 1963

28. Smith C.: Long-term preservation of test strains (fungus). Int. Biodeterior. Biodegrad. 31, 227-230 o. 1993
29. Somos A., Angeli L.: Korszerű csiperketermesztés. Mezőgazdasági kiadó, Budapest, 1963
30. Stamets P.: Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms. Ten Speed Press, Toronto, 2000
31. Szili I.: Gombatermesztés. Mezőgazda kiadó, Budapest, 1994
32. Szili I.: Gombatermesztők könyve. Mezőgazda Kiadó, Budapest, 2008
33. Tan C. S., van Ingen C. W., Talsma H., van Miltenburg J. C., Steffensen C. L., Vlug Ij. A., Stalpers J. A.: Freeze-drying of fungi: influence of composition and glass transition temperature of the cryoprotectant. Cryobiology 32, 60-67 o. 1995
34. Windels C. E., Bumes P. M., Kommendahl T.: *Fusarium* species stored on silica gel and soil for ten years. Mycologia 85, 21-23 o. 1993

Internetes hivatkozások:

1. FAOSTAT adatbázis. <http://faostat.fao.org/> (Letöltés: 2012.11.03.)
2. A QR-kód titkai. http://hvg.hu/Tudomany/A_QRkod_titkai_GWEY9I (Letöltés: 2012.11.06.)
3. QR code. <http://en.wikipedia.org/wiki/QRcode> (Letöltés: 2012.11.06.)