



SZENT ISTVÁN EGYETEM

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

Doktori (PhD) értekezés tézisei

HALÁSZ ÁGNES

GÖDÖLLŐ

2014

A doktori iskola

Megnevezése: Növénytudományi Doktori Iskola

Tudományága: Növénytermesztési és Kertészeti Tudományok

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

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

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

1. A MUNKA ELŐZMÉNYEI, A KITŰZÖTT CÉLOK

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

Az őszi búza legfontosabb kenyérgabona-növényünk, valamint fontos megélhetési forrás, ezért gazdasági és ökológiai védelme elsőrendű feladat. A búzatermesztés sikerét a különböző kórokozók, mint a rozsdá- és üszöggombák, nagymértékben befolyásolják, fellépésük esetén rontják a gabona minőségét és csökkentik a termés mennyiségét. A csíranövény-fertőző *Tilletia*-fajok világszerte az egyik legveszélyesebb kórokozónak számítanak (KELLERER et al. 2006).

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

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

Általánosságban elmondható, hogy az üszögbetegségek ma kevesebb gazdasági kárt okoznak, mint ötven évvel ezelőtt, köszönhetően az agrotechnika és kémiai védekezési módszerek fejlődésének. Azonban napjainkban némi visszalépést tapasztalhatunk az 1970-es és 1980-as évekhez képest mind a termelés színvonalát, mind az agrotechnikai igényességet illetően, mivel a termelés bizonyos szegmensei kiestek a gazdasági szakirányítás hatásköréből (kis és gazdaságtalan üzem- és táblaméret, csávázás elhagyása, kényszergazdálkodás, stb.), így a gabonaüszög a 90-es években ismét felütötte a fejét.

Számos országban van érvényben hatósági szabályozás a *Tilletia*-fajokkal fertőzött búzaszállítmányokkal kapcsolatban, ez főként importkorlátozásban nyilvánul meg. Az érintett

fajokkal szemben – *T. contraversa* és *T. indica* – zéró tolerancia, illetve fertőzöttségi küszöbértékek vannak érvényben annak érdekében, hogy elsősorban meggátolják ezeknek a gombáknak a kórokozómentes területeken való megtelepedését, valamint, ha már jelen vannak, akkor korlátozzák terjedésüket, és felszámolják jelenlétüket. Export szállítmányaink esetleges visszautasításának elkerülése érdekében hazánkban évente végzünk felderítést a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal, Növény-, Talaj- és Agrárkörnyezet-védelmi Igazgatóság (NÉBIH NTAI), Növény-egészségügyi és Molekuláris Biológiai Laboratóriumában (NMBL) a *T. contraversa*-mentesség igazolására.

A *T. caries* és *T. contraversa* teliospóráinak nagyfokú hasonlósága megnehezíti a növény-egészségügyi vizsgálatok elvégzését (MURRAY et al. 1998). Többféle, morfológiai és csírázási tulajdonságon alapuló vizsgálati módszer együttes alkalmazása szükséges a megbízható diagnózis felállításához. Ez magában foglalhatja a fénymikroszkópos, fluoreszcens fénymikroszkópos jellemzőkön túl a táptalajon való csíráztatást is. Ezen technikák rendkívül idő- és munkaigényesek, gyakorlott, szakértő szemet igényelnek. Az előzőek alapján szükségesnek látszott egy vagy több DNS és fehérje alapú molekuláris módszer feltérképezése, adaptálása vagy fejlesztése a munka gyorsabbá és hatékonyabbá tételére.

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

Munkánk során célkitűzéseink az alábbiak voltak:

1. A *Tilletia*-fajok előfordulásának felderítése Magyarországon kombájn-tiszta, learatott őszi búza minták vizsgálata alapján a 2007-2012. közötti időintervallumban, illetve a 2011-ben kimutatott, „visszatérő” *Tilletia contraversa* morfológiai jellemzése, és újbóli színrelépésének háttérben lévő lehetséges tényezők áttekintése.

2. A gabonátárházak levegő-összetételének vizsgálata Hirst-típusú mintavevővel: a tárolók levegőjének növény- és humán-egészségügyi vonatkozású analízise különös tekintettel az üszögspórák jelenlétének felderítésére.

3. A *T. caries* és *T. contraversa* elkülönítését célzó DNS alapú módszerek tesztelése, a megfelelőnek talált módszer adaptálása a laboratóriumi eljárásaink közé.

4. A *T. caries* és *T. contraversa* elkülönítését célzó, fehérje-összetételen alapuló rutin diagnosztikai módszer kifejlesztése, egy megbízható, gyors és ismételhető elektroforetikus technika létrehozása.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1. Mintagyűjtés

A vizsgálati minták gyűjtése a *Tilletia*-fajok éves országos felderítése keretében történt a NÉBIH NTAI szakmai irányításával. A növényvédelmi felügyelők a mintavétel során a kombájntiszta állapotban lévő búzátételekből (az egy tábláról származó tételek nem keveredtek egymással) minimum 2 x 50 g búzaszemet gyűjtöttek be búzátételenként, és összesen 133 db (2007), 94 db (2008), 105 db (2009), 103 db (2010), 90 db (2011) és 98 db (2012) mintát vettek évente. (A kötelezően előírt mintaszám megyénként 5 db.) A mintákat feldolgozás előtt és után száraz, szobahőmérsékletű helyiségben tároltuk.

A levegőmintákat hordozható Hirst-típusú térfogatos spóracsapdával vettük (HIRST 1952) két központi gabonatárházban Budapesten (Bp), illetve Jászapátiban (Ja), valamint 14 kisebb méretű siktárolóban (10 cégnél). A levegőminták mellett búzamintákat is gyűjtöttünk az egyes mintavételi helyszíneken, valamint pormintákat, mégpedig a gabonátárolók vízszintes felületein leülepedett anyagból műanyag csövekbe.

Két lengyel (TILLCO A, TILLCO B) és egy régi magyar (TILLCO C) *Tilletia contraversa* izolátumot, valamint 5 db magyar *T. caries* izolátumot vontunk be a molekuláris diagnosztikai munkánkba. A *T. contraversa*-val fertőzött üszkös kalászkokat Grazyna Szkuta bocsátotta a rendelkezésünkre, illetve herbáriumi anyag formájában Dr. Révay Ágnes szíves felajánlása alapján jutottunk hozzá. A *Tilletia caries*-sel fertőzött mintákat Magyarország különböző régióiban 2008-2009-ben a megyei növényvédelmi felügyelők és Varga András növényvédelmi mikológus gyűjtötték.

2.2. Mikroszkópos vizsgálatok

A búzaminták *Tilletia*-fajokkal való fertőzöttségének megállapításához a lemosásos módszert alkalmaztunk. A teliospóra-méretük meghatározásához 1000x nagyítást használtunk immerziós olajba merített lencsével (USDA 1974; OEPP/EPPO 1982, 2007). A *Tilletia*-teliospórák morfológiai meghatározását VÁNKY (2012) alapján végeztük.

A fluoreszcens fénymikroszkópos vizsgálatot a STOCKWELL és TRION (1986) által leírt módszer szerint végeztük, kisebb módosításokat eszközölve. A fényvisszaverési tulajdonságokat fluoreszcens fénymikroszkóppal (Leica DM LB2, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) vizsgáltuk, és ehhez 50 W higanylámpát és I3 Leica szűrőket (450–490 nm extinkciós filter, 515 nm barrier filter) alkalmaztunk.

A Hirst-típusú térfogatos spóracsapdával vett mintákat Olympus BX51 fénymikroszkóppal 800x nagyításon, valamint Leica DM LB2 fénymikroszkóppal, 1000x

nagyítást használva immerziós olajba merített lencsével értékeltük ki. A *Tilletia*-teliospórák morfológiai meghatározását VÁNKY (2012) alapján végeztük.

2.3. DNS-alapú módszerek alkalmazása a *Tilletia contraversa* és *T. caries* elkülönítésére

A DNS kinyerése teliospórákból

A *Tilletia*-fajok teliospóráiból DNEasy Plant Mini Kit-tel nyertük ki a DNS-t a gyártó használati utasításának megfelelően, kis módosítással.

Tilletia nemzetség-specifikus PCR-módszer

A polimeráz láncreakciókat a BioRad iCycler Thermal Cycler készülékben, KOCHANOVA és munkatársai (2004) alapján végeztük a TILf, TILr *Tilletia* nemzetség-specifikus primerpárral. A PCR reakciókörülmények az alábbiak voltak: 5 min 95 °C-os kezdeti denaturáció, ezt 50 ciklusban 1 min 94°C-os denaturáció, 1 min 58°C-os primerkötés, 1 min 72°C-os lánchosszabbítás követte, melyet egy végső 4 min 72°C-os lánchosszabbítási szakasz zárt le. A PCR-terméket 2%-os agaróz gélen való futtatást követően UV fényben vizualizáltuk és dokumentáltuk. A PCR-termék mérete: 361 bp volt.

Tilletia contraversa-specifikus PCR-eljárás

A polimeráz láncreakciókat a BioRad iCycler Thermal Cycler készülékben, YUAN és munkatársai (2009) alapján végeztük a CQUTCK2, CQUTCK3 primerpárt alkalmazva. A PCR-program lépései az alábbiak voltak: 3 min 94 °C-os kezdeti denaturációt 40 ciklusban 30 s 94°C-os denaturáció, 30 s 60°C-os primerkötés, 45 s 72°C-os lánchosszabbítás követett, melyet egy végső 7 min 72°C-os lánchosszabbítási szakasz zárt le. A PCR-terméket 1,5%-os agaróz gélen való futtatást követően UV fényben vizualizáltuk és dokumentáltuk, a várt PCR-termék mérete 747 bp volt.

A módszert kilencszer ismételve próbáltuk meg reprodukálni. Miután ez sikertelen volt, megkíséreltük a P23-BA0166, CQUTCK1 primerpár alkalmazásával a cikkben szereplő másik módszer reprodukálását, mellyel a fenti primer-párt kifejlesztették. A PCR program lépései az alábbiak voltak: 4 min 94 °C-os kezdeti denaturáció, ezt 5 ciklusban 30 s 94°C-os denaturáció, 45 s 53°C-os primerkötés, 1 min 72°C-os lánchosszabbítás követett, ezután 10 ciklusban 30 s 94°C-os denaturáció, 45 s 36°C-os primerkötés, 1 min 72°C-os lánchosszabbítás következett, melyet egy végső 10 min 72°C-os lánchosszabbítási szakasz zárt le. A PCR-terméket 1,5%-os agaróz gélen való futtatást követően UV fényben vizualizáltuk és dokumentáltuk, a várt PCR termék mérete 1322 bp volt.

Tilletia contraversa azonosítása SCAR-marker felhasználásával

A polimeráz láncreakciókat a BioRad iCycler Thermal Cycler készülékben, GAO és munkatársai (2010) alapján végeztük a TCKSF3, TCKSR3 primereket felhasználva. A PCR reakció körülményei az alábbiak voltak: 5 min 94 °C-os kezdeti denaturáció, ezt 30 ciklusban 30 s 94°C-os denaturáció, 30 s 55°C-os primerkötés, 1 min 72°C-os lánchosszabbítás követte, melyet egy végső 10 min 72°C-os lánchosszabbítási szakasz zárt le. A PCR-terméket 1,5%-os agaróz gélen való futtatást követően UV fényben vizualizáltuk és dokumentáltuk, a PCR-termék mérete: 419 bp volt.

Az eredeti cikk szerinti körülményeket ismételve viszonylag halvány sávokat kaptunk a gélben. A PCR körülményeken változtatva, optimalizálva elértük, hogy a sávok határozottabbak lettek. Touch down PCR-t alkalmazva a reakció körülményei az alábbiak voltak: 15 min 95 °C-os kezdeti denaturáció, ezt 5 ciklusban 30 s 94°C-os denaturáció, 30 s 45°C-os primerkötés, 30 s 72°C-os lánchosszabbítás követett. Ezután 30 s 94 °C-os kezdeti denaturáció, majd 30 ciklusban 30 s 94°C-os denaturáció, 30 s 55°C-os primerkötés, 30 s 72°C-os lánchosszabbítás következett, melyet egy végső 10 min 72°C-os lánchosszabbítási szakasz zárt le.

2.4. Fehérjealapú módszerek alkalmazása a *Tilletia contraversa* és *T. caries* elkülönítésére

Fehérjék kinyerése teliospórákból

A *Tilletia*-teliospórák belső fehérjetartalmának kinyerésére saját, PBS puffer alapú módszert fejlesztettünk. A minták fehérjekoncentrációját a Bradford-módszer alapján határoztuk meg (ROSENBERG, 2004). A kinyert fehérjemintákat aliquotokra osztva további felhasználásig -70°C-on tároltuk.

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

A gélelektroforézis vizsgálatokat LAEMMLI (1970) leírását követve végeztük. Az előkészítés során a kinyert fehérjemintákhoz 4x-es SDS mintaoldó puffert adtunk 3:1 térfogatarányban, majd 3 percre forrásban lévő vízbe tettük az oldódás elősegítésére. Ezután mintánként 15-30 µl mennyiséget (kb. 1 µg/ µl fehérjekoncentráció) vittünk fel a gélre. A vizsgálatokat E5889 – Dual mini típusú (Sigma-Aldrich Co. LLC) vertikális gélelektroforézis készüléken végeztük. A főgél kiöntése után alkohollal (etanol) csökkentettük a felületi feszültséget, melynek eredményeként a gélfelszín homogén maradt. Az etanolt csak a főgél megkötése után távolítottuk el. Ezután gyűjtőgélét öntöttünk a főgél fölé. A gél futtatása során a következő paramétereket alkalmaztuk: feszültség 55 V, amíg a brómfenolkék jelzőfesték elérte a gyűjtőgél alját, majd 45 V, amíg a brómfenolkék jelzőfesték elérte a főgél alját. Az alkalmazott áramerősség 6 mA, a futtatás ideje mintától függően 3-4 óra volt. A gél 15 percig fixáltuk 12%-

os triklór-ecetsavban (TCA), ezalatt a szétválasztott fehérjék adott helyen kicsapódtak, rögzültek. A kék ezüst gélfestést CANDIANO és munkatársai (2004) alapján végeztük. A gélt a festést követően kamerával lefotóztuk és a Quantity One 1-D Analysis szoftver (Bio Rad) segítségével értékeltük ki.

3. EREDMÉNYEK

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

Munkánk során 2007-től napjainkig követtük nyomon a Magyarországon gazdaságilag jelentős *Tilletia*-fajok elterjedését, az eredményeket dokumentáltuk és térképen rögzítettük, valamint leírtuk a fajok előfordulása és a befolyásoló abiotikus tényezők közötti lehetséges összefüggéseket. 2007-ben 133 db, 2008-ban 94 db, 2009-ben 108 db, 2010-ben 103 db, 2011-ben 90 db és 2012-ben 98 db őszi búza mintát vizsgáltunk meg. A tapasztalataink szerint a *T. caries* 2008-tól kezdve minden évben megjelent hazánk területén. A *T. laevis* 2009-ben, 2011-ben és 2013-ban a *T. cariessel* együttesen, kevert fertőzésként is kimutattuk 1-1 mintából, valamint 2009-ben a *T. laevis* önállóan is jelent volt 1 db búzamintában. A *T. contraversa* két alkalommal, 2011-ben és 2013-ban detektáltam a *T. caries* spórákkal kevert fertőzés formájában (Pölöske, Ludányhalászi). A 2011-es pozitív találat miatt az érintett területen megemelt mintaszámmal fokozott felderítést végeztünk a következő évben. 2012-ben a Pölöske környékéről behozott minták egyikéből sem tudtuk kimutatni a *T. contraversa* kórokozót, sőt ebben az évben ezen mintákban egyetlen más *Tilletia*-fajt sem találtunk. A *Tilletia contraversa* és *T. caries* azonosításához kétféle hagyományos mikológiai módszert alkalmaztunk, a fénymikroszkópos (le mosásos módszer) és a fluoreszcens fénymikroszkópos módszert. A mikroszkópos fajhatározás hátránya, hogy a *T. caries* és *T. contraversa* teliospórák nagyfokú hasonlóságot mutatnak, paramétereikben jelentős átfedések figyelhetők meg, ezért a fajszintű határozás időigényes, nem minden esetben megbízható és gyakorlott, szakértő szemet igényel.

A *T. contraversa* fertőzésre gyanús mintát szabad szemmel vizsgálva az üszögpuffancsok feketésbarna színűek, a trimetil-amintól romlott halszagúak voltak, bennük a spórák összetapadtak. A mikroszkópi képen a teliospórák arany-, illetve sötétbarna színűek, átmérőjük $19,29 \pm 1,3$ μm volt. A spórafaluk lécesen vastagodott volt, átlónként 4–5 mezőcskét figyeltünk meg, a mezőcskék mérete $3,08 \pm 1,04$ μm . A spórafalról kiemelkedő lécek, a tüskék átlagosan $1,49 \pm 0,69$ μm hosszúak voltak, a spórát körülvevő átlátszó zselatinburok mérete $2,44 \pm 0,18$ μm volt. Fluoreszcens fénymikroszkópos technika segítségével a következő morfológiai bélyegeket figyeltük meg a *T. contraversa* teliospóráin: a spórák narancssárgás színűek voltak, a citoplazma sárgás-zöldes színben fluoreszkált. A léces falszerkezet felülnézetben hálózatos, futball-labdára emlékeztető mintázatú; a spóra kerületén pedig tüskék formájában látható, rajzolt Nap jellegű volt.

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

lévő spóratömeg sötétbarna volt, porszerűen széteső. A teliospórák gömbölyűek, sárgás vagy világosbarna színűek, $17,41 \pm 1,2$ μm átmérőjűek voltak. A teliospórák fala léces szerkezetű volt, 4-5 mezőcskét figyeltünk meg átlónként, a mezőcskék $3,55 \pm 0,45$ μm átmérőjűek. A spórafalról kiemelkedő kisméretű tüskék átlagosan $0,99 \pm 0,014$ μm rövidek voltak. A *T. caries* fluoreszcens fénymikroszkópos vizsgálata során a következő morfológiai jellegeket figyeltük meg: a spórák citoplazmája világos, sárga-sárgászöld volt, fluoreszkáló gömböket tartalmazott, a spóra vékony burka nem fluoreszkált. Immerziós olajba merítve a *T. caries* teliospórák szerkezete összeomlott, ezért deformált képet mutattak.

Néhány mintában *T. laevis* kórokozót mutattunk ki a lemosásos módszer segítségével. Ezekben az esetekben a spóratömeg barna volt és porszerű, nem összetapadt. A teliospórák gömbölyűek vagy ovális alakúak, sárgásbarna színűek, sima felszínűek, $16,8 \pm 0,4$ μm átmérőjűek voltak, citoplazmájukban olajcseppeket tartalmaztak.

3.2. Hirst-típusú térfogatos spóracsapdával vett levegőminták elemzése

A gabonatárházakban tárolt búzatételek és a tárházak levegőjének vizsgálata során a *Tilletia*-fajok előfordulását vizsgáltuk. A Hirst-típusú levegő-mintavevővel két központi (Budapest, Jászapáti) és 14 db vidéki gabonaraktár levegőjét mintáztuk (és a tárolt őszi búza tételekből és a leülepedett porból is vettünk mintát). Zárlati károsítókat (*T. contraversa* és *T. indica*) nem tudtunk kimutatni a mintákból. A levegőmintákban a *T. caries* kórokozó dominált, míg a *T. laevis* csak alacsony koncentrációban, kizárólag a Budapesten gyűjtött mintákban, volt kimutatható.

A budapesti levegőminták mindegyikében azonosítottunk teliospórákat. A jászapáti központi raktárban gyűjtött levegőminták teliospóra koncentrációja alacsonyabb volt, mint a budapestieké. A vidéki síktárolókban vett minták tekintetében a búzaminták 88,9%-ában, a porminták 25,8%-ában, valamint a levegőminták 56,3%-ában azonosítottunk *Tilletia*-teliospórákat. A mért spóra koncentrációk általában alacsony értékeket mutattak egy eset kivételével, ahol kiemelkedően magas levegő- és búzamintabeli koncentrációt mértünk (220 db teliospóra/ m^3 ; 1985 db teliospóra/50g). Ezt az egyik hódmezővásárhelyi tároló esetében figyeltük meg. Abban az esetben, ha a teliospórákat kimutattuk a levegőben, az ugyanott vett búzamintákat mindig fertőzötteknek találtuk, azonban ez nem volt elmondható fordított esetben. A mintavételek 38,8%-ában ugyanis nem tudtunk kimutatni *Tilletia*-teliospórákat a kőszöggel fertőzött búzahalom feletti levegőben.

A budapesti tárházban a kilenc emeleten, a félig zárt cellákat tartalmazó helyiségek két legtávolabbi pontján mért teliospóra koncentrációt összehasonlítva, nem találtunk szignifikáns különbséget az értékek között ($P=0,16$). Hasonlóképpen a betárolt őszi búza mennyisége nem

befolyásolta szignifikánsan a felette lévő levegőben mért spórkoncentrációt ($p=0,64$). (A búza mennyiségét a búzahalmok magasságával fejeztük ki.) A búzamintákban mért teliospóra mennyiség korrelált a mintavételi pont feletti levegőben mért teliospóra koncentrációval ($n=12$, $r_s=0,581$, $P<0,05$).

Nagy mennyiségű teliospórát mutattunk ki a központi gabonatárházakban vett pormintákban (Bp: 53,3 db teliospóra/mg, Ja: 11,1 db teliospóra/mg), ezzel szemben a vidéki siktárolókban gyűjtött mintákban alacsony koncentrációban voltak jelen a *Tilletia*-teliospórák (átlagosan 1,4 db teliospóra/mg). Közepes összefüggést találtunk a por teliospóra tartalma és a levegő-eredetű teliospóra-koncentráció között ($r_s = 0.551$, $P<0.05$), viszont nem volt összefüggés a por-, és a magminták teliospóra-tartalma között. A külső referencia helyszíneken, vagyis az udvaron és a tetőn vett mintákból szintén kimutattuk a *Tilletia*- teliospórákat: 9,4%-a, illetve 7,0%-a volt a kint mért érték a beltéri teliospóra koncentrációnak. Meglepetésünkre a beltéri referencia mintavételi helyek (a budapesti gabonatárház nem búzát, hanem napraforgót vagy kukoricát tároló helyiségei) levegőjében is nagy koncentrációban találtunk *Tilletia*-teliospórákat, a búzát tároló helyiségek teliospóra koncentrációjának 86,7%-át, illetve 91,5%-át mértük.

3.3. A *Tilletia contraversa* és *T. caries* elkülönítése DNS-alapú molekuláris módszerekkel

A *T. caries* és *T. contraversa* teliospórákból kinyert DNS-t először a KOCHANOVA és munkatársai (2004) által leírt módszer alapján, a TILf és TILr primerpár felhasználásával vizsgáltuk, és eredményül minden esetben a várt 361 bp hosszúságú *Tilletia* nemzetség-specifikus terméket kaptuk.

További munkánk során a YUAN és munkatársai (2009) által kifejlesztett PCR-módszert is teszteltük a *T. caries* és *T. contraversa* fajszerűtű elkülönítésére a szerzők által leírt, kizárólag a *T. contraversa* izolátumokból felszaporított, 747 bp hosszúságú fragmentum kimutatására. Ebben az esetben azonban nem tudtuk reprodukálni a fenti szerzők publikációjában leírt eredményeket.

GAO és munkatársai (2010) tanulmányukban egy új, SCAR-marker alapú ISSR-módszert írtak le, melyet szintén teszteltünk a laboratóriumunkban. A SCAR-primerek (TCKSF3/TCKSR3) felhasználásával a vizsgált *T. contraversa* izolátumokból a leírt faj-specifikus DNS-fragmentumot (419 bp) amplifikáltuk a PCR körülményeket saját viszonyainkra optimalizálva, módszerfejlesztés keretében.

3.4. A *Tilletia contraversa* és *T. caries* elkülönítése fehérjealapú molekuláris módszerekkel

Mivel a célunk az volt, hogy a különböző *Tilletia*-fajok teliospóráin belüli fehérje-összetételt hasonlítsuk össze, több lépésben desztillált vizes mosást alkalmaztunk a felesleges

anyagok oldatból és a teliospórák faláról való eltávolításához. A teliospórák falának feltörése sikeres volt a sejten belüli fehérjék kinyeréséhez.

Az extrakció során eltérő mennyiségű fehérjét nyertünk ki mind a *T. caries*, mind a *T. contraversa* mintákból. Ugyanazon körülmények között végzett extrakció a *T. contraversa* izolátumokból kevesebb mennyiségű fehérjét eredményezett, mint a *T. caries* minták esetében. Nem volt szignifikáns különbség a kinyert fehérje mennyiségében sem az azonos fajból származó minták között, sem a két faj izolátumait összevetve. Mindezek ellenére a polipeptidek festődési sajátosságaiban eltérések mutatkoztak a fajok között, sőt az azonos fajból származó izolátumok között is. A *T. caries* fehérjemintázatok összességében erősebben festődtek a *T. contraversa* izolátumoknál. A három *T. contraversa* minta közül a plusz két fehérjesávval rendelkező TILLCO B fehérjemintázata festődött a legintenzívebben, míg a magyar *T. contraversa* izolátum (TILLCO C) festődött a legkevésbé.

Az egyes búzamintákból több ismétlésben kinyert teliospóra-extraktumok következetes és reprodukálható fehérjemintázatot adtak. Az egydimenziós SDS (nátrium-dodecil-szulfát) gél-elektroforézis során mind a *T. cariesből*, mind a *T. contraversából* származó mintákból jól elkülöníthető fehérjesávokat kaptunk 14-110 kDa mérettartományban. Az öt *T. caries* izolátum fehérje-gélképe alapján az azonos fajon belüli fehérjemintázat a különböző helyről származó izolátumokban állandó. A három *T. contraversa* teliospóra-izolátum proteinmintázatában egy 106 kDa méretű, faj-specifikus fehérjét azonosítottunk, amely minden *T. contraversa* mintából kimutatható volt, viszont a *T. cariesből* származókból nem. Emellett az egyik lengyel *T. contraversa* izolátumban (TILLCO B) két további, 73 és 85 kDa méretű fehérjét is kimutattunk, melyek sem a másik lengyelországi (TILLCO A), sem pedig a magyar izolátumban (TILLCO C) nem jelentek meg. Ezen fehérjesávok egyike sem volt jelen egyik *T. caries* izolátumban sem.

4. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

4.1. A *Tilletia* fajok magyarországi elterjedése

Az általunk végzett *Tilletia*-felderítések során 2007-től a 2010. évig bezárólag Magyarországon nem mutattunk ki *T. contraversa* fertőzést. A begyűjtött minták túlnyomó része *T. caries*-szel, míg kisebb hányada *T. laevis*-szel volt fertőzött, összességében 2008-ban 12,77%-ban, 2009-ben 15,24%-ban, 2010-ben 23,30%-ban (HALÁSZ 2012), 2011-ben 20%-ban és 2012-ben 19,28%-ban. A 2011-es évben egy mintában *T. contraversa* jelenlétét is bizonyítottuk a laboratóriumi vizsgálatok során. Ez utóbbi eset, vagyis hogy a *T. caries* fertőzések mellett egy mintában *T. contraversa* és *T. caries* kevert fertőzést is találtunk, feltétlenül figyelmet érdemel. Ennek gazdasági jellegű következménye is lehet, de a problémát részletesen szükséges vizsgálni. Egyetlen pozitív mintából ugyanis még nem tanácsos messzemenő következtetéseket levonni. A fokozott felderítés keretében 2012-ben Zala megyében gyűjtött 15 db minta egyikéből sem mutattunk ki *T. contraversa* kórokozót. Kiemelendő továbbá az, hogy 2013-ban ismételen *T. contraversa* kórokozót azonosítottunk egy mintából, mely a Nógrád megyei Ludányhalásziból származott. Mindezek alapján méltán lehet számítani a törpeüszög jövőbeli szórványos előfordulására.

A 2008-2013. évek során nyert eredmények magyarázatát két szempontból is megközelíthetjük. Az egyik: a mezőgazdasági gyakorlatban bekövetkezett változások, melyeket korábban már taglaltunk (elaprózott táblaméret, csávázás elhagyása, gyenge minőségű agrotechnika). Itt érdemes azonban még egyszer hangsúlyozni, hogy a termesztéstechnológiában bekövetkezett negatív irányú változások elősegíthették a kórokozó újbóli megjelenését. A másik: a kórokozó környezeti igényeiben, és a természetes környezeti viszonyok folytonos változásában keresendő. Közismert, hogy a gombabetegségek kialakulását befolyásoló tényezők között szerepel a csávázás, a fajta és az időjárás is és a gombafajtól függ, melyik milyen súllyal szerepel a fertőzés kialakításában. Mindenesetre a járványok kialakulásának elsőszámú kockázati tényezője általában az általunk nem befolyásolható időjárás.

Ahhoz, hogy lássuk, milyen kockázati tényezőkkel kell számolnunk a *T. contraversa* fertőzés szempontjából PETERSON és munkatársai (2009) szerint figyelembe kell vennünk a hóborítottságot (öt napnál több hótakaróval való borítottság már havas időszaknak számít), valamint, ha nem havazik a *T. contraversa* által kiváltott fertőzéshez minimum 42 napig tartó folyamatos csapadékhullásra van szükség, miközben a talajhőmérséklet -2 és $+10^{\circ}\text{C}$ között marad az őszi búza bokrosodási fenofázisának elején.

Ennek tükrében áttekintve hazánk éghajlati sajátosságait megállapítható, hogy Magyarországon nem jellemző a 42 napon át tartó csapadékos periódus. Hazánkban az őszi búza

októberben kezd csírázni, és ebben a fenológiai stádiumban válik fogékonyá a *T. contraversa* fertőzésre. A meteorológiai állomások megfigyelései alapján hazánkban januártól márciusig van a legnagyobb esély a hótakaró kialakulására, míg az októbertől decemberig tartó periódusban ennek sokkal kisebb az esélye (10 év alatt 5 alkalom). Magyarországot tekintve tizenöt időjárási állomás adatai állnak rendelkezésre 2000 és 2013 között (forrás: OMSZ). 2007-től kezdve nem volt olyan hosszú csapadékos, illetve hóborította időszak, ami az említett tanulmány alapján elősegítette volna a *T. contraversa* terjedését, fertőzését, viszont a talaj szükséges nedvességtartalmát adhatta az időszakos nagyobb csapadékhullás az egyes években.

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

Kiegészítésként érdemes még megemlíteni, hogy a *T. contraversa* kórokozó a környezeti feltételeket tekintve igen igényes, viszont mindezen feltételek együttes előfordulása kevésbé valószínű, bár előfordulhat. És ez valamelyest magyarázatot adhat a 2011-ben kimutatott *T. contraversa* fertőzésre is. Azután a 2011/2012. év telén kialakult hosszan tartó hótakaró kedvező környezeti feltételt teremthetett volna a *T. contraversa* ismételt fertőzéséhez. Ennek ellenére a fokozott mintavétellel sem tudtunk újabb *T. contraversa*-fertőzést kimutatni. Viszont 2013-ban földrajzilag eltérő helyen a Nógrád megyei Ludányhalászinál gyűjtött búzamintából azonosítottunk *T. contraversa* kórokozót, mely eredmény előre vetíti, hogy a jövőben szórványosan újabb találatok várhatók.

Áttérve az őszi búza fogékonyságának kérdésére, Veisz Ottó és Szunics László tájékoztatása szerint az is tény, hogy a Magyarországon köztermesztésben lévő őszi búza fajták egyike sem rezisztens a *Tilletia*-fajokkal szemben. Nálunk ezzel a kórokozóval szembeni ellenállóságra nem nemesítettek, ezért a köüzögnnek ellenálló vagy mérsékelt ellenálló fajta csak a véletlen eredménye.

Értékeljük eredményeinket abból a szempontból, hogy a fertőzött minták milyen őszi búza fajtát fertőztek, illetve, mivel voltak csávázva. Sajnos a mintavételkor nem mindig volt sikeres az adatfelvétel. A csávázás sikeressége nem ítélni meg, mert a találatok közel 50%-ában nem áll rendelkezésre adat a csávázószerrel, illetve, hogy történt-e csávázás. A fertőzött őszi búza fajták

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

Az őszi búzát fertőző kő- és törpeüszögről viszont az irodalmi adatok alapján elmondható, hogy ellentétben több más kórokozóval, az időjárás, a termesztéstechnika egyes elemei (vetésmélység), valamint a fajta nem játszanak elsődleges szerepet a betegség megjelenésében, hiszen a szakszerűen alkalmazott vetőmagcsávázással a fertőzés biztonsággal megelőzhető: az üszögfertőzés kialakulása szempontjából első a csávázás, második az időjárás és a harmadik tényező a fajta.

4.2. A *Tilletia contraversa* és *T. caries* azonosítási módszerek használhatósága és megbízhatósága

Az üszögfertőzés-gyanús őszi búza minták esetében a *Tilletia* fajok fajszintű azonosításához kétféle hagyományos mikológiai módszert alkalmaztunk, a fénymikroszkópos és a fluoreszcens fénymikroszkópos módszert. A mikroszkópos fajhatározás hátránya, hogy a *T. caries* és *T. contraversa* teliospórák nagyfokú hasonlóságot mutatnak, paramétereikben jelentős átfedések figyelhetők meg, ezért a fajszintű határozás időigényes és gyakorlott szemet igényel, és nem mindig ad megbízható eredményt. Az előzőekből következően célul tűztük ki egy vagy több molekuláris módszer fejlesztését, adaptálását a munka gyorsabbá és hatékonyabbá tételére.

A DNS-alapú molekuláris módszer kutatására irányuló törekvéseink eredményeként sikeresen adaptáltuk és alkalmazzuk vizsgálatainkhoz a KOCHANOVA és munkatársai (2004) által leírt módszert, mely a TILf és TILr primerpár felhasználásával egy 361 bp hosszúságú *Tilletia* nemzetség-specifikus terméket szaporít fel. A 361 bp hosszúságú fragmentum a szerzők leírása alapján *Tilletia* nemzetség-specifikus, melyet mi is bizonyítottunk a munkánk során. Az általános primereknél (ITS1/ITS4) (PIMENTEL et al. 1998 a) specifikusabb ez az újonnan fejlesztett primerpár, mivel az ITS1/ITS4 primerpár a *Tilletia*-fajok esetében két fragmentumot szaporít fel – 550 bp és 750 bp -, az első *Tilletia*-specifikus, míg a második búza DNS-t amplifikál. Ez a gyakorlati munka során gondot okozhat.

YUAN és munkatársai (2009) egy másik DNS-alapú módszert fejlesztettek ki a *T. caries* és *T. contraversa* fajszintű elkülönítésére. A tanulmányukban közölt 747 bp hosszúságú fragmentumot, amely kizárólag a *T. contraversa* izolátumokból szaporítható fel, a munkánk során nem detektáltuk a gélben. Szándékunkban állt a YUAN és munkatársai (2009) által ajánlott módszer adaptálása és felhasználása a diagnosztikai munkában a laboratóriumunkban, mivel ez volt az első közölt cikk a *Tilletia*-fajspecifikus primerek sikeres fejlesztéséről. Annak, hogy nem tudtuk reprodukálni ezen eredményeket egyik oka az is lehet, hogy eltérő a YUAN és munkatársai (2009), illetve az általunk felhasznált izolátumok földrajzi származási helye, azaz az

ő izolátumaik és a mi mintáink kérdéses szekvenciái, ahová a primerek bekötődnek, néhány bázispárban eltérhetnek.

A GAO és munkatársai (2010) által publikált új, SCAR-marker alapú ISSR-módszert viszont eredményesen átvettük a laboratórium diagnosztikai eljárásai közé. Ezen technika a SCAR-primerek (TCKSF3/TCKSR3) segítségével egy 419 bp méretű faj-specifikus DNS-fragmentumot szaporít fel a *T. contraversa* izolátumokból. Ennek megfelelően ez a módszer felhasználható a hatósági diagnosztikai munkánk során.

A *Tilletia*-fajok fehérje összetételükben lévő különbségek alapján történő elkülönítésére sikeresen fejlesztettünk ki egy új SDS gél-elektroforézisen alapuló módszert. Az általunk egydimenziós SDS-PAGE módszerrel nyert fehérjemintázat eltér WEBER és SCHAUZ (1985) eredményeitől, akik a két *Tilletia*-faj fenol-oldható fehérje-extraktumaiban egy 65 kDa méretű faj-specifikus különbségfehérjét írtak le a *T. contraversa* mintákból. Mindemellett eredményeink nem egyeznek meg KAWCHUCK és munkatársai (1988) megfigyeléseivel sem, akik szintén a két faj fenol-oldható fehérjefrakcióját vizsgálták kétdimenziós gél-elektroforézissel. Ezen szerzők minden mintában jelentős mennyiségű polipeptidet mutattak ki, de végül arra a következtetésre jutottak, hogy nincs olyan faj-specifikus marker a két *Tilletia*-fajban, amely alapján a két faj biztonságosan és következetesen elkülöníthető lenne. És végül, BANOWETZ és munkatársai (1994) tanulmányukban leírtak egy 116 kDa méretű polipeptidet, mely egyedi és fajra jellemző a *T. contraversa* esetében. A fehérje-extrakció során 2x Laemmli puffert használtak. Kísérleteink során a teliospórák teljes PBS-oldható fehérjemennyiségét elemeztük de ezen különbségfehérjék egyikét sem detektáltuk sem a *T. caries*, sem a *T. contraversa* izolátumokban. Az általunk nyert fehérjemintázatokban egy 106 kDa méretű *T. contraversa* faj-specifikus különbségfehérjét mutattunk ki. Emellett az egyik lengyel *T. contraversa* izolátumban (TILLCO B) két további, 73 és 85 kDa méretű fehérjét is kimutattunk, melyek semelyik másik izolátumban sem voltak jelen. Az eltérő mintázat magyarázata lehet az is, hogy különböző a mintavételi hely, vagy, hogy más őszi búza gazdanövény-fajtáról származnak a minták (sajnos az őszi búza fajta nem ismert a TILLCO A esetében).

Bizonyítottuk a PBS-alapú fehérjekinyerés hatékonyságát a 2x Laemmli extrakciós pufferrel szemben. A 2x Laemmli extrakciós pufferrel ugyanis a fehérjemintázat elmosódott, kevésbé elkülöníthető sávokat eredményez, valamint túl erős a háttérzaj. Ezzel ellentétben a PBS extrakciós pufferrel nyert mintázat tiszta, a sávok és oszlopok denzitometriásan könnyen összehasonlíthatók.

A *T. caries* és *T. contraversa* elkülönítésére általunk alkalmazott kétféle molekuláris módszerrel kapcsolatban megjegyzendő, hogy a DNS-alapú technikák napjainkban sokkal népszerűbbek a fehérjevizsgálatoknál, a *Tilletia*-fajok esetében is jelentősen bővebb az ehhez

kapcsolódó kutatási projektek, publikációk száma, ezeket tesztelve végül a GAO és munkatársai által kifejlesztett ISSR-módszert sikerült saját laboratóriumi viszonyaink között megerősíteni. A fehérjevizsgálat esetében viszont nem állt rendelkezésre publikált megbízható módszer, így saját módszerfejlesztés keretében tökéletesítettük az általunk alkalmazott technikát.

Eredményeink alapján - az adott laboratórium felszereltségének függvényében - mind a fehérje-, mind a DNS-alapú módszer alkalmazása javasolt. Igaz, hogy manapság a DNS-alapú technikák térhódítása figyelhető meg, de nem szabad megfeledkeznünk a fehérjealapú módszerekről sem. Ez utóbbiak ugyanis nem csak néhány amplikont szaporítanak fel, hanem nagyszámú géntermék, azaz fehérjék hasonlíthatók össze segítségével egy gélen, tehát ezek bármelyikében jelentkező változás diagnosztikai értékű lehet. Limitáló tényezőként jelentkezik viszont a fertőző anyag mennyisége, ezért kis mennyiségű minta esetén a DNS-vizsgálat alkalmazása indokoltabb.

4.3. Gabonatárolókban terjedő üszögspórák

A rendszeres, napi anyagmozgatás következtében a gabonatároló helyiségek és emeletek között gyorsan végbemegy a levegő keveredése a nyitott tetejű cellás tároló rendszeren és a beömlőnyílásokon keresztül. Így magas a kockázata annak, hogy a bekerült *Tilletia*-teliospórákkal fertőzött tételek átfertőzik a már betárolt egészséges tételeket. Emellett annak a veszélye is fennáll, hogy az adott helyszínen korábban tárolt fertőzött gabona által is megfertőződhet az ugyanott később raktározott tétel, mivel mi is találtunk teliospórákat a nem-*Tilletia* gazdanövényt (napraforgó, kukorica) tároló referencia helyiségekben. Tehát a leülepedett por a repülő teliospórák fontos forrása lehet. És valóban, közepes korrelációt mutattunk ki a por-, és a levegőminták teliospóra-tartalma, valamint a búza-, és a levegőminták teliospóra-tartalmai között, de nem volt összefüggés a búza-, és a porminták teliospóra-koncentrációi között. Emellett a tárolótér légköre gyakran, ill. hosszabb ideig és nagy mennyiségben telített üszögspórákkal, ahogy az tapasztalatunk szerint a központi gabonatárházakban rendszeresen előfordul, ami a légzőszervi megbetegedések szempontjából fokozott mértékű kockázatot jelent. Javasolt tehát a légutakat védő felszerelés használata a gabonatárolókban végzett munka során.

A dolgozatban ismertetett eredmények reményeink szerint egyrészt hozzájárulnak a *Tilletia*-fajok laboratóriumi diagnosztikájában használt módszerek palettájának bővítéséhez és megbízhatóságuk növeléséhez; másrészt rámutatnak a betárolt gabona növény- és humán-egészségügyi vonatkozásaira is.

4.4. Új tudományos eredmények

1. Országos felderítés keretében (2007-2013) bizonyítottuk a *Tilletia caries* domináns előfordulását a *T. laevisszel* szemben, valamint két esetben megtaláltuk a gazdaságilag jelentős károsítóként ismert *T. contraversa* fajt is. Megállapítottuk, hogy az időjárási körülmények nagyban hozzájárulhatnak a fertőzés sikeréhez, de a hatékony csávázás megfelelő védelmet kellene, hogy jelentsen az üszögök ellen. A fajtának van a legkisebb jelentősége a fertőzés szempontjából, mivel hazánkban nem nemesítettek üszög-ellenállóságra.
2. Bizonyítottuk a SCAR-primerek (TCKSF3/TCKSR3) felhasználásával nyert 419 bp méretű *T. contraversa* faj-specifikus DNS fragmentumot adó DNS-alapú módszer laboratóriumi használhatóságát. A publikált eljárást módosítva adaptáltuk helyi körülményeinkre, és a morfológiai identifikációt követő megerősítő vizsgálatként alkalmazhatónak tekintjük a *T. caries* és *T. contraversa* fajsztintú elkülönítésére. Ezen kívül igazoltuk a TILf és TILr primerpár felhasználásával kapott 361 bp hosszúságú, *Tilletia* nemzetség-specifikus terméket adó technika alkalmazhatóságát is.
3. Hatékony fehérje-kinyerési módszert dolgoztunk ki a *Tilletia*-fajok teliospóráinak belső, teljes fehérjetartalmának kinyerésére, a teliospórák falának feltörésével.
4. Elsőként fejlesztettünk ki a hatósági laboratóriumi diagnosztikában is alkalmazható, egydimenziós gél-elektroforézisre épülő fehérje-elválasztási technikát a *T. caries* és *T. contraversa* elkülönítésére; amelynek az alapja egy 106 kDa méretű *T. contraversa* faj-specifikus fehérje kimutatása reprodukálható módon. Ennek a munkának a során bizonyítottuk a PBS puffer hatékonyságát a 2x Laemmli pufferrel szemben.
5. Hirst-típusú térfogatossá spóracsapdával hazánkban első alkalommal vizsgáltuk a vidéki és központi gabonaraktárak belső levegőjének *Tilletia*-teliospóra tartalmát. Vizsgálataink során a *T. caries* dominált a levegőmintákban. Szoros korrelációt mutattunk ki a por- és a levegőminták teliospóra-tartalma, valamint a búza- és a levegőminták teliospóra-tartalmai között, de nem volt összefüggés a búza- és a levegőminták teliospóra-koncentrációi között. Megállapítottuk továbbá, hogy az adott helyszínen korábban tárolt fertőzött gabona által is megfertőződhet az ott később raktározott, egészséges tétel, mivel a leülepedett gabonaporban is kimutathatók a teliospórák.

5. FELHASZNÁLT IRODALOM

- ÁGOSTON T. (2009): Az évjárat hatása az őszi búzafajták agronómiai tulajdonságaira. Doktori értekezés. Debreceni Egyetem.
- BANOWETZ G. M. és DOSS R. P. (1994): A comparison of polypeptides from teliospores of *Tilletia controversa* (Kuhn) and *Tilletia tritici* (Bjerk) Wint. *J. Phytopathol.*, 140: 285-292.
- CANDIANO G., BRUSCHI M., MUSANTE L., SANTUCCI L., GHIGGERI G. M., CARNEMOLLA B., ONECCHIA P., ZARDI L. és RIGHETTI P. G. (2004): Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*, 25: 1327-1333.
- CROTZER V. és LEVETIN E. (1996): The aerobiological significance of smut spores in Tulsa, Oklahoma. *Aerobiologia*, 12: 177-184.
- GAO L., CHEN W. Q. és LIU T. G. (2010): Development of a SCAR marker by inter-simple sequence repeat for diagnosis of dwarf bunt of wheat and detection of *Tilletia controversa* Kühn. *Folia Microbiol.*, 55(3): 258-264.
- HALÁSZ Á. (2011): National survey of the economically important *Tilletia* species (*T. controversa*, *T. caries*, *T. foetida*) on winter wheat in Hungary (2007-2009). *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 46(1): 27–37.
- HIRST J. M. (1952): An automatic volumetric spore trap. *Ann. Appl. Biol.*, 39: 257-265.
- HORVÁTH J. (1995): Búza (*Triticum aestivum* L.) In: A szántóföldi növények betegségei. *Mezőgazda Kiadó*: Budapest. 15–43.
- KAWCHUCK L. M., KIM W. K. és NIELSEN J. (1988): A comparison of polypeptides from the wheat bunt fungi *Tilletia laevis*, *T. tritici*, and *T. controversa*. *Can. J. Bot.*, 66: 2367-2376.
- KELLERER T., SEDLMEIER M., RABENSTEIN F. és KILLERMANN B. (2006): Development of immunochemical and PCR methods for qualitative detection of *Tilletia* species in organic seeds. *Czech J. Genet. Plant Breed.*, 42: 72-74.
- KOCHANOVA M., ZOUHAR M., PROKINOVA E. és RYSANEK P. (2004): Detection of *Tilletia controversa* and *Tilletia caries* in wheat by PCR method. *Plant Soil Environ.*, 50(2): 75-77.
- LAEMMLI U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259): 680-685.
- MURRAY T. D., PARRY D. W. és CATTLIN N. D., (eds.) (1998): Bunts/smuts. In: A Colour Handbook of Diseases of Small Grain Cereal Crops. *Manson Publishing*, London, 9-11.
- OEPP/EPPO (1982): Data sheets on quarantine organisms No. 83, *Tilletia controversa* Kühn. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 12: 137–142.
- OEPP/EPPO (2007): *Tilletia indica*. Diagnostics PM 7/29 (2). *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 37: 503-520.
- PETERSON G. L., WHITAKER T. B., STEFANSKI R. J., PODLECKIS E. V., PHILLIPS J. G., WU J. S. és MARTINEZ W. H. (2009): A risk assessment model for importation of United States milling wheat containing *Tilletia controversa*. *Plant Disease*, 93: 560-573.

- PIMENTEL G., CARRIS L. M., LEVY L. és MEYER R. J. (1998): Genetic variability among isolates of *Tilletia barclayana*, *T. indica* and allied species. *Mycologia*, 90: 1017-1027.
- ROSENBERG I. M. (2004): The Bradford method. In: Protein analysis and purification: Benchtop Techniques. *Birkhäuser*: Boston, 111-114.
- SAVINO E. és CARETTA G. (1992): Airborne fungi in an Italian rice mill. *Aerobiologia*, 8: 267-275.
- STOCKWELL V. O. és TRIONE E. J. (1986): Distinguishing teliospores of *Tilletia controversa* from those of *T. caries* by fluorescence microscopy. *Plant Disease*, 70: 924-926.
- SZEPESSY I. (1977): Növénybetegségek. *Mezőgazdasági Kiadó*: Budapest, 200–203.
- TÓTH Á. (2006): A gabonafélék üszögbetegségei régen és ma. *Agronapló* (2006/9). www.agronaplo.hu
- TSE K. S., CRAVEN N. és CHERNIACK R. M. (1980): Allergy to saprophytic fungi in grain workers. In: DOSMAN J. A. and COTTON D. J. (eds.): Occupational pulmonary disease. Focus on grain dust and health. *Academic Press*: Toronto, 335-346.
- USDA, Agricultural Marketing Grain Division Service (1974): Examination of the spores of *T. controversa* (dwarf bunt).
- VÁNKY K. (2012): Smut Fungi of the World. *APS Press*: St Paul, MN, USA., pp. 1480.
- WEBER G. és SCHAUZ K. (1985): Characterization of spore protein patterns in *Tilletia controversa* and *Tilletia caries* with gel eletrophoretic methods. *Z. Pflkrankh. Pflschutz.*, 92: 600-605.
- YUAN Q., NIAN S., YIN Y., LI M., CAI J. és WANG Z. (2009): Development of a PCR-based diagnostic tool specific to wheat dwarf bunt, caused by *Tilletia controversa*. *Eur. J. Plant. Pathol.*, 124: 585-594.
- ZHANG Z., ZHANG C. R. és WANG Z. Z. (1995): Plant quarantine significance of dwarf bunt of wheat to China. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 25: 665–671.

6. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK

Idegen nyelvű impakt faktoros közlemények

Halász Á. and Magyar D. (2013): Aerobiological aspects of quarantine risks in grain warehouses – a study on bunt (*Tilletia* spp.) dispersal. *Aerobiologia*. DOI 10.1007/s10453-013-9314-2. **IF:** 1,333 (2012)

Halász Á., Szamos J. and Virányi F. (2013): Comparison of teliospore proteins of the two smut fungi *Tilletia caries* and *Tilletia contraversa* by SDS electrophoresis. *Acta Alimentaria*, 42(4): 599-608. DOI 10.1556/Aalim.42.2013.4.14. **IF:** 0,475 (2012)

Idegen nyelvű, lektorált tudományos közlemény

Halász Á. (2011): National survey of the economically important *Tilletia* species (*T. controversa*, *T. caries*, *T. foetida*) on winter wheat in Hungary (2007-2009). *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 46(1): 27-37.

Magyar nyelvű, lektorált tudományos közlemény

Halász Á. (2012): A *Tilletia* fajok felderítése Magyarországon – a *Tilletia contraversa* újbóli megjelenése. *Növényvédelem*, 45(5): 193-202.

Idegen nyelvű lektorált konferencia kiadvány (proceeding)

Halász Á., Magyar D., Kredics L. and Körmöczi P. (2011): Mycological investigation of a grain warehouse. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 58(Suppl): 117–24. DOI: 10.1556/AMicr.58.2011.Suppl.2

Magyar nyelvű lektorált konferencia kiadvány (proceeding)

Kredics L., Magyar D., **Halász Á.** és Körmöczi P. (2012): Raktári kórokozó gombák egy gabonatarház levegőjében. *Mikológiai közlemények – Clusiana*, 51(1): 143-145. ISSN: 0133-9095

Idegen nyelvű konferencia összefoglaló (abstract)

Körmöczi P., **Halász Á.**, Kredics L. and Magyar D. (2012): Presence of fungal spores associated with farmer's lung disease in the air of a grain warehouse. In: A. Gácsér, I. Pfeiffer, C. Vágvolgyi and K. Nagy (eds.): 3rd CESC 2012, Central European Summer Course on Mycology, Biology of pathogenic fungi. (9-13 July, 2012, Szeged) JATE Press. p. 64. ISBN: 978-963-315-078-8

Magyar nyelvű konferencia összefoglalók (abstracts)

Magyar D., **Halász Á.**, Kredics L. és Körmöczi P. (2011): *Aspergillus flavus* és más, egészségre ártalmas gombák előfordulása gabonatárház levegőjében. *Egészségtudomány*, 55(3) (Suppl): 21.

Halász Á. és Magyar D. (2009): Gabonatárházak aerobiológiai vizsgálata. *Egészségtudomány*, 53(3) (Suppl): 20.

Halász Á. és Magyar D. (2009): Őszi búzát károsító *Tilletia* fajok levegőbiológiai vizsgálata gabonatárházban. 55. Növényvédelmi Tudományos Napok, 2009. február 23. (poszter), Absztrakt kötet, p. 76.