

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

**A termesztett *Pleurotus ostreatus* hibridek tulajdonságainak javítása
és új hibridek előállítása vadon termő törzsek alkalmazásával**



***Készítette:*
Hajdú Csaba Ph.D hallgató**

**Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar
Növénytani Tanszék**

BUDAPEST, 2007.

Doktori iskola

Megnevezése: Interdiszciplináris (1. Természettudományok / 1.5 Biológiai tudományok / 4. Agrártudományok / 4.1. Növénytermesztési és kertészeti tudományok) Doktori Iskola

Tudományága: Növénytermesztési és Kertészeti tudományok

Vezetője: **Dr. Papp János**
Egyetemi tanár, DSc.
Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar,
Gyümölcsstermő Növények Tanszéke

Témavezető: **Dr. Rimóczi Imre,**
tanszékvezető egyetemi tanár, az MTA doktora
Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar, Növénytani
Tanszék és Soroksári Botanikus Kert.

Külső kutatóhely: **Quality Champignons Kft.** Gombacsíra Üzem és Kutató
Laboratórium

A jelölt a Budapest Corvinus Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, az értekezéssel kapcsolatos szakmai és formai észervételeket, javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, ezért az értekezés nyilvános vitára bocsátható.

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
Témavezető jóváhagyása

A Budapesti Corvinus Egyetem Élettudományi Területi Doktori Tanács 2007. 06. 12-i határozatában a nyilvános vita lefolytatására az alábbi bíráló Bizottságot jelölte ki:

BÍRÁLÓ BIZOTTSÁG:

Elnöke
Balázs Sándor, MHAS

Tagjai
Terbe István, CSc
Udvardy László, CSc
Lenti István, CSc
Hodossi Sándor, DSc

Opponensek
Gyórfi Júlia, PhD
Szántó Mária, CSc

Titkár
Udvardy László, CSc

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	6
1.1.A kutatómunka célkitűzései	6
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	9
2.1. Taxonómia, morfológia, elterjedés	9
2. 2. A laskagombákról ökológiai, ökofiziológiai megközelítésben	18
2. 2. 1. A cellulózbontás enzimeit	19
2. 2. 2.Szinergizmus a celluláz enzimrendszerben	20
2. 2. 3. Hemicellulázok. A fapoliózok enzimrendszerei	21
2. 2. 4. Ligninázok. A ligninbontás enzimrendszerei	22
2. 2. 5. A faanyag enzimatikus degradációja	23
2. 2. 6. A fehér-korhasztó gombák enzimrendszere és hatása	23
2. 3. A laskagombák beltartalmáról	24
2.4. Termesztési szempontból jelentősebb laskagomba-fajok hazánkban	25
2. 5. A világ és a magyarországi laskagomba-termesztés története	29
2. 5. 1. Intenzív termesztés	31
2. 6. A laskagomba hibridek	33
2. 7. A bazídiumos „nagygombák” szaporodásáról	35
2. 8. Polimorfizmus és a markerek	38
2. 9. Klasszikus nemesítési módszerek	41
2. 9. 1. Álszövetoltás	41
2. 9. 2. Nemesítés monospóras tenyészetekkel	41
2. 9. 3. Multispóras tenyészetek	41
2. 10. Gombanemesítésben használt új módszerek	43
Génbanki szekvenciák	48
3. ANYAG ÉS MÓDSZER	50
3. 1. Az új hibridek előállítás Keresztezésekkel	50
3. 1. 1. A nemesítési munkában alkalmazott törzsek jellemzése	50
3. 1. 2. A keresztezéseknél alkalmazott törzsek rövid jellemzése	50
3. 2. Nemesítési munka	55
3. 2. 1. Tenyésztörzs előállítás klasszikus keresztezéssel	55
Spóragyűjtés	55
Spóra csíráztatása	56
3. 2. 2. Dikarionta tenyészetek előállítás monospór eljárással.	57
Spóraszuszpenziók készítése	58
Spórák szélesztése	59
Csíráztatás	59
Csírázó spórák kiemelése	60
Monospór tenyészetek mikroszkópi ellenőrzése	60
Különböző származású monospór tenyészetek összeoltása és a kompatibilitás megfigyelése	61
Dikarionta tenyészetek fenntartása	66
3. 2. 3. Dikarionta tenyészetek előállítás multispór eljárással	68

Spóraszuszpenziók készítése	68
Spóraszuszpenziók összekeverése	68
Oltás agarlemezre	69
Csíráztatás és a heterogén telep megfigyelése	69
Izolálás a szektorokból és az izolátumok tisztítása	70
A csatképzés ellenőrzése	71
Dikarionta tenyészetek fenntartása	71
3. 2. 4. A monospór és multispór eljárás összehasonlítása	72
3.3. Gombafajták elkülönítése molekuláris biológiai módszerekkel	73
3. 3. 1. Nukleinsav extrakció	73
3. 3. 2. A PCR (polymerase chain reaction)	74
3. 3. 3. Véletlen primerek használatán alapuló módszerek (MAAP), A RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)	75
3. 3. 4. Differenciáló DNS izolálás a gélről	79
3. 3. 5. A DNS tisztítása gélből	79
3. 3. 6. Kompetens sejt készítése	80
3. 3. 7. Ligálás plazmidba	80
3. 3. 8. Transzformáció	81
3. 3. 9. Miniprep készítése	81
3. 3. 10. Szekvenálás, primertervezés	83
4. EREDMÉNYEK	86
4. 1. a KERESZTEZÉSi munka eredményei, Az előállított új hibridek	86
4.2. Molekuláris Biológiai módszerekkel segített nemesítési munka eredményei	91
5. KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK	108
ÖSSZEFOGLALÁS	110
SUMMARY	114
MELLÉKLETEK	115
M1.: FELHASZNÁLT SZAKIRODALOM	115
MELLÉKLETEK	127
M2.: TÁBLÁZATOK ÉS ÁBRÁK JEGYZÉKE	127
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	129

1. BEVEZETÉS

A laskagomba termesztés eredményessége, éppen úgy, mint minden élő objektummal foglalkozó termelési ág - mezőgazdaság, kertészet stb. – eredményessége nagymértékben függ a termesztett, vagy tenyésztett élőlény fajtájától, élettani és alaki tulajdonságaitól.

A laskagomba termesztés terjedésével mind a termesztők, mind a fogyasztók részéről egyre újabb igények jelentkeznek:

- a termesztett gomba legyen bőtermő,
- betegségekkel szemben ellenálló,
- tenyészideje legyen rövid,
- kívánatos a tetszetős külső, - nem közömbös a szín sem, a fogyasztók a sötétebb alapszínt szeretik inkább, míg a konzervipar a világosabb színt kedveli,
- csökkentett számban és lehetőleg az érési időszakban szórjon spórát.

Előnyös, ha a laskagombafajta környezeti igényei egyszerű berendezésekkel olcsón kielégíthetők, és az évszakos változásoktól függetlenül folyamatosan, egész éven át termesztethető.

Nincs olyan laskagombafajta, amely minden igényt ki tudna elégíteni. Így nincs más megoldás, mint a fajtaválasztékot bővíteni, hogy a termesztő a termesztési feltételeknek és a piaci igényeknek minél inkább a megfelelő fajtát választhassa ki.

Az egy bizonyos fajtát reprezentáló, meghatározott termesztési célra kiválasztott, gondosan fenntartott gombatenyészetet tenyésztőrzsnak nevezzük. Ez kerül elszaporításra több lépcsőben a termesztés során. A korábban előállított tenyésztőrzsek idővel „előregszenek”, degenerálódnak. Ezek helyett is új, hasonló tulajdonságú törzseket kell kiválasztani. Mindezek a következmények szükségessé teszik egyre újabb tenyésztőrzsek előállítását.

1.1.A KUTATÓMUNKA CÉLKITŰZÉSEI

Kutatási munkám során fő célkitűzésem volt, hogy vad laskagomba törzsek és a jelenleg is használt piaci hibridek bevonásával új, kedvező termesztési tulajdonságokkal rendelkező, nagyüzemi szinten is termesztethető laskagomba hibrideket állítsak elő. Célszerűnek láttam folytatni mindazt a munkát, amit eredményesen végzett a neves laskagomba nemesítő Gyurkó Pál és kutató csoportja a 80-as években. Az általuk előállított hibridek is kiváló alapjai az újabb hibridtörzsek előállításának. Nemesítő munkám során felhasználtam a „Gyurkó-hibrideket”, illetve az azok előállításánál alkalmazott módszerekkel igyekeztem új törzseket előállítani. A nemesítésbe bevontam több újonnan begyűjtött vad *P.ostreatus* törzset is.

A világon a hagyományos növény- és gombanemesítési eljárások az elmúlt években kiegészültek, egyben felgyorsultak a molekuláris biológia módszereinek alkalmazásával. Ezzel szemben hazánkban a termesztett nagygombák nemesítési eljárásai még mindig a klasszikus módszerekkel történnek és a hazai nemesítési munka, fajtaazonosítás még mindig az 1980-as évek módszereivel történik. Ez nem azt jelenti, hogy a hagyományos nemesítési és fajta-elkülönítési módszerek nem alkalmasak új hibridek létrehozására, esetleg diszkrét morfológiai jegyekkel rendelkező fajták elkülönítésére. Sőt a jelenlegi gyakorlat a gombák esetében is még mindig azt mutatja, hogy a tradicionális módszerekkel eredményesebb nemesítés folytatható, azonban célszerű megoldásnak azt tartottam, hogy a tradicionális és a hazai viszonylatban mindenképpen újnak nevezhető molekuláris genetikai módszereket használjam. Mivel külső kutatóhelyemen (Quality Champignons Kft. Csíraüzem és Fajtakutató Laboratórium) az utóbbi évek fejlesztéseinek eredményeként egy új molekuláris biológiai laboratóriumi részleget sikerült kialakítanunk, ezért - bár dolgozatomnak nem vállalt feladata a molekuláris biológiai munka – az országban elsőként kezdtem meg a gombaiparhoz kapcsolódó, nukleinsav alapú fajta-elkülönítési vizsgálataimat. Az új gombahibridek előállításában inkább a tradicionális, a fajta-elkülönítésben mind a tradicionális, mind pedig a molekuláris biológiai módszereket kívántam érvényre juttatni.

A gombák, elsősorban a termesztett „nagygombák”, szemben a növényekkel, rendkívül érzékenyen reagálnak a környezeti feltételek változására. Mindez jól megfigyelhető egy adott törzs termőtesteinek morfológiai változatosságán, amennyiben azok különféle környezeti feltételek mellett fejlődtek. Tehát az egyes környezeti-ökológiai hatások, adott fajra jellemzően, bár más-más súllyal, de széleskörű morfológiai változatok kialakulását teszik lehetővé. A gombatermesztésben és a nemesítési munka során mindez azt a hátrányt hordozza magában, hogy az adott fajta más összetételű szubsztrátumon, más klímájú helyiségben, más termesztéstechnológia mellett igen változatos morfológiai bélyegeket hordozhat. A környezeti tényezők változásából, valamint az adott faj, fajta jellegéből kifolyólag a morfológiai spektrum a torz termőtestektől a szép, a fajtajelleget magukon hordozó termőtestekig változhat. Mindezek azt jelentik, hogy a hagyományos, morfológiai jegyeken alapuló fajta-elkülönítés, főként a gombafajták esetében, nem minden esetben ad megbízható eredményt.

Hazánkban nagyon kevés a gombafajták kutatásával, új fajták nemesítésével foglalkozó kutatóhely és bár a gombaipari kutatások (komposztálás, nemesítés, új agrotechnológiai módszerek alkalmazása stb.) most kezdtek föllendülni, még így is jelentős lemaradásban vannak a növénynemesítési, növényfajta-elkülönítési, biotechnológiai stb. kutatásokhoz képest. Jelenleg hazánkban, a Quality Champignons Kft. Fajtakutató Laboratóriuma a gombaipari kutatások központi szerepet játszó kutatóhelyévé vált. Az 1996-os év óta saját forrásokból és állami finanszírozások segítségével jelentős laboratóriumfejlesztések történtek és mára létrejött egy magas

színvonalú, gombaipari kutatásokra alkalmas kutatóhely, ahol több mint 31 gombaiparhoz kapcsolódó kutatási projekt valósult meg és jelenleg is 19 van folyamatban. A kutatóhely hazánkban úttörőmunkát végzett olyan kutatásokban, mint dsRNS mikovírusok diagnosztikája, új gombafajok termesztésbe vonása, starterek használata a gombakomposzt előállításában, orvosi szempontból jelentős gombahatóanyagok tesztelése humán sejtvonalakon, fajta-elkülönítés, nemesítés stb.

2002-ben kezdtük meg egy olyan molekuláris biológiai laboratórium kiépítését, mely alkalmas fajta-elkülönítési, mikovírus-diagnosztikai, egyéb (pl. identifikálási, tipizálási) munkára. A dolgozatom központi témája a laskagomba-nemesítés volt, azonban a doktori iskola megkezdése óta a kutatóhelyemen jelentős fejlesztések történtek, így a munkám során e fejlesztésekből eredő előnyöket is próbáltam kihasználni. Természetesen ez az új lehetőség már nem tette lehetővé, hogy a fajta-elkülönítés termesztett gombákra vonatkozó minden részletét kimerítsem, azonban annyit sikerült elérnem, hogy megalapozzam a gombafajták molekuláris alapú elkülönítését. Így a dolgozatom központi témájaként szereplő lakagomba-nemesítési munka mellett hazánkban elsőként próbálkoztam molekuláris biológiai alapú laskagomba-fajta elkülönítéssel. Sajnos a növényi biotechnológiai vizsgálatokhoz képest az ilyen jellegű mikológiai kutatások még gyerekcipőben járnak, így azok a módszerek kevésbé kidolgozottak a mikológiai munkában. A további molekuláris biológiai lehetőségeknek részben még határt szabott az, hogy az eszközpark, mely a kutatóhelyen létrejött elsősorban PCR-alapú munkát tesz lehetővé. Bízom benne, hogy a molekuláris biológiai alapú gombafajta elkülönítő vizsgálataim jó alapot szolgáltatnak a későbbi hazai mikológiai kutatásokhoz.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. TAXONÓMIA, MORFOLÓGIA, ELTERJEDÉS

A taxonómia, bizonyos értelemben, rendhagyó tudomány. Igen kevés egyéb terület képes kiváltani annyi vitát, mint a taxonómia. Valójában minden tudományterület a valóságot csak bizonyos mértékig megközelítően írja le, ez alól a rendszertan sem kivétel. Linné sem rendelkezett kimerítő gyűjteménnyel az általa rendszerezett növényekből, hanem izoláláskor, leírásakor rendszerezte őket. Minden taxonómus egy-egy új faj leírásakor kicsit teljesebbé teszi bolygónk ismert élőlényekinek listáját, mely azonban még ma is igencsak hozzávetőleges. Ez komoly problémát okoz a rendszerező kutatóknak. A leírt fajok többé-kevésbé ismertek, a többiről azonban semmit sem tudunk. Az egyes élőlények, ill. azok közötti változékonyság is nagyrészt látóköri kívül esik. Az új ismeretek birtokában szükséges (lehet) a régebbi feltevések revíziója, ahogy az több gombataxononál is indokolt (Van GRIENSVEN, 1988).

A gombák határozásakor a nemzetség megjelölése viszonylag egyszerű. Sok esetben azonban annál nehezebb az egyes fajok elkülönítése. A gombák rendszerezésekor a taxonómusnak gyakran szubjektív, nehezen mérhető jellemzőket kell figyelembe vennie (pl. a hús többé-kevésbé vörösödik, a kalap pikkelyes lehet stb.), melyek ráadásul függhetnek környezeti tényezőktől is. E kiküszöbölhetetlen szubjektív tényezőtől adódóan voltak és vannak is viták egy-egy taxon hovatartozását illetően.

A laskagombák a bazídiumos gombák (*Basidiomycota*) törzsébe, valódi bazídiumos gombák (*Basidiomycetes*) osztályba, osztatlan bazídiumú gombák (*Homobasidiomycetes*) alosztályba, *Agaricales* rendbe, *Pleurotaceae* családba tartoznak. A *Pleurotus* (Fr.) Quel. nemzetség típusfaja a *Pleurotus ostreatus* (Jacq. et Fr.) Kummer. Májig hozzávetőlegesen 70 *Pleurotus*-fajt tartanak nyilván. Ezek pontos faji meghatározása a tapasztalt szakemberek számára is bonyolult feladat. Mindenek előtt a morfológiai, élettani, genetikai, ökológiai tulajdonságaik alapján történik a fajok elkülönítése, de egyre komolyabb szerephez jutnak a molekuláris biológiai technikák is.

A párosodási összeférhetőség alapján ma 15 ún. intersterilitási csoportot állapítottak meg a *Pleurotus* nemzetségben belül.

A rendszerezés, csoportokba sorolás legtöbbször morfológiai vizsgálatokon alapul. A laskagombáknál azonban sok nehézség mutatkozott, így többek között a fajok definiálása is problematikus volt és a mai napig is vannak a rendszerezők között viták. Morfológiai vizsgálatokon nyugvó rendszerezés során néhány észak-amerikai kutató a késői laskagombákat a spóralenyomataik színe alapján határozták meg (EGER, 1978).

A lilától a sötét szürkéig változó színű spóralenyomatokat produkáló törzseket *P. sapidusnak* nevezték, míg a fehér-krémszínű világos spórákat "termő" csoportot *P. ostreatus*-nak.

A szín is rendkívül változó jelleg, de morfológiai szempont a laskagombáknál. A kalap, a spóratartó lemezek, a tönk és maguk a spórák színe a fehértől a liláig, a krémszínűtől egészen a szürkéig változhat (RIMÓCZI, 2004).

Hasonló bizonytalanságokat jelentett a *P. ostreatus* és a *P. florida* megkülönböztetése és faji definiálása. Terméshozó képességüket, környezeti igényeiket figyelembe véve nagyban eltérnek egymástól, genetikailag azonban kompatibilisek, keresztezhetőek. A floridai típus 15 °C felett képes termőtesteket produkálni; a termőtestek világosak, a spóratartó lemezek fehérek, húsuk vékony. Az európai típus 15 °C alatt termőképes, bizonyos változataik termőre fordulása nemcsak a hideghatástól, hanem az évszaktól is függ (szélsőséges téli típusok) (GYURKÓ, 1984).

A hazai törzsek termőtestei a világos galambszürkétől egészen a kékesszürkéig változhatnak. A szín a törzsre jellemző, bár a környezeti tényezők meglehetősen módosítják. A termőtest zömök, vastag húsú. Ugyanakkor mindkét típust alacsony hőmérsékleten és világos helyen természetve, habitusukat vizsgálva a törzseket alig lehet megkülönböztetni egymástól (EGER, 1978). Ezért is javasolja EGER, hogy az észak-amerikai *P. florida* típust nevezzük *P. ostreatus*-nak.

A párosodási kompatibilitás tanulmányozása és a törzsfejlődés molekuláris elemzése hasznos keretet ad a faji meghatározás megértéséhez és a laskagombák rendszerezéséhez. Legalább 15 egymással kereszteződni nem képes, ún. intersteril csoportot azonosított. A genetikai rokonságot a fajkomplexumon belül kereszt-párosodási reakciókkal és bizonyos DNS technikákkal vizsgálták, így pl. a rDNS ún. ITS régiójának (internal transcript spacer region) szekvencia-azonosságát tanulmányozták.

A gyűjtésekből származó termőtestekből monospóras tenyészeteket állítottak elő. Ezeket a különböző szülőktől származó tenyészeteket keresztezték. A létrejött párosodást a dikariotikus micéliumra jellemző "csat" jelenlétének vizsgálatával bizonyították. A párosodási kompatibilitás (az eredményes fúzió) elsődleges kritériuma a "csat" formációk megjelenése volt. A vizsgálat során a párosodási reakciót a begyűjtött laskagomba-fajták monospóras tenyészeiteinek minden lehetséges kombinációjában elvégezték.

A párosodási reakciók elvégzésével párhuzamosan molekuláris filogenetikai vizsgálatokat végeztek. Különböző technikákat alkalmaztak, így PCR technikát, gélelektroforézis-vizsgálatot molekuláris és biokémiai markerekkel, izoenzim analízist és a már említett ITS vizsgálatokat.

A molekuláris technikák segítségével további genetikai diverzitást mutattak ki a *Pleurotus* nemzetségen belül. A legtöbb esetben a vizsgálatok alátámasztották az intersteril csoportok meghatározását, mint evolúciós egységeket. Az intersterilitást előidéző gének nagyban azonosak a

független evolúciós egységek fejlődésével és alapként szolgálnak a rendszertani csoportok megállapításában.

VILGALYS et al. (1996) javaslatot tesznek arra, hogy a laskagombák rendszerezéséhez fogadjuk el az általuk javasolt intersteril csoportosításokat a természetett és a kutatott fajták meghatározására (1. táblázat).

1. táblázat: Intersterilitási csoportok összefoglalása

Fajok	Szinonim nevek vagy alfaji kategóriák	Intersterilitási csoportok
<i>P. ostreatus</i> – Késői laskagomba	<i>P. columbinus</i> – Galambszürke laskagomba, <i>P. florida</i> – Floridai laskagomba, <i>P. salignus</i> , <i>P. spodoleucus</i>	I.
<i>P. pulmonarius</i> – Nyári laskagomba	<i>P. sajor-caju</i> – Szaka laskagomba, <i>P. sapidus</i>	II.
<i>P. populinus</i>	-	III.
<i>P. cornucopiae</i> – Erestöknű laskagomba	<i>P. citrinopileatus</i> – Citromsárga laskagomba	IV.
<i>P. djamor</i> – Rózsaszín laskagomba	<i>P. flabellatus</i> , <i>P. ostreatoroseus</i> , <i>P. salmoneostramineus</i> , <i>P. euosmus</i>	V.
<i>P. eryngii</i> – Ördögsekér laskagomba	<i>P. ferulae</i> , <i>P. nebrodensis</i> , <i>P. hadamardii</i> , <i>P. fossulatus</i>	VI.
<i>P. cystidiosus</i>	<i>P. abalonus</i> , <i>P. formosensis</i>	VII.
<i>P. levis</i>	-	VIII.
<i>P. dryinus</i>	-	IX.
<i>P. tuber-regium</i>	-	X.
<i>P. "agaves"</i>	-	XI.
<i>P. "abieticola"</i>	-	XII.
<i>P. "brazil"</i>	-	XIII.
<i>P. australis</i>	-	XIV.
<i>P. purpureo-olivaceus</i>	-	XV.

Ezekon kívül igen fontos még az élőhely leírása (talajtípus, növénytársulás, kitettség, tengerszint feletti magasság, földrajzi régió stb.). Az utóbbi években a határozásban és a rokonsági viszonyok meghatározásában egyre nagyobb hangsúlyt kapnak a különböző molekuláris biológiai módszerek. Ezek nagyrészt megerősítik az eddigi besorolásokat, helyenként azonban azok felülvizsgálatára készítetik a szakembereket (RAMIREZ et al., 2000).

2. táblázat: A *Pleurotus* nemzetség „intersteril csoportjai” és földrajzi elterjedései

Csoport	Faj neve	Észak-Amerika	Európa	Ázsia	Dél-Amerika	Afrika	Ausztrália-Ázsia
I	<i>P. ostreatus</i>	■	■	■			
II	<i>P. pulmonarius</i>	■	■	■			■
III	<i>P. populinus</i>	■					
IV	<i>P. cornucopiae</i>		■	■			
V	<i>P. djamor</i>	■	■	■	■	■	■
VI	<i>P. eryngii</i>		■	■			
VII	<i>P. cystidiosus</i>	■	■	■		■	■
VIII	<i>P. levis</i>	■					
IX	<i>P. dryinus</i>	■	■				
X	<i>P. tuberregium</i>			■		■	■
XI	<i>P. "agaves"</i>	■					
XII	<i>P. "abieticola"</i>			■			
XIII	<i>P. "brazil"</i>				■		
XIV	<i>P. australis</i>						■
XV	<i>P. purpureo-olivaceus</i>					■	

A *Pleurotus* (Fr.) Quel. nemzetség típusfaja a *Pleurotus ostreatus* (Jacq. et Fr.) Kummer.

A *Pleurotus* nemzetség fajjaival ill. taxonjaival több mikológus is foglalkozott, mivel a rendszerezésben uralkodó nagyfokú bizonytalanság, többszöri névváltoztatás, a termesztett fajok (fajták, hibridek) kétes rendszertani helye szükségessé tette. A *Pleurotus* nemzetséget PILÁT (1935) monográfiájában nem természetes, hanem mesterséges nemzetségnek tartja és több faj kizárásával lényegesen lecsökkentette a nemzetség akkori fajszerkezetét HILBER (1982, 1989) taxonómiai, ökológiai vizsgálatait elsősorban közép-európai *Pleurotus* fajokkal végezte. Kutatásainak eredményeként kidolgozott egy általános határozókulcsot, amely akkor a kutatók számára alapműnek számított. A nemzetség akkori fajszerkezetét jelentősen csökkentette, s a PILÁT (1935) által ebbe a nemzetségbe sorolt fajokat más nemzetségekbe helyezte át. SINGER (1975) 35 *Pleurotus* faj létezéséről számol be, amelyet 5 szekcióba sorol. CORNER (1981) malaysiai kutatásai során számos fajt, összesen 14 új fajt írt le, melyek napjainkban is érvényesek. VETTER (1981, 1982, 1984, 1985 a,b, 1986, 1992 a, b) munkáiban a *Pleurotus* nemzetség fajjaival végzett ökológiai, biokémiai kísérleteinek (fehérje-összetétel, enzimprodukciónak: proteáz, lignocelluláz, xylanáz, fenoloxidáz, peroxidáz, extracelluláris celluláz) eredményeként fontosnak tartja biokemotaxonómiai bélyegeket figyelembe vételét a *Pleurotus* nemzetség rendszerezésben.

Az Index Fungorum alapján a világban eddig összesen 746 *Pleurotus* taxont írtak le, jelenleg 51 *Pleurotus* taxon érvényes.

A *Pleurotus ostreatus*-nak összesen eddig 31 taxonja létezett, ebből 2 szinonim volt: a *P. osteratus* sensu Cooke/Ill. Brit. Fung. 279 (195) Vol. 2 (1883)/, amely jelenleg *P. cornucopiae* (Paulet) Rolland (1910), és a jelenleg érvényes *P. ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. (1871). Továbbá a világon eddig összesen 10 forma-ját, 4 subforma-ját, 2 subspecies-ét és 13 varietas-át publikálták. Az Index Fungorum alapján jelenleg az alapfaj mellett csak 4 varietas létezik.(VILGALYS, 1997).

A jelenleg, az Index Fungorum alapján érvényes *Pleurotus* taxonok a következők:

- P. abieticola* R.H Petersen & K.W. Hughes (1997)
- P. albidus* (Berk) Pegler (1983)
- P. alocasiae* Corner (1981)
- P. armeniacus* Corner (1981)
- P. auerovillosus* Corner (1981)
- P. australis* (Cooke & Masee) Sacc. (1891)
- P. calyptratus* (Lindbad) Sacc. (1887)
- P. chrysorrhizus* Corner (1981)
- P. citrinopileatus* Singer (1981)
- P. columbinus* Qué. (1881)
- P. cornucopiae* (Paulet) Rolland (1910)
- P. craspedius* (Fr.) Gillet (1874)
- P. cyatheicola* Corner (1981)
- P. cystidiosus* var. *formosensis* Moncalvo (1995)
- P. decipiens* Corner (1981)
- P. djamor* (Rumph. ex Fr.) Boedijn (1959)
- P. dryinus* (Pers.) P. Kumm. (1871)

- P. dryinus* var. *pometi* (fr.) Reijnders (1973)
- P. eous* (Berk.) Sacc. (1887)
- P. eryngii* (DC.) Gillet (1874)
- P. eryngii* var. *elaeoselini* Venturella, Zervakis & La Rocca (2000)
- P. euosmus* (Berk.) Sacc. (1887)
- P. favoloides* Singer (1989)
- P. flabellatus* (Berk. & Broome) Sacc. (1887)
- P. floridanus* Singer (1946)
- P. fuscus* var. *ferulae* Lanzi
- P. hyacinthus* Corner (1981)

P. incarnatus Hongo (1973)
P. lactuosus Corner (1981)
P. lampas (Berk.) Sacc. (1887)
P. lazoi Donoso (1981)
P. lilaceilentus Corner (1981)
P. lindquistii Singer (1960)
P. musae Corner (1981)
P. olivascens Corner (1981)
P. omnivagus Corner (1981)
P. osteratoroseus Singer (1961)
P. ostreatus (Jacq.) P. Kumm. (1871)
P. penangensis Corner (1981)
P. populinus O. Hilber & O. K. Mill. (1993)
P. problematicus Corner (1981)
P. pulmonarius (Fr.) Quél. (1872)
P. rattenburyi Segedin (1984)
P. roseolus Quél. (1880)
P. sapidus (Schulzer) Sacc. (1887)
P. smithii Guzman (1975)
P. staringii Oudem. (1881)
P. subareolatus Peck (1886)
P. submembranaceus (Berk.) Pegler (1988)
P. subviolaceus Corner (1981)
P. viscidulus (Berk. & Broome) Pegler (1965)

A *Pleurotus* nemzetség jellemzése HILBER (1982), VETTER (1985, a) és VASAS (1993) nyomán

A *Pleurotus* név etimológiája: pleura (görög) = oldalt; ours, otos (görög) = fül.

Micélium: heterokariota micélium jellemzői: többé-kevésbé ritmikusan növekedő, többé-kevésbé kifejezett anamorf formák (korémiumok, aleuriospórák), fehérbarna, többé-kevésbé narancssárga guttációs cseppek találhatóak benne; legtöbbször hideghatás nélkül primordiumokat képeznek; monomitikus-dimitikus hifarendszerű; illata ánizsra vagy gyümölcsre emlékeztet, ill. savanykás, egyes fajoknál semleges.

Termőtest: a többé-kevésbé húsos gombák, egyesével vagy többé-kevésbé csoportosan nőnek.

Kalap: 1,5-20 cm átmérőjű, fiatalon púpos, majd kagyló vagy tányér alakú, excentrikus-laterális, ill. egy-egy faj tölcséres formájú, centrikus. Színe változatos, variábilis, gyengén (fehér, szürke, sárgás, rózsás) erősebben (barna, fekete, ibolyásbarna, acélkékes) pigmentált. Hidegebb időben sötétebb a kalapszín, felülete sima.

Lemezek: lefutók, több fajnál hálózatot alkotva vagy bordaszerűen lefuthatnak a tönkre. Élük nem fogazott. Színük fehér, sötétkrém, rózsaszínű. A lemezeket fiatalon borító velum a fajok többségénél nincs, csupán néhány fajnál fordul elő, néha gyűrűszerű.

Tönk: rövid, néhány fajnál hiányozhat. Többnyire laterális, excentrikus, de lehet centrális is, gyakran csoportos. Színe: fehér, szürkésbarna, rózsás. Felülete sima vagy érezett, gyakran -különösen a bázis felé- szőszös, szálás.

Hús: a kalapban kompakt, húsos, törékeny, rugalmas, nem szívós-rostos. A tönkben több fajnál szívós, rostos, szálás, kevésbé törékeny, különösen az idősebb példányoknál.

Illat: semleges, ánizs-, hal vagy retkszagú.

Íz: semleges, esetleg gyengén kesernyés.

Spórapor: fehér, krémszínű, szürkéslilás.

Mikroszkopikus tulajdonságok:

Spóra: hengeres, elliptikus, vékonyfalú, áttetsző. Felülete sima, belsejében több-kevesebb sárgás olajvakuolom található. Nem amiloid, nem cianofil, fala krezilkékre gyengén megfestődik.

Bazídium: hengeres vagy buzogányalakú, négy (kettő) sterigmával. A szaporodás mechanizmusa tetrapoláris.

Hifatípusok: 1. vékonyfalú vagy vastagfalú, harántfalakkal, legtöbbször kapcsokkal rendelkező generatív hifákkal. 2. faszzerű, vastagfalú, kapocs nélküli, néha másodlagos szeptummal.

Cisztidák: egyes fajoknál fordul elő, elsősorban keilo- és pileocisztidák, melyek exogén konídiumképzés révén a vegetatív reprodukciót szolgálhatják.

Kutisz: legtöbbször vékonyfalú, kapcsokkal rendelkező generatív hifákból áll, epimembrán (memrán alatti) pigmentcsíkokkal. A pigment vakuolárisan fordul elő.

Kémiai reakciók: HILBER (1982) szerint csak a *P. eringii*-nél mutattak ki mind a micéliumnál, mind a termőtestnél guajakolos oldat hatására kékes színreakciót. VETTER (1981) szerint a *Pleurotus* fajok többségénél a micéliumok peroxidáz, fenoloxidáz termelők. Színreakció tehát kimutatható, és ebből valószínűsíthető, hogy megfelelő reagensekkel a termőtestek is adnak ilyen reakciót.

Mellékszaporító sejtfarmák: egyszerű konídiumok a nemzetség szinte minden fájánál megtalálhatók a dikariotikus micéliumon és a termőtesten.

Életmód: szaprotrófok, általában xilofágok lombos és tűlevelű fákon, fehér korhasztók. Parazitizmust bizonyos lágyszárúakon (*Umbelliferae, Labiatae*) néhány fajnál megfigyeltek.

Előfordulás: Korhadó fán, növényi maradványokon, ernyős virágzatúak gyökerén. Kozmopolita fajok.

Gyakorlati hasznosíthatóság: ehető, jóízű gombák. Több faj termeszthető. Általában agresszív enzimtermelők, emiatt a növényi eredetű lignocelluláz anyagok lebontására, hasznosítására képesek. Egyes fajok penicillin V-aciláz termelnek. Spórájuk allergiás tüneteket okozhat.

Hazánkban található *Pleurotus* taxonok jellemzése

MOSER (1983) rendszerében tárgyalom a hazai *Pleurotus* fajokat, magyarországi elterjedésükre vonatkozóan BABOS (1989) munkáját, ill. a Magyar Természettudományi Múzeum Növénytárának *Pleurotus* anyagát vettem figyelembe.

MOSER (1983) két fajcsoportot állít fel a Közép-Európában található *Pleurotus* fajokra.

Az egyik a vélummal rendelkező *Lentodiopsis* Bubak csoport, melybe 2 faj tartozik:

***P. dryinus* (Pers) P. Kummer**

Kalap: 5-12 cm átmérőjű; többé-kevésbé kagylóformájú, féloldalas; fehéres vagy halvány szürkésbarna tónusú; finoman szálas, pelyhes, többé-kevésbé pikkelyes; a kalap szélét fehéres vélumfoszlányok díszíthetik. Tönk: rövid, oldaltálló; fehéres, idősen barnás-sárgás, felülete gyakran pikkelyes, több-kevesebb gallérszerű vélummaradvánnyal. Lemezek: mélyen lefutók; fiatalon fehéresek, krémszínűek, idővel többé-kevésbé megsárgulnak. Hús: fehéres, a tönk tövében kissé barnás, többé-kevésbé sárguló, merev, fásodásra hajlamos. Spórák: 9-13 x 3-4 um. Spórapor: fehér. Termőhely: kivágott és élő lombosfákon, különösen *Quercus*-on és *Fagus*-on nő, ritkán fenyőn és feldolgozott faanyagokon is előfordulhat. Hazánkban nem ritka, augusztustól novemberig terem.

***P. calyptratus* (Lindbl.) Sacc.**

Kalap: 3-9 cm átmérőjű; többé-kevésbé kagyló-félgömbformájú, féloldalas; halvány szürkésbarna, szárazon gyakran fehéres, világos szürkés; felülete sima, csupasz; a kalap szélét fehéres vélumfoszlányok díszítik. Tönk: rövid, oldaltálló vagy tönknélküli. Lemezek: lefutók; fiatalon fehéresek, krémszínűek, idővel többé-kevésbé megsárgulnak. Hús: fehéres, a tönk tövében kissé

barnás, többé-kevésbé sárguló, merev, fásodó. Spórák: 12-15 x 4-5 µm. Spóratömeg: fehér. Termőhely: leggyakrabban kiszáradt *Populus*, ritkábban *Betula* és *Fraxinus* törzseken nő. Hazánkban nem ritka, áprilistól augusztusig terem.

A másik csoport vélummal nem rendelkező, *Pleurotus* csoport, amelybe hazánkban 5 faj tartozik:

***P. cornucopiae* (Paul.) Rolland**

Kalap: 2-10 cm átmérőjű; többé-kevésbé kagyló-, lapát-, nyelvformájú; krémfehéres halvány szürkésbarna, okkerbarnás vagy húsbarnás tónusú; felülete sima, csupasz, a kalap széle hullámos. Tönk: rövid, oldaltálló, gyakran központi helyzetű; csoportos; a lemezek mélyen, gyakran anasztomizálva lefutnak a tönkre, ahol bordák, erek formájában folytatódnak; színe fehéres, idősen barnás-sárgás. Lemezek: mélyen lefutók; fiatalon fehéresek, krémszínűek, idővel többé-kevésbé megsárgulnak. Hús: fehéres, a tönk tövében kissé barnás, merev, a tönkben fásodó; illata ánizsra emlékeztet. Spórák: 8-11 x 3,5-5 µm. Spóratömeg: lilás. Termőhely: kivágott lombosfákon, különösen *Quercus*-on, *Fagus*-on és ritkán fenyőn (*Pinus*) nő. Hazánkban nem gyakori, májustól júliusig terem, melegkedvelő.

***P. eryngii* (DC.) Gillet**

Kalap: 5-15 cm átmérőjű; kezdetben domború, majd ellaposodik, végül tölcsérformájú lesz; széle fiatalon begöngyölt, majd kiegyenesedik, és hullámossá válik; szürkésbarna, kávébarnás, ritkán piszkosfehéres; felülete fiatalon kissé nemezes majd csupaszra válik, vagy ritkán benőtten sugarasan szálas. Tönk: 3-10 cm hosszú, 1-3 cm vastag, oldaltálló vagy többé-kevésbé központi helyzetű; gyakran gyökerező; színe fehéres. Lemezek: mélyen lefutók; gyakran elágazók; fiatalon fehéresek, krémszínűek, idővel többé-kevésbé megszürkülnek. Hús: fehéres; illata fűszeres. Spórák: 10-14 x 4-5 µm. Spórapor: fehér. Termőhely: legelőn, réten, kertben, többnyire *Eryngium campestre* közelében nő. Hazánkban elég gyakori, májustól novemberig terem, hidegtűrő.

***P. fuscus* var. *ferulae* Lanzi**

BABOS (1985) leírása alapján.

Kalap: 6-17 cm átmérőjű; kezdetben domború, majd ellaposodik, közepe bemélyedő, tölcsérgombára emlékeztet; széle fiatalon begöngyölt-aláhajló, idővel hullámossá válik; krémokkeres színű; felülete fiatalon kissé nemezes majd csupaszra válik, bőre kissé megrepedezhet. Tönk: 6-15 cm hosszú, 2,4-3,5 cm vastag, lefelé vékonyodó, kihegyesedő; központi helyzetű vagy kissé excentrikus; színe fehéres, krémszínű; felülete többé-kevésbé felszakadozóan szálas. Tövét körbefogják a *Peucedanum* elszáradt levélnyél maradványai. Lemezek: eléggé ritkán állók; mélyen

lefutók, vonalszerűen futnak le a tönkre; fehéresek, krémszínűek. Hús: fehéres; illata fűszeres. Spórák: 9,3-14 x 4,7-6,2 µm. Spórapor: fehér. Termőhely: Hortobágyon a sziki kocbord (*Peucedanum officinale*) karógyökeréből nőtt ki 1984. októberében.

***P. ostreatus* (Jacq.) P. Kumm.**

Kalap: 4-15 (30) cm átmérőjű; kezdetben domború, majd ellaposodik, majd többé-kevésbé kagyló-, lapát-, nyelvformájú lesz, kajla-féloldalas; szürke, acélszürke, szürkésbarna, kékesfeketés. Melegebb időben világosabb, hidegebb időben sötétebb színű; felülete sima, csupasz, a kalap széle hullámos. Tönk: 1-4 cm hosszú, 1-3 cm vastag, többnyire rövid, oldaltálló, ritkán központi helyzetű; csokros; színe fehéres, idősen halványszürkés vagy barnás-sárgás; felülete különösen a tövénél többé-kevésbé pelyhes-szőrös. Lemezek: a tönkre lefutók; sűrűn állók; keskenyek; fiatalon fehéresek, krémszínűek, idővel többé-kevésbé megsárgulnak. Hús: a kalapban vastag, rugalmas, a tönkben kemény, szívós; fehéres, illata nem jellegzetes. Spórák: 7,5-11 x 3-4 µm. Spórapor: fehér. Termőhely: kivágott és élő lombosfákon, különösen *Quercus*-on, *Fagus*-on, *Populus*-on, sokszor igen nagy csoportot alkotva nő. Hazánkban gyakori, augusztustól decemberig terem, hidegtűrő.

***P. pulmonarius* (Fr.) Quél.**

Kalap: 2-10 cm átmérőjű; kezdetben domború, majd ellaposodik, majd többé-kevésbé kagyló-, lapát-, nyelvformájú lesz, kajla-féloldalas; krémszínű, világosbarna, idősen világos piszkos szürkésbarna, széle halványabb, idővel sárgul; felülete sima, csupasz, a kalap széle hullámos. Tönk: 1-2 cm hosszú, 0,5-1 cm vastag, többnyire rövid, oldaltálló, ritkán központi helyzetű; színe fehéres; felülete fehéren pelyhes-szőrös. Lemezek: a tönkre lefutók; sűrűn állók; keskenyek; fiatalon fehéresek, krémszínűek, idővel többé-kevésbé megsárgulnak. Hús: a kalapban vékony, rugalmas, a tönkben kemény, szívós; fehéres, illata nem jellegzetes. Spórák: 7,5-11 x 3,2-4 µm. Spóratömeg: fehér. Termőhely: kivágott lombosfák tuskóján, különösen *Fagus*-on, ritkán egyesével vagy kisebb csoportot alkotva nő. Hazánkban nem ritka, májustól szeptemberig terem, melegkedvelő.

2. 2. A LASKAGOMBÁKRÓL ÖKOLÓGIAI, ÖKOFIZIOLÓGIAI MEGKÖZELÍTÉSBEN

A gombák heterotróf, lebontó szervezetként vannak jelen az ökoszisztémában. Funkciójuk az élő szervezetek által előállított szerves anyagok lebontása. Lebontásuk révén jelentős szerepük van a bioszféra anyagkörforgásban és az energiaáramlásban. Gombák nélkül a bioszféra rendszerei nem működnének. Hiányukban megszűnne az anyagok körforgása és a rendszer fennmaradását biztosító anyag- és energiaáramlás. (ZADRAZIL 1974.), (Van GRIENSVEN, 1988), (RIMÓCZI 1994).

A laskagombák lehetnek gyengültségi paraziták, amikor a gazdaszervezet állapota leromlik (sebzés, klimatikus stresszek, alultápláltság, szervek öregedése stb.), és így képesek behatolni és parazitálni a növényt. Másik esetben szaprofitaként elpusztult növényi szervesanyag lebontására is képesek (NÉMETH, 1998).

A faanyagok felépítése, kémiai összetétele, víz- és levegőtartalma, pH értéke, fungisztatikus anyagai sajátos élőhelyet és tápanyagforrást biztosítanak a farontó gombák számára. A fa lebontása már élő állapotban megkezdődik és folytatódik 5-30 éven át. A faanyagok lebontása többtényezős folyamat. A fő szénforrás a fában a cellulóz, hemicellulóz és a lignin. A nitrogén nagyon kis mennyiségben van jelen a fában (MANCZINGER et al., 2003). A fontosabb tápanyagok a 3. táblázatban szerepelnek.

3. táblázat: Laskagomba fajok fontosabb tápanyagainak egyszerűsített, összefoglaló táblázata

Tápanyagok		
Szerves anyagok	C-forrás	Cellulóz
		Hemicellulóz
	N-forrás	Protein
		Amino nitrogén
Szervetlen anyagok		K, P, Fe, Mg, stb.

Forrás: SEUNG (2004).

A szaprofitonok között a laskagombák az ún. fehérkorhasztó gombák közé sorolhatók. Ez azt jelenti, hogy laskagomba a faanyag fő komponensét, a cellulózt és a lignint egyaránt képes enzimrendszere segítségével lebontani. Mivel a cellulóz mellett lignin-bontás is zajlik, így a faanyag kifehéredik, ahonnan a lebontási folyamat neve is ered. A bontásban részt vevő enzimek a gombafonalak mentén fejtik ki hatásukat. A bontás eredményeképpen fehéres-sárgás laza, szivacsos vagy szalmaszerű anyag marad vissza.

2. 2. 1. A cellulózbontás enzimeit

A mikroorganizmusok a lebontási folyamatba az egyszerű szénhidrátokat tudják bevonni. Fa-, ill. cellulózbázisú tápanyag esetében először a polimer szénhidrátoknak le kell bomlania egyszerű szénhidrátokká. Ezt a folyamatot katalizálja a celluláz enzimrendszer. A kristályos cellulóz, különösen, ha ligninmátrixban van jelen, nem oldható, biológiai szempontból ellenálló rendszer. A lebontáshoz több enzim együttes működése, szinergizmusa szükséges. A lebontási folyamat modelljét Reese (REESE et al., 1950) adta meg, amelyet többen továbbfejlesztettek. A ma elfogadott

hipotézis szerint a bomlás a cellulóz amorf részein indul, véletlenszerűen a C_x jelű endo-celluláz enzim hatására.

Az *endo-celluláz* szisztematikus neve *1,4-β-D-glükán-4-glükánhidroláz* (EC 3.2.1.4). Elnevezésére a „C_x” jelzést is alkalmazzák. (WOOD-CRUE, 1978). Hatására a β-1,4-glikozidos kötés véletlenszerű hidrolízise játszódik le, a cellulóz amorf részein. A véletlenszerű hidrolízis eredményeképpen a kompakt cellulóz rendszer „fellazul”, lehetővé téve további folyamatok lejátszódását. A hidrolízis a lejátszódó lánctördelődés következtében jelentősen csökkenti a molekulatömeget.

A bomlásfolyamat következő lépése az *exo-celluláz* „C₁” jelű enzim hatására lejátszódó reakció. Az *exo-celluláz* szisztematikus neve *1.4-β-D-glükán-cellobiohidroláz* (EC 3.2.1.91), „C₁” konvencionális elnevezéssel. Hatására a kristályos cellulóz nemredukáló végéről cellobióz egységek hidrolizálódnak le. A hidrolízis eredményeképpen a molekulatömeg tehát csak kismértékben csökken.

A *β-glükozidáz*, amelynek szisztematikus neve *β-D-glükohidroláz* (EC. 3.2.1.21) katalizálja a cellobióz, valamint nagyobb szénatomszámú szénhidrát-egységek hidrolízisét glükózzá. Az amorf és kristályos cellulózhoz viszont nincs aktivitása.

A cellulóz bomlását elősegítő, hidrolitikus hatást kifejtő enzimek mellett, elsősorban lignocellulóz rendszerekben további enzimeket izoláltak, amelyek fontos szerepet játszanak a biodegradációs folyamatokban.

A *cellulóz-dehidrogenáz* (cellobióz: kinon oxireduktáz) a cellobióz oxidációját katalizálja cellobionsavvá, cellobion-laktonon keresztül, kinonok jelenlétében, amelyek viszont fenolokból keletkeznek lakkáz által katalizált folyamatban. A cellobióz mint redukáló ágens hat a kinon fenollá történő redukciós folyamatban. Az enzim ezt a folyamatot katalizálja.

A degradációs folyamatban további oxidáló enzimek is részt vesznek. Ezek közül:

- *Cellobióz-oxidáz* a cellobióz és cellodextrinek megfelelő aldonsavvá történő oxidációját katalizálja oxigén jelenlétében.
- A *glükóz-oxidáz* a teljes hidrolízis eredményeképpen keletkező glükóz oxidációját katalizálja glükonsavvá. A két oxidáz a lejátszódó folyamat jellege miatt a cellobióz-dehidrogenázhoz hasonlóan lignin jelenlétéhez kötött.

2. 2. 2.Szinergizmus a celluláz enzimrendszerben

eredeti elképzelése szerint, a kristályos cellulózt először egy enzimátikus (C₁) vagy nemenzimes faktor lazítja, ezután hidrolizálható a cellulóz a (C_x) enzimmel (, et al., 1950). Az

elképzelést $C_1 - C_x$ hipotézisnek nevezték el. Ezt az elméletet fejlesztették tovább többen, melyeket Wood foglalt rendszerbe (WOOD-CRUE 1978). Szerintük a C_1 faktor a celluláz rendszer egy enzime, mely szinergizmust mutat a C_x enzimmel. Ők állapították meg, hogy a C_1 komponens cellobiohidroláz (exo-celluláz). Wood által felállított mechanizmus, a $C_x - C_1$ hipotézis szerint a C_x enzim, az endo-celluláz véletlenszerűen hat a szemikristályos cellulóz amorf részein, ezután hasítja a C_1 enzim, az exo-celluláz a cellulóz nemredukáló végéről a cellobióz egységeket, új kristályos cellulóz végcsoportot létrehozva. Ez természetesen az eredeti endo-exo, ill. $C_1 - C_x$ fogalmakat is megváltoztatta (WOOD-CRUE, 1978).

A cellulózláncban két térbelileg eltérő glikozidos kötés van. Ezeknek a hasadása a cellulózmolekulában két különböző végcsoport-konfigurációhoz vezethet, ami viszont két különböző sztereospecifikus enzimet igényel.

Az endo-glükánáz aktív centruma jobban hozzáférhető, így kevésbé specifikus, mint az exo-glükánázé. Erre utal, hogy más cellulózszármazékok, sőt xilán hidrolízisét is katalizálja. Az endo-glükánáz átviteli reakciókat is katalizál, és hasított cellulóz-, ill. xilán-oligoszacharidokat véletlenszerű kombinációban ismét összekapcsol.

Az exo-glükánázok enzimjeinek az aktív centruma egy ún. csatornában van, amelyen keresztül a cellulózláncnak át kell húzódnia, mely így mintegy lazító szerepet is betölt. Az exo-glükánáz-II (cellobiohidroláz-II) aktív csatornájában négy glükózrész számára van kapcsolódási hely. Az aktív centrum a csatorna közepén van. Az exo-glükánáz-I (cellobiohidroláz-I) katalitikus csatornája hosszabb, és az aktív hely a csatorna végén helyezkedik el. Így tud két glükózegység a csatorna végén kapcsolódni, majd lehasadni (NÉMETH, 1998).

2. 2. 3. Hemicellulázok. A fapoliózok enzimrendszerei

A fapoliózok kémiai felépítése lényegesen bonyolultabb, mint a cellulózé. A heteropolimer jellegből és az elágazó szerkezetből adódóan több enzimből álló, bonyolultabb enzimrendszer szükséges a lebontáshoz, mint a cellulóz esetében. Ennek megfelelően a polióz enzimrendszerek a szubsztrát alapján csoportosíthatók. A xilánra a xilanáz enzimek hatnak, a mannánra viszont – mivel pl. a fenyő mannán felépítése az acetil-galakto-mannán már bonyolultabb – többek között mannánából és galaktozidából álló enzimrendszer hatása szükséges. A fa-poliózoknál további enzimek szükségesek az oldalláncok és az egyes funkciós csoportok lehasításához.

A xilanázok a cellulázokhoz hasonlóan csoportosíthatók exo-xilanázokra, endo-xilanázokra és β -xilozidázokra. Az endo-xilanázok tovább osztályozhatók aszerint, hogy a hasadást a xilán láncon véletlenszerűen, vagy az elágazásoknál hajtják végre. Az endo-xilanázok is jelentős átvivő (transzfer) aktivitást mutatnak és létrehoznak stabil intermediereket. Az endo-xilanázok a polimer

láncról xilobiózt és xilotriózt hasítanak le, amelyeknek nem redukáló végéről a β -xilozidáz xilózt hidrolizál. A keletkező xilóz viszont a hasító enzim működését erősen inhibeálja.

A lombosfa xilánok α -1,2 kötéssel kapcsolódó 4-O-metilglükuronsav oldallánca az α -glükuronidáz, a túlevelű xilánok arabinóz szubsztituense az α -arabinozidáz enzim segítségével hasad le. Ezek az enzimek rendkívül specifikusak, és hatásukat más enzimek jelenléte jelentősen befolyásolja (szinergizmus). Jelentős szinergizmust és specifikusságot mutatnak a xilán-észterázok. Így az acetyl-xilán-észteráz- amely részben acetilezett xilán deacetilezését segíti elő – hidrolitikus hatása endo-diklanáz mellett lényegesen fokozódik.

2. 2. 4. Ligninázok. A ligninbontás enzimrendszerei

Bár a lignináz nevet még nem definiálták, ezt a fogalmat használják azon enzimek összefoglalására, amelyek a lignin monomerek közötti kötések hasadását eredményezik. Izolált lignináz elsősorban a $C_\alpha - C_\beta$ kötések hasítja, elsősorban aromás aldehidek képződése közben. Ezeket az enzimeket tulajdonképpen peroxidázoknak kell nevezni, mert a legtöbb peroxidáz, mint a ligninázok is, működésükhöz hidrogén-peroxidot igényelnek, mely sztöchiometrikusan reagál az enzim prosztetikus csoportjával, a vastartalmú protohem IX-cel, oxidált komplex intermedier keletkezése közben. A következő redukciós lépésben az enzim a ligninegységgel lép reakcióba, az aromás gyűrűről elektront hasít le. A keletkező kation a szubsztrát felépítésétől függően C_α - ill. $C_\alpha - C_\beta$ hasadást szenved, vagy alakul át más folyamatban. Az enzim fehérjérszének molekulatömege 41000-43000 dalton és a szubsztrátok széles választékával lép reakcióba a katalitikusan oxidatív hatású hidrogén-peroxid jelenlétében (VETTER, 1981).

A ligninázok látszólag jelentősen különböző oxidatív folyamatokat is katalizálnak. Így a benzil-alkohol C-H kötésének hasadását aldehyd vagy keton képződése közben; vicinális diolok C-C kötésének hasadását aldehydképződéssel kísérve; difenil képződését dehidrogénezés útján; az oldallánc kettős kötésének oxidációját; demetoxilezést kinon és metanol képződése közben; vagy a veratril-alkoholnak közvetlen gyűrű hasítását. A ligninázok tehát abban különböznek alapvetően a specifikus enzimektől, hogy nagymértékben multifunkcionálisak, a reakciók igen nagy számát katalizálják.

Egy további peroxidázt is azonosítottak, mely mangán (II) függő, mivel a mangán (II)-t mangán (III)-á oxidálja. Az oxidált forma számos, különféle szubsztrát lebomlását segíti elő. A lakkáz viszont réztartalmú enzim, amely a difenol-benzokinon oxidációt katalizálja oxigén jelenlétében. Ezt az enzimet poli-fenol-oxidáznak vagy fenoláznak is nevezik az adott vegyületekre kifejtett hatása miatt.

Mivel a ligninázok hatásukat csak hidrogén-peroxid jelenlétében tudják kifejteni, működésükhöz hidrogén-peroxid termelő enzimek is szükségesek. Ebből a szempontból a glükóz-oxidáz enzimszisztéma jöhet elsősorban számításba. A hidrogén-peroxid mellett, mint aktív oxigénforrás – az élő szervezetekben mindig jelenlevő – a peroxidgyök, a hidroxilgyök és a szingulett állapotban lévő oxigén is szerepelhet.

A ligninázok által katalizált folyamatokban, az állandó koncentrációban jelenlevő hidrogén-peroxid mellett veratril-alkoholnak is jelen kell lenni, ami a ligninázok működésének magyarázatát bonyolultabbá teszi.

A ligninázok által katalizált reakciók ún. egy-elektron átmenettel járó oxidációs reakciók. Az oxidáció folyamatok azonban nemcsak a lignin lebomlásához vezetnek, hanem közbenső termékek kapcsolódásához, rekombinálódásához is.

2. 2. 5. A faanyag enzimatiszta degradációja

A Basidiomycetes gombák között a Pleurotus fajok is fehér-korhadás okoznak. A károsodott fa világos, csaknem fehér, gyakran színes szegéllyel. A faanyag puha lesz, a mechanikai tulajdonságok romlanak, a duzzadás nő.

2. 2. 6. A fehér-korhasztó gombák enzimszisztéma és hatása

A fehér-korhadás és a faanyag nagyméretű lágyulása a lignin degradációjának a következménye. A fehér korhadáskor azonban mindhárom fő alkotó szimultán bomlik, csaknem azonos mértékben. A ligninbontásban résztvevő enzimek a ligninázok (peroxidázok), valamint a lakkáz (poli-fenoloxidáz), mely a cellobióz-kinon oxireduktázzal és laktonázzal szoros szinergizmusban vesz részt a fenolok lebontásában. Ebben a folyamatban vesz részt a hidrogén-peroxidot generáló glükóz-oxidáz is. A fehér-korhadás során mindig jelen vannak a cellulózt és a poliózokat bontó enzimszisztémák is, így a cellulázok, a xilanázok, ill. a többi poliózt bontó enzimszisztéma (VETTER, 1986).

A fehér-korhasztó gombák enzimszisztémáinak hatására a ligninmolekulában jól meghatározható kémiai változások játszódnak le. Így a metoxilcsoport- és az oxigéntartalom nő, karbonil- és karboxilcsoportok képződnek, és az α - β hasadás mellett a β -O-4, β -O-4; β -5, β -1, β - β kötések is bomlanak. A ligninbomlás egyik oldalról kismolekulájú termékek képződésével, majd gyűrűhasadással jár, másrészt viszont magasabb kondenzáltsági fokú termékek, többek között bifenilek képződnek.

2.3. A LASKAGOMBÁK BELTARTALMÁRÓL

A gombából készült ételeket elsősorban íz- és aromaanyaguk miatt kedveljük. A laskagombából készült ételek íze, a laskagomba fűszerező értéke a többség véleménye szerint megelőzi a csiperkéét. Túlzás lenne persze a laskagombát a hússal egyenértékűnek tekinteni, hiszen a gombák fehérjetartalma lényegesen kisebb és fehérjéik biológiai értéke is valamelyest alulmarad a húshoz képest.

A laskagomba szárazanyagának 15-25%-a fehérje, 1-2%-a zsír, 6-10%-a ásványi só. Az ásványi sók többsége kálium és foszfor. A fennmaradó részt a szénhidrátok és egyéb anyagok teszik ki, ebből jelentős részt tesz ki az emészthetetlen rost.

Vetter János ICP (VETTER, 1999) módszerrel mért eredményei alapján a három legjelentősebb termesztett gombafaj nyersfehérje, nyerszsír, nyersshamu eredményeket tett közzé. A legmagasabb nyersfehérje mennyiséget a csiperkegomba három fajtájában (24-28 szá.%) mérte, a shii-take 24,77 %-ot, a laskagomba csak 17,4%-ot (kalapjában) illetve 7,4 %-ot (tönkjében) tartalmazott. A kalapok és a tönkök nyersfehérje tartalmának arányai igen különbözőek voltak, az *Agaricus bisporus* kalapja és tönkje közel azonos értékű (1,04 és 1,20 kalap/tönk arány áll fenn), a *Lentinula edodes*-nél 1,48, a laskagombánál pedig 2,34-es arány állapítható meg (a laskagomba tönk jelenti tehát a legkisebb táplálkozási értéket).

A nyerszsírtartalom 1,2 és 2,3 %-ok között változott, az összes vizsgált gomba tehát igen alacsony nyerszsír tartalmú volt. A kalap és a tönk összevetése során (VETTER, 1999) megállapította, hogy a csiperke törzseknél csak kis eltérés mutatkozott, a laska és a shii-take esetében azonban a tönk többet tartalmazott, mint a kalap (a kalap/tönk arányok: 2,55 és 1,75).

A nyersshamu-tartalom: 8,77% és 12,77% között volt a csiperke fajtáknál, a laskagomba és a shiitake termőtesteiben lényegesen alacsonyabb a nyersshamu mennyisége. Ennek oka az utóbbi fajok eltérő táplálkozási módja lehet. A färontó életmódú *Pleurotus ostreatus* és *Lentinula edodes* szubsztrátumai lényegesen kisebb hamutartalmúak, mint a csiperke komposztja (4. táblázat).

4. táblázat: Nyersshamu-, nyersfehérje- és nyerszsír-tartalom alakulása a *Pleurotus ostreatus* termőtesteinek kalapjában és tönkjében (minden adat a szárazanyag %-ában)

Pleurotus ostreatus „357”	Kalap	6.41	17.4	1.89
	Tönk	5.11	7.42	0.74
	Kalap/tönk	1.25	2.34	2.55

Forrás:(VETTER, 1999).

A gombák egyes vitaminokban meglehetősen gazdagok. Ezek a B₁-, B₂-vitamin, a niacin, a folsav és a pantoténsav. Jelentős mennyiségben tartalmaznak D-vitamint is. Említést érdemel, hogy 10 dkg friss laskagomba elfogyasztása kielégíti egy felnőtt ember napi B₂-vitamin és niacin igényének 40%-át, a folsav igényének 25%-át, pantoténsav igényének 23%-át, valamint B₁-vitamin igényének 17-20%-át. A laskagomba B₁-vitamin- és folsavtartalma jelentősen meghaladja a csiperkegombáét.

A laskagomba más gombákhoz hasonlóan az egészséges táplálkozás fontos eleme lehet. Beltartalma miatt fogyókúrázók, cukorbeteg, köszvényben és magas vérnyomásban szenvedők diétájában egyaránt kiválóan felhasználható. Magas emészthetetlen rosttartalma miatt csökkenti a vastagbélrák kialakulásának veszélyét. Vesebeteg étrendjében azonban magas káliumtartalma miatt csak korlátozottan szerepelhet.

A laskagomba általános beltartalmi értékei mellett ki kell emelnünk speciális gyógyhatásait is. Japán kutatók a laskagomba vizes kivonatával sikeresen csökkentették egyes daganatok növekedési sebességét. Állatkísérletekben kimutatták a takarmányként felhasznált szárított örölt laskagomba koleszterincsökkentő hatását. Csehországban a gomba termőtestéből magas koleszterinszint elleni kivonatot állítottak elő. Orosz kutatók a laskagombából egy pleurotin nevű antibiotikumot is készítettek.

2.4. TERMESZTÉSI SZEMPONTBÓL JELENTŐSEBB LASKAGOMBA-FAJOK HAZÁNKBAN

A késői laskagomba – *Pleurotus ostreatus* (Jacquin: Fries) P. Kummer. A természetben főként ősszel, ritkábban tavasszal vagy enyhe teleken jelenik meg különböző fafajokon. Az sérült, beteg, legyengült fákat támadhatja meg, élő, egészséges fákat nem. Az elpusztult faanyag szaprofitaként (korhadéklakó, korhadékbontó) folytatja életét. A faanyag nem ritka a 3-5 kg-os termés csokor sem. Mivel a laskagomba az ilyen faanyagokon terem, lehetőséget biztosít hazánkban -főként a hobbytermesztőknek- a földben maradt tuskón vagy kivágott farönkön történő termesztésére. Ebben az esetben a termőtestképzés az évszaktól függ.

Hazai törzseinek termőtestei a világos galamszürkétől egészen a kékesszürkéig változhatnak. A szín a törzsre jellemző, bár a környezeti tényezők jelentősen módosíthatják. A termőtest zömök, vastag húsú. A tönkje rövid, a kalapja féloldalas, akár a 30 cm-es átmérőt is elérheti. A lemezek fehérek, mélyen lefutók. A spóraporuk színe fehér, világos vajszerű. A vad törzseket szinte alig termesztik, szinte teljesen felváltották a hibridfajták (SZABÓ, 1986).

Hasonló változatai a világosbarna *P. ostreatus* var. *Salignus*, és a fenyőféléken gyakoribb **galambszürke laskagomba** (*P. ostreatus* var. *columbinus*, *P. columbinus*). Ide tartozik a **floridai laskagomba** *P. florida* is, bár az irodalmak egy kis hányadában a nyári laskagombával rokonítják. A floridai laskagombáról még részletesen lesz szó, ugyanis termesztési szempontból nagy jelentősége van (RIMÓCZI, 1994, 2000, 2004).

A késői laskagomba nem minden törzse igényel hideghatást a termőrefordításhoz, de a vad típusfaj 15°C-on magasabb hőmérsékleten nem képez termőtestet. A világban termesztői körökben hibridjei rendkívül népszerűek, beltartalmi értékük kiváló.

Floridai laskagomba – *P. florida* Eger, *P. ostreatus* var. *florida*. Észak-Amerikából került Európába. Egyes szerzők a *P. ostreatus* mások a *P. pulmonarius* változatának tartották, de mint fentebb említettem a *P. ostreatus* fajjal kereszteződni is képes. Magyarországon e fajjal kezdődött az egész éven át tartó intenzív termesztés a 70'-es években, de a gyengébb minősége miatt a hibrid laskagombák fölváltották. A faj nagy előnye, hogy lehetővé tette a nyári termesztést is, mivel a melegebb időszakokban is képzett termőtesteket. A *P. ostreatus* és a *P. ostreatus* var. *florida* keresztezéséből származó hibridfajtákat termesztik ma is hazánkban. A két faj keresztezése GYURKÓ (1984) nevéhez fűződik.

Nyári laskagomba – *Pleurotus pulmonarius* (Fries) Quélet. A hazai törzseinek egy része hasonlított a floridai laskagombához (*Pleurotus* sp. var. *florida*), míg a másik részük a szaka laskagombához (*P. sajor-caju*). A hazai gombapopulációból is igen értékes törzseket lehet begyűjteni (SZILI, 1994). Hazánkban általában lomblevelű fákon található meg. Kedveli a nyírt, juhart, tölgyet, bükköt, de tűlevelű fákon is megél. Hazánkban nyáron, júliusban, augusztusban és az őszi hónapokban gyűjthető, vagyis a termőtestképzés szempontjából jól tűri a magasabb hőmérsékletet.

Kalapja valamivel kisebb, mint a késői laskagombáé, széle begöngyölt, éréssel kiegyenesedik, majd felfelé hajlik. A kalap széle világosabb, ritkán csíkozott. Alakja általában kagyló vagy vese alakú, de előfordul fül, nyelv vagy kanál alakú termőtest is. Fiatalon a termőtest teteje kidomborodó. Színe világos csontszíntől a halványbarnáig, esetleg halványszürkékig változhat.

Tönkje rövid, szintén excentrikusan áll. Lemezei fehérek, tönkre lefutók. Spórái hengeresek, kissé homorúak, fehéres színűek.

A nyári laskagomba egyik változata a **szaka laskagomba** (*Pleurotus sajor-caju*), amelyet főleg trópusi, szubtrópusi területeken termesztenek, azonban hazánkban is érdemes lenne foglalkozni a termesztésével és keresztezési kísérleteket folytatni vele. Kompatibilis a szintén nyári

laskagomba másik változatával a *P. sapidus*-szal. A szaka laskagomba termőtestképzési hőmérséklete viszonylag magas, így lehetővé teszi a nyári termesztést (SZILI, 1994).

Ördögsekér laskagomba – *Pleurotus eryngii* (De Candolle: Fries) Quélet. Magyarországon is egyedülálló termesztési lehetőségek rejlenek az ördögsekér laskagombában. Ez a hazai termesztésben kevésbé ismert „nagygomba”, gasztronómiai értéke és termésmennyisége alapján méltán okot adhat arra, hogy hazánkban termesztésével többen foglalkozzanak. (KALMÁR 1960). A természetben – hazánkban is – a gomba *Eryngium*, *Ferula*, stb. korhadó gyökerein él (SZILI, 1994). A nevét is a mezei iringóról kapta (*Eryngium campestre*), amelynek hajtásai letörve, majd ördögsekéreként gurulva szórja a magvait (természetesen más növényeken is előfordul). A gomba elsősorban mezőn, réten, szántóföld szélein terem, de ritkán erdei füves tisztásokon, dombvidékeken is megtalálható. Jellegzetesen őszi faj. Októberben, novemberben gyűjthető.

Az ördögsekér laskagomba kalapja barnás, barnásszürke, ellaposodó vagy kissé tölcséres. Tönkje, amely szintén fogyasztható fehér, hengeres, vastag. Lemezei fehérek, a tönkre lefutók. Jól szárítható, rendkívül jó ízű (más laskagomba-fajok ízét is felülmúlja). Szintén több változata ismert, mint például: *P. ferulae*, *P. nebrodensis*, *P. hadamardii*, *P. fossulatus*. Ezek keresztezésével új jellegeket hordozó hibrideket lehetne előállítani.

Erestönkű laskagomba – *Pleurotus cornucopiae* (Paulet ex Persoon) Rolland. Hazánkban is honos gombafaj, elsősorban az ország déli részén elhalt lomblevelű fák (szil-, nyár-, juharfák) fordul elő. A magasabb hőmérsékletet jól tűri, ezért nemcsak tavasszal, ősszel, hanem nyáron is megtalálható. Ez egyben azt is jelenti, hogy a nyáron is termesztethető. A kalap színe világos sárga, ritkán sárgásbarna. Lemezei fehérek, sárgásak és a tönkre mélyen lefutók. A tönk ebből kifolyólag bordázott, „eres”. Húsa fehér, közepesen vastag, puha. Jellegzetes illata miatt nem mindenki kedveli. Nem csak faanyag, hanem egyéb lágyszárú növényi hulladékon is megél.

E faj egyik változatának tartják a *P. cirtinopileatus*, azaz **citromsárga laskagombát**, amely intenzív citromsárga színű faj, kis mennyiségben, elsősorban gasztronómiai célokra termesztik. Nem különösebben jóízű gomba, bár ez a konyhatechnológiai eljárásoktól is nagyban függ. Főként dekorációs célokra használják (ALBERT et al., 1995).

Rózsaszínű laskagomba – *Pleurotus djamor* (Rumphius: Fries) Boedijn. Ehhez az inersterilitási csoporthoz tartozik a *P. flabellatus* a szűkebb értelemben vett, termesztői körökben ismert „rózsaszín laskagomba”, amely trópusi, szubtrópusi területeken él és hazánkban főként gasztronómiai célokra használják föl.

Pleurotus cystidiosus (O.K. Miller). Trópusi, szubtrópusi területeken széles körben elterjedt és termesztett melegigényes laskagomba faj. A gomba, termesztési szempontból viszonylag alacsony produktivitású. Két változata ismert a *Pleurotus cystidiosus var abalonus* (*P. abalonus*) és *Pleurotus cystidiosus var. formosensis*. Később kiderült, hogy az utóbbi nem kompatibilis a típus *P. cystidiosus*-szal.

A *P. cystidiosus* azáltal, hogy a micéliumán konídiumokat visel, más laskagombafajoktól is jól elkülöníthető.

2. 5. A VILÁG ÉS A MAGYARORSZÁGI LASKAGOMBA-TERMESZTÉS TÖRTÉNETE

A laskagomba-fajok (*Pleurotus* spp.) nagyon közkedvelt, vadon élő és termesztett ehető gombák. Megtermelt mennyiségüket tekintve a világon a harmadik, hazánkban pedig a második helyen állnak. Ezen ízletes és egészséges fajok termesztése a jövőben világviszonylatban valószínűleg emelkedni fog. Ennek oka, hogy termesztésük nem igényel olyan komoly technikai háttérrel, gépparkot, mint a csiperke termesztés, továbbá – intenzív lignocellulóz-bontó képességükből kifolyólag – alkalmasak lehetnek olyan mezőgazdasági, erdészeti melléktermékek további hasznosítására, melyek eddig kihasználatlanok voltak (POPPE, 2000).

A laskagomba fajok termesztési lehetőségeire más gombákhoz (pl. *Lentinula edodes* – shiitake, *Volvariella* spp. – bocskoros gombafajok, *Agaricus bisporus* – kétspórás csiperkegomba) képest jóval később figyeltek fel (CHANG, 1999). A laskagomba fajok közül elsőként a késői laskagomba (*Pleurotus ostreatus*) és az ördögsekér laskagomba (*P. eryngii*) keltette föl a kutatók, erdészek, termesztők érdeklődését. A késői laskagomba termesztésbevonásában főként az erdészek jeleskedtek. A természetes úton „fertőzött” fatörzseket kivágták és az erdészlak közelében árnyékos helyre helyezték (CHANG-HAYES, 1978), (CHANG, 1993).

Az első termesztési próbálkozások 1897-ben történtek, amelyek a francia Matruchot nevéhez fűződnek. Különböző faanyagokon vizsgálta a gomba növekedését. A kutatómunka 1910-es években, Németországban folytatódott. 1916 – 1919 között a müncheni Erdészeti Főiskola Mikológiai Intézetben Falck dolgozta ki a tömör faanyagon történő termesztést. Itt említhető meg, hogy Németországban 1917-ben már kapható volt steril laskagomba csíra, amit feltehetően termesztéshez használtak fel (SZABÓ, 1986).

Később 1930 – 1940 között Busse, Liese, Bavendamm és Luthart végeztek e területen figyelemre méltó kísérleteket, továbbfejlesztették, és biztonságosabbá tették a Falck által kidolgozott termesztési eljárást. Az NDK-ban az 50-es évek elején tulajdonképpen ezt alkalmazták, amikor tömegével oltották a fatuskókat (SZABÓ, 1986).

Lignocellulóz melléktermékeken első termesztési kísérletekről Block, Tsao és Han számoltak be 1958-ban Floridában (POOPE, 2000). Ők még a laskagomba szubsztrátumot (a csiperkegomba-komposzt mintájára) komposztálták. E kutatók számos xylophag ehető gombafajt vizsgáltak meg. Kísérleteikhez fűrészport, rizshéjat, kukoricacsutkát használtak. Kísérleteikben a floridai laskagomba is szerepelt, amely kitűnt gyors növekedésével, viszonylag bőséges termésével.

Hazánkban szintén korán megkezdődtek a laskagomba hasznosítás kísérletei az erdészek és az erdő közelében lakók körében, de az első termesztési próbálkozások jóval később történtek.

1963-ban Luthardt német professzor ösztönzésére és segítségével kezdődtek meg a kísérletek. Luthardt már az 1940-es évektől foglalkozott a laskagomba szaporítóanyag-előállításai és termesztési módszereivel, végül az 1950-es évek elején kidolgozta a laskagomba farönkön történő termesztését. Az akkori célok nem minden esetben termőtestek nyerését, hanem az ún. mikofa előállítást célozták. A gomba által átalakított és más anyagokkal történő kezelést követően a mikofa könnyű, lyukacsos állományú, viszonylag hő- és vízálló, jó ipari fa volt. E fa forgalmazásából származó jövedelem jóval nagyobb volt, mintha a termőtesteket adták volna el (TASNÁDI, 1985), (KORONCZYNÉ-UZONYINÉ, 1969).

Luthardt professzor eredményeinek híre eljutott hozzánk is, és az ő munkája nyomán kezdte el kísérleteit a soproni Erdészeti Egyetem kutatócsoportja Gyurkó Pál vezetésével. A 60-as évek elején a soproniakkal egy időben kezdett el a témával Tóth Ernő foglalkozni, akihez később Véssey Ede csatlakozott, és a farönkön történő termesztési eljárásukat 1966-ban szabadalommal védtek le. Magyarországon tehát lényegében a faanyagon történő termesztést Falck és Luthardt módszere alapján Véssey Ede, Tóth Ernő, és Gyurkó Pál vezették be. Kísérleteiket az 1960 – 1965 között végezték (HELTAY, 2000).

Az eredményeket követően az üzemi telepítésekre 1967-ben került sor a Rábatamási Új Élet Mgtsz-ben és a Hosszúhegyi Állami Gazdaságban. Itt saját részre állították elő a gombacsírát, sőt béroltásokat is vállaltak. 1968-ban már exportálták (Olaszország, Dánia, Hollandia, NSZK) is a beoltott rönköket. A szélesebb körű elterjedésnek az szabott határt, hogy nagyüzemileg nem volt gazdaságos a használata. Hátrányai voltak: a termőtestképzés az időjárás függvénye, a tenyészidő hosszú, a termés szezonálisan jelenik meg, a gondozási munkák az időjárás miatt nem mindig végezhetőek el, a termés gyakran szennyezett, kártevők, vadak károsítják a termést. Ez a módszer a mai napig kisüzemi, háztáji, hobbi módszer maradt (SZILI, 1980).

Ezt követte a Véssey Ede, Tóth Ernő egyéb mezőgazdasági hulladékon történő termesztési technológiája, sterilizálással. 1970-ben beadott szabadalmuk kidolgozásában már Tóth László és Heltay Imre is részt vett, termelési eljárásuk HTTPV néven vált ismertté. A módszer nagy lendületet adott a 60-as évek végétől meginduló és a 70-es években kibontakozó intenzív termesztéstechnológiának (HELTAY, 2000).

1971-ben a HTTPV szabadalom alapján felépült a Borota Tsz laskaüzeme. Ugyancsak ekkor épült fel a Duna Tsz-ben is egy kísérleti laskaüzem, amely 1976-ban tovább bővült. (A tsz megszűnése után leállt.)

1968-69-ben Gyurkó Pállal együttműködve a Duna Tsz kutató csoportja kidolgozta a mezőgazdasági hulladékok, főleg a kukoricacsutka táptalaj készítését pasztörizálással. Ezt az

eljárást sajnos a Duna Tsz nem szabadalmaztatta, így elsőbbségi jogát a Találmányi Hivatalnál kellett megvédenie, amit sikerrel véghezvitt.

A 70-es évek elején indította el Tóth Ernő Olaszországban a HTTV alapján a laskagomba-termesztést, majd a későbbiek során Heltay Imre is több olaszországi üzem létrehozásában vett részt. Olaszország termeli ma a legtöbb laskagombát Európában.

A hazai, de mondhatjuk, hogy az európai laskagomba-termesztés mérföldköve a Gyurkó Pál által a 70-es évek elején előállított hibrid-fajták lettek. A *P. ostreatus* és a Kaliforniából származó *P. florida* keresztezése útján létrehozott fajták gyors fejlődésűek, bőtermők voltak, és hidegsokkot sem igényeltek, sőt, a nyári meleget is jobban tűrték, mint a *P. ostreatus*. A sok hibrid fajtajelölt közül kiválasztott H-7 fajta lett az egyik szülője a ma is forgalomban lévő HK-35 fajtának (GYURKÓ, 1984).

Újabb fejlődést hozott az ún. száraz (xeroterm) 100 °C-os hőkezelés, a kecskeméti Zöldségtermesztési Kutató Intézet szabadalma, amelyet az 1980-as évek elején Balázs Sándor és Kovácsné Gyenes Melinda dolgoztak ki. A Kutatóintézetben felépített laskaszubsztrátum-üzem növelte a laskatermesztés mennyiségét, amely 1991-ben érte el csúcspontját, mintegy 3.000 tonna éves termést, ami a következő években, kereslet hiányában, lecsökkent (BALÁZS, 1982), (BALÁZS-KOVÁCSNÉ, 1988).

A rendszerváltás a laskatermelésben nem hozott olyan fellendülést, mint a csiperketermesztésben, csupán kb. visszaállt az 1991. évi szintre. Ennek oka valószínűleg a szubsztrátum minőségének bizonytalanságában és az ezzel összefüggő, sokszor alacsony termésátlagban keresendő.

Az ázsiai országokban a laskagomba-termesztés sokkal gyorsabban fejlődött, mint Európában. Az ún. intenzív termesztés kezdetét itt is a 70-es évektől számítják (MUSHWORLD 2004), (FLEGG et al, 1985).

2. 5. 1. Intenzív termesztés

Az extenzív módszert felváltva a 60-as évek végére három intenzív módszer bontakozott ki: steril, hőkezelés nélküli, hőkezeléses termesztési technológia. Mindhárom technológiához tartozik egy-egy olyan elem, amely a laskagomba termesztés alatti védelmét szolgálja a kórokozók, kompetitor és kártevő szervezetekkel szemben. Az intenzív módszereknél főként lágyszárú növények maradékát használták szubsztrátum alapanyagként, amelyek nem nevezhetők a laskagomba természetes táptalajának.

Mint fentebb említettem a steril technológia magyar szabadalom, Heltay Imre, Tóth Ernő, Tóth László, Véssey Ede dolgozták ki, amelyet ma is HTTV eljárásnak nevezünk (SZABÓ, 1986). A sterilizálás során minden kórokozó, konkurens szervezet elpusztul, ugyanakkor a szubsztrátum a termesztési környezetbe kihelyezést követően fogékony a különféle betegségekre, mivel a szubsztrátum védettségét biztosító mikrobionta is elpusztul a sterilizálás során. Hazánkban ez nem elterjedt módszer a késői laskagomba hibridek termesztésekor (GYÖRFI, 1986).

A hőkezelés nélküli eljárás kezdeményezői, kidolgozói Benedek és Gyurkó (Erdészeti és Faipari Egyetem) (GYURKÓ,1984). Technológiájukban az elmaradt sterilizálást nagyobb mennyiségű szaporítóanyag bekeverésével (5tf%), fertőzésmentes alapanyagokkal próbálták kompenzálni. A nagy mennyiségű csírázás kompenzálására az ún. „hatszorozást”, mint szaporítóanyag léptéknövelést dolgozták ki. A költség így csökkenthető volt, de idővesztés is jelentett. A módszer további hátránya, hogy nem biztonságos, mert az alapanyag könnyen fertőződhet.

A hőkezeléses eljárások eredményeként nem steril, de a termesztés szempontjából problémát jelentő mikroorganizmusoktól mentes szubsztrátumot állítanak elő. Az alapanyagban visszamaradó mikrobionta egyben védettséget is ad a termesztésben problémát jelentő fertőzésekkel szemben. A hőkezelési módszereknek két formája terjedt el: a száraz hőkezelés és a nedves hőkezelés.

A száraz hőkezelés vagy más néven xerotherm eljárás során a száraz alapanyagot (pl. búzaszalmát) kalapácsos darálóval aprítják, majd zárt hőkezelőkbe termelik. A hőkezelőkben az alapanyagot átlagosan 1 órán át 100°C-os gőzzel járatják át. Ezt követően a kitermeléskor történik az anyag nedvesítése (egyben a lehűtése és fungicides kezelése), végül a becsírázás. Az eljárás nem steril módszer, ugyanis termofil (spórás) szervezetek maradnak az alapanyagban, nedvesítéskor, az anyagmozgatás során a higiéniai rend betartása mellett is kerülnek mikroszervezetek a szubsztrátumba. Az eljárás szintén magyar kutatók nevéhez kapcsolódik (SZILI, 1994).

A nedves hőkezelésnek több módja ismert, amely lényegében a csiperkegomba-komposzt előállítás laskagomba szubsztrátumra adaptált változatát jelenti. Az alapanyag előállítók saját bevált receptúrákkal dolgoznak, így nehéz lenne egy bizonyos technológiát leírni. Általánosságban a következők szerint történik a hőkezelés. Az alapanyagokat nedvesítik, prizmákba rakják. A prizmákon levegőt fúvatnak át, esetleg friss levegővel keverve visszacirkuláltatják (ahol erre a szükséges felszerelés rendelkezésre áll). A halmokat meghatározott időszakonként átforgatják. Az alapanyagot zárt tömeghőkezelő alagutakba termelik, ahol 55 – 60°C-ra felfűtik az alapanyagot és 72 órán át ezen a hőmérsékleten tartják. Gyakran használják azt a módszert, hogy az alapanyagot a hőkezelés kezdete előtt, vagy annak befejeztével 70°C-ra fűtik fel és ezt 3 órán át tartják. A 70°C-os

hőkezelés mellett rövidebb ideig szokott tartani az 55 – 60°C-os hőntartás. A hőkezelést követően az alapanyagot legalább 30°C-ra hűtik le és elvégzik a becsírázást.

Az alapanyag-előállítás egy negyedik lehetősége, amely a laskagomba termesztők körében ma ismét egyre gyakrabban emlegetett erjesztéses eljárás. Ennek során az előkészített alapanyagokat erjesztő tartályokban nedvesítik, vízzel töltik fel. A többnapos eljárás során bizonyos mikroorganizmusok a konkurens szervezetek számára (is) könnyen hasznosítható tápanyagforrásokat az erjesztés folyamán felhasználják, és olyan anyagcsere-termékeket juttatnak a fermentlébe, amelyek megakadályozzák más káros mikroszervezetek elszaporodását a szubsztrátumban.

Az alapanyag-előállítás más, kevésbé ismert és népszerű formái is léteznek, de ezek gyakorlati jelentősége nem nagy (KHAN-ALI, 1981), (STAMETS,1993).

2. 6. A LASKAGOMBA HIBRIDEK

A laskagomba a Föld csaknem valamennyi mérsékelt övi erdejében előfordul. Az egyik legismertebb a késői laskagomba, melynek szép, húsos termőteste van, színe lehet kékes, szürke vagy barnába hajló. Termesztéstechnológiai szempontból azonban van több hátrányos tulajdonsága. Az egyik az, hogy az alapanyag átszövése után nem fordul termőre, hanem 3-4 hét érlelési időre van szüksége, e nélkül nem terem. Ez az érlelési idő nagyon meghosszabbítja a tenyészidőt, a termesztő számára ez emeli a költségeket.

A másik hátrányos tulajdonsága, hogy a termés indukálásához hideghatást igényel. Az átszövődött gombatenyészetet 13-15 °C-ra kell lehűteni, az e fölötti hőmérséleten nem terem. Ezen alacsony hőmérséleten ráadásul 12-14 napig kell tartani szükséges, 2-3 °C-on viszont már 4-5 nap múlva megjelenhetnek a termőtestkezdemények. A hideghatás után a kultúrák normális termesztési hőmérséleten is termőre fordulnak, de ettől függetlenül elmondható, hogy a vad *P.ostreatus* fajták egész éven át nem termesztethetők.

Hazánkban a laskagomba-nemesítés szinte egyidős az intenzív termesztéssel. Kezdetben hazai *P. ostreatus* és *P.pulmonarius* fajtákat szelektáltak és adaptáltak a termesztésben. Ez a szelektációs munka az első időkben kielégítő volt, melynek eredményeképpen több államilag

minősített fajtát termesztettek. Heltay Imre – Tóth László – Tóth Ernő – Véssey Ede kutatók termesztéstechnológiai szabadalmi nagy lendületet adtak a termesztés fejlődésének (HELTAY, 1970). Ezt tovább fokozták Gyurkó Pál hibridjei is. A hazai, de mondhatjuk, hogy az európai laskagomba-termesztés mérföldköve a Gyurkó Pál által a 70-es évek elején előállított hibrid-fajták lettek. A *P. ostreatus* és a Kaliforniából származó *P. ostreatus. var. florida* keresztezése útján létrehozott fajták gyors fejlődésűek, bőtermők voltak, és hidegsokkot nem igényeltek; sőt, a nyári meleget is jobban tűrték, mint a *P. ostreatus*. A sok hibrid fajtajelölt közül kiválasztott H-7 fajta lett az egyik szülője a ma is forgalomban lévő HK-35 fajtának (GYURKÓ, 1984).

Az első államilag minősített H 7 hibrid átszövetési ideje már csak 3 hét volt, és 15–25 °C között is jól termett. A H 7 egy késői és a floridai laskagombák hibridje. Sorban azután következtek az újabb hibridek, mind jobb tulajdonságokkal és termesztési lehetőségekkel. A G 24, HK 44 és elsősorban a HK 35 fajták még ma, néhány évtized elteltével is kiváló fajták. A legismertebb HK 35-ös hibridet a H 7 és egy Olaszországból származó késői laskagomba keresztezésével nyerte a nemesítő. E hibrid és különböző spórafelvételei, változatai meghódították az egész világot (SZABÓ 1990), (SZILI-VÉSSEY, 1980), (SZILI 1994).

Összefoglalva elmondható, hogy a nemzetközi szintű laskagomba-termesztés fellendüléséhez a magyar szakemberek nagyban hozzájárultak.

2. 7. A BAZÍDIUMOS „NAGYGOMBÁK” SZAPORODÁSÁRÓL

A bazídiumos nagygombák ivaros szaporodásakor külön ivarszervek (specializált ivarsejtek) nem alakultak ki, hanem a különböző párosodási jellegű spórákból kifejlődő (ún. primer hifák) úgy olvadnak össze, hogy csak a sejtek sejtplazmája fuzionál, a sejtmagok nem. Tehát kariogámia nem figyelhető meg. Az összeolvadás (anasztomózis) eredményeként létrejön a dikariotikus gombafonál az ún. szekunder hifa. Ezeknek heterokariotikus sejteknek az osztódásával gombafonál, majd annak szövedéke a micélium alakul ki. A termőtestfejlődés indukálásában genetikai és környezeti tényezők egyaránt fontos szerepet játszanak. A micélium „sodródni” kezd, kialakulnak a primordiumok majd ebből a termőtestek (MILLER, 1971).

A szekunder hifák növekedése osztódással történik. Sejtjeinek sorozatos osztódásakor mindkét párosodási jellegű sejtmag sorozatosan szinkron osztódik, és az újabb sejtekbe szintén sejtmag-párok kerülnek. Ennek az osztódásnak van még egy különlegessége, az ún. csatképzés. Az osztódásokkor keletkezett csatok a szekunder micéliumon általában jól megfigyelhetők (JAKUCS, 1999).

A termőtest kialakulásával kifejlődik a himénium, amely a bazídiumból és a közöttük elhelyezkedő steril sejtekből, a cystidákból áll. A bazídiumok az egyes dikariotikus hifák végsejtjeiből alakulnak ki. A bazídium a helye az ivaros folyamatoknak. Itt történik meg a kariogámia, így a bazídium diploid zigótaként is felfogható. A sejt ezzel bazídiummá, sporangiummá alakul át. Ezt követően a diploid sejtmag meiotikusan osztódik, amelyből négy haploid sejtmag keletkezik, melyek a bazídiospórák sejtmagjai lesznek. A bazídiumon négy exogén bazídiospóra keletkezik egy-egy maggal. A spórákat a sterigma köti a bazídiumhoz, később e mentén válnak le arról és szóródnak (SZARVAS, 2002), (SZARVAS, 2003), (SZARVAS, 2004); (SZILI, 1970).

A genetikai variabilitásnak az ivaros szaporodás az alapja és forrása. Nagyobb genetikai variabilitás abban a populációban van, ahol az egyedek önsterilek, hiszen az önmegtermékenyülés a homozigócia, a beltenyésztés irányába hat, és az ilyen populáció kevésbé alkalmazkodóképes. A magával vagy egy hasonló törzssel kereszteződni képes gomba **homotallikus**. Ezzel szemben **heterotallikus** az, amely önsteril és kompatibilis partnert kíván a reprodukcióhoz. Itt a párosodás két fajazonos, de két ellentétes szaporodási típust (**mating type**) képviselő sejtek között megy csak végbe (KEVEI et al. 1999).

A heterotallizmusnak két eltérő típusa létezik. Az egyik a *morfológiai heterotallizmus* (morfológiailag különböző ivarszerveket jelent például több alacsonyabb rendű gomba esetén). A másik az *életteni heterotallizmus*, amely a kompatibilitási faktoroktól függ, abszolút független a két nem morfológiai különbségektől, vagy azok hiányától.

A szabályozásban genetikai tényezők érvényesülnek: egy gén, egy lókuszon vagy egy allélsorozat egy vagy két lókuszon.

1. *Két alléles heterotallizmus*: melyet egy lókuszon lévő két allél határoz meg. Az ilyen szervezetek két részre oszthatók: + és a – vagy „A” és „a” törzsekre. Itt a + törzs csak – törzsekkel kereszteződhet. Ilyen gombák például: *Mucor*, *Rhizopus*, *Neurospora*, *Puccinia graminis*, stb.

2. *Sok alléles heterotallizmus*: abban különbözik az előbbtől, hogy az ivari kompatibilitást szabályozó lókuszban sok allél van. Előnye, a két alléles heterotallizmushoz képest, hogy a kompatibilis törzsek találkozásának esélye nagyban megnőtt. Ez az eset is lehet bipoláris vagy tetrapoláris:

a) *Bipoláris heterotallizmus*: A bipoláris esetben egy lókuszt szabályoz, de azon allélsorozat van. Bipoláris heterotallizmus jellemző a legtöbb rozsdagombára, néhány *Gasteromycetes*-re, a *Coprinus comatus*-ra, a *Fomes subroseus*-ra, *Polyporus betulinus*-ra, stb.

5. táblázat: Bipoláris heterotallizmus (VETTER, 1989)

	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄
A ₁	-	+	+	+
A ₂	+	-	+	+
A ₃	+	+	-	+
A ₄	+	+	+	-

b) *Tetrapoláris heterotallizmus*: Lényegében a bipoláris heterotallizmusra hasonlít, de itt „A” és „B” lókuszt szabályozza a kompatibilitást. Ezek a meióziskor függetlenül öröklődnek. Minden lókuszt sok alléles. Kompatibilis kereszteződés akkor jöhet létre, ha az „A” és „B” allélek különböznek. Heterokaryonok jönnek létre akkor is, ha csak egyik allélben egyeznek meg, és a másikban már különböznek. Az ilyenkor keletkező heterokaryonok azonban („flat” és „barrage” reakciók) a normálistól eltérő tulajdonságú micéliumot jelentenek (6. táblázat). A tetrapolaritás a *Hymenomycetes*-ben, *Gasteromycetes*-ben, az *Ustilago mayidis* rozsdagombában fordul elő, s jellemző például a *Coprinus fimetarius*, *C. lagopus*, a *C. macrorrhizus*, a *Polyporus abietinus*, a *Schizophyllum commune*, a *Cyathus striatus*, valamint a – a disszertációmban szereplő – *Pleurotus ostreatus* fajokra.

6. táblázat: Tetrapoláris heterotallizmus (VETTER, 1989)

	A₁B₁	A₁B₂	A₂B₁	A₂B₂
A₁B₁	-	FL	B	+
A₁B₂	FL	-	+	B
A₂B₁	B	+	-	FL
A₂B₂	+	B	FL	-

A Bazidiomyceták ivari folyamatainak genetikai hátterének leginkább tanulmányozott alanyai a *Coprinus cinereus* és a *Schizophillum commune*. A szaporodási rendszerük *bifaktoriális heterotallizmus*, más néven *tetrapoláris heterotallizmus*. Amint említettem, ennél a szaporodási formánál a párosodást két különböző kromoszómán lokalizált, négy ivari típus (mating type, MAT) lókuszt koordinálja. Az A α , A β genetikai lókuszt felelősek a szexuális differenciálódás ún. A folyamataiért, a B α , B β az előbbtől független genetikai lókuszt a differenciálódás B folyamatait kontrollálják. Az „A” folyamatok közé tartoznak a kétféle mag párbaállítása a dikarionban, ezek szinkron osztódásának biztosítása, a csúcsi csatképző sejtek létrejötte. A „B” folyamat történései a csúcsi sejt kétmagvúságának a fenntartása a szeptumok enzimatikus oldódása révén, mind a magok a csúcsi sejtbe történő előrejuttatása, mind pedig a csatban az egyik szülői mag visszajuttatása a dikarionikus állapot fenntartása érdekében (KEVEI et al. 1999), (KEVEI-KUCSERA, 1998).

Az A és a B folyamatok együttesen váltják ki a sikeres szexuális szaporodást. A lókusztok polimorfikusak (KRONSTAD-STABEN, 1997), (KOTHE, 2001).

Mivel csak a szekunder (heterokarionikus) hifák képesek a termőtestképzésre, a sikeres matinghez, a szexuális szaporodás beindulásához kompatibilis monokarion párokra van szükség (a kompatibilitás nem azonos, hanem legalább egy allélben eltérő párosodási típusú törzseket jelent). A polimorfok nagy száma miatt jelentős az a variációegyüttes, ami fertilis utódhozásra alkalmas kompatibilis variációkat jelenthet (LODDER et al. 1993).

A nemesítési munkákban a molekuláris markerek alkalmazása a homokarionok izolálására volt legnagyobb hatással. A homokarionok izolálásával a „csírázott” spórákat vagy a regenerált protoplasztokat összegyűjtik és genetikai markereken alapuló vizsgálatoknak vetik alá. A vizsgálat után a heterokarionokat eltávolítják. A megmaradt homokarionokat új hibridek előállítására használják, amelyeket később hosszú tesztfolyamatnak vetnek alá.

2. 8. POLIMORFIZMUS ÉS A MARKEREK

A gombatermesztés fő, favorizált faja világszerte a kétspórás csiperkegomba (*Agaricus bisporus* var. *Albidus* (Lange) Pilát), így a kutatási munkák zöme e fajra összpontosít. Elsősorban a kétspórás csiperkegombánál a nemesítési programoknak ma már részei a különböző DNS-technikák, amelyek az 1990-es években váltak igazán elérhetővé (RAPEL et al. 1972). A késői laskagomba (*Pleurotus ostreatus*) és hibridjei esetében ezek később jelentek meg. Hazánkban a DNS-alapú technikákkal történő nemesítés, fajtaelkülönítés nem történt meg eddig egyetlen termesztésben szereplő gombafaj esetében sem (BASTIDE et al. 1997).

A fajtaelőállítás sikerét a kiindulási alapanyagban meglévő genetikai variabilitás határozza meg. Kezdetben az evolúció során kialakult természetes genetikai variabilitást használták új fajták előállítására. Ezekben a főszerep a többé-kevésbé spontán kereszteződésé, gén-, kromoszóma mutációké, természetes szelekcióé, génáramlásé (gene-flow), genetikai sodródásé (drift) volt. Mivel e lehetőségek korlátozottak, és nem minden tulajdonságra terjednek ki, így a variabilitás mesterséges növelését célzó törekvések bontakoztak ki. Ilyen volt a keresztezés, a genetikai variabilitás növelésének első mesterséges tényezője. A nemesítők rájöttek, hogy a genetikai variabilitás fő forrásai a mutációk, rekombinációk, és mindezek mesterségesen is kiválthatók. Míg az evolúció során kialakult genetikai variabilitás spontán keresztezések, gén-, kromoszóma mutáció, valamint a természetes szelekció (natural selection) révén jöttek létre, addig ma a kutatók tudatosan, saját céljaiknak megfelelően irányítják, azaz mesterséges szelekciót végeznek (SEY-VARGA, 1997), (BRUNS et al. 1991), (RAGUZ et al., 1992).

Amikor változatosságot, polimorfizmust keresünk egy faj egyedei vagy fajtái között, akkor lényegében különbségeket keresünk a tulajdonságaikban. A különbségeket különböző szinteken lehet detektálni:

- Makro- és mikromorfológiai jegyek (pl. termőtest alakja, színe, pikkelyezettsége; spórák mérete alakja, ornamentikája stb.)
- Fiziológiai jegyek (pl. hőmérséklet, pH, ozmotikus viszonyok stb.)
- Kemotaxonomiai makerek (szekunder metabolitok, ubikinonok)
- Genetikai markerek (pl. párosodási hajlam)
- Biokémiai markerek (pl. enzim, protein, RNS, DNS)
- Biológiai markerek (pl. izolálás helye, szubsztrátum milyensége stb.)
- Agronómiai markerek (termésátlag, termésminőség, rezisztencia stb.)

A különbségeket vizuálisan vagy mennyiségi mérésekkel lehet megállapítani. Egy fajon belül kétféle variáció jöhet létre: környezeti és genetikai. A környezeti tényezők hatására bekövetkező környezeti variációk általában méretben, alakban, színben, beltartalomban, bizonyos esetekben pikkelyezettségben, vagy fejlettségi állapotban jelentkeznek. Ezek nem öröklődnek és így szelekciókkal nem izolálhatók. Az öröklődő variációkat genetikai jelenségek hozzák létre. Ilyen variációk jelentkezhetnek könnyen megfigyelhető tulajdonságokban vagy komplex jellegekben. Ezek a variációk öröklődhetnek, de expressziójuk mértéke függhet a környezettől. A környezeti és örökletes variációkat kiváltó tényezők általában együttesen hatnak az élőlényekre (HAJÓSNÉ, 1999); (KEVEI et al. 1999), (HINTZ, 1988), (PERRY et al. 1993).

A nemesítők a nemesítési alapanyagokban az öröklődő variációkat keresik. Ezeket azonosítják, kiemelik, és új fajtákat állítanak elő belőlük. A nemesítők a genetikai variációkat hagyományos vagy új nemesítési módszerekkel növelhetik.

Hagyományos módszerek:

- Ivaros irányított keresztezés
- Vegetatív micélium anasztomizáltatása
- Indukált mutáció
- Poliploidia (növényeknél)
- Kromoszóma átvitel

Új módszerek

- Protoplaszt fúzió (szomatikus hibridek)
- In vitro mutációk (szomaklonáris variabilitás)
- Géntranszfer rekombináns DNS módszerrel.

A nemesítők munkájának eredményeképpen létrejön egy bizonyos genetikai variabilitás. Pusztán genetikai variabilitás létrehozása nem elegendő, a megfelelő variációkat meg is kell találni. A megfelelő variációk megtalálását főként morfológiai markerekre alapozták, azonban ma a műszeres analitika, detektálási módszerek fejlődésével a genetikai markerek is használatosak erre a célra (izoenzim analízis, RFLP, PCR stb.).

A nemesítési alapanyagokban meglévő genetikai variációkat a nemesítők genetikai markerek segítségével találják meg, illetve különböztetik meg a környezeti variációktól. A genetikai

markerek tulajdonságokat meghatározó allélek, amelyek sajátosságait fenotípusos, fehérje- vagy DNS szinten vizsgáljuk.

A nemesítők a 60-as évekig morfológiai, élettani és agronómiai tulajdonságokat meghatározó alléleket használták genetikai markerként. Több hátrányuk miatt ma egyre elterjedtebbek a biokémiai markerek. TANKSLEY-ORTON (1983) molekuláris markereknek nevezte el azokat a biokémiai markereket, amelyek fehérje és DNS-szinten azonosítják a polimorfizmust.

2. 9. KLASSZIKUS NEMESÍTÉSI MÓDSZEREK

2. 9. 1. Álszövetoltás

A szövetoltás a fajtaelállítás legegyszerűbb módszere. Egy vadon termő törzs termőtestéből történő sikeres szövetoltás tulajdonképpen már egy új fajta tenyésztésbe vételét is jelentheti. A szövetoltás a frissen gyűjtött termőtestből történik. A gomba kalapját fertőtlenítyük, a kalapbört eltávolítjuk, a plectenhyámából kis darabot vágunk ki. A termőtestdarabokat steril, lelángolt oltókacsra tűzzük, majd szilárd táptalaj felszínére helyezzük. Ez kiváló módszere a vad törzsek begyűjtésének és nemesítésbe, termesztésbe vonásának (IMBERNON et al, 1984).

2. 9. 2. Nemesítés monospórák tenyészetekkel

A monospórák tenyészetekkel történő fajtanemesítést már régóta használja számos laboratórium. Ennek során spórafelvételekből hígítási sor készítésével, vagy más módszerekkel (pl. mikromanipulátor) monospórák tenyészeteket hozunk létre. A homokarionok egymás mellé oltásával - a csatokat nem hordozó, termőtestképzésre nem alkalmas, lassú növekedésű primer micéliumtelepek az ivari faktorok kompatibilitása esetén - anasztomizálnak, így létrejön a heterokariotikus szekunder micélium, mely gyors növekedést mutat, csatokat hordoz és termőtestképzésre alkalmas. A szemi- vagy inkompatibilis homokarionokat újabb keresztezéskor tesztelik (LARRAYA et al. 2001).

Elegendő számú spórafelvétel és teszt esetén javulás érhető el, és ezek a kiválasztott utódvonalak idővel új fajtákká is válhatnak.

Sajnos a laskagomba monospórák tenyészetek nem használhatók adott üzemi fajták vitalitásának megőrzésére, szemben a kétspórák csiperkegombával. A hosszabb ideje termesztett fajták között előfordulhat termés-csökkenés és/vagy minőségromlás (SINDEN, 1981). Ennek a leromlásnak a tudományos háttere nagyrészt ismeretlen, az azonban bizonyos, hogy a sorozatos átoltások nagyban befolyásolják. Még nem ismerjük ennek hátterét, de lehetséges, hogy a meiózis és a ds RNS elemek is szerepet játszanak ebben (ELLIOT, 1972, 1985), (FRISCHE, 1984, 1991).

2. 9. 3. Multispórák tenyészetek

A multispórák nemesítési módszert Gyurkó Pál, kiváló magyar laskagomba nemesítő előszeretettel alkalmazta. Ennek lényege, hogy két kedvező tulajdonságokat hordozó termőtestekből spórákat nyerünk. A két törzs spórakeverékét szilárd táptalaj felszínére csöppentjük. Az egymás

közelében kihajtó hifák anasztomizálnak és elkezdenek növekedni. A táptalajon a növekvő heterokarionokat "megversenyeztetjük", melynek során a legjobb növekedésű, legszebb morfológiájú vegetatív micéliumot a szektorokból sorozatos átoltással tisztítjuk, míg a folyamat eredményeként egy vitális heterokarion tenyészethez jutunk (GYURKÓ, 1984), (IMBERNON, 1984), (IMBERNON et al. 1996).

2. 10. GOMBANEMESÍTÉSBEN HASZNÁLT ÚJ MÓDSZEREK

Az új gombafajták nemesítésére kezdetben az alábbi technikákat alkalmazták: szövettenyészet, multispórás és monospórás tenyészetek. Ezek a módszerek viszonylag egyszerűek, nem kívánnak komoly beruházást egy standard mikrobiológiai labor felszereltségén túl. Gerda Fritsche által hagyományos módszerekkel nemesített hibridek piacra bocsátása világszerte fordulópontot jelentett a gombaiparban (FRITSCHÉ, 1984), (SPEAR-MILLER, 1991). Ettől kezdett kibontakozni a természetből nagygombák „következő hullámának” kutatási iránya, mely elsősorban a kétspórás csiperkére irányult, később pedig más, természetbe vonható gombafajokat is érintett. A Hollandiában véghezvitt úttörő jelentőségű munka megmutatta, hogy a gombafajták tulajdonságai irányított nemesítési stratégiával javíthatók. A tradicionális és új molekuláris biológiai módszerek egyre nagyobb teret nyitottak a gombaipari kutatások számára (XU et al., 1993), (CHALLENGEN et al. 2000), (CHANG, 1992).

Szomatikus hibridizáció

A szomatikus hibridizációnak három lépése van:

- Protoplasztok előállítás
- Protoplasztok fúziója
- Szelekció

A protoplasztok előállításához először le kell emészteni a gomba sejtfalát. Ehhez olyan enzimkeveréket használnak, amely a sejtfal fibrilláris szénhidrát-komponenseit lebontja. A sejtfal elvékonyodik, majd kis lyukak keletkeznek rajta, melyeken a membránnal körülvett csupasz sejtek „kifúvódnak”. A membrán konstriktiói miatt gyakran egy sejtől több protoplaszt is keletkezik. A protoplasztok tehát sejtfal nélküli, csupasz sejtek. A protoplasztok izolálására egy magasabb ozmolaritású közeg felel meg, amely megakadályozza a sejtek nagy mennyiségű vízfelvételét, így azok lízisét. Az izolálás után a sejtmaradványokat egy sor filtrációs módszerrel távolítják el (LARRAYA et al. 1999), (LARRAYA et al. 2000).

A protoplasztok fúziójához főként két módszert használnak. Az első esetben PEG-t (polyetilén-glikol) használnak a protoplasztmembránok fúziójának elősegítésére. A fúzió gyakorisága a PEG használata esetén 1:1 000 –tól 1: 100 000-ig terjed. A másik módszer az elektromos fuzionáltatás, amely sokkal hatékonyabb fúziót eredményez, mint a PEG használata. E módszer esetében a két

gomba protoplasztjait azonos mennyiségben keverik össze és helyezik a fúziós kamra elektródjai közé. A nagyfrekvenciájú váltóáram hatására a protoplasztok felületén kialakuló töltéskülönbség következtében vonzzák egymást (dielektroforézis), láncszerűen rendeződnek el, majd erősen kapcsolódnak egymáshoz. Ezt követően adott egyenáram impulzusok hatására a sejtek kapcsolódási pontjainál pórusok keletkeznek a membránon, megindul a membránok, sejtek fúziója.

A fúziós termékek szelekciójának első lépéseként a fuzionált protoplasztokat regeneráltatni kell egy alkalmas médiumon. Ez a táptalaj általában egy ozmotikusan stabil agar táptalaj, melyen a sejtek új sejtfalet kezdenek regenerálni. A sejtfalet kialakulását követően egy vagy több hifa hajt ki és fejlődik ki a telep. Általában csak kevés protoplaszt képes a regenerációra és a fiatal fúziós termékeket is izolálni kell egymástól. Az izolált fúziós termékeket általában vitális festékekkel (fluoreszcens festékek, mikromanipulátor) vagy molekuláris biológiai módszerekkel (izoenzim analízis vagy más DNS technika) tesztelik, szelektálják. A PEG-lal végzett fúziót az alacsony hatékonysága miatt inkább auxotróf mutánsok izolálására használják (TANKSLEY-ORTON, 1983).

A protoplasztfúziót a természetű nagygombák esetében használják:

- Szomatikus hibridizáció
- Homokariotizáció
- Genetikai transzformáció
- Vírusfertőzés

Izoenzimvizsgálat (izozimek)

Az élő sejtekben azonos funkciók ellátására szolgáló fehérjemolekulák szerkezetében (összetételében) genetikailag meghatározott, biokémiai módszerekkel kimutatható eltérések vannak. Az izoenzim elnevezést Markert és Mollert 1959-ben vezette be (MARKERT-MOLLER, 1959), de 1977-től kapta meg az izoenzim a következő tartalmi definíciót: egy faj olyan multiplex molekuláris enzimformáit, amelyeknek a genomban több mint egy enzim struktúrgén felel meg, izoenzimeknek nevezzük (HAJÓSNÉ, 1999). Izoenzim kritériumként említik a különböző genetikai eredetet és a hasonló funkciót. A multiplex formák genetikai háttere háromféle lehet:

- Hasonló vagy azonos működést végző enzimet kódolhat több különböző gén (lókus). A többlókuszos enzimformák kialakulásában valószínűleg a génduplikációs mechanizmusok játszhatták a fő szerepet.

- Mutáció eredményeképpen azonos lókuszt több allélikus formája jöhet létre.
- Az egyedfejlődésben, egy-egy sejtvonalban szomatikus mutáció eredményeként is keletkezhetnek fehérjeszerkezeti változások, amelyek egyedi eltérést eredményeznek, és ivaros úton nem adódnak tovább.

A gombanemesítők számára hozzáférhető első genetikai markerek az izoenzimek, azaz a különböző enzimek eltérő allélikus formái, melyek gélelektroforézissel és színreakcióval elválaszthatók voltak (ROYSE-MAY, 1982), (MAY-ROYSE 1982). A módszert még ma is alkalmazzák néhány laboratóriumban (pl. Sylvan, USA; INRA, Franciaország). A módszer számos feltérképezett lókusztól nyújt információkat és - bár munkaigényes - a maga idejében óriási előrelépést jelentett (CALLAC et al.1993), (CALLAC, 1996), (CALLAC, 1997), (CALLAC 1998), (HARMSEN, 1992).

RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism

Az RFLP technikával nem csak a restrikciós endonukleázos emésztés után kapott DNS-fragmentek hosszának a különbségeit lehet kimutatni, hanem az inszerciót, deléciót, és a bázisváltást is. A deléció, inszerció megváltoztatja az érintett fragmentumok elektroforetikus mobilitását. A fragmentumok számának a változása és új fragmentumok megjelenése pedig azt jelzi, hogy bázis szubsztitúció, inszerció vagy deléció miatt egy enzim hasítási helye megszűnt, illetve egy új hely jött létre.

A folyamatban sejtmagi DNS-t izolálunk, restrikciós endonukleázzal emésztjük, majd a DNS-fragmentumokat elektroforézis után denaturáljuk, depurináljuk, majd a gélről nitrocellulóz vagy nylon membránra visszük át (Southern-blot). A membránon lévő denaturált, egyfonalas DNS-fragmentumokat hibridizáltatjuk egy jelzett próbával. Autoradiogramon, fluorigramon vizsgáljuk az RFLP mintázatot.

Az 1980-as évek végén hozzáférhetővé váltak az első DNS-markerek, az RFLP-k (Restriction Fragment Length Polymorphism; BOTSTEIN et al. 1980). Az izoenzimekhez hasonlóan ez a módszer is idő- és munkaigényes. Azokkal ellentétben azonban az RFLP a robusztus markerek nagy számát nyújtja a nemesítőnek. A RFLP-módszert így használni kezdték *A. bisporus*-ra is (CASTLE et al. 1987). A termesztett gombáknál az RFLP-ket kapcsoltsági térképek (KERRIGAN et al. 1993), és fizikai géntérképek (SONNENBERG et al. 1996), valamint fajták szabadalmi levédésére (LOFTUS, 1995), (LOFTUS et al.1998), (LOFTUS et al., 2000 a, b), (GEML-HAJDÚ, 2000) használták. Számos RFLP-t fejlesztett ki - többek között - Kerrigan, Anderson, Horgen (University

of Toronto, Erindale) az 1980-as évek végén. Ezek közül a markerek közül néhány, pl. p1n150, p1n148 és p33n16 standard markerekké váltak a kutatólaboratóriumokban.

RAPD - Random Amplified Polymorphic DNA

A RAPD módszerrel a genom ismeretlen DNS szekvenciáit lehet felszaporítani egy vagy két, 10 nukleotidból álló (dekamer) random primerrel. Az amplifikáció kiindulását képező primer(ek) a genomon véletlenszerűen hibridizál(nak) a komplementer szekvenciával.

Az 1980-as évek második felében, a PCR-technikák elterjedésével új marker-rendszer vált a kutatók számára hozzáférhetővé. A RAPD-módszert (Random Amplified Polymorphic DNA; WILLIAMS et al. 1991) az *A. bisporus* esetében KHUSH et al. (1992) alkalmazták. Az eljárást homokarionok kiválasztásában, kapcsoltsági térképek készítésében és fajta-levédési folyamatban alkalmazták (LOFTUS, 1995, et al., 1998). A RAPD-módszer igen nagy, lehetőség szerint végtelen számú markert nyújt a nemesítőnek, bár az eljáráshoz igen tiszta DNS szükséges és a megismételhetőség is számos nehézségbe ütközik. További hátrány, hogy a legtöbb RAPD lókuszt domináns, így csak '+' vagy '-' formában értékelhető. Ez a jellemvonás megnehezíti a ténylegesen '-' eredmény elkülönítését a PCR-felerősítés során képződő hibától. Növeli a nehézségek számát az, hogy az amplifikáció nem terjed ki a teljes genomra, így a keresztezéskor megjelenő egy-egy hasznos RAPD sáv más keresztezésekkor gyakran hiányzik.

SCAR - Sequence Characterized Amplified Region

A legutóbbi években, a SCAR-markereken vagy más néven SCAR-okon (Sequence Characterized Amplified Region, PARAN-MICHELMORE, 1993) alapuló módszer terjedt el széles körben a gombanemesítők körében. A SCAR-markereket közvetlenül a DNS-szekvencia adatokból fejlesztik ki. Egy szoftver segítségével egy pár összeillő PCR marker megtervezhető, majd ismert szekvenciájú és sávméretű szakasz amplifikálható.

A SCAR markerek, amelyek általában különböző allélokkal rendelkeznek, gyengébb minőségű DNS-minta felhasználására is alkalmasak és a vizsgálat gyorsabban elvégezhető, mint a nem PCR-on alapuló módszerek esetében. A SCAR-ok nagy része specifikus kromoszómákhoz kötött. Ezekből az előnyökből kifolyólag a SCAR-markereket széleskörűen használják nemcsak a gomba, hanem különböző haszonnövények nemesítésében is.

A leghasznosabbak azok a SCAR-markerek, amelyek közvetlenül a PCR alkalmazása után polimorfizmust mutatnak. Az inszercióból és delécióból adódó eltérések két PCR allél közötti

méretkülönbséghez vezethet, így ezek agaróz gélen könnyen elválaszthatók (SONNENBERG et al. 1999), (LOFTUS, 2000 a,b). Más esetekben polimorfizmus észlelhető a PCR-sávok egy alkalmas restriktív enzimmel történő emésztése során is. A szükséges enzim a DNS-szekvenciától függ. A négy bázispár hosszú felismerési hellyel rendelkező enzimek a leghasznosabbak, mert gyakrabban hasítanak, mint a hat bázispárt igénylő nukleázok.

Markerekkel végzett szelekció a gombanemesítésben

Legtöbb haszonnövény tervezett nemesítési folyamatában szerepel a "markeres szelekció" kifejezés (Marker Assisted Selection, MAS) (RAFALSKI-TINGEY, 1993). A MAS már eddig is hasznos eszköznek bizonyult, mert lehetővé teszi szelektálást egy kívánt tulajdonságra, olyan marker vagy markerek segítségével, amelyek az adott tulajdonságot meghatározó lókuszhoz vagy lókuszhoz közel helyezkednek el. Így a DNS-markerek alkalmazásával a szelekció már a termesztési kísérletek előtt elvégezhető (MOQUET et al. 1999).

Az elmúlt tíz évben négy fontos tulajdonság öröklődéséről publikáltak adatokat az *A. bisporus* esetén: ivari típus (*MAT*), bazídiumonkénti spóraszám (*BSN*), kalapszín (*PPCI*) és baktériumos foltosodás elleni rezisztencia. A *MAT*, *BSN* és *PPCI* jelentik a nemesítő számára legkönnyebb célpontot, mert ezeket csak egy genetikai lókuszt határoz meg.

A kulcsfontosságú fenotípusos jellemzők - pl. termésátlag, alak, termőre-fordulás ideje - mindegyikét több gén határozza meg. Ahhoz, hogy ezeket a sokkal összetettebb kapcsolatokat ábrázolhassuk, tesztelés, majd az adatok statisztikai kiértékelése szükséges. A növény-nemesítés számos területén végeznek ilyen kísérleteket, amelyek ezeknek a mennyiségi tulajdonságokat meghatározó lókuszhoz (Quantitative Trait Loci, QTLs) az öröklődési folyamatait vizsgálják.

A gombahibridek tesztelése meglehetősen költséges a szükséges hőmérséklet-, páratartalom- és CO₂-szint pontos szabályozása miatt. A MAS révén csökkenthető a tesztelésre kerülő hibridek száma, a szelekció gyorsabb, és a költségek is alacsonyabbak.

Egy PCR eljárás során meghatározhatók a különböző homokarionok ivari típusai (*MAT*) a keresztezés előtt, mely információ létfontosságú a nemesítési pedigré megtervezésekor. Szintén kutatások folytak a bazídiumonkénti spóraszám, kalapszín markerezésével kapcsolatban. A molekuláris markerek kutatása napjainkban is nagy erővel folyik (CHOW et al. 1994), (KERRIGAN, 2000), (KIDDER, 2000).

Genetikai térképek

A markeres szelekció (MAS) kiindulópontja a rendelkezésre álló markerek széles skálája, amelyek lehetőleg ismert elhelyezkedéssel és kapcsoltsági viszonyokkal rendelkeznek. Számos mezőgazdaságilag fontos növény- és állatfaj esetében már részletes genetikai térképeket készítettek és ezek közül jónéhány a "nemzetközi genom" projektek részét is képezi. A termesztett gombáknál e terület viszonylag lassan fejlődött, bár történt néhány jelentős előrelépés, és ezek is elsősorban a csiperkegombát érintik (ARTHUR et al. 1982), (KERRIGAN et al. 1993), (SONNENBERG et al. 1996), (BRUNS et al. 1988).

A térképek használata a nemesítési programban

Amikor új markereket fedeznek föl, fontos, hogy a genom egészében is el tudják helyezni azokat. Bizonyos cégek kutatócsoportjai saját fizikai és kapcsoltsági térképeket készítettek a CHEF, RAPD és SCAR-analízisek kombinálásával. Fizikai (CHEF) térképeket készítettek a különböző kromoszómákhoz tartozó sávok kimetszésével a CHEF gélből, PCR és SCAR markerek segítségével. Ezzel a megközelítéssel sikerült megerősíteni olyan kapcsolatokat, melyeket főleg korábbi térképi adataikból ismertek. Ezen kívül bizonyos kromoszómákon sikerült lokalizálni nem polimorf SCAR markereket. Kapcsoltsági térképeket készítettünk monospórás tenyészetek két különböző populációjának felhasználásával, RAPD és SCAR kombinációjával.

Génbanki szekvenciák

Egyre több szekvenciát közöltek a Genbank web-oldalán (www.ncbi.nih.gov). Ezek között megtalálhatók részleges és teljes hosszú mRNS-ek, különböző mitokondriális szekvenciák, a filogenetikai kutatásokban használt riboszomális RNS-ek részleges szekvenciái, és néhány teljes génszekvencia a promotor és terminator szekvenciákkal stb. A szekvenciából SCAR-markereket lehet készíteni, amelyeket aztán térképezésben és nemesítésben használtunk.

Cégünknel egyéb felhasználás vonatkozásában mikovírus-specifikus (LIV, MVX) primereket tudunk tervezni az ismert szekvenciaadatokra.

Mikroszatellit

Az eukarióták többségének, ha nem is mindnek, az örökítőanyaga tartalmaz 2-4 bázispárból álló ismétlődő szekvenciákat. Ezek mikroszatellitként ismertek (TAUTZ, 1989). A

mikroszatellitek rendelkeznek egy tulajdonsággal, mely nagyon fontos a genetikai kutatásban: az ismétlődések száma a fajon belüli egyedek között is változhat. Elméletileg, a mikroszatellit motívumok bármely oldalára kialakított primer-párok, különböző genotípusokban, különböző fragmentumhosszúsággal amplifikálnak fel.

A mikroszatellitek nagy polimorfizmust mutató DNS-szakaszok, amelyek 2-5 bp hosszúságúak. Ha a tandem, ismétlődő régiók két nukleotidból állnak, akkor VNDR-nek (Variable Number of Dinucleotide Repeats = változó számú dinukleotid ismétlődések, STR-nek (Short Tandem Repeat = rövid tandem-ismétlődés, (EDWARDS et al. 1991) mikroszatellitnek vagy SSR-nek (Simple Sequence Repeat = egyszerű szekvencia ismétlődés) nevezzük (HAJÓSNÉ, 1999). A mikroszatellitek egyes szerzők szerint 11-60 bp, mások szerint 20-40 bp hosszú, könnyen amplifikálható, nagy polimorfizmust mutató DNS-szakaszok, amelyek egyenletesebben oszlanak el a genomban, mint a miniszatellitek.

GMO-gombák

Jelenleg is igen élénk vita folyik a Genetikailag Módosított Organizmusokról (GMO). Egy genetikailag módosított, üzemi gombafajta megjelenése nem valószínű addig, amíg a GMO vita véget nem ér. Addig is a munka a megalapozott, nem GMO-technikára épülő módszerekkel előállított új hibridek felé irányul.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3. 1. AZ ÚJ HIBRIDEK ELŐÁLLÍTÁSA KERESZTEZÉSEKKEL

3. 1. 1. A nemesítési munkában alkalmazott törzsek jellemzése

Hazánkban és gyakorlatilag az összes laskagomba termesztésével foglalkozó országban a Gyurkó-féle HK35-ös hibrid és annak klónja a legelterjedtebben alkalmazott fajta. Mondhatjuk azt, hogy ez a hibrid adja a standardot a nemesítők számára, mivel ez a hibrid a termesztők szemével minden szempontból a legjobb eredményességet adó fajta. Ma már nehéz lenne bármelyik, a HK35 nemesítésénél alkalmazott szülő törzs szaporítóanyagát önálló fajtaként értékesíteni. Ugyanakkor kiváló lehetőséget adnak ezek a törzsek arra, hogy felhasználásukkal, illetve kiegészítve újabb vad *P. ostreatus* törzsekkel, új, a HK35 fajtától eltérő, de azzal szemben versenyképes hibrideket állítsunk elő.

Ezért is alkalmaztuk a következő törzsek tenyésztéseit a nemesítésben szülői alapanyagként:

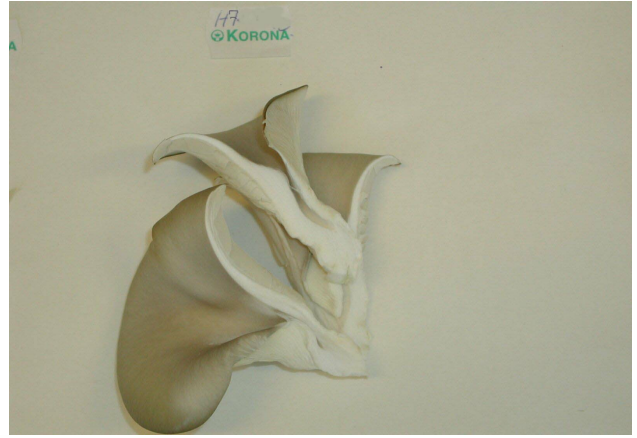
-Gyurkó hibridek: H7, G24, HK35-vonalak különböző forrásból, HK44;

-Vad ostreatusok: PO1-től 25-ig, OL 1-től 7-ig, *P.ostreatus.var.florida*.

3. 1. 2. A keresztezéseknél alkalmazott törzsek rövid jellemzése

H7:

Ez a hibrid a Gyurkó hibridek első generációjához tartozik (P5-jelzésű *P.ostreatus europea* X *P.ostreatus var. florida*). Bő termésével, esztétikus, kissé barnába hajló színével igen kedvelt hibriddé vált az 1970-es, 80-as években. 23 °C -25 °C között viszonylag jól képez termőtestet, e fölött húsa elvékonyodik, piaci minőségét elveszíti.



1-2. ábra: A H7-es fajta termesztési kísérletei

G24:

Szintén vad *P.ostreatus* olaszországból származó törzseiből és a *P.ostreatus.var.florida* keresztezésével előállított hibrid. A termőcsokor levelei kisebbek, mint a H7 esetében, színe barna. A magas hőmérsékletet is jól tűri, ezért a nyári termesztésre kiválóan alkalmas volt. A termőcsokor viszonylagos kis súlya miatt manapság a piac nem kedveli, ellenben kiváló szülői törzs.



3-4.ábra: A G24-es fajta termesztési kísérletei

HK hibridek:

A H7 és egy olaszországból származó vad *P.ostreatus* keresztezésével előállított hibridcsalád. Bőtermőek, galambszürke színűek, húsos csokrokat termő fajták. A legelterjedtebb a HK 35-ös fajta, a melyet jelenleg is a Sylvan cégcsoport Duna HK 35 néven forgalmaz. A hibridcsalád fontos jellemzője még az, hogy viszonylag későn szórja a spóráját, ezért a szedők légzőszervét kevésbé terheli.



5-6. ábra: A HK hibridek termesztési kísérletei

Vad törzsek:

A vad törzsek igen tetszetősek. Húsuk vastag, a termőcsokrok súlyosak, sok termőtest összessége alkotja. Színük a galambszürkétől egészen a sötét barnáig terjed, változatosak. Termőképességük korlátozott, csak intenzív hűtéssel lehet termésképzést indukálni. A tönk hamar keményedik, „fásodik”, élvezeti értékét hamar elveszíti.

A kutatási munka során alkalmazott **OI** törzsek Olaszországból, míg a **PO** törzsek Magyarországról származó fajták.



7-8. ábra: Vad *Pleurotus ostreatus var. europae* törzsek termesztési kísérletei

A vad törzsek közül a leginkább figyelemre méltó, a *P.ostreatus.var.florida* faj. Ez az észak-amerikai faj képes termőtestet növelni még 22 °C fölötti hőmérsékleten is, ezért a melegtűrés tulajdonságának jó átvivő alanya. Hátránya, hogy a termőtestek színe halvány, gyakran kifehérednek, húsa vékony. A piaci igényeknek nem megfelelő minőséget produkál.



9-10.ábra: A vad *Pleurotus ostreatus* var. *Florida* termesztési kísérletei

3. 2. NEMESÍTÉSI MUNKA

3. 2. 1. Tenyésztörzs előállítás klasszikus keresztezéssel

A szülői törzsekkel a következő keresztezéseket végeztük el.

7.sz. táblázat

A keresztezéseknél alkalmazott szülői törzsek összefoglalása

	PO 1-25	P.o. var. florida	H7	HK35	G24	HK44	OL1-7
PO 1-25	0	X	X	0	X	X	0
P.o. var. florida	X	0	0	0	0	0	X
H7	X	0	0	0	0	X	X
HK35	0	0	0	0	X	0	0
G24	X	0	0	X	0	0	X
HK44	X	0	0	0	0	0	X
OL1-7	0	X	X	0	X	X	0

(X= keresztezett törzsek; 0= nem keresztezett törzsek)

A táblázatban jelöltük azokat a keresztezési párokat, amelyekkel a nemesítő munka 1999-től folyik. Nagyobb részt azokhoz a szülői törzsekhez hasonló fajtákkal dolgoztam, amelyekkel Gyurkó Pál is dolgozott. Munkám annyival egészült ki az ő csoportjáéhoz képest, hogy már elkezdtem a G24, H7 és HK hibridek keresztezését is egymással, illetve vad törzsekkel.

Spóragyűjtés

A spóratermelés céljára kiszemelt érett termőtest a termőblokkról, vagy fatuskóról levágható. Minthogy a laskagomba lemezei nem zárt helyen fejlődnek ki, mint pl. a csiperkegomba fátyollal takart lemezei, hanem nyitott körülmények között, ezért a fölösleges szennyezés elkerülése végett célszerű a termőtestet nagyon tisztán kezelni. Felületi fertőtlenítést célszerű alkalmazni, csak a nagyobb szennyezéseket törölöm le, vigyázva, hogy közben a lemezeket be ne szennyezzem. Spóranyerés céljából legjobb a levágott termőtestet steril Petri-csésze nyitott alsó felére, lemezekkel lefelé úgy elhelyezni, hogy a termőtest ne fedje be az egész Petri-csészét, vagy kisebb termőtesteknél a lemezek ne feküdjenek rá szorosan a Petri-csésze aljára. A termőtest tönkjét a csésze szélére kell támasztani, hogy a lemezek, és a csésze alja között levegő maradjon. Ez az

elővigyázatos elhelyezés azért szükséges, mert a termőtest igen intenzíven lélegzik, és ha a termőtest szorosan az üvegre fekszik, akkor sok kondenzvíz képződik, amelyben a termőtesten esetleg jelenlevő baktériumok rövid idő alatt elszaporodhatnak. Ha a ledobott spórapor száraz marad, az esetleg bejutó egy-két baktérium nem képes elszaporodni, és később sem okoz nagy problémát, hiszen a spórák nagymértékben hígított szuszpenzióban kerülnek felhasználásra. A jobb levegőzés céljából a Petri-csésze fedelét sem szoktam visszahelyezni az aljra, csak ferdén nekitámasztom. Minthogy az egész elrendezés a jó levegőzés, illetve a kondenzvíz elkerülése céljából meglehetősen nyitott, ezért az egész spóráztatást célszerű kisebb, huzatmentes, nem forgalmas helyiségben, vagy nagyobb zárt légtérben, pl. szekrényben, vagy nagyobb üvegbúra alatt, pormentes helyen folytatni. A leírt körülmények között 18-24°C hőmérsékleten a termőtest spóráit már 24 óra leforgása alatt tömegesen leszórja.

A spórák leszórása után a termőtestet eltávolítom a Petri-csészeből. A csésze fedelét rátéve, lezárom, csökkentve így is a további fertőzésveszélyt.

Ha a spórákat nem akarjuk azonnal felhasználni, akkor ajánlatos a Petri-csészét tiszta papírzacskóba tenni és hűtőszekrényben elhelyezni. 0 és +5°C közötti hőmérsékleten a spóra hónapokig tárolható. A tárolás során a spóra fokozatosan veszít csírázóképeségéből, legjobban mindig a friss spóra csírázik.

Spóra csíráztatása

A spóra csíráztatására általánosan használtos a malátás táptalaj. Ennek összetétele a következő:

10 g maláta /árpa vagy kukorica/ lekvár

10 g szaharóz

2 g (NH₄)₂ SO₄

2 g KH₂PO₄

0,5 g MgSO₄

0,1 g NaCl

0,1 g CaCl₂

0,5 ml ZnSO₄ 1/1.000 oldatából

1,0 ml FeSO₄ 1/100 oldatából

1,0 ml MnCl₂ 1/100 oldatából

1,0 ml CuSO₄ 1/10.000 oldatából

20 g agar-agar

A lombikba bemért anyagokat felfőzzük autoklávban, hogy az agar-agar feloldódjon, majd az autoklávból kivéve, a pH értéket pH=7,0-7,2-re állítjuk. Ezután a még meleg, folyékony agaros táptalajt 15 ml-ként kémcsövekbe adagolom, majd vattadugóval lezárom. A 15 ml agaros táptalaj 10 cm átmérőjű Petri-csészék felöntéséhez, agarlemez készítésére szolgál. Ha szükséges, a kémcsövekbe kevesebb, kb. 6-8 ml táptalajt is adagolunk ún. ferde csövek készítésére. Az ilyen kémcsöveket autoklávozás után ferde helyzetben hagyom kihűlni, mert így nagyobb agarfelületet kapunk, amelyen a tenyészetek jól fenntarthatók.

A táptalaj kiadagolása után a kémcsöveket papír vagy gyapotvatta dugóval zárom le. Ezután autoklávban 3-szor, áramló gőzben, vagy 1 atmoszférán /121°C-on/ 45 percig, nyomáson sterilizálom. Rövid lejáratú munkáknál a nyomelem kiegészítést a táptalajból elhagyható. Törzsfenntartáshoz mindig a teljes táptalajt alkalmazom.

Malátalekvár helyett magunk is készíthetünk kivonatot csíráztatott, majd megszáritott és megdarált árpából. A kivonat készítéséhez 10 g árpadarát 1 liter vízben felmelegítünk 53 °C-ra. Egy óra hosszáig ezen a hőmérsékleten tartjuk, majd hagyjuk, hogy lassan kihűljön. Másnap papírvattán átszűrjük, kiegészítjük 1 literre, és ebbe mérjük bele a többi vegyszert. Felfőzés, pH-beállítás, adagolás kémcsövekbe ugyanúgy történik, mint azt az előbbieken leírtuk.

A spórák csíráztatásához, illetve a keresztezések végrehajtásához általában a fent leírt agaros táptalajt használjuk.

3. 2. 2. Dikarionta tenyészetek előállítása monospór eljárással.

Keresztezésekhez mindig legalább két tenyészetet kell összeoltani egy agarfelületre, célszerűen 10 cm átmérőjű Petri-csészében, lehetővé téve ez által a sejtfúziót, és így a kétmagvú, dikarionta hifák létrejöttét. A keresztezések végrehajthatóak előzőleg izolált monospór tenyészetek összeoltásával – ezt nevezzük monospór eljárásnak – vagy pedig a Petri-csészék közepére eleve sok spórát oltunk, és a kinőtt telepekből izoláljuk a már dikarionta tenyészeteket. Ez utóbbi eljárást sokspórás, idegen szóval multispór, vagy polispór módszernek nevezzük. Az eljárások bármelyikével előállított dikarionta tenyészetek közül válogatjuk ki több termesztés során a céljainknak legmegfelelőbb tenyészeteket.

A monospór eljárás egyes lépései a következők:

- Spóraszuszpenziók készítése
- Agarlemezek kiöntése
- A spórák szélesztése
- Csíráztatás
- A csírázó spórák kiemelése

- A tenyészetek mikroszkópos ellenőrzése
- A különböző származású monospór tenyészetek összeoltása és a kompatibilitás megfigyelése
- A dikarionta tenyészetek fenntartása

Spóraszuszpenziók készítése

A megfelelő tulajdonságokat hordozó szülők spóráját a korábban leírt módon felfogtam Petri-csészében, vagy más alkalmas edényben. Ezt a sterilen felfogott és esetleg tárolt spóraanyagot használom fel szuszpenziók készítésére.

A munkát kémcsövekbe adagolt steril fiziológiás oldatok elkészítésével kezdem. Egy főzőpohárban vagy más megfelelő edényben 0,8%-os NaCl oldatot kell készíteni, majd ezt 2 cm³-ként normál kémcsőbe szükséges adagolni, papír-, vagy gyapotvatta dugóval a szokásos módon bedugaszolva és gőzben sterilizálva. Jó, ha egy spóraféleségre legalább két kémcsövet számítunk. Általában így is csak néhány kémcsőről van szó, amit célszerűen háztartási kuktafazékban is lehet sterilizálni. A gőzvezető nyílásra a súlyt feltesszük. Az első sípolástól számítva 50 percig célszerű tartani nyomás alatt. Aztán hagyjuk a csöveket kihűlni. Csak akkor használjuk a csöveket, ha a hőmérsékletük 30°C alá csökkent.

A szuszpenzió készítést azzal kezdjük, hogy a leégetett oltókaccsal a steril sóoldatba nyúlunk, majd a kaccsal a steril oldatot a Petri-csészében levő spóratömegre visszük. Az üvegre száradt spórák ekkor leválnak – a kacsot kissé mozgatva a leválást elő is segíthetjük. Ha most a kacsot felemeljük, a kis gyűrűben maradt vízzel együtt rengeteg spórárt is felveszünk. A kacsot a kémcsőben levő oldatba mártva a spórák leválnak. Ezt a műveletet még egyszer megismételjük. Többször általában nem érdemes ismételni, mert akkor túl sok lesz a spóra a szuszpenzióban. Ugyanezt a műveletet a másik spóramintával másik kémcsőbe is elvégezzük. A kémcsöveket enyhén megrázva szabad szemmel is megfigyelhetjük, hogy a spórák bevitelével enyhén opalizáló homogén szuszpenziót kaptunk.

A laskagomba spórái a vízben, vagy híg sóoldatban nem csapódnak össze, minden nehézség nélkül készíthető szuszpenzió.

A szuszpenzió készítésénél arra kell törekedni, hogy a spóraszám cm³-eként kb. 200-300 legyen. Ekkor ugyanis az agarlemezre felvitt 4-6 csepp szuszpenzióban majd mintegy 50-80 db spórárt juttatunk egy Petri-csészébe, ami a későbbi műveletek szempontjából a legkedvezőbb. A spóraszám ellenőrzését érdemes Thoma, vagy Bürker-kamrával végezni és a kapott eredménytől függően a szuszpenziókat vagy steril sóoldattal hígítani, vagy ha szükség van rá még spóra bevitelével sűríteni. A Petri-csészébe vitt spóraszámot a felvitt cseppek számával is

szabályozhatjuk. Ez a lehetőségünk azonban meglehetősen korlátozott, mivel több szuszpenzió felvitele esetén a folyadék az agarlemez felületén elfolyik, és a spórákat összesodorhatja. A cseppek nagysága nagyban függ a használt pipetta csúcsának méretétől. Vastagabb csúcsú pipettával nagyobb lesz egy csepp mérete, vékonyabb csúcsú pipettával kisebb cseppeket kapunk. Ezért a cseppek száma nem adható meg pontosan. A lényeg, hogy a Petri-csészébe vitt spórák száma lehetőleg a megadott értékek között mozogjon.

Spórák szélesztése

Az előzőleg elkészített spóraszuszpenziókat enyhén megrázogatjuk, hogy a spórák eloszlását egyenletessé tegyük. Majd steril pipettával felszívjuk a szuszpenziót és az agarlemezekre egyenletesen elosztva 4-6 cseppet juttatunk. Ezután a folyadékcseppeket hokibot-szerűen meghajlított steril üvegbottal óvatos, de határozott mozdulatokkal szétkenjük az agarlemez felületén. Az óvatosságra azért van szükség, hogy az agarlemezt meg ne sértsük az üvegbottal. Ezzel a szélesztést lényegében befejeztük. A Petri-csészéket lefedjük és 20°C-os termosztátba helyezük csíráztatásra. Egy spórafajtából 6-8 csészét készítünk. Fontos, hogy a Petri-csészék a termosztátban is vízszintes felületen álljanak. A cél ugyanis az, hogy a szétkent spórák helyben maradjanak. Márpedig ha kelletténél több vízben vittük fel a spórákat, vagy kondenzvíz is volt az agarfelületen, akkor az összefolyó víz egy helyre összesodorhatja a spórákat és a szélesztés eredménytelen, használhatatlan lesz.

Csíráztatás

A szélesztést követő napon a Petri-csészéket nem mozdítjuk, hogy a felületi víz ne mozogjon. A spórák a leírt körülmények között általában 24 órán túl, de 48 órán belül elkezdnek csírázni. Ezért a szélesztést követő második napon már figyelemmel kell kísérni a spórák csírázásának megindulását. Keresünk olyan Petri-csészéket, amelyekben az agar felületéről a víz felszikkadt, vagy ferdén tartva is már alig folyik. Ezeket a csészéket anélkül, hogy kinyitnánk, megfordítjuk és binokuláris preparáló mikroszkóp alatt átvilágítva megvizsgáljuk. Fordított helyzetben az agarlemezen keresztül a spórák mindig megfigyelhetők. Eredeti helyzetben a Petri-csésze fedelét belülről rendszerint pára borítja, ami lehetlenné teszi kinyitás nélkül a mikroszkópi megfigyelést. Ha a spórák elkezdtek csírázni, azonnal nekiállhatunk kiemelésüknek. Ha még nem csíráznak, akkor tovább kell várni, de naponta legalább kétszer mikroszkópon továbbra is meg kell őket figyelni.

Csírázó spórák kiemelése

A spórák kiemeléséhez egy egyszerű kis eszközt használunk. Ez nem más, mint egy szűrt tenyészetek oltására is használt tű, amelynek a legvégét kb. 2 mm hosszban laposra kalapáljuk, és a kis lapát síkjában kicsit meghajlítjuk. A kis lapát, melegítésre használt elektromos készülékekben található, vékony cekaszuzalból is készíthető. Az oltólapátot természetesen minden használat előtt leégetjük és az agarhoz érintve hűtjük.

Preparáló mikroszkóp alatt – a Petri-csésze fedelét levéve – az agar felületén megkeressük a csírázó spórákat. Gondosan megfigyeljük, hogy a csírázó spóra egyedül áll-e, nincs-e a közelében másik spóra függetlenül attól, hogy a másik csírázik-e, vagy sem. Csak olyan spórát veszünk célba, amelyik közelében nincs másik spóra, és így biztosak lehetünk benne, hogy csak egy spórát emelünk ki.

Ha a kicsírázott spóra az agarhoz tapad, akkor nem célszerű az agarról leválasztani. Az agardarabbal együtt szépen ki lehet emelni. Kiemeléshez a kis lapát nyelét a Petri-csésze falának peremére támasztjuk. Így sokkal kevésbé fog rezegni, mint szabad kézben. A preparáló mikroszkópban figyelve a kiválasztott spórát, finom előre-hátra és jobbra-balra mozgatóval az agar fölött a látómezőbe betoljuk a kis lapátot. Ha a spórát és a lapátot egyszerre látjuk, a lapát élével a spóra alatt és fölött belevágunk az agarba. Ezután a Petri-csészét 90 fokkal elforgatjuk és az előbbi műveletet ebben a helyzetben is megismételjük. Elfordítás alatt nézzük a mikroszkópban, hogy a kiválasztott spórát el ne veszítsük szem elől. A negyedik bevágáskor már nem is vesszük ki a lapátkát, hanem kanalazó mozdulattal emeljük ki a kivágott kis agarkockát, rajta a csírázó spórával. A kis kocka élhossza kb. 2 mm szokott lenni. A kiemelt kis agardarabot a spórával együtt kémcsőbe, ferde agarra, vagy Petri-csészébe előre kiöntött agarlemezre visszük, ahol tovább növekedve egyspórás, vagy másképp monospór tenyészetet képez.

A spórák szélesztése és a kislapátos kiemelés kis gyakorlat után viszonylag gyorsan és biztonságosan végezhető, és feleslegessé teszi a drága mikromanipulátor beszerzését. A munka eredményességét nagymértékben segíti a spórák megfelelő szélesztése. Ha a spórák nem túl ritkán állnak, tehát mikroszkóp alatt gyorsan megtalálhatók, és nem is túl sűrűn, tehát könnyen lehet egyedülálló spórát találni, akkor rövid idő alatt némi gyakorlattal 8-10 spórát is ki lehet emelni.

Monospór tenyészetek mikroszkópi ellenőrzése

A monospórok izolálása után várni kell, amíg a kis telepek megerősödnek, ez akár két hetet is igénybe vehet, majd mikroszkópon kb. 300-szoros nagyítás mellett ellenőrizzük, hogy képez-e csatot. A csatképzés a bazídiumos gombáknál a kétmagvú, azaz dikarionta állapot jele, ami

monospór tenyészeteknél természetesen nem kívánatos. A csat nem más, mint a hifán kívül kialakult ív alakú híd a harántsejtfal mellett, amely a sejtmagok osztódása után az egyik leánymag visszavándorlását teszi lehetővé az új sejtől az előző sejtbe. Ez a híd feladatának teljesítése után is megmarad és biztos jele a kétmagúságnak. Vizsgálatához leégetett és hűtött tú segítségével kevés hifát emelünk ki a gombatelepből. Tiszta tárgylemezre vízceppbe helyezük, két preparálótűvel kissé széthúzzuk, majd fedőlemezzel lefedjük. A laskagomba fonalain a csat már 300-szoros nagyítással jól megfigyelhető. Kétes esetben nagyobb nagyítású objektívet is ráállíthatunk. Az olyan tenyészet, amelyen csatot találunk, további munka céljainak nem felel meg, kiselejtezzük. A csatok száma a dikarionta fonalakon tenyészetenként nagyon változó. Legtöbbször 300-szoros nagyítással vizsgálva már az első látómezőben többet, esetenként sokat lehet találni. De előfordul, hogy csak a második vagy harmadik látómezőben találunk. Ha a negyedik látómezőben sem találunk egyetlen csatot sem, akkor már nem valószínű, hogy a fonál dikarionta.

Különböző származású monospór tenyészetek összeoltása és a kompatibilitás megfigyelése

Ahhoz, hogy a termőtestképzésre alkalmas dikarionta sejtekből álló fonálat, illetve gombatelep kialakulhasson, két monokarionta tenyészetet egymás mellé kell oltani, lehetőséget adva ezáltal, hogy a sejtfúzió létrejöhessen.

Az egymás mellé oltás nagyon egyszerűen kivitelezhető. 10 cm átmérőjű Petri-csészébe előre kiöntjük az agarlemezt, majd a csésze szélének közelében egymástól mintegy 1 cm távolságra elhelyezzük a két különböző monospór tenyészetből vett kb. 10 mm² területű oltódarabot. Az agaros oltódarabokból a gomba elkezd növekedni. A kis kör alakú telepek néhány nap múlva összeérnek és ettől kezdve a telepek növekedési gyorsasága és alakja a találkozási típusnak megfelelően alakul. Ahhoz, hogy ezt elbírálhassuk, meg kell ismerkednünk a laskagomba szexualitását szabályozó ún. inkompatibilitási faktorok működésével.

A jobb megértés kedvéért térjünk vissza arra a klasszikus esetre, amikor az összeoltott monospór tenyészetek nem két különböző eredetű termőtestből, hanem egy és ugyanazon termőtestből nyert spórákból származnak. Ez az eset egyébként a gyakorlatban is előfordulhat akkor, amikor egy bevált, de előregedő törzstenyészetet fel kell újítanunk és saját spóraanyagát – idegennel való keverés nélkül – kívánjuk felhasználni azért, hogy az előregedő törzshöz hasonló tulajdonságokkal rendelkező fiatal tenyészetet válasszunk ki.

A laskagomba két monospór tenyészetét egymás mellé oltva nem biztos, hogy sejtfúzió jön létre, és ha fúzió létre is jön, nem biztos, hogy az egészséges, kétmagvú sejtekből álló fonálat kialakulását eredményezi. A laskagomba két haploid fonalának kapcsolódását két ún. inkompatibilitási faktor szabályozza, amelyeket A és B betűvel szoktunk jelölni.

Egy laskagomba termőtest fonalainak minden sejtjében két-két sejtmag van. Mindkét sejtmag hordozza magával a saját szabályozó faktorait. Az egyik mag faktorait jelöljük A_1 és B_1 betűkkel, a másik magét A_2 és B_2 -vel. A bazídiumban a két sejtmag összeolvad és a magfúzió eredményeként e rövid életű diploid fázisban, együtt van a négy inkompatibilitási faktor is ($A_1 B_1$ és $A_2 B_2$), majd a kétszeri sejtmagosztódás során négy sejtmag, illetve négy haploid spóra keletkezik. Ezekből a spórákból a korábbi négy inkompatibilitási faktor közül kettő-kettő a következő kombinációban fordulhat elő: A_1B_1 , A_1B_2 , A_2B_1 , A_2B_2 . Ha ezekből a spórákból monospór tenyészeteket készítünk és ezeket összeoltjuk, akkor az alábbi találkozások jöhetnek létre (8. sz. táblázat).

8. sz. táblázat A genotípusok lehetséges megoszlása tipikus bifaktoriális heterotallikus bazidiomicéteszeknél (mint pl. a laskagomba).

	A_1B_1	A_1B_2	A_2B_1	A_2B_2
A_1B_1	-	H	H	+
A_1B_2	H	-	+	H
A_2B_1	H	+	-	H
A_2B_2	+	H	H	-

A matematikailag lehetséges 16 féle találkozás közül csak azokból jön létre életképes magvú fonálzat, ahol mind az A, mind a B faktor alléljai (arab számmal jelölve) eltérők. Pl. $A_1B_1 + A_2B_2$, vagy $A_2B_1 + A_1B_2$ stb. ezeket az eseteket valódi kompatibilitásnak nevezzük és a táblázatban + jellel jelöltük. Ez az összes találkozások 25%-a.

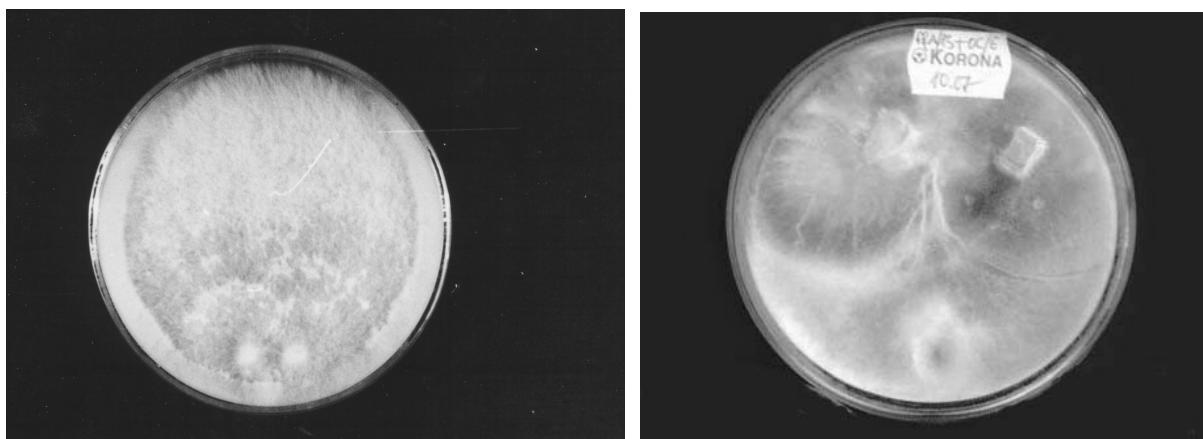
Ha a találkozó fonalakban mind az A, mind a B faktor alléljai megegyeznek, akkor a kapcsolatra teljesen alkalmatlanok. Ez a teljes inkompatibilitás esete. Pl. $A_1B_1 + A_1B_1$, vagy $A_2B_1 + A_2B_1$. A teljes inkompatibilitás eseteit a táblázatban – jellel jelöltük. Ez is az összes találkozás 25 %-át teszi ki.

Ha a találkozó fonalakban a faktorok közül az egyik, pl. az A alléljai különbözők, de a másiké, a B-é azonosak, akkor felemás terméketlen találkozások, hemikompatibilis heterokarionok jönnek létre. Pl. $A_1B_1 + A_2B_1$. Itt az A faktorok különbözők és a B-k azonosak, a hiba a B faktornál van. Egy másik példa $A_1B_1 + A_1B_2$, ahol az A faktor alléljai azonosak és a B-k különbözők. A gátló hiba jelen esetben az azonos A faktornál jelentkezik. A hemikompatibilitás eseteit a táblázatban – függetlenül attól, hogy a terméketlenség az A faktorok, vagy a B faktorok alléljeinek azonosságából adódik – egységesen H betűvel jelöltük. A terméketlen hemikompatibilitás kétféle esete együttesen az összes találkozási lehetőségek 50 %-át teszik ki.

A találkozások esetén az A faktor a magpárok kialakulását és a csatképződést szabályozza, a B faktor a magvándorlást és a csatosfúziót.

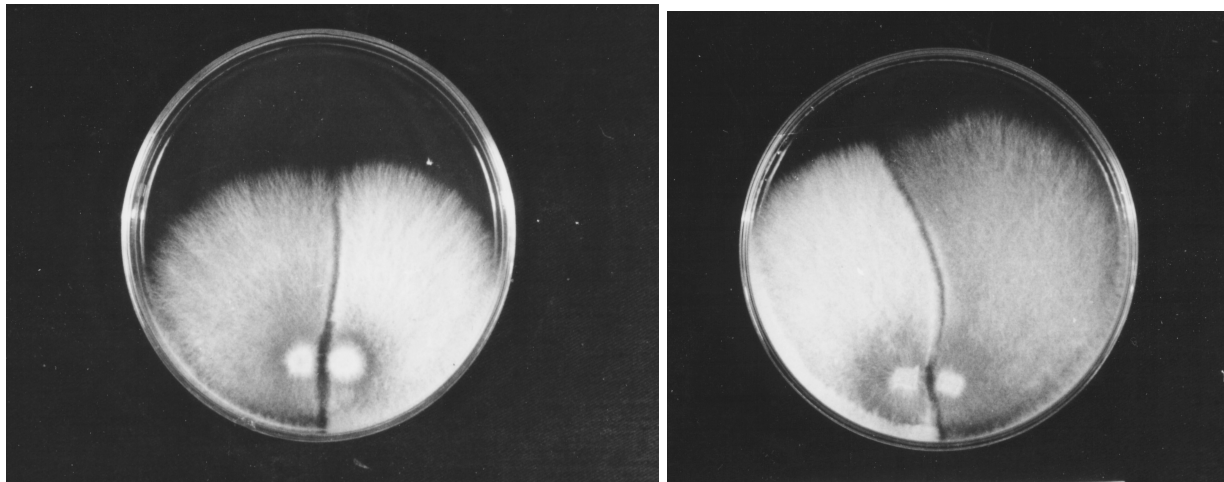
Az A és B szabályozó faktorok működésének eredményeképpen létrejött különböző kapcsolatok az egymás mellett növekvő telepek növekedési sebességében és alaki tulajdonságaiban is megnyilatkoznak. Ezek a jellegek szabadszemmel és mikroszkópi vizsgálatokkal általában biztosan megállapíthatók.

Valódi kompatibilitás esetében a sejtfúzió szabályosan létrejön, kialakulnak a magpárok a csatképződés szabályos. Magvándorlás van, a kétmagvú új sejt tovább növekszik. Mikroszkópos jellegek: Az egymás mellé oltott telepek összenöve az érintkezési vonalon nem, vagy alig mutatnak hifatorlódást. A két telep simán egymásba nő és néhány nap elteltével egységes telep képét mutatja. A kapcsolat kialakulása nyomán a növekedési sebesség határozottan meggyorsul. (Mire a hemikompatibilis telepek és az inkompatibilis monokarionták a Petri-csésze széléről eléri a csésze közepét, addig a dikarionta telepek a Petri-csésze egész felületét benövik.) Mikroszkópos jellegek: a kompatibilis kapcsolat kialakulása után a közös telep bármelyik részéről mintát véve mikroszkópon kb. 300-szoros vagy ennél nagyobb nagyítással vizsgálva mindenütt megtalálhatók a csatok a dikarionta állapot bizonyítékaként.



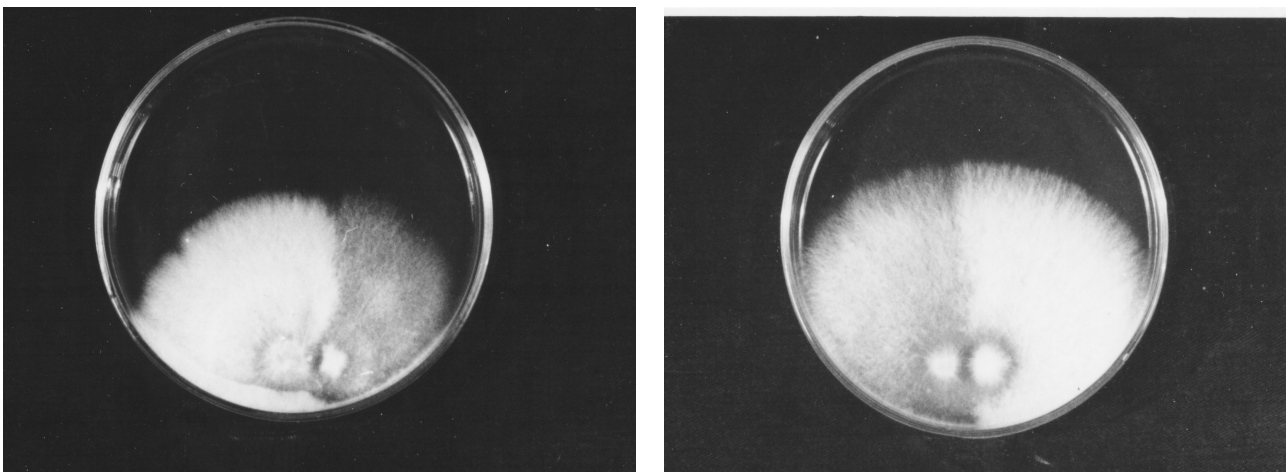
11-12. ábra Valódi kompatibilitás

A teljes inkompatibilitás esetén kapcsolat nem jön létre. Makroszkópos jellegek: a telepek érintkezési vonalában légmicéliumok alig nőnek, egy 1-2 mm széles éles, sötét vonal (a csupasz agarfelület) választja el a két telepet. Növekedésük sebessége nem változik, marad továbbra is a monokariontákra jellemző viszonylag lassú növekedés. Mikroszkóppal a monokarionta állapothoz képest változás nincs, csat nem mutatható ki.



13-14. ábra Teljes inkompabilitás

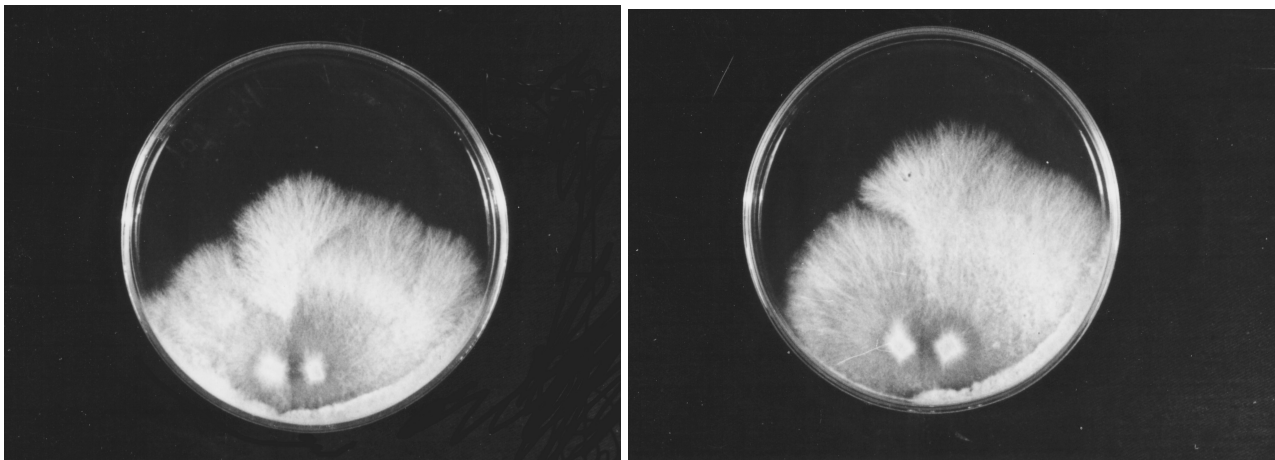
A hemikompatibilitások esetében, ha az A faktorok különböznek, de a B faktorok nem, akkor makroszkopikusan semmi különös változás nem észlelhető a monokarionta állapothoz képest, a növekedés sebessége sem változik. A telepek külön-külön megtartják sajátos színüket és sűrűségüket, szorosan egymás mellett nőnek a találkozási vonalon. Olyan éles, árokszerű választóvonal, mint az inkompatibilitás esetében, nem látható. Mikroszkóposan megállapítható, hogy magvándorlás nincs. A heterokarion fonal csúcssejtje dikarionta, de az alatta lévő már monokarionta. Hamis csat is felfedezhető, de a magvándorlás hiánya miatt a terméketlen heterokarionok csak a két telep találkozási zónájára korlátozódnak. Hamis csat csak a két telep találkozási vonalán mutatható ki, sohasem az egész telep bármely részén.



15-16. ábra Az A faktor azonossága esetén jelentkező hemikompatibilitás

A hemikompatibilitás másik esetében, amikor az A faktorok nem különböznek, de a B faktorok igen, a makroszkópos jellegek nagyon hasonlítanak az előző hemikompatibilis esethez. Mikroszkóppal megállapítható, hogy előbb a találkozási vonal mentén, majd később

máshol is multikariotikus, sokmagvú sejtek találhatóak, sejtenként változó magszámmal. A kapcsolódás terméketlen heterokariont eredményez. Magvándorlás van, csatképződés nincs. A magvándorlás miatt a heterokarion nem helyhez kötött. Ez a körülmény később szabad szemmel is látható hifakinövést is eredményezhet, amely a két telep érintkezési vonalának végéből indul ki.



17-18. ábra A B faktor azonossága esetén jelentkező hemikompatibilitás

A fentiekben leírtam a kétfaktoros szabályozó rendszer klasszikus sémáját. Ugyanannak a termőtestnek a spóráiból kapott monokarionta tenyészeteket összeoltva a fent leírt találkozási típusokat mind megkapjuk. Ezek közül természetesen csak a valódi kompatibilitás esetén kialakult egészséges dikarionta tenyészeteket használhatunk, ami a monospórok kellő nagyszámú összeoltása esetén az oltásoknak mintegy 25%-ában fog jelentkezni. Ezt a viszonylag alacsony számot az öreg tenyészetek saját spóraanyagából történő felújítása esetén figyelembe kell venni és a vizsgálni kívánt dikarionta tenyészetet megkapjuk.

A klasszikus kéttényezős szabályozási rendszer ismeretében nézzük meg hogyan alakul a monospór tenyészetek haploid hifáinak kapcsolódása, ha a tenyészetek nem egy termőtest spóráiból, hanem két különböző, nem rokon termőtestből származnak.

Ebben az esetben az egyik termőtest spóráiból származó monospór tenyészetekben az inkompatibilitási faktorok kombinációit a következő betűkkel jellemezhetjük: A_1B_1 , A_1B_2 , A_2B_1 , A_2B_2 . A másik, nem rokon termőtest leszármazottjainak faktorkombinációit az A_3B_3 , A_3B_4 , A_4B_3 , A_4B_4 betűkkel jelölhetjük. E jelölések felírásával azt kívánom vizuálisan is demonstrálni, hogy nem rokon faktorkombinációk gyakorlatilag mind különböznek a másik nem rokon faktorkombinációtól, tehát két nem rokon monospór telep hifáinak találkozása elvben minden esetben dikarionta fonálat kialakítását eredményezi.

Nagy földrajzi távolságból származó különböző termőtestek felhasználása esetén nagy valószínűséggel meg is kapjuk ezt az eredményt. Azt azonban sosem lehet tudni, hogy két termőtest

nincs-e egymással rokonságban, hiszen a spórákat a szél óriási távolságra elszállíthatja. Éppen ezért még a nem rokonnak vélt termőtestek felhasználásakor is gondosan meg kell figyelni az egymás mellé oltott monospór telepek kapcsolatának alakulását. Némi gyakorlattal ehhez a szabadszemmel végzett megfigyelés általában elegendő, a biztonság kedvéért azonban ajánlatos mikroszkópon a csatok jelenlétét is ellenőrizni.

Dikarionta tenyészetek fenntartása

Az előbb leírt munkák végén természetesen csak a dikarionta, termőtestképzésre alkalmas tenyészeteket tartom meg. Ezeket a Petri-csészékből átoltom ferde malátás agarra, kémcsőbe. Minthogy legtöbbször nagyszámú tenyészettel dolgozunk, hogy a kívánt tulajdonságú tenyészetet minél nagyobb valószínűséggel megkapjuk, azért a több száz kitenyésztett dikarionta kultúrát rendszerint nem tudjuk egyszerre szelekciós termesztési vizsgálatba vonni. A tenyészetek egy részét hosszabb-rövidebb ideig tárolni kell.

A szelekciós vizsgálatok előtt a tárolás fél évnél rendszerint nem hosszabb. Ennyi ideig a kémcsöves tenyészetek hűtőszekrényben 0 és +5°C között rendszerint tárolhatók. Az egyes tenyészetekből a tároláshoz több példányt is ajánlatos leoltani.

A tárolás folyamán a tenyészeteket időnként ajánlatos megnézni, hogy az agar nem száradt-e be nagyon. A laskagomba tenyészetek a beszáradást nagyon különbözőképpen viselik el. Vannak, amelyek a csontkeményre kiszáradt agarból is aktív életre kelthetők, mások ugyanakkor elpusztulnak. Az újonnan kitenyésztett kultúrák ilyen irányú tűrési képességét nem ismerve célszerű a lepadt, de még nem száraz táptalajon levő tenyészeteket idejében átoltani friss táptalajra és a telep kinövése után újra hűtőbe tenni.

A törzsek fenntartásánál fontos szempont az, hogy hosszú távon modellezni tudjam a táptalajjal a természetes környezetet. Az ilyen természetes anyagok fenntartják a törzsek enzimaktivitását, a fajta nem „lustul” el, a természetői közegben aktív marad. Ezzel szemben azok a tápközegek, amelyek könnyen felvehető szénhidrátokat, aminosavakat tartalmaznak, bár növekedésükben gyorsítják a tenyészeteket, az enzimaktivitásukat károsan befolyásolják. Vizsgálataink során a legjobb táptalajok mindig a legszegényebb keverékek, esetleg egykomponensű faanyagok voltak. Ebből kiindulva továbbfejlesztettünk egy technikát a törzseink egyszerű, de hatékony és hosszú távú fenntartására.

A módszer lényege az, hogy keményfa tipliket felfőzés után sterilizálunk bőséges vízzel, úgy hogy azokat a folyadék akkor is ellepje, ha a sterilizálásnak vége van. Az így elkészült kémcsöveket, tubusokat elrakjuk addig, míg a víz alól ki nem kerül párolgás miatt a tiplik felszíne. Ezt követően oltjuk rá az agar inokulumot a fenntartó közegre. A micélium csak a faanyagban

3. 2. 3. Dikarionta tenyészetek előállítása multispór eljárással

Az eljárás egyes lépései a következők:

- Spóraszuszpenziók készítése,
- A spóraszuszpenziók összekeverése,
- Oltás agarlemezre,
- Csíráztatás és a heterogén telep megfigyelése,
- Izolálás a szektorokból és az izolátumok tisztítása,
- A csatképzés ellenőrzése,
- A dikarionta tenyészetek fenntartása.

Az eljárás egyes lépéseit az alábbiakban részletesen tárgyaljuk.

Spóraszuszpenziók készítése

A steril Petri-csészében felfogott spóratömegből a szuszpenziót lényegileg ugyanúgy készítem, mint azt a monospór tenyészetekkel végzett munkánál már leírtam. A különbség csak annyi, itt nem fontos, hogy cm^3 -enkénti spóraszám bizonyos meghatározott értékek között legyen, hanem csak az, hogy a különböző származású spórákból készített szuszpenzióban a spórasűrűség megközelítőleg azonos legyen.

Spóraszuszpenziók összekeverése

Ha a különböző spóraszuszpenziók megközelítőleg azonos mennyiségű fiziológiás oldatban megközelítőleg azonos számú spórákat tartalmaznak, akkor a szuszpenziók összekeverését úgy is elvégezhető, hogy a két kémcső tartalmát összeöntöm. Így a térfogategységnyi kevert szuszpenzióban mindkét spóraféleségből nagyjából azonos számú spóra lesz jelen. (Ami később a csírázás után az idegen monokarionta telepek fúzióját segíti elő, szemben a saját spórák fúziójával.) Ha valamelyik spóraféleség túlsúlyban van a szuszpenzióban, akkor kisebb az idegen fúziók valószínűsége.

Az idegen telepek közötti fúzió eshetőségeit csökkenti az is, ha a különböző spórafélék nem egyszerre csíráznak. A csírázásbeli nagy időkülönbség az esélyeket ronthatja, és előfordulhat, hogy idegen spórák közötti fúzió csak nagyon kis számban jön létre. Ennek elkerülésére a szuszpenziók elkészítése előtt néhány nappal érdemes a spóramintákból csírázási vizsgálatot végezni. Előre

kiöntött agarlemezre 1-2 pontban ráoltjuk a spórákat (A száraz spórákat kaccsal felvitt steril vízbe tegyük fel, így vigyük rá az agarra). 24 óra eltelte után néhány óránként mikroszkópon ellenőrizzük a csírázást. Ha a különbség a kétféle spóra csírázási időpontja között meghaladja a két napot, akkor ajánlatos a később csírázó spórából a szuszpenziót a késésnek megfelelő számú nappal előbb elkészíteni. Két napnál rövidebb csírázási különbség esetén fölösleges a „lusta” spóra szuszpenzióját előre elkészíteni. Ha nem végeztünk előzetes ellenőrzést, még akkor is érdemes a szuszpenziókból külön leoltást végezni, mielőtt összekevernénk azokat. A jó és időben bekövetkező csírázás észlelése mindig megnyugtató, nagy időkülönbség esetén pedig tudjuk, mire számíthatunk. Egyébként két napnál hosszabb lemaradás nagyon ritkán fordul elő, inkább csak hosszabb ideig tárolt spóraanyag felhasználásakor. A fent leírt egyszerű összeöntés előtt ajánlatosnak tartjuk ezért a szuszpenziókból külön-külön kioltani agarlemezre, és az összeöntést csak ezután elvégezni. Jó megoldás az is, ha a szuszpenziókból steril pipettával veszünk ki azonos mennyiségeket, és ezeket keverjük össze egy tiszta kémcsőben. Így a maradék szuszpenziókból külön leoltásokat végezhetünk az egyes spóraféleségek csírázási idejének megfigyelésére. Természetesen a különböző származású spórák egyidejű csírázása a legelőnyösebb. A pipetázásnál vigyázni kell, hogy az egyik spóraféleségnél használt pipettával ne nyúljunk a másik spóraszuszpenzióba, mert idegen spórát keverünk bele, és ez által alkalmatlanná válik az ellenőrző oltásokra. A különböző szuszpenziókhoz mindig tiszta pipettát kell elővenni.

Oltás agarlemezre

A szuszpenziókból való oltáshoz az agarlemezeket előre kiöntöm 10 cm átmérőjű Petri-csészékbe. Átlagban egy Petri-csészéből majd kb. 8-10 tenyészet izolálásával számolhatunk. Így tehát, ha megközelítőleg ezer tenyészetet kívánok izolálni, akkor a szuszpenzió beoltásához mintegy száz Petri-csészét kell táptalajjal felönteni. Ehhez kell még számolni a különböző spórák csírázásának ellenőrzésére szolgáló csészéket.

A megszilárdult és kihűlt agarlemezeket közepén, egy helyen oltjuk be kaccsal a szuszpenziókeverékből. Az oltást nyugodt mozdulatokkal végezzük! Ha a kacsot az agarfelület megérintése után hirtelen kapjuk fel, a szuszpenzióból kis cseppek szétfröcsöghetnek. Ezek helyén is kicsíráznak az odakerült spórák és később a csészében kialakult képet zavarják.

Csíráztatás és a heterogén telep megfigyelése

Beoltás után a Petri-csészéket szobahőmérsékleten, célszerűen termosztátban tartjuk. 24 óra után az ellenőrző oltásokat már rendszeresen figyelni kell. A spórák általában 48 órán belül

kicsíráznak. A spórák kicsírázásakor az oltókaccsal felvitt szuszpenzió fényes felülete matt lesz, néhány nap múlva pedig finoman kibolyhosodik. A csírázás után a kicsi telepek fonalai között azonnal megindul a sejtfúzió, elképzelhetetlenül nagy számú kapcsolódás, sejtanyag átrendeződés zajlik. Kialakulnak a dikarionta fonalak, és elsősorban az oltási folt szélén, kedvező helyen levő telepek máris elkezdenek sugárirányban kifelé növekedni. A növekvő telepek között óriási verseny alakul ki. A lassabban növekedő és kedvezőtlenebb helyről indulók lemaradnak, beszorulnak. Az erőteljesebben, gyorsabban növekvők igyekeznek minél több helyet elfoglalni. 10-12 nap elteltével már lassan kialakul a verseny eredménye és a csészékben sugaras elrendeződésű kép látható. Keskenyebb-szélesebb, többé-kevésbé homogén felületű körcikk, szektorok fedezhetők fel. A szomszédos szektorok között sokszor dúsabb micéliumból álló vékony sugárirányú vonal mutatja a határt, máshol ilyen éles határ nem fedezhető fel, csak a gombaszövedék sűrűségbeli vagy szerkezetbeli különbségei segítenek a határ megállapításában. Egy-egy körcikk, vagy szektor, amelyet azonos szerkezetű, azonos színű, sűrűségű fonálat borít, általában az egy telep által elfoglalt területet jelöli. Ezekből végezem az izolálást. Az izolálások, kioltások legkedvezőbb ideje akkor van, mielőtt a növekedő heterogén telep elérné a Petri-csésze falát. Ebben az időben az egyes szektorok közötti szövedék szerkezetbeli különbségei már kialakultak. Amikor a heterogén telep frontja a Petri-csésze falát elérte, a hosszirányú növekedés megáll, a telep néhány nap alatt besűrűsödik és az egyes szektorok közötti különbségek elmosódnak.

Izolálás a szektorokból és az izolátumok tisztítása

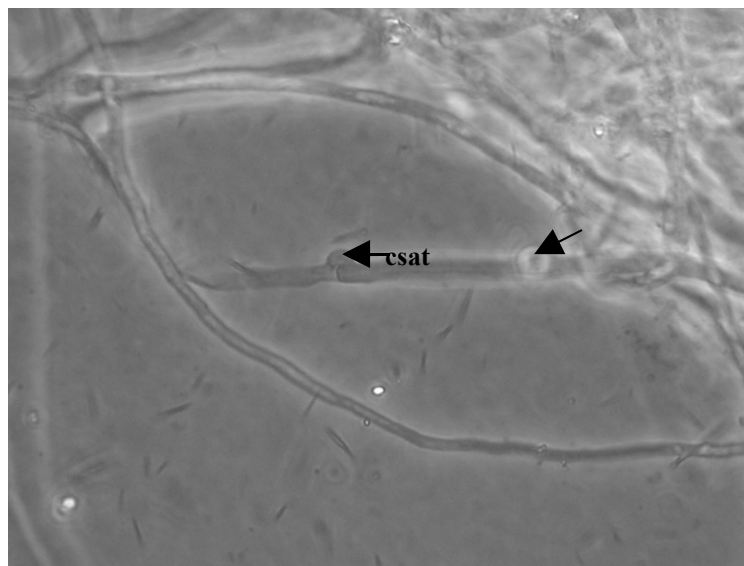
A fent leírt legkedvezőbb állapotban végezzük el az új tenyészetek izolálását. A Petri-csészét, amelyből az izolálást éppen végezzük, ajánlatos fekete papírra, vagy egyéb sötét alpra helyezni. Így az egyes szektorok közötti különbségek jobban szembetűnnek. Tanácsos mindig a szektorok közepéből izolálni, és nem a szomszédos telep közeléből. Ha a szektorok területe elég nagy, ez általában nem ütközik nehézségbe, és legtöbbször már az első izolátum tiszta lesz. Keskeny szektorokból oltva, amikor a szektor szélessége alig pár milliméter, a kockázat már nagyobb, és sokszor előfordul, hogy az első kioltás nem lesz tiszta. A siker érdekében nem tanácsos nagy agardarabokat kivágni, hanem arra kell törekedni, hogy a szektorokból kiemelt darabok minél kisebbek legyenek. Sugárirányban a vágott darab lehet 4-5 mm hosszú is, de a szélessége ne haladja meg az 1-2 mm-t. Ilyen kis darabok kivágására legalkalmasabb a monospór izolátumok készítésénél ismerttetett kis lapát.

A szektorokból kiemelt kis agardarabot ne kémcsőbe tegyük, hanem Petri-csészébe, előre kiöntött agarlemez közepére. Egy csészébe csak egy izolátumot helyezünk el. A telep kinövése után ugyanis alaposan meg kell nézni, hogy az új telep homogén-e, vagy sem. Ezt az elbírálást rá-,

és átvilágított állapotban is végrehajthatjuk. Ha a telepet homogénnek találom, akkor a tenyészetet átoltom kémcsőbe ferde agarra, és kinövés után tárolom. Ha a telep nem homogén, akkor a – most már minden bizonnyal kevesebb számú – szektor mindegyikéből újabb kioltást végzek megint csak a Petri-csésze közepére, egészen addig, amíg a telepeket teljesen egyöntetűnek, homogénnek nem találom. A tenyészetek tisztaságánál természetesen nagyon fontos, hogy a csészékbe kiöntött agarlemez egyenletes legyen, a lemez vastagsága az egész csészében megközelítően egyenlő, és a felülete is sima legyen, hogy külső körülmények ne zavarják a telep képének kialakulását.

A csatképzés ellenőrzése

Jóllehet a munka elején az agarlemezre felvitt spórasuszpenzió-cseppben több ezerre tehető a spórák száma, és a kicsírázásuk után csaknem kizárt, hogy a sejtfúzió létre ne jöjjön, mégis ajánlatos az izolátumokból mikroszkópi készítményt készíteni és mikroszkópon megbizonyosodni a dikarionta állapot bizonyítékának, a csatnak a jelenlétéről.



21. ábra. A csatok ellenőrzése mikroszkóppal

Dikarionta tenyészetek fenntartása

A törzsek fenntartása a gyakorlatban ugyanúgy történik, mint a monospóras technikával előállított tenyészeteknél.

A Petri-csészéből ferde agarra átvitt tenyészeteket ugyanúgy kezelem, mint ahogy a monospór eljárásnál leírtam. Hűtőszekrényben tárolva időnként ellenőrzöm, hogy nem száradt-e be nagyon az agartáptalaj, és ha szükséges, friss táptalajra átoltom.

3. 2. 4. A monospór és multispór eljárás összehasonlítása

Az egyspórás eljárást a csírázó spórák kiemelése miatt munkaigényesebbnek tartom, mint a sokspórásat. A monospór tenyészetek összeoltásakor, ha a spórák valóban idegenek és nem rokonok, - amit nem lehet előre tudni -, akkor az összeoltásoknak csak mintegy negyedrésze szolgált dikarionta tenyészetet. Ebben az esetben sok a feleslegesen végzett munka. A monokariontákat egyébként – ha már izoláltuk őket – érdemes egymással minden kombinációban összeoltani. A monospór eljárásnak előnye viszont, hogy a tenyészetek mesterséges összeoltása következtében biztosan lehet tudni, hogy a kialakult dikarionta tenyészet két idegen monospór tenyészet fúziójából származik. Előny továbbá még az is, hogy az így előállított tenyészet tiszta.

A multispór eljárás esetében tapasztalatunk szerint gyorsabban jutunk sok dikarionta tenészethez, de ezekről nincs bizonyítékunk, hogy nem két azonos származású kicsírázott spóra hifáinak fúziójából, hanem két idegen összeolvadásából keletkeztek. Egzaktsági kísérletek bizonyítják ugyan, hogy az idegenek között igen nagy az affinitás, ez azonban csak valószínűsíti az idegenek összeolvadását, de nem bizonyítja. Bizonyosságot csak akkor szerezhethetünk, ha a két szülőtenyészetnek határozottan elkülöníthető, eltérő egyéni tulajdonságai vannak, amely tulajdonságok az utódban együttesen jelennek meg. Ezt a körülményt bizonyítéknak tekinthetjük a kereszteződésre.

A multispór eljárás esetében felhasználhatjuk egy termőtestet, de kettőt, vagy több idegen származású termőtest spóráit.

Egy termőtest spóráit önmagukban általában akkor használom, ha egy elöregedő, de korábban jól bevált tenyészetet akarok felújítani, megifjítani. Egyetlen termőtest spórautódok között is találok eltéréseket, amelyek közül a korábbi jó törzshöz leginkább hasonlító tenyészetet választom ki.

Egyetlen termőtest spórautódainak változatosságánál sokkal nagyobb változatosságot, sokkal tarkább képet kapok, ha kettőt vagy esetleg még több, különböző tulajdonságokkal rendelkező termőtest spóráinak keverékéből készítek multispór tenyészeteket. Teljesen új tenyészetek előállításánál általában ezt az utat követem. A spórát adó termőtesteket célszerű minden esetben gondos mérlegelés alapján kiválasztani.

3.3. GOMBAFAJTÁK ELKÜLÖNÍTÉSE MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI MÓDSZEREKKEL

A DNS-technológiák nem elsősorban nemesítési módszerek, viszont a köztes tenyészetek és persze a nemesítés végeredményének analízisében jelentős szereppel bírnak. Ezek a vizsgálatok akár a termesztési tesztek is képesek helyettesíteni, illetve fontos kérdésekre adhatnak választ. Ezért úgy gondoltuk, hogy mivel Magyarországon elsőként van lehetőségünk a laskagombák PCR alapú analízisére, kiegészítem ezekkel a vizsgálatokkal a tudományos értekezést.

3.3.1. Nukleinsav extrakció

A polimeráz láncreakciót használó RAPD módszer esetében a reprodukálhatóságot elsősorban a templát minősége és mennyisége határozza meg. Ehhez olyan, a DNS bomlását kizáró izolálási módszert kellett kidolgozni, amelyek konzisztens eredményt adó, jó minőségű DNS-t eredményez.

A nukleinsav kivonáshoz számos módszert próbáltunk ki (növényi, élesztő DNS izolálási kit-ek, CTAB-módszert stb.). Ezek közül Shure és munkatársainak módszerét (*Plant DNA Isolation Protocol, 1983, Cell 35: 225-*) találtuk megfelelőnek. A kivonási alapanyagok körét, mennyiségét is optimalizáltuk a módszerek tekintetében.

- A gomba friss hymeniumából (ez volt a legmegbízhatóbb) 300 mg-ot mértünk ki és dörzsmozsárban folyékony nitrogénnel porítottunk. A porított anyagot 2 ml-es Eppendorf csőbe vegyszeres-kanállal töltöttük bele.

Kivonás történhet:	termőtestből	300 mg-ból
	folyadékkultúrából	1,5 –2 g-ból (centrifugálás és mosás után)
	liofilizált mintából	300 mg.

- A mintákat folyékony nitrogénben porítottuk és azokból 300 – 1000 mg mennyiséget mértünk be Eppendorf-csövekbe (a mintától függően).
- Az Eppendorf csövekben lévő mintára ráértük az izoláló puffert (0,6 M NaCl, 0,1 M Tris (pH 7, 40 mM EDTA, 4% sarcosyl, 1% SDS), 2x ureát, 2 M-os Na₂S₂O₅-ot a következő mennyiségben:

▪ 2x DNS izoláló puffer	325 µl
▪ 2x Urea	325 µl

- A kivonópufferrel vortexeltük.
- 650 µl fenol:kloroform 1:1 arányú keverékét adtuk hozzá. A fenol kloroformmal kézben átforgattuk.
- Centrifugáltuk 3000 ppm-en 7 percig. Centrifugálás után a felülúszót átvittük egy másik, Eppendorf csőbe.
- A fenol-kloroformozást és a centrifugálást összesen háromszor ismételtük meg.
- Az utolsó csőbe áttöltött felülúszóra 70 tf % -alkoholt öntöttünk. Az alkohol hozzáadását követően 10-szer átforgattuk és a DNS csapadék formában vált láthatóvá.
- A csöveket 3000 rpm-en centrifugáltuk 7 percig, az izopropil-alkoholt leöntöttük róla, majd szalvétára fordítva szárítottuk.
- A csövek alján maradt DNS-re ráértünk 1 ml 70%-os szobahőmérsékletű etanolt. Néhányszor átforgattuk, majd centrifugáltuk 3000 rpm-en 7 percig. Ezt a lépést háromszor megismételtük.
- Az utolsó alkoholos mosást és centrifugálást követően leöntöttük az alkoholt és szalvétára fordítottuk a csöveket. A csöveket végül nyitott állapotban vákuum-centrifugába helyeztük és 5 percig centrifugáltuk.
- A beszárított DNS-re ráértünk 150 µl TE-puffert és 2 µl RN-ázt.
- Rövid vortexelés után 37°C-os termoblokkba helyeztük 45 percre.
- Az extrakció eredményét 1,2%-os agaróz gélen ellenőriztük. A DNS-t DNS-festékekkel vittük a zsebekbe és etidium-bromiddal festettük. Kontrollként λ-markert használtunk. 1xTBE pufferben, 125 V-on végeztük az elektroforézist.
- A gélt fényképeztük és vizsgáltuk a DNS jelenlétét, mennyiségét, épségét (smear). Megfelelő minőségű extraktum esetén a DNS-mintákat –20°C-ra helyeztük felhasználásig.

3. 3. 2. A PCR (polymerase chain reaction)

A **polimeráz láncreakció** (Polymerase Chain Reaction – PCR), amelyet 1985-ben K. B. Mullis talált fel saját bevallása szerint az ötlet oly egyszerű, hogy csodálnivaló, miért nem botlott belé már más is öelőtte (MULLIS-FALOONA, 1987). 1989-ben a DNS-polimeráz enzim, a PCR motorja elnyerte a Science-ben az "Év molekulája" címet. A PCR lényegében egy *in vitro* módszer, amellyel kromoszómális vagy klónozott DNS (cDNS) célszekvenciákat amplifikálunk enzimatikus

úton. A DNS-fragmentumok enzimatiszus felszaporítása egy vagy két olyan oligonukleotid primer felhasználásával történik, amely(ek) a célszekvenciák mindkét fonalának végeivel komplementerek. Az egyszálú templátról a DNS polimeráz a primertől kiindulva 5'-3' irányban komplementer szálát szintetizál. A primer kapcsolódási pontja specifikus, így eltérő szekvenciasorrend esetén eltérő nagyságú DNS-fragmentumok képződnek, amelyek agarózgélen elektroforézissel elválaszthatók.

A reakció három lépésből áll: *denaturáció*: a DNS-t 95 °C körüli hőmérsékleten két egyszálú fonallá denaturáljuk; *anellálás* (annealing): a hőmérséklet 37°C-ra csökkentésével a rövid, általában 8-20 nukleotidból álló szintetikus oligonukleotid molekulák, a primerek kapcsolódnak a komplementer célszekvenciákhoz; *elongáció, extenzió*. 72-75 °C-on a hőstabil DNS-polymeráz (Taq-polymeráz) az egyszálú templát DNS-hez kapcsolódó primerek 3' végét meghosszabbítja. (elongáció) Ezzel egyidőben megtörténik a templát DNS-sel komplementer szál szintézise (extension) is 5'-3' irányban.

A három fő lépést 30-40-szer ismétlik meg, így pikogrammnyi DNS-ből néhány óra alatt mikrogrammnyi mennyiséget lehet előállítani. Mivel a ciklusok ismétlődése során a Taq-polimeráz az újonnan elkészített, DNS-szálakat is templátként használja, ezért a primer kötőhelyek közötti DNS-szakaszok mennyisége exponenciálisan nő.

Az amplifikációs reakciót a hőmérsékleti értékek változtatásával és a reakcióelegy komponenseinek arányával lehet az adott feladathoz optimalizálni.

3. 3. 3. Véletlen primerek használatán alapuló módszerek (MAAP),

A RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

A láncreakció felfedezése óta számos PCR-en alapuló technika vált ismertté. Közülük ismertek olyanok, amelyek ismert szekvenciájú, de véletlen nukleotidokból álló primert vagy primereket használnak. Így a genomnak azokat a régióit tudjuk felszaporítani, ahová a primer vagy a primerek elég közel kapcsolódnak az ellenkező fonalon, lehetővé téve a közbeeső, ismeretlen szekvenciájú DNS-szakasz felszaporítását. Ezek a DNS-fragmentumok megfelelő primer(ek) alkalmazásakor tehát egyedenként vagy vonalanként eltérő mintázatot, polimorfizmust mutatnak. A véletlen primereket használó PCR-technikákat CAETANO-ANNOLLÉS et al. (1992) MAAP-nak (Multiple Arbitrary Amplification Profiling = többszörös tetszés szerinti amplifikációs profil) nevezték el (HAJÓSNE, 1999).

MAAP módszerek közül először a RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) technikát WILLIAMS et al. (1991), valamint WELSH et al. (1990) írták le olyan eljárásként, amellyel az

RFLP-nél használt klónozott DNS-próbák nélkül lehet polimorfizmust találni (HAJÓSNÉ, 1999). A RAPD módszerrel tehát a genom ismeretlen DNS szekvenciáit lehet felszaporítani 1 vagy 2 önkényesen választott, 10 nukleotidból álló (dekamer) primerrel. Az amplifikáció kiindulását képező primer(ek) a genomon véletlenszerűen hibridizál(nak) a komplementer szekvenciával.

Ha az amplifikációhoz egy primert használunk, akkor a DNS mindkét szálának felszaporításához a primerrel komplementer szekvenciáknak mindkettőn néhány kbp-nyi távolságon belül kell lenniük. PCR-rel általában maximum 2 kbp DNS-fragmentumot lehet felszaporítani. Azok a DNS-régiók, amelyek nem tartalmazzák egymástól kb. 2 kbp-re a primer szekvencia két kópiáját fordított orientációban, PCR-rel csak akkor amplifikálhatók, ha két primert használunk.

Véletlen primerek használatakor az egyedek vagy a vonalak közötti polimorfizmust egyrészt a primer kötőhelyi DNS-szekvenciakülönbség, másrészt pedig az amplifikált régióban vagy a primer kapcsolódási helyén deléció, inszerció vagy inverzió okozhatja. A RAPD-okkal kimutatott genetikai polimorfizmus lokuszonként 1 allélt fed fel, ami megfelel a látható amplifikációs terméknek. A RAPD-ok domináns öröklődésűek, ezért a heterozigóta genotípusok kimutatására nem alkalmasak.

A RAPD-mintázatok reprodukálhatósága körül sok vita van. A sok vitából eredendően önmagában a RAPD-PCR módszer nem is alkalmas a gombafajták elkülönítésére. A reprodukálhatóságot főleg a templát DNS minősége és mennyisége határozza meg, ezért a DNS bomlását kizáró izolálási módszert kell választani. A RAPD-mintázatokban lévő variabilitást leginkább a DNS etanollal kicsapható szennyeződései okozzák. A templát DNS minőségét hígítási sor készítésével lehet ellenőrizni. Elméletileg, ha jó minőségű a templát DNS, akkor minden koncentrációnál azonos mintázatot kapunk. A nagyon magas vagy nagyon alacsony templát DNS-koncentráció szintén megbízhatatlan mintázathoz vezet. Ha egy adott templát DNS-re az optimális koncentrációt megállapítottuk, akkor a további RAPD-analíziseknél is ezt kell használni.

A RAPD-markeres polimorfizmus alkalmazási területei:

- genetikai különbözőség és/vagy rokonság megállapítása, mutáns vonalak detektálására,
- tulajdonságok térképezése,
- DNS-ujjlenyomat készítése,
- beltenyésztett vonalak homozigótaságának megállapítása,
- fajták homogenitás vizsgálata,
- F₁ hibrid vetőmagok uniformitásának megállapítása.

Fajtaazonosítás esetében nagyon fontos, de nehezen megválaszolható kérdés az, hogy hány RAPD primert kell használni, és hogy a fajtákat hány sáv alapján lehet megkülönböztetni.

A RAPD-PCR módszer mellett számos más MAAP technika ismert, ilyenek például AP-PCR (Arbitrary Primed PCR = PCR tetszés szerinti primerrel), DAF (DNA Amplification Fingerprinting), ASAP (Arbitrary Signatures from Amplification Profiles), tecMAAP (Template Endonuclease Cleavage MAAP) stb.

A munka során számos protocol-t és jelentős számú optimalizálási kísérletet állítottam be. Az optimalizálások eredményeként az Eppendorf Taq DNA Polymerase Kit felhasználásával a következő RAPD-PCR reakcióelegyet használtam a vizsgálataimhoz: 25 ng templát DNS 2 µl; 20 mM primer 2 µl; 0,5 µl dNTPs (10 mM); 1 µl Taq-polimeráz (5U/µl); 2,5 µl MgCl₂ (25 mM) 2,5 µl 10x puffer, MQ víz 14,5 µl. A reakciót 25µl-es mennyiségben 200µl-es csövekben állítottam be. A reakcióhoz az Eppendorf Mastercycler készüléket használtam.

Az optimalizált reakció beállítás a következő volt:

94°C 5 min

94°C 30 sec

47°C 30 sec

72°C 30 sec

72°C 7 min

4°C ∞

35 ciklus, a RAMP értéket 80 %-kal lassítottuk.

A RAPD-PCR reakcióban tesztelendő hibridekhez használt dekamerek köre viszonylag tág volt, amelyet az Operon Technologies, CA, USA, által forgalmazott sorozatból választottunk ki. Ezekből az OpA01-OpA20 és OpB01-OpB20 sorokat használtuk.

Templátok tekintetében a következő hibrideket használtam, mesterségesen termesztési és morfológiai tulajdonságaik alapján „morfocsoportokra” osztva:

„A” morfocsoport

P. ostreatus.var.*florida*

„B” morfocsoport

Korona új hibridek

„C” morfocsoport

G24

„D” morfocsoport

1030

BULA

GHK35

K357-1

„E” morfocsoport

Po12

„F” morfocsoport

HK44^A

„G” morfocsoport

OL1

OL7

Az amplifikációs termékeket a PCR-reakció után 1,2%-os agarózgélen, etídium-bromid jelenlétében elektroforézissel választottam el. UV fényben azonnal fényképeztünk. Megfelelő primer vagy primerek alkalmazásakor a gélen primerenként változó számú (maximum 10) és méretű (néhány 100 bp - 2000 bp) fragmentumok láthatók. A fragmentumok méretét a mintákkal együtt futtatott DNS-méretmarker segítségével állapítottuk meg.

A gélelektroforézis mintázatának elemzését követően kerestük a különböző laskagomba törzsek közötti RAPD mintázatbeli különbségeket. Az adott méretnél detektált differenciáló band-eket regisztráltuk és újabb két PCR vizsgálatot állítottunk be, újabb ismétlésekként. Az ismétlésekben is jelen lévő differenciáló band-ek esetében egy 100 µl-es PCR reakciót állítottunk be.

3. 3. 4. Differenciáló DNS izolálás a gélről

A PCR reakciót 100 µl-es térfogatban állítottuk be. A kapott keveréket a PCR csőben festettük meg 8-10% DNS festékkel. A futtatáshoz 0,8-1%-os agaróz gélt használtunk és az elektroforézist alacsony feszültségen (100 V) végeztük. A gélből a transzilluminátoron metszettük ki steril szikével a differenciáló band-eket, amelyeket Eppendorf csövekbe helyeztük.

3. 3. 5. A DNS tisztítása gélből

A RAPD-PCR eredményeként keletkező differenciáló band visszaizolálásához az esetek többségében Novagene SpinPrep Gel DNA Kit-et használtunk.

- A fagyasztóból kivett, vagy frissen izolált band-ekre 400 µl „A” oldatot mértünk, majd 50 °C-on 10 percig inkubáltuk, közben kétszer vortexeltük, így a DNS-t az agarózzal együtt oldatba vittük.
- Közben izoláló filtereket 2 ml-es Eppendorf csőbe helyeztünk.
- A csőbe helyezett filterre rápipettáztuk a feloldott band-et, majd 30 másodpercig 14.000 rpm-en centrifugáltuk, az átszűrt oldatot kidobtuk.
- A filtert újabb csőbe helyeztük, majd 400 µl „A” oldatot adunk hozzá. 14.000 rpm-en 30 másodpercig centrifugáltuk, a szűrletet kidobtuk.
- A filtert újabb csőbe helyeztük, majd 650 µl alkoholos „B” oldatot pipettáztunk rá. 14.000 rpm-en 30 másodpercig centrifugáltuk, a szűrletet kidobtuk.
- Közben a „C” jelű pufferből vagy MQ vízből mintánként 30 µl-t 70 °C-on inkubáltunk.
- A filtert újabb csőbe helyeztük és oldat nélkül 2 percig 14.000 rpm-en szárítottuk.
- A filtert 1,2 ml-es Eppendorf csőbe helyeztük, és mintánként 30-50 µl „C” pufferrel eluáltuk a filteren lévő DNS-t.
- A csöveket 14.000 rpm-en 2 percig centrifugáltuk.
- A kapott DNS-t gélen 4 µl-el megfuttattuk.
- A kapott szűrletet Eppendorf csőbe pipettáztuk át és fagyasztva, -20 °C-on tároltuk.

3.3.6. Kompetens sejt készítése

- 3 ml LB tápfolyadékba oltottunk 1 kompetens sejt telepet (*E.coli* DH5 α).
- Overnight 37 °C-on rázattuk.
- 300 ml-es lombikba 40 ml LB tápfolyadékot mértünk, amihez 0,5 ml DH5 α sejtet adtunk.
- 0,2-0,3 OD-ig növesztettük (OD₆₀₀).
- A sejteket 10 percre jégre helyeztük, közben a centrifugacsöveket lehűtöttük +4 °C-ra.
- A sejteket a csövekbe töltöttük (25 ml/cső).
- A mintát 10 percig 3.000 rpm-en, 4°C-ra hűtve centrifugáltuk, a felülúszót eltávolítottuk.
- A pelletre csövenként 5 ml, 50 mM-os, steril, jégen hűtött CaCl₂-ot adtunk, amit pipettával szuszpendáltunk fel.
- 20 percre jégre helyeztük.
- Majd 10 percig hűtve 3.000 rpm-en centrifugáltuk, a felülúszót eltávolítottuk.
- A pelletre csövenként 0,5-0,4 ml CaCl₂-t mértünk, ebbe vettük vissza.
- 3-4 órát hagytuk állni szobahőmérsékleten.

3.3.7. Ligálás plazmidba

A PCR termék ligáláshoz pGEM-T Easy Vector System Kit-et használtam (Promega), melynek előnye, hogy a hagyományos módszerekhez képest jelentősen megkönnyíti a PCR termékek klónozását (nem szükséges a PCR előtt a primereket foszforilálni, nem kell a plazmidot hasítani, defoszforilálni), ugyanis egy linearizált klónozó vektorról van szó, melynek két végén egy-egy túlnyúló „T” található. Ehhez a véghez a túlnyúló „A” véghez az izolált PCR termék ligálással jó hatékonysággal kapcsolható.

A gyakorlati munka szempontjából plazmidon megtalálható főbb referencia helyek: replikációs origo, PCS, lacZ, Amp^R gén stb.

A ligálási reakciót a következő összeméréssel állítottuk be:

- 5 μ l 2x ligáz puffer
- 0,5 μ l pGEM-T Easy Vector
- 0,5 μ l ligáz enzim (3U/ μ l)
- 2 μ l insert
- 2 μ l MQ víz

A mintákat szobahőmérsékleten inkubáltuk 3 órán át.

3.3.8. Transzformáció

- 10 ml-es, gömb aljú műanyag csőben készítettük, hogy minél nagyobb felületen keveredjenek az összetevők.
- A csövekbe 100 µl kompetens sejtet mértünk.
- 100 µl kompetens sejthez 5 µl ligátumot adtunk. A csöveget 20 percre a jégben hagytuk.
- 30 másodpercig 42 °C-on inkubáltuk.
- 400 µl SOC oldatot adtunk hozzá.
- 40 percig 37 °C-on rázattuk.

- Az LB ampicillin táptalajokat elkészítettük. A lemezekre 40 µl X-gal (20 mg/ml) és 4 µl IPTG (20 %-os) oldatot kentünk ki.
- A ráztatás végeztével a klónokból 200 µl oldatot szélesztettünk ki a táptalajra.
- A Petri-csészéket 37°C-on overnight inkubáltuk.
- Az inkubálást követően megjelentek a klónok telepei az agaron. A fehér színű telepek jelezték a sikeres transzformációt.
- Az egy sejtől fejlődő transzformáns klón telepét LB folyadékba vittük bele.
- A mintákat 37°C-on rázatva overnight inkubáltuk.

3.3.9. Miniprep készítése

Miniprep készítéshez a Roche *High Pure Plasmid Isolation Kit*-et használtuk a gyártó utasítását követve. A folyamat lépései:

- A steril Eppendorf csöveget, teletöltöttük a mintatartó üvegekben lévő *E. coli* baktériumszuszpenzióval. A csöveget centrifugáltuk 9.000 g-n 30 másodpercig.
- A csövekről leöntöttük a felülúszót és leitattuk a tápfolyadékot.
- A csövekre ráértünk 250µl Suspension Buffer/RN-ase-t (1.) átpipettázással reszuszpendáltuk a sejteket. (Időközben jégre helyeztük a Binding Buffert (3.) és 4°C-ra hűtöttük a centrifugát.)

- A felszuszpendált mintákhoz 250 µl Lysis Buffer-t pipettáztunk, ami NaOH tartalmánál fogva lizálta a sejteket.
- Kézben 10-szer átforgattuk a csöveket.
- 5 percig szobahőmérsékleten hagytuk a csöveket állni.
- Hozzáadtunk 350µl jégben hűtött Binding Buffer-t (3.). Kézben 10-szer átforgattuk a csöveket.
- A csöveket 5 percre jégre helyeztük.
- A csöveket max. sebességen 10 percig, 4°C-on centrifugáltuk a precipitátum eltávolítása céljából.
- A centrifugálás ideje alatt összeállítottuk a kit-ben lévő gyűjtőcsövet az oszloppal.
- A felülúszót óvatosan leszívtuk a pellettől és az oszlopra nyomtuk.
- Centrifugáltuk az oszlopot, maximális sebességen 60 másodpercig.
- Az átfolyót egy üvegbe leöntöttük, és az oszlopot visszahelyeztük a gyűjtőcsőbe.
- Az oszlopra ráértünk 500µl Wash Buffer I.-et (4.).
- Centrifugáljuk a csöveket 13 000g-n 1 percig.
- Az átfolyót egy üvegbe leöntöttük, és az oszlopot visszahelyeztük ugyanabba a gyűjtőcsőbe, mint amiből kivettük.
- Az oszlopra ráértünk 700 µl Wash Buffer II.-t (5.).
- Centrifugáltuk a csöveket 13.000 g-n 1 percig.
- Az átfolyót egy üvegbe öntöttük le, és az oszlopot visszahelyeztük a gyűjtőcsőbe.
- További 1 perces centrifugálást végeztünk 13.000 g-n.
- A centrifugált oszlopokat a gyűjtőcsövekből az előkészített Eppendorf-csővekbe helyeztük át.
- A filtereket szobahőmérsékleten hagytuk 2 percig száradni.
- A filterekre ráértünk 50 Elution Buffer-t (6.)
- A csöveket centrifugáltuk 13.000 g-n 1 percig.
- Az oszlopokat kidobtuk és a cső alján összegyűlt kb. 50 µl plazmid-DNS oldatot egy új, előzőleg felíratkozott, steril, 1,5ml-es Eppendorf-csőbe pipettáztuk át.
- A folyamat eredményeképpen rendelkezésünkre állt az insertet tartalmazó tisztított plazmid. A csöveket jégen hagyjuk felhasználásig, vagy -20°C-ra helyezzük.

Az insert kivágása a plazmidból, a miniprep ellenőrzése

Az insert kihalását EcoRI. restrikciós endonukleáz enzimmel végeztem el, ugyanis az insert mindkét oldalán van egy-egy hasítóhely. A munkához replikáz pGEM, Nb tubulin pGEM kontrolokat használtunk.

Az egy enzimes hasításhoz a következő elegyet állítottuk össze:

3μl	plazmid-DNS (a miniprepből)
1μl	10x O ⁺ EcoRI. Puffer
0,2μl	EcoRI. Enzim (Fermentas 5.000U – 10U/μl)
5,8μl	steril MQ-víz

10μl

A csöveket óvatosan átpipettáztuk.

A csöveket 37°C-on inkubáltuk 20 percig.

3. 3. 10. Szekvenálás, primertervezés

A miniprepekből 10 μl mennyiséget adtunk át a Gödöllői Biotechnológiai Kutatóintézetnek szekvenálásra. A szekvenálás eredményeit megkapva arra primereket terveztünk.

A primer összetétele, mérete és a cél DNS-sel való homológiája minden más tényezőnél jobban meghatározza a PCR-reakció sikerét vagy sikertelenségét. Ezen kívül a primer(ek) hossza és szekvenciája meghatározza a reakcióban kapott egyszerű vagy komplex mintázat jellegét is. A tervezett primereink általában 20-21 nukleotid hosszúak. Fontosnak tartottuk, hogy a primer(ek) G + C tartalma 50-60% legyen, és a primeren belül ne legyen palindrom szekvencia. A PCR reakcióelegy optimális primerkoncentrációja 0,1-0,5 mM. PCR (AS-PCR) vagy a PCR-termékek klónozása esetén céljainknak megfelelően (150 – 500nt-ig amplikonméret) terveztük a primerpárokat. A primerek olvadási hőmérsékletét is szem előtt tartottuk (T_m = melting temperature). Ez primerhossztól függően 55°C vagy ennél magasabb, és mindkét primer esetében közel azonos értékű. Az olvadási hőmérsékletet az alábbi képlettel határoztuk meg:

$$T_m = 4 n_{(G+C)} + 2 \cdot n_{(A+T)}$$

ahol az aktuális $n = a G + C$ és az $A + T$ nukleotidok számával.

A tervezett primereket számítógépes programokkal is megvizsgáltuk, ugyanis ezek segítségével könnyebben meghatározható a primerek helyes T_m értéke, és elkerülhető a saját magunkkal vagy másik primerrel kapcsolódó, illetve hurkot képező primerek tervezése.

A primereinket újabb PCR reakciókban teszteltük. Vizsgáltuk a specifikusságot, a hatékonyságot és a hűséget. A nem megfelelő eredmények - pl. nem specifikus sávok megjelenése stb. – esetén a PCR körülményeinek optimalizálásával kívántuk a megfelelő eredményeket megkapni. Ezeket a paramétereket a reakcióelegy egyes komponenseinek koncentrációja, egymáshoz való aránya, a reakció körülményei (a ciklusok hőmérséklete, ideje és száma) és a PCR-készülék megbízhatósága határozzák meg. A megfelelő mennyiségű és minőségű termék, valamint a reprodukálhatóság érdekében az amplifikációs paramétereket előkísérletben állapítjuk meg. Ha ezt nem tesszük meg, akkor a következők lehetségesek:

- nincs termék,
- kevés a termék,
- erős, nem specifikus a háttér,
- mutáció léphet fel a termékben.

A PCR során nem PCR mix-et használtunk, hanem olyan kit-eket, melyben az összetevők mennyisége változtatható. Nem ionos detergenset (pl. Tween 20 vagy Triton X-100), és ásványi olajokat vagy paraffint nem használtunk. Elsősorban a magnézium-klorid koncentráció beállítását tartottuk fontosnak, ugyanis a magnézium koncentráció befolyásolhatja:

- a primer kapcsolódását,
- a primer dimerek keletkezését,
- a DNS-Taq-polimeráz aktivitását és
- a másolás pontosságát.

A reakcióelegy összetétele mellett a PCR reakció körülményeinek optimalizálása is fontos. Ennek során figyelembe kell venni:

- a templát DNS denaturációs hőmérsékletét,
- a primerkapcsolódás hőmérsékletét,
- a ciklusszámot,

- a hőmérséklet hatását az enzimre és a nukleinsavakra,
- a kapcsolódás, a denaturálás és a lánchosszabbítás idejét.

A templát DNS denaturálása általában 92-95°C-on 4-5 másodperc alatt történik. A denaturációs idő csökkentése feltehetően azért növeli az amplifikált termékek mennyiségét, mert növeli a Taq-polimeráz felezési idejét. Túl magas hőmérsékleten vagy 5 másodpercnél hosszabb denaturációs idő esetén csökken az enzim aktivitása. A primerkapcsolódási hőmérséklet az amplifikált termék mennyiségét, számát és megoszlását befolyásolja.

A kapcsolódási hőmérséklet az alkalmazott módszertől, primerek olvadási hőmérsékletétől függően 32-65°C. A hőmérséklet növelésével kevesebb a téves lánchosszabbítás (misextension) a primer 3' végén, és jobb lesz a specificitás. Az alacsony kapcsolódási hőmérséklet ugyanakkor magas dNTP-koncentrációval párosulva téves primerkapcsolódást (mispriming) és téves lánchosszabbítást okoz.

A láncszintézis hőmérséklete hagyományosan 72°C. Ezen a hőmérsékleten a láncszintézis sebessége 35-100 bázis/sec, a puffertól, a pH-tól, a sókoncentrációtól és a DNS-templáttól függően.

A ciklusszámot optimális körülmények között főleg a templát kezdő koncentrációja befolyásolja. A 40 fölötti ciklusszám esetén erősen megnő a nonspecifikus termékek mennyisége.

4. EREDMÉNYEK

4. 1. A KERESZTEZÉSI MUNKA EREDMÉNYEI, AZ ELŐÁLLÍTOTT ÚJ HIBRIDEK

A III. fejezetben közölt módszerekkel évente több száz hibridet állítottam elő. Ezeket kezdetben kisparcellás kísérletekben szelektáltam. A kisparcellás termesztéseket üvegekben végeztem. Laboratóriumi autoklávban sterilizáltam le az előtte benedvesített és konzervüvegekbe töltött darált szalmát, majd az így előállított steril alapanyagot szemcsírával oltottam. A kis üvegeket perforált fóliával és papírral zártam le. Az átszövetést a csiragyártásnál alkalmazott tiszta, klímatisztított körülmények között végeztem, majd az egységeket aztán egy kis hűvös szobában fordítottam termőre. A termőtestképzéshez szükséges környezeti feltételeket egyszerű technikákkal, a párasítást egy háztartási berendezéssel, a légcserét kis ventilátorral biztosítottam.

A vizsgálatok célja az volt, hogy megállapítsam, melyek azok törzsek, amelyek a kontrol HK35 és HK44 törzsekhez viszonyítva azonos vagy jobb eredményeket mutatnak. A kisparcellás, üvegekben végzett termesztések nem alkalmasak termésátlag számítására, viszont kiválóan alkalmazhatóak a primordiumképzés idejének, a termőtestek színének és morfológiájának vizsgálatára. Tehát ezekre a tulajdonságokra végeztem a szelektálást. A kisparcellás vizsgálatok az ismétlésekkel együtt 5-6 hónapig tartottak, s végül 5-8 törzset hagytam meg további termesztési kísérletek céljából.



22-23. ábra Termesztési tesztek laboratóriumi körülmények között.

A kisparcellás termesztés szelektációját követően a kiválasztott, ígéretes tulajdonságot mutató törzseket 10 literes steril szubsztrátumra oltottam, és azokon termesztettem, már üzemi körülmények között.



24 ábra Steril szubsztrátumok átszövetése



25. ábra Termesztés steril blokkokon.

Az összehasonlító termesztésikísérletekben már nemcsak a törzs morfológiai tulajdonságait lehet elemezni, hanem a kontroll fajtákhoz mérten megkaphatók a termésátlagok eredményei is. Ezekről természetesen messzemenő következtetéseket levonni még nem szabad, de három ismétlés után már az adatok a végleges szelekció alapjául szolgálhatnak. A vizsgált 5-8 törzsből már csak egyet vagy maximum kettőt választok ki, hogy a nagyüzemi szaporítóanyag-gyártásban alkalmazzam, és a felhasználóknak értékesítsük.

Mielőtt azonban ez megtörténne a cég működtetésében lévő egzotikus gombákat termesztő és fajtakísérletnek helyet adó gombafarmon is termesztésbe vonjuk, vizsgálva a törzsek környezeti hatásokkal szembeni toleranciáját, érzékenységét.

Ezzel a tesztelési módszerrel az elmúlt években piaci értékesítésre alkalmassá tettünk több új, a tudományos munkám eredményét képező hibridet. Az első hibridjeim a HK 44 és H7, továbbá a HK35 és G24 keresztezésével születtek. Az így készült Korona 3-as vonalak, a Korona 4-es törzsek 2000-től kerültek üzemi gyártásra, és természetesen kereskedelmi forgalomba.

A további években - 2000-től-, egy a *P.ostreatus.var.florida* és egy hazai Po5 törzs keresztezéséből előállított fajtát kereszteztem egy OL. törzssel.

Az így kapott vonalak közül egy törzs ment keresztül a törzsszelekciós munkán, a Korona 312-es hibrid, terméseredményei határozottan elkülönítik a kontroll csoportoktól. A hibridet, a termesztési tesztelésével párhuzamosan, vizsgálatoknak vettem alá molekuláris biológiai módszereknek, annak érdekében, hogy a törzs PCR elkülönítésének lehetőségét is megvizsgáljam. Ez azonban már jelen dolgozatnak nem lehet célja, hiszen egy markerkutatás akár 5-10 évet felölelő munka is lehet, jelenleg pedig a molekuláris munka pillanatnyi állapotáról igyekszünk összefoglalást adni.

A törzs minden szempontból versenytársa lehet a HK35-ös hibridnek, ugyanakkor melegtűrése szempontjából meghaladja azt. Bár a 2006-os év nyara nem volt ideális a melegtűrés vizsgálata szempontjából, termesztési kísérleteink azt mutatták, hogy a Korona 312 egy igen ígéretes hibrid.



26-27. ábra Nagyüzemi termesztési kísérletek.

A Korona 312 a termesztések során hasonló termésátlagot produkált, mint a HK35 és más, konkurens cégek hibridjei. A fajta termőcsokra tömör, vaskos, a termőtestek húsa vastag. Színe galambszürke, homogén eloszlású. A termőtest kalapszéle vastag, kevésbé hajlamos a felhasadásra. Spóráját viszonylag későn szórja, hasonló időben, mint a HK család tagjai, és szerencsére csak kis mennyiségben. A törzs ígéretes fajta, friss piaci értékesítésre alkalmas.



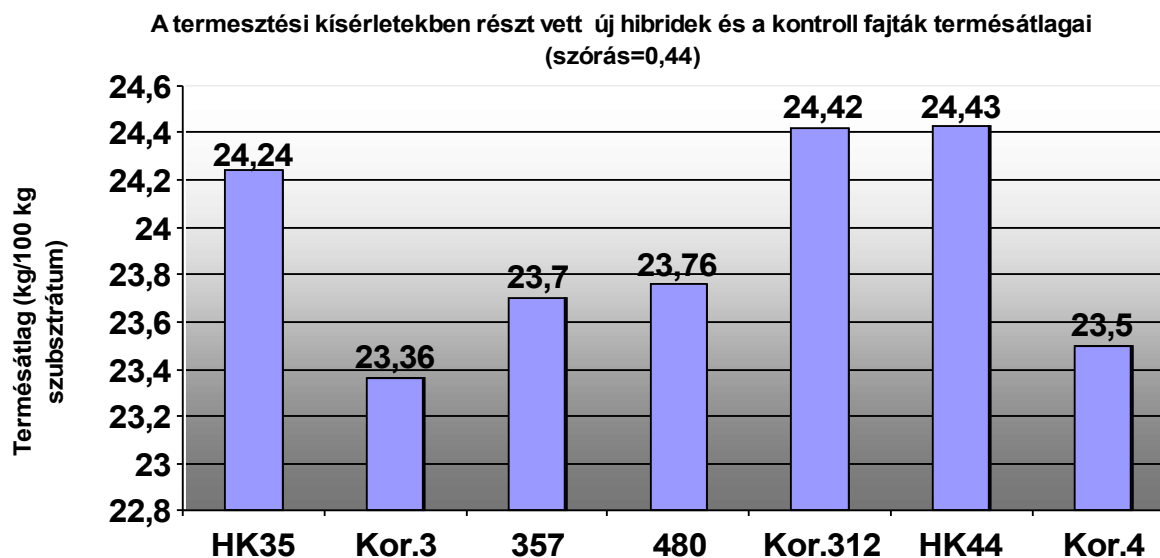
28. ábra A Korona 312 hibrid vaskos termőcsokra.

Terméseredmények:

A következőkben néhány termesztési kísérlet eredményeit közlöm diagramok segítségével. A termésadatokat nagyüzemi technológiával előállított szubsztrátumon beállított, háromszori ismétlésben végzett kísérletekből kaptam. Alapanyagdúsítást nem végeztem, a darált szalmát xerotherm eljárással hőkezelttem. A termesztési kísérletek két hullámának eredményeit pontosan adminisztráltam. A termés súlya mellett a termőtestek színét, fejlődésének intenzitását, vastagságát jegyeztem fel.

A terméseredmények korrelációs analízisét elvégeztem, az azonos évszakban végzett ismétlések értékei az 1-hez közelítettek. Az egy éven belüli termesztési kísérletek korrelációs vizsgálatának a termesztési szubsztrátum és a környezeti paraméterek nagy szórása miatt nem láttam értelmét.

1. diagram.



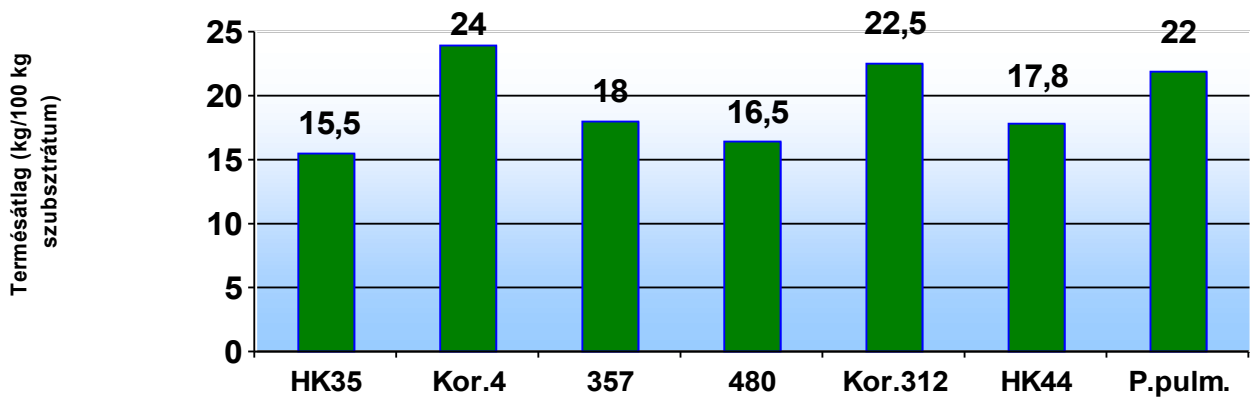
Az oszlopdiagramon látható, hogy a Korona 3 és 4 törzsek még elmaradnak termésátlagban a HK család tagjaitól. Ezek a törzsek nagyszámú termőtestetképesek kinevelni, viszont a húsvastagságuk, a termőcsokor súlya elmarad a kontrollokhoz képest. A két törzsnél még dominálnak a *P.ostreatus.var.florida* tulajdonságai, ez leginkább a következő 2. diagramon látható, ahol a Korona 4 még meleg termesztési körülmények között igen magas termésátlagot produkált.

A Korona 312 viszont már a HK család két tagjához viszonyítva azonos minőségben és mennyiségben adott termést, elhagyva a Korona Fajtakutató Laboratórium két üzemi fajtáját, a 357 és 480 törzseket.

A kutató munkánk legnagyobb eredményének ezt tartom.

2. diagram

Termésátlagok összehasonlítása 24 °C-os termesztési körülmények között
(háromszor ismételt kísérletek átlaga) (szórás=3,30)

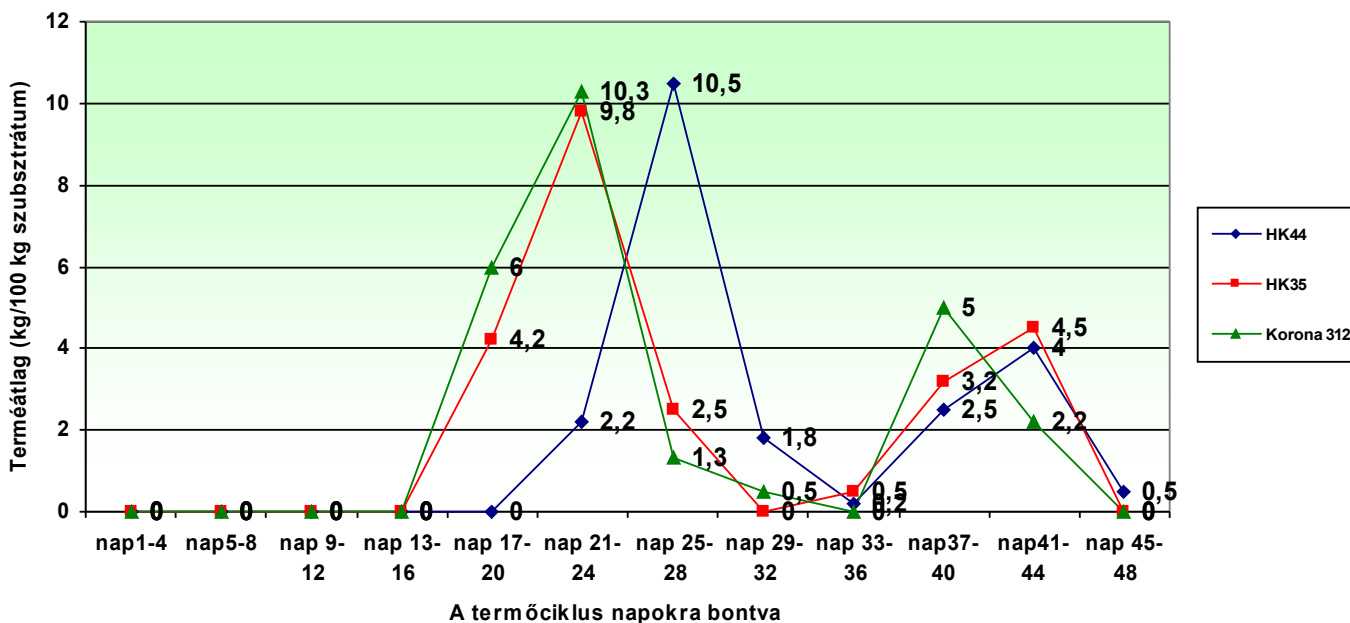


A 2. diagram a meleg, átlag 24 °C-os nappali levegőhőmérsékleten folytatott termesztési kísérletek átlageredményeit mutatja be. Kontrollként *Pleurotus pulmonarius* vad törzset is bevontam, ez a faj ugyanis jól viseli ezeket a körülményeket, bizonyos országokban nagyüzemileg is folytatnak ezzel a fajjal termelést. Látható, hogy a Korona 4 és 312 kiemelkedően jól szerepeltek, és ez alkalmassá teheti a két fajtát a nyári nagyüzemi termesztésre.

A 3. diagram azt mutatja meg, hogy az új Korona 312 hibridnek nem marad el a HK35 kontroll törzstől a primordiumképzés idejében sem. A termesztők elvárják, hogy az átszövődés gyors és intenzív legyen, hogy a fertőzéseket nagyobb valószínűséggel elkerülhessék. Az intenzív alapanyag-átszövésre képes törzsek a harmadik hét végére elkezdik a termőtestek fejlesztését, így a betelepítést követő negyedik hétre az első hullámot már szedni lehet.

3. diagram.

A termés időbeli eloszlása a HK35, HK44 és a Korona 312 hibrideknél
(három kísérlet átlaga) (szórás=3,03)



4.2. MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI MÓDSZEREKKEL SEGÍTETT NEMESÍTÉSI MUNKA EREDMÉNYEI

A vizsgált laskagomba fajok RAPD mintázatainak vizsgálata során a következő primerek használata esetén találtam differenciáló band-eket:

- OpA 11
- OpA 15
- OpA 17
- OpA 01
- OpA 4391
- OpA 20

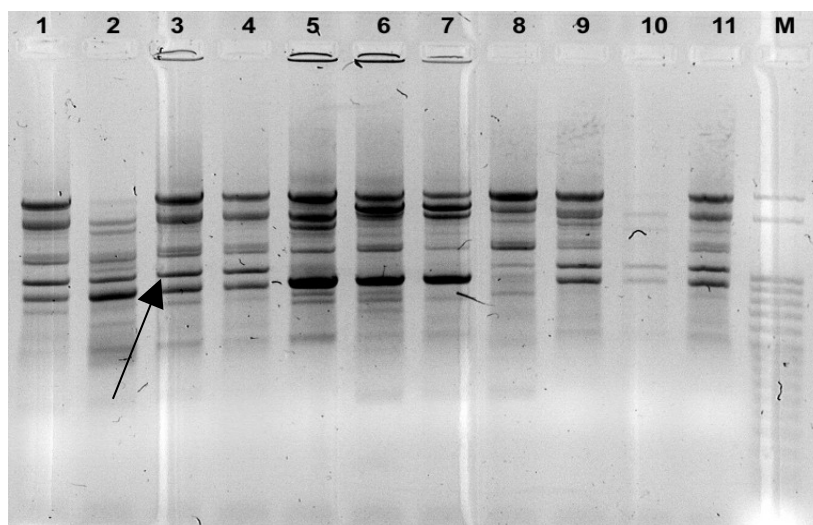
A minták felvitelének sorrendje a következő volt:

- 1-0-30, egy francia gombacsíra üzem fajtája (1),
- Bu-La, romániai gombacsíra laboratóriumok gyakori fajtája (2),
- GHK-35, az eredeti Gyurkó hibrid (3),

- 357-1, a Korona Üzem fajtája, gyakorlatilag HK szelekció (4),
- *P.ostreatus.var.florida* vad törzs (5),
- Korona 312, új hibrid (6),
- G24, Gyurkó hibrid (7),
- Po12, európai vad törzs (8),
- HK44, Gyurkó hibrid, nincs kereskedelmi forgalomban (9),
- OL1, olaszországi vad *P. ostreatus* (10),
- OL7 olaszországi vad *P. ostreatus* (11),

A RAPD analízis céljából kiválasztott törzsek között nemcsak a szülői törzseket, hanem konkurens cégek szaporítóanyagaiból származó fajtákat is vizsgáltam. Ez azért fontos, hogy a Korona 312 hibridet meg tudjam DNS-módszer segítségével különböztetni a konkurens cégek fajtáitól, és a nemesítésben alkalmazott szülői és rokon törzsekhez való viszonyt, eltérést is vizsgálni tudjam.

OpA 11



29. ábra Az OpA 11 primerrel végzett RAPD-vizsgálat gélmintázata.

Kb. 1000 bp sávot izoláltam, melyre tervezett primer várhatóan differenciál a *P.ostreatus.var.florida*, Korona 312, G24 és a többi fajta között. Az izolált band megtalálható a *P.ostreatus.var.florida*, Korona 312, G24 (5. 6., 7. sáv) kivételével mindegyik fajtában.

A szekvenciaadatok és tervezett primer:

```
CTCNTATAGGGCGATTGGGCNaNaCGTCGCATGCTCCCGGCCCATGGTGGCCGCGGGAATTCGATTCAATCGCCGTCGGAAGGGTT
ATCGTTGTTACCGACGCGGCCATCGTTCCCCCTTTCCCCAACCTAGACCCATGCACTATCGACTAATACCGAAGGCAGCCCTCTGTG
AAATTCAGCCCTGTCCTTGTGCCATTACGACGGTTACCATCAAGAATTGCTTCTAGGGGTGTCAGAGATATCATCTACCCATCAGTGC
TGGGAATTACTCACAACTGGCAGACTTTCGCAGTGTACGGTCGCCTCCGAACGCGATTGGTGATGTGGCGTCTGATATAACTAGT
CGAAACGACAGGCGGGGGCGCGCTGCAAGCACCCTTGCAATATTCAGTTGTCCATATCACGCTGGTGAGTACCCCGTCAAAGT
AGGAGAAGTCAAACATTATTCATGTGCTATGAAGTCAATCATGAAAAGATGACTGCGGGAGTATCCTTCCACATCGCTTGAACACATC
TCGAAAAGGGCCGTGAAAGGTCCGGGTCATTGCGAGTTGCAATGGTTCACAAACCAACGCGACTCGATTGAGGCCACCTACTGC
CGCAATGATGCATGTATAACTGATTGTATGCACTTCCTTCAAACCAATCGCAAACCGTGCTTCAGCTATCCCCATTTGCTTCGGTCCCG
CACACGCTCACATTGAACATATCCATGAGTGATTCAAAACGCGGTGATGGGGTTNAACTCTCAGTGAGTAGCTCTTCCATGCTG
CTTGATATCTTACCTCGCTCGGATCNATTGNGTCTTACNAGAGGAGCNAGAANCCGCCAAAATTNCTATCAANTTGTGAATAAACG
CNCCATACTCGNGTATTCNAGNGATTTACCNC
```

OpA11

CAATCGCCGT-RAPD-PCR primere

Tervezett szekvenciák:

F primer: 5'CCCTTTCCCAACCTAGACCC 3'

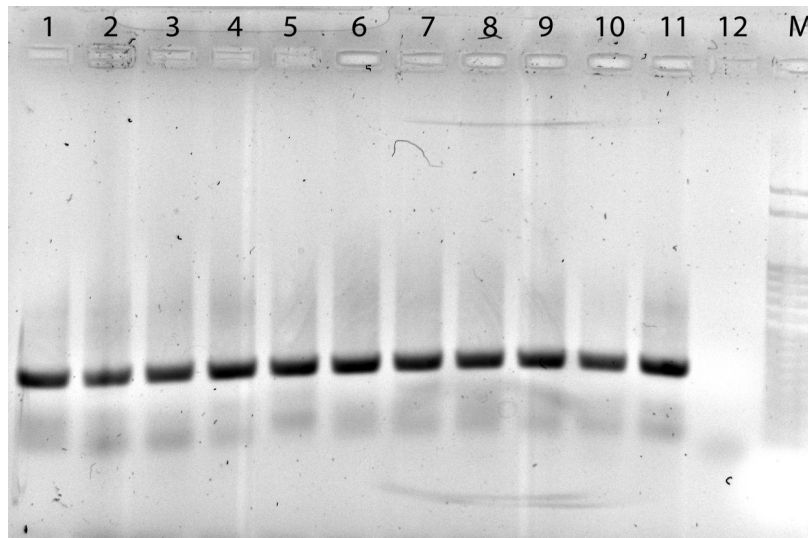
21nt Tm:68°C GC61% (40-60)

R primer: 5' TTGCAAGGGTGCTTGCAGCGC 3'

21nt Tm:68°C GC61% (294-314)

275 nt termék

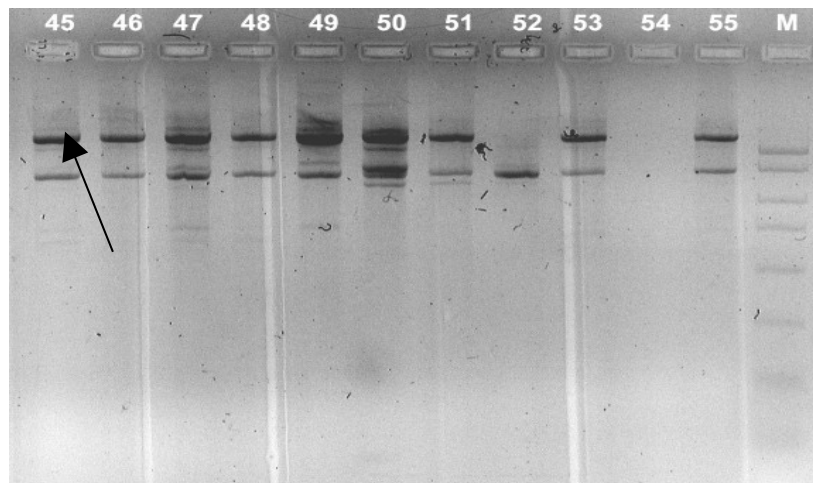
A PCR reakció eredménye 64°C-os anellálási hőmérséklet mellett.



30. ábra Az OpA 11 primerrel végzett RAPD-analízis differenciáló sávjaira tervezett primerek tesztelése PCR-reakcióban

Amint a gélelektroforézis eredményén is látható, sajnos a tervezett primer nem differenciál a *P.ostreatus.var.florida* faj a Korona 312, G24 és a többi fajta között. Mivel azonban minden törzsben megtalálható a band, így egy későbbi esetleges multiplex PCR vizsgálat során laskagomba-DNS jelenlétét vagy hiányát lehet igazolni a primer segítségével a kérdéses mintában.

OpA 15



31. ábra OpA 15 primerrel végzett RAPD-vizsgálat gélmintázata.

Kb. 2000 bp sávot izoláltam, melyre tervezett primer várhatóan differenciál a Po 12 és a többi fajta között. Az izolált band megtalálható az összes fajtában, kivéve a Po 12 vad laskatörzset (31.képen a 52. sáv).

A szekvenciaadatok és tervezett primer:

```
GNTCGACTCCTATAGGGCGAATTGGGCCCGACGTCGCATGCTCCCGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTTCCGAACCCCTG
AAAAGAGTGGACACAACCTGGCTAGTGTGGTGC GTTCCATTCTTTCGACAGGAAAACCCGTAATGACTACCCCTTCTCAGTCCATC
GTGAGGAATAGGATTTATCTATGGCGACGGATGGTTCGGCAGCTTCGCTTACCAAAGGCACCGTAACGTGTATCTATGTATGAGTCTC
GATTCATATTCGGAGGTTTTGTAGTCTGTAGACCAACGTCTGTGTCGAGAGGATGATGTCGATCCTCCGAGAACATCTTCTAGCTC
ATTGTATGTTTGATTTATTAACCGGGATAGACTAATTCCACCGTATCAGAAGAGATAGCCAAAACCTCGTGGATTATGGTCGAGATT
TCAAAAAACGACATTCGGCGTGC GGAAGAACTAATCGCCATCGAGCCACCTCCAGGAACTCAAATCGTTCGCACAGATTGTTGCA
CATGGGACAGGGGTTCCAACCACAGGAATTCGAATAGCGGCGTGAATGTAAGGACGATAAGCGCAGCCTGGTTGTCTGCAAGTTTC
TCTCAATGCCTGCAAAGAAAGTGCTTATCGGTTTTGGCGTTGACGTGACGCGGTGGCCGGCTGGTGAGTGGCTTTCTACCTTGTCTTG
TTCACGATTGACGCTTGACAGGCTAGGTTCTATGGAGGTGAANACTCCCATTANATATCTCGCGGGTATGTGGATTCTGTCCCCGG
TACNAATGGGTCTGANGATCNC TGNANGGAATGNTTGCAGGCNAAATCGGCCCNCCCGATTATGAACTGTCCGAAAAAATCCATNC
NAACAATTGGTTCATCCTGGNANCCNTGTTATCCGGNCC
```

OpA 15

TTCCGAACCC

Tervezett primerek:

F primer: 5'GGACACAACCTGGCTAGTGTGG 3'

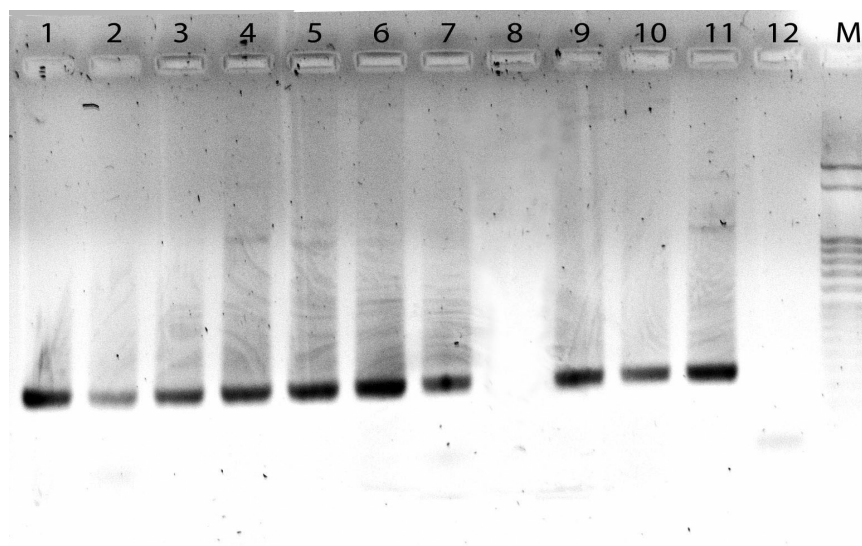
21nt Tm:66°C GC57% (10-30)

R primer: 5'CGGAGGATCGACATCATCCTC 3'

21nt Tm:66°C GC57% (227-247)

Termék: 238 nt

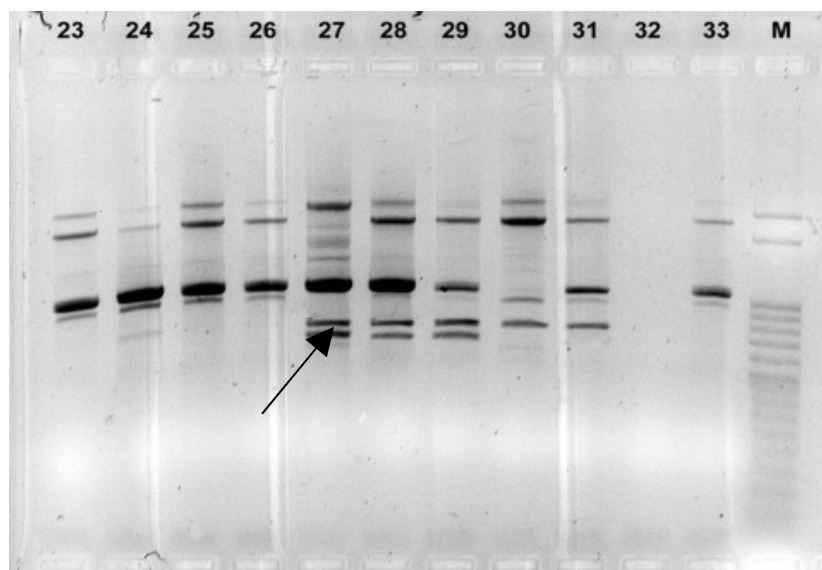
A PCR reakció eredménye 64°C-os anellálási hőmérséklet mellett.



32. ábra Az OpA 15 primerrel végzett RAPD-analízis differenciáló sávjaira tervezett primerek tesztelése PCR-reakcióban

A tervezett primer differenciál a Po 12 és a többi fajta között, mivel minden törzs esetében a kívánt méretben detektálható sávok láthatók, kivéve a vadon begyűjtött törzset a 8. sávban.

OpA 17



33. ábra Az OpA17 primerrel végzett RAPD-analízis gélmintázata.

Kb. 600 bp-os sávot izoláltam, melyre tervezett primer várhatóan differenciál a *P.ostreatus.var.florida*, Korona 312, G24 és a többi fajta között. Az izolált band megtalálható a *P.ostreatus.var.florida*, Korona 312, G24 (27. 28. 29. sáv) fajtákban.

A szekvenciaadatok és tervezett primer:

```
CGCTCCTATAGGGCGATTGGGCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTGACCGCTTGTATCCGAC
TGATCTGTTGCAGGATCAGGTAAGTACTGGCACACCCGTGCATCAAAATACCAATTGGCTTCTGCACGGGACATGCACGAGACG
AATGCATTGTGAGTTATCCGACCAATGACCAGTTACTAGTAAACGCTTGCCTTATCCACCCCTAGCAGAATCTATGGCAAAGATATC
TTAGCCAGATGGACTTAAAAGAGAAGTGTCTTCATTTCCGGTTC AAGA AACTCAACAGCAATCCTAAATAGTTCAAATTAGAACAT
GCTGTCATGATGGAATCAGCCTGAAAACGGGCCAGATGACCTTGCTTTGAGAGAGTAAAACTGAAGGGTGTGATAAATTAAGGAGA
GCAATTGATGGCAAAGGGTATGTATATAGTGCGGCATGATTGATCAATTATCGGTATTACGCCGGAGCCAGCTCCGCTCGCTATATC
GGGAGGGCATTGGTGAGTAGAAATCCCAACGTAGATGACGCAaGGAAGTACTCACCCACTGGCATTACCTAGCAGGTCTTCAAACCTG
TAACGTAGATTATTCATCTGTCTACAAGCGGTCAATCACTAGTGAATTCGCGGCCCGCCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCA
ACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTGTCNCCTAAATAGCTNNGCGTATCATGGTCATAGCTGNTTCTGNGNGAATTGTT
ATCCGCTCNCAATTCNNACATACNAGCCGNAACATAAAGTGNAAGCCTGGGGNGCCTANNGAGNGACCTACTCCNTTATTGGG
TNGCCCTCCTGCCNCT
```

OpA 17

GACCGCTTGT RAPD-PCR primere

Tervezett primerek:

F primer: 5' CAGGATCAGGTAAGTACTGATTAC 3'

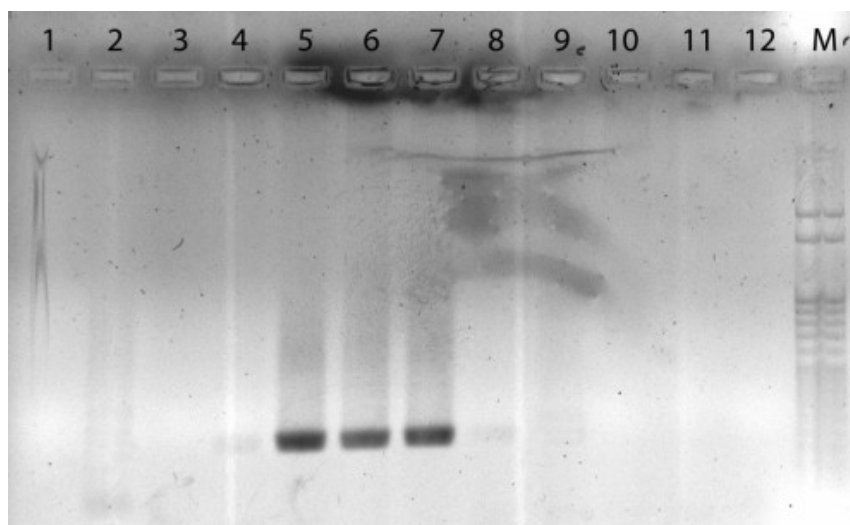
21nt Tm:60°C GC42% (18-38)

R primer: 5' GAACCGAAATGAAGACACTTC 3'

21nt Tm:60°C GC42% (206-226)

209 nt termék

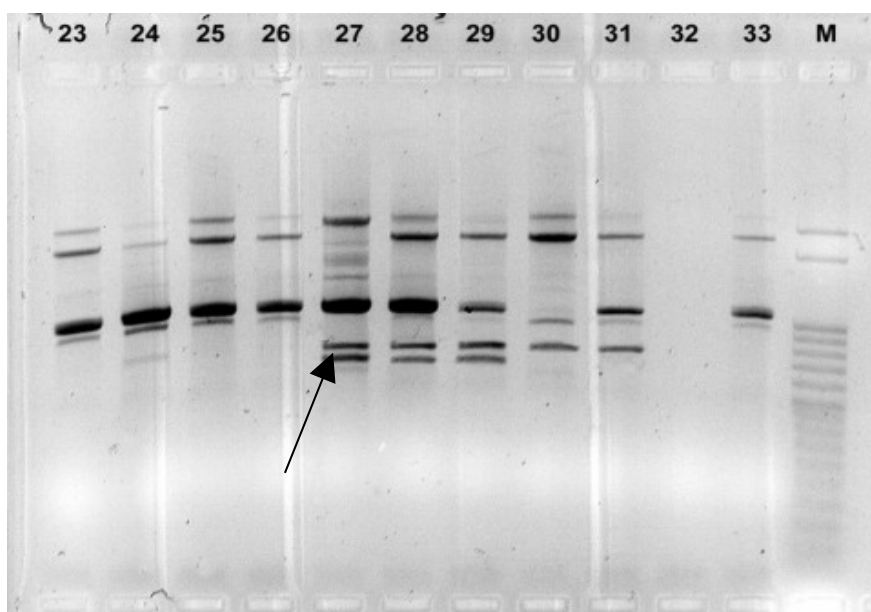
A PCR reakció eredménye 64°C-os anellálási hőmérséklet mellett.



34.ábra Az OpA 17 primerrel végzett RAPD-analízis differenciáló sávjaira tervezett primerek tesztelése PCR-reakcióban

A primertervezés eredménye sikeres volt, ugyanis az izolált differenciáló sávok szekvenciaadataira tervezett primerek a kívánt mérettartományban differenciáltak a következők szerint. Az amplikonok megfigyelhetők a *P. ostreatus*.var.*florida*, Korona 312, G24 fajtákban, míg a többi hibridben nem.

OpA 17



35. ábra. OpA17 primerrel végzett RAPD-analízis gélmintázata, amelyből egy újabb differenciáló sávot izoláltunk (nyíllal jelzett band)

Kb. 750 bp sávot izoláltam, melyre tervezett primer várhatóan differenciál a *P. ostreatus.var.florida*, Korona 312, G24, Po12, HK44 és a többi fajta között. Az izolált band megtalálható a *P.ostreatus.var.florida*, Korona 312, G24, Po12, HK44 (27., 28., 29., 30., 31. sáv) fajtákban.

A szekvenciaadatok és tervezett primer:

```
NGACTCNTATAGGGCGATTGGGCCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTGACCGCTTGTGACAAA  
CTTGCTGGAGTTTTGGAAGTCAGGCGTCTTTTATACCCGAGCTTGTAACCACCCCAAGGCGTTTTGGTTCCGATAGCTCTGGTGCCTG  
TGGTTTTCGACCTTCCCGCAGCATGCCAGGTTTCTGGCTTTGGAGCCTACCAGTCTAGCCATGACTGTCATGACTGCCTTCATACTCTG  
GAAGATATGGAGAATGTGGACCCCTCAGTCGTTTGTGTCAGCAGAGATAGACGACACCACATGTATCTTGCCGAGTCTTGGCGTGACGC  
CATGGACGAAATCACTCAGGAACACCTATATTCTAAATCCCATATTCGGTGGTCTGAACTCCTTCGCCTCCCTTACTGGGATCCCACGA  
AGTTCGTCGTCATTGATCAATGCACTGTTTTATCTTGGTCTCCTACATCGACACTGCCGAAAGTCTGGGGCATGGATGTCAAATT  
TGCGGATGGAGAAGGCATCACGTTTGATAAGCACAAGAAGGCTCCTTCTGAAGAGGGGATGGTCGTAGCTAGGCAAGTTCTAAATAC  
TGGCAGTGACAAGGATTTGCAAGCTCTCCGCGTCAACGTGATAAGTGAAGTCTGCAAGGAACTCGGCCTCCGCTTCGCCCTCANACTC  
ACTACAAGCGGTCAATCACTANTGAATTCGCGGCCGCTGCAGGTCGACCATATGGGAAANCTCCAACGCGTTGGATGCATAGCTG  
GANTATCTATANGCCCCCTAAANANCTNGGCGTANCATGGNCANANCTGTTCCNGGGGNAATNGTTANCGCTCAAATTCCCCAAAA  
AANAANCCG
```

OpA 17

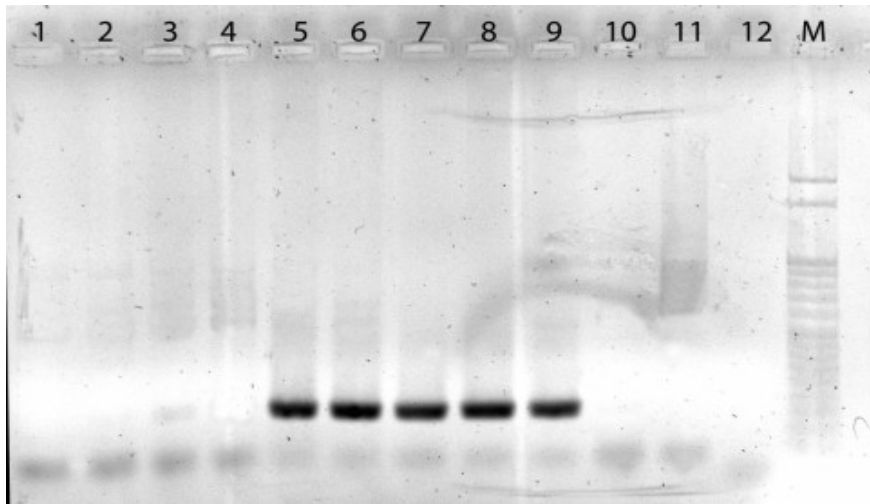
GACCGCTTGT RAPD-PCR primere

Tervezett primerek:

F primer: 5'CTTGCCGAGTCTTGGCGTGAC 3' 21nt Tm:68°C GC61% (248-268)

R primer: 5'CCCAGACTTTCCGGCAGTGTC 3' 21nt Tm:68°C GC61% (411-431)

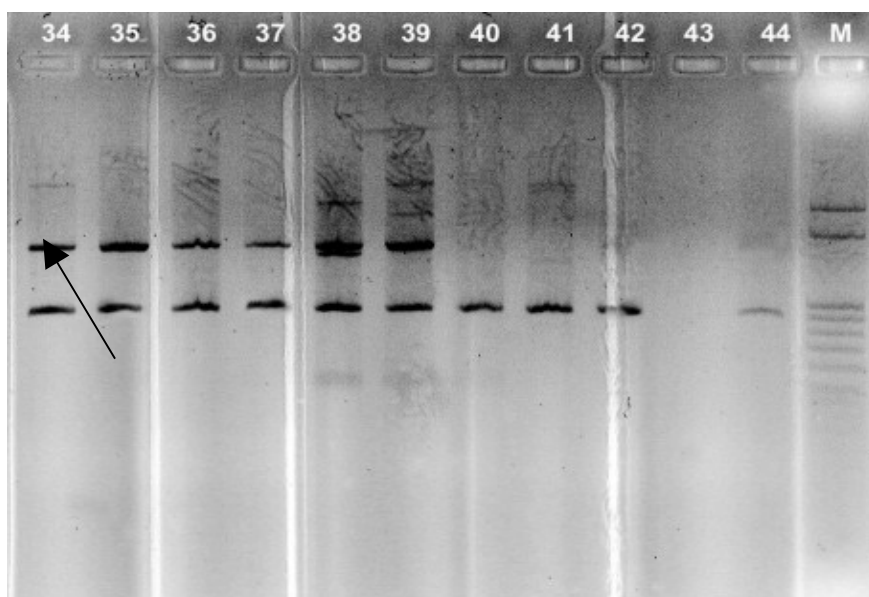
152 nt termék



36. ábra. Az OpA 17 primerrel végzett RAPD-analízis újabb differenciáló sávjaira tervezett primerek tesztelése PCR-reakcióban

A tervezett primerek optimális eredményt adtak. A kívánt méretben kaptam sávokat, melyek képesek elkülöníteni a *P.ostreatus.var.florida*, Korona 312, G24, Po12, HK44 törzseket a többi fajtától.

OpA 4391



37. ábra. Az OpA4391 primerrel végzett RAPD-analízis gélmintázata

Kb. 1800 bp sávot izoláltam, melyre tervezett primer várhatóan differenciál a G24, Po12, HK44 és a többi fajta között. Az izolált band megtalálható a 1-0-30, Bu-La, GHK 35, K 357-1, *P.ostreatus.var.florida*, Korona 312, HK44 (34 - 39.) fajtákban.

A szekvenciaadatok és tervezett primer:

```
NNNNNTATAGGGCGAATTGGGCCCGACGTCGCATGCTCCCGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTCTGACTCATGATAAATA
AGCTGTATACATAGCAAAACATCTTTAAAAGATAGTGTTAAGAGCCACACTCGCAGGGGGCTCAGGATACCGGACCCGCGGGTGCC
CAGTCCACGTAGACGCGTGGGGGAAACGGGGGGAGCGAGGACGTACAGGCTTGGCTTCAGCTACTGGCTGCGCCTCCACACTCT
TGCGTGCCCTGTATTTCCAGGAGGAGTCTACGCGGGTACCGAGGGTACTGGTGGAGGCGATGTAAGGGGACACTCCTATTTTCTCCT
ATTCCCTGTCCCTCTCCCTTCCCTTCGTTTCTTTCTCCCTTCCCTTCCATCCCATGGTCTATTATCTACATTCCCTTATTCCCTTCCCT
TCCCTCTCGCCCCCTTACCTTTCCGCTTCCCTTCCGTTCACTCCCTTCGCATCCGAGCCCCGTCCGGTGACTCCGAAGTCTTCCCGCAC
TTCGGACTCGCTCAGACTCGCTCGGACACTTCGGACTCGTAGATACACTTCGGGGCTCGTCCGGGCTACCTCTATCCTCCTTTCTCAC
TTCATTACTCCTTGTCCCACTTCCCAGGTCGCTGGCAGACTCCTGTACATTCCTTCCACTTCATTATCACATGCCCCCTCGTACC
TTGTGATATTCGTTTGTACCTGTGGCTGGTGTACTGTANAGTTACCCTTCACTTCCACGCTACTANAGTANATACTTCGCTTCCCTAGC
AGGAAAACCTTATCTGGTCTCTTGAATCCCCCTGCTAGGNGAACAGCTCTCTCANGTATGCAN
```

OpA 4391

CTGACTCATG – RAPD-PCR primere

Tervezett primerek:

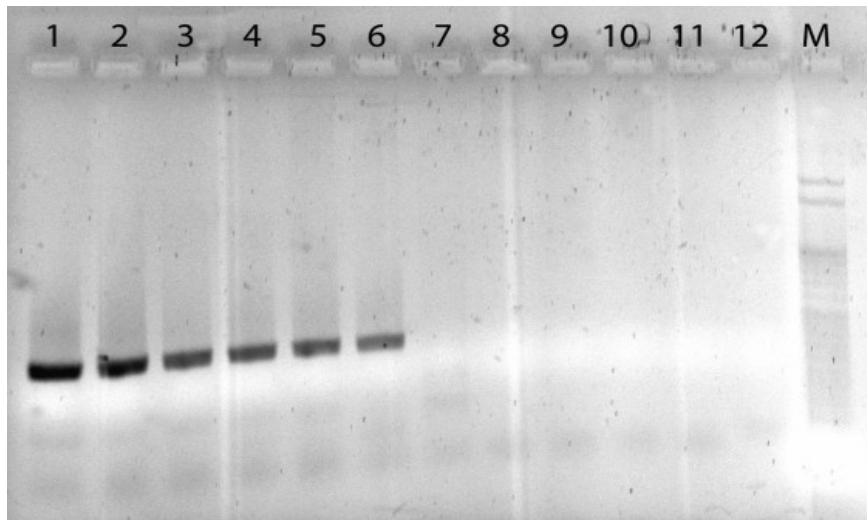
F primer: 5'GTGCCCAGTTCCACGTAGAC 3'

20nt Tm:64°C GC60% (90-109)

R primer: 5'CGGGAAGACTTCGGAGTCAC 3'

20nt Tm:64°C GC60% (427-446)

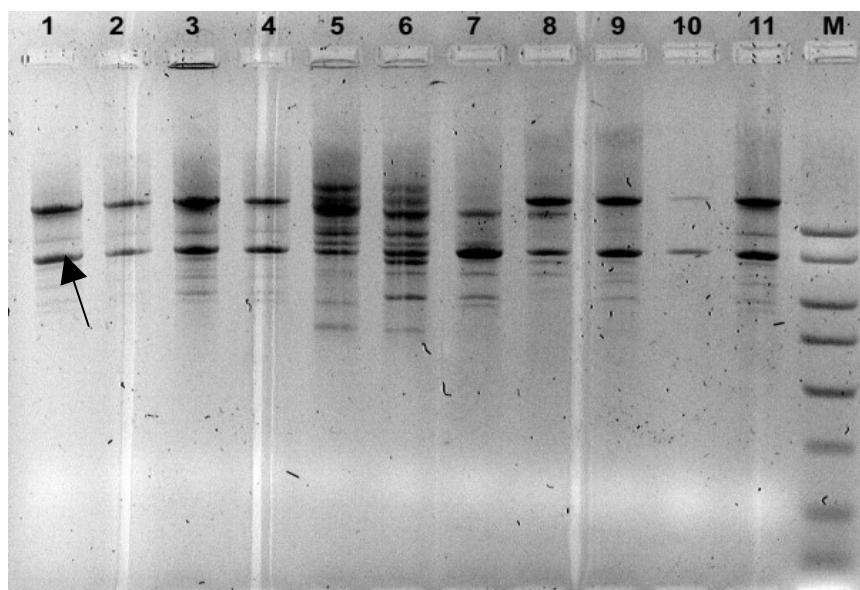
359 nt termék



38. ábra. Az OpA 4391 primerrel végzett RAPD-analízis differenciáló sávjaira tervezett primerek tesztelése PCR-reakcióban

A tervezett primer képes volt a 1-0-30, Bu-La, GHK 35, K 357-1, *P.ostreatus.var.florida*, Korona 312, valamint a G24, Po12, HK44, OL 1 és OL7 törzsek között a kívánt mérettartományban differenciálni.

OpA 01



39. ábra. Az OpA01 primerrel végzett RAPD-analízis gélmintázata

Univerzális, azaz minden törzsben meglévő band-et kívántam izolálni, egy későbbi Multiplex-PCR alkalmazás esetére, amelyben a laskagomba DNS kontrollként szerepelhet. A band-et 1500 kb mérettartományból izoláltam.

```
TGTTTCGCTCCTATAGGGCGATTGGGCCCCGACGTCGCATGCTCCCGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTCAGGCCCTTCCAA
GCCACAAGCATCGACGCACGTCGGCACATTGAATCAGAAATCTATACGGCATGATGCCGCTACCTCAACTCAAACTCGGAACAGA
ATGAGAGCTACCTCGATCGCCGAAAGACCTACAAAAGCGCATTGCAGGCATTGAGTCGGAGATCCAGTCCTACGACGAGGAGCTGC
GGAAGATCCAAGACGTGCGGGCGCTAAGGATGCGGGAAAAGGGGACTTAGAGAATCAGCTCGAGGCGCTGAGACAGCAGAATATC
TTTGGAGTCGGTGGAAATCTCAAGGTAAGTATTCTGATTCTCTGGGCCCTAAGGTGGAGGGCCTTTCACATTCAAGCCACGTTCTT
CCTCGCTCCATCAGGAAAGGGGAAGCAGCTGCTGAAGGGTGTACTCGACTATGGATCTGATGATTCCAATGGGTGCCGAGCTAA
AGACGAAGTTGCAGAAAGTGTTCGGGATACAGAATTTCCGGTTATGCCAACAAAGGTACGTACCTCCTCCATCCCTTTCTCTCACGAC
GACAGCCCTTGAATGTAAAGTCAATGAGAACAGTGCCTGCAACGCGAATGTTGACGGCCGANATGTTGTCTGTATCATGCCTACCGGC
GGCGGCAAGTCGTTGACATACCAACTGNCCGCCCTCTCATAACNNGGATGCACGATCGTAATCTCCCCGCTCATANCGCTGATATGGA
CNAGTGCNTCATCTACNCGAAGCCGNGGNGANTCCCTGCNTCCGTTTGGGNTCCGATCCNANTNGANCCAANCNTANNCAAC
```

OpA 01

CAGGCCCTTC RAPD-PCR primere

Tervezett primerek:

F primer: 5'GCCGCTACCTCAACTTCAAAC 3'

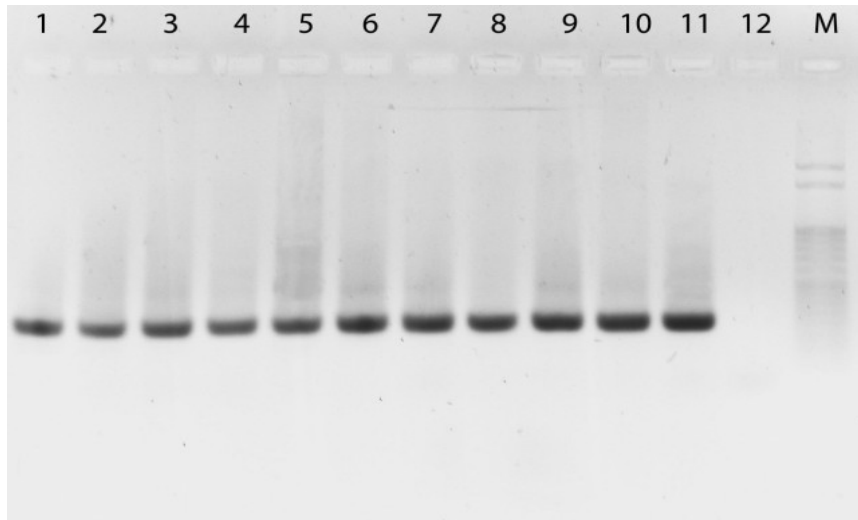
21nt Tm:64°C GC52% (59-79)

R primer: 5'GCTTGAATGTGAAAGGCCCTC 3'

21nt Tm:64°C GC52% (320-340)

282 nt termék

A szekvenciaadatok és tervezett primer:

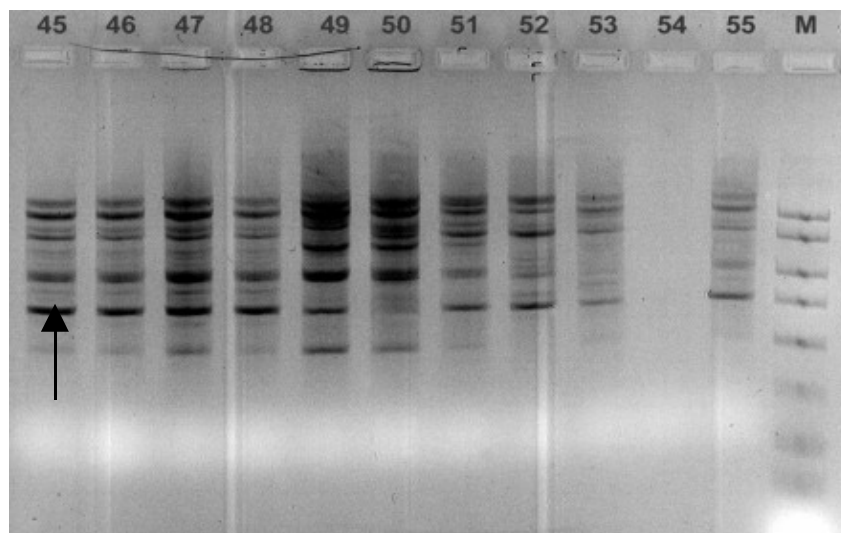


40.ábra. Az OpA 01 primerrel végzett RAPD-analízis differenciáló sávjaira tervezett primerek tesztelése PCR-reakcióban

Az összes laskagomba törzsre, hibridre tervezett primerek a tervezett mérettartományban pozitív reakciót adtak. E primer későbbi multiplex PCR során használható.

OpA 20

Kb. 800 bp sávot izoláltam, melyre tervezett primer várhatóan differenciál a Korona 312 és a többi fajta között. Az izolált band megtalálható az összes fajtában, kivéve a Korona 312-ben (50. sáv).



41.ábra. Az OpA20 primerrel végzett RAPD-analízis gélmintázata

A szekvenciaadatok és tervezett primer:

```
CNNTCNTATAGGGCGAATTGGGCCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCGATGGCGGCCGCGGGAATTTCGATTGTTGCGATCCTCCAAC
CACCAGCCTATACTAGTGTCTACTCCAGAACACGGTTCGCTAAGTGATATGATCTATGTATGTGACGTTCCCAATCTCGGTCAACCT
ATCTGACGAGCTACACTTTCAGTTCACTGTCGGGACGGCATCGTTATAGGCTCCAGTACAGATCTTGGCATTGCTGGTAACGGCACC
GCGTCGGCAGCAGTCAATACACAAGATAGTTCACAGTCTTCATTGACGCCTGATCCTAAAGTGGTTTCAGTAGCCTCTGCAAGTGCAG
GACAAACCCCTTCCAAGGTAGGAATATAGTACATGCGCGCATCGTACAATCCTCATCGTTCGTGCAGGACCCACTGGGCCACCGACC
TCTTCAGACAACCTTCACTAATACTGCCTATCGCTACAGAACACACCACTCACAAATGGCGGAATCGTCCCATCTAGTTCATGCAAT
CCCGTCCCAATGGGCGTCTTACCAGATATGGCGTTGATGCCATCTCAAAGTTCATAAAATCCTAAGAATGGGGACAATATCCTTGCTC
GCAAGGCGTTACCATCTCGCTCGCCATTCGTAATTTCCAAACAGGTTTCGCTAGCGAATCCCCAGAAGAGTTACCTTGCTGCACCACA
ACANGTGAATGCTCAAGGGTTGATANTCGGACACGCCAAGGTCGTTATCGAAGCGTTACAGGGTTCAACCAGACAACACCACTGNA
CCCTACGAAGTTCGCGTTCNCGAGCATATGGGATCGCAACAATCACTANTGAATTCNCGGCCGCTGCAGGTCNAC
```

OpA 20

GTTGCGATCC RAPD-PCR primere

Tervezett primerek:

F primer: 5'GCCTATACTAGTGTCTACTCC 3'

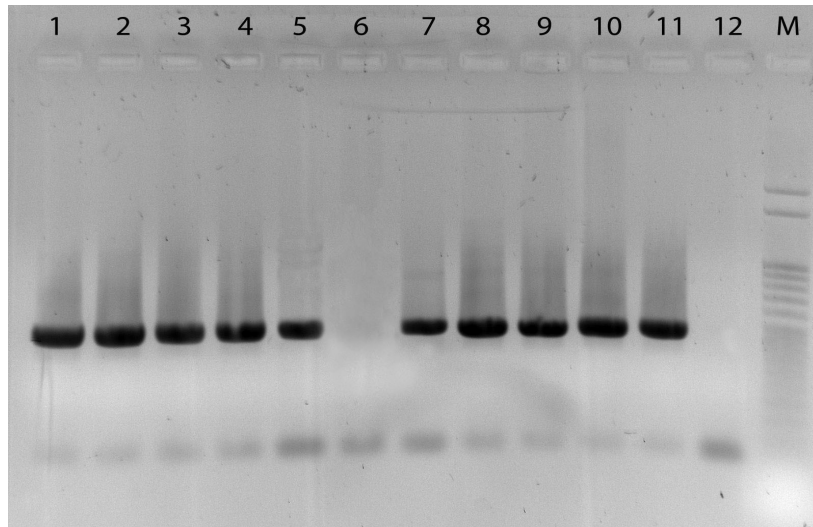
21nt Tm:62°C GC47% (12-32)

R primer: 5'GGATTGCATGAACTAGATGGG 3'

21nt Tm:62°C GC47% (426-446)

435 nt termék

A szekvenciaadatok és tervezett primer:



42.ábra. Az OpA 20 primerrel végzett RAPD-analízis differenciáló sávjaira tervezett primerek tesztelése PCR-reakcióban

A Korona 312-es fajta nem ad bandet, szemben a többi hibriddel. Ezzel a primerrel el lehet különíteni az új és a korábbi törzseket, nemesítési alapanyagokat.

A molekuláris biológiai vizsgálatok eredményeinek összefoglalása:

A molekuláris biológiai vizsgálataim eredményeképpen elmondható, hogy az általam keresztezésekkel előállított és termesztési kísérletekben is vizsgált Korona 312-es hibridet, valamint más hazai nemesítők által előállított laskagomba hibridektől sikerült elkülöníteni a RAPD-PCR differenciáló band-jeire tervezett primerekkel. Az OpA11, OpA15 dekamerek RAPD-PCR-ben történő használata esetén differenciáló bandeket találtam, azonban a klónozási, szekvenálási, primertervezési munka eredményeként tesztelt saját primerekkel a fajták között nem tudtam differenciálni. Az OpA01 primer esetében a konkrét cél az volt, hogy ne differenciáljon a primer a különböző laskagomba hibridek között, így azt a munka folyamányaként szóba kerülő multiplex PCR-ben lehet fölhasználni. Ezt, mint „univerzális” primerpárt sikerült előállítani, ugyanis a összes hibridben a kívánt mérettartományban visszakaptam a tervezett amplikont.

Az OpA 17-es dekamer használata esetén két differenciáló sávot sikerült izolálnom. Az egyik sáv szekvenciaadataira tervezett primerekkel a vizsgálatba bevont laskatörzseket két csoportra lehetett bontani. A következő törzsek, hibridek esetében volt megfigyelhető az amplikonok jelenléte: *P.ostreatus.var.florida*, G24, valamint a nemesített, új Korona 312. Ezek azt bizonyítják,

hogy a Korona 312 hibridben dominálnak a *P.ostreatus.var.florida* tulajdonságai, hiszen ezeknél az egyik szülő törzs a „*florida*„ volt.

Az OpA 17 egy másik differenciáló sávjából egy másik primert terveztem, melynek segítségével szintén két csoportra lehetett osztani a törzseket, hibrideket. A következőkben volt megfigyelhető a PCR termék: *P.ostreatus.var.florida*, Korona 312, G24, Po12, HK44.

Az OpA 4391 dekamerrel beállított RAPD-PCR-ből származó tervezett primerekkel 6 fajtánál volt megfigyelhető az amplikon jelenléte, így szintén két csoportra voltak bonthatóak a kísérletbe bevont laskagomba-törzsek. A termék a következő templátok használata esetén volt megfigyelhető: 1-0-30, Bu-La, GHK35, K357-1, *P.ostreatus.var.florida* és Korona 312.

Az OpA 20 random primer használatával tudtam azt elérni, hogy a saját nemesítésű Korona 312 esetében nem volt kb. 800 bp-nál amplikon, szemben a többi törzssel. Várakozásom az lett volna, hogy a Korona 312 esetében kapjak egy differenciáló band-et, és a többi törzs esetében nem. Kb 40 random primer RAPD-PCR során történő tesztelésével sem tudtam ezt a célt elérni, azonban úgy gondolom, hogy az amplikon hiánya a saját tervezésű primerrel hasonlóan jó eredmény a fajta-elkülönítési vizsgálatokban. Ennek megfelelően a saját primerekkel beállított PCR eredményeképpen az összes hibrid esetében megfigyelhető volt az amplikonok jelenléte, kivéve a Korona 312 új hibridet. Ezzel a primerpárral sikerült elkülöníteni az általam termesztési kísérletekben is bizonyítottan jól szereplő új laskagomba hibridet a többi hibridtől. Ez a molekuláris biológiai munka egyik legjelentősebb eredménye.

5. KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK

A kutatási munkám során 7 szülői törzsel dolgoztam. Az ilyen kevésnek mondható fajtából előállított hibridek morfológiai variabilitása nagyon szembetűnő volt, feltehetően további vad törzsek bevonásával még nagyobb változatosságnak lehettünk volna vizsgálói. Munkám eredményeiből és a tapasztalataimból azt a következtetést tudom levonni, hogy bár nagyon aprólékos és hosszú ideig tartó munkával, de lehetőségünk lenne a változó piaci igények kielégítése céljából speciális hibrideket előállítani. Ehhez azonban célszerűnek látom, egy az *Agaricus Resource Program*-hoz hasonló génbankot létrehozni, és az ott felgyülemlett, genetikailag, morfológiailag változatos vad törzsekkel folytatni a nemesítő munkát.

A Korona Gombacsíra Üzem vezetőjeként, gyakran szembesülök olyan természetű igényekkel, amelyeket a piac átalakulása teremt. Az európai piac és gombaipar átalakulóban van. Olyan országokban emelkedik a gombafogyasztás, mint például Románia és Bulgária, ahol egy évtizeddel ezelőtt még gyakorlatilag nem is volt működőképes ágazat. Mára a szupermarketek hatására növekedik a minőségi gomba és a fajtaválaszték iránti igény, és ez a folyamat a laskagomba szempontjából is érezhető. Sokasodnak azok a fogyasztói megkeresések, amikor is az egyébként közismerten galambszürke laskagombánál a barna színt keresik, de előfordult az is, hogy kifejezetten konzervüzemi feldolgozásra kerestek apró termőtesteket produkálni képes, bőtermő, melegtűrő fajtákat. A laskagomba termesztés súlypontja érezhetően áttevődik keletebbre, Ukrajnába és Romániába. Az ottani termesztők még híjján vannak a korszerű termesztési eszközöknek, mint például klimatechnika, számítógépes vezérlés stb. Ezzel szemben mennyiséget és minőséget egyaránt megtermelni akaró vállalkozókkal állunk szemben, akiknek igyekezni kell kielégíteni igényeiket.

Mindezeket figyelembe véve elmondhatom, hogy érdemes folytatni a nemesítő munkát, kiegészítve újabb vad törzsekkel, esetleg újabb olasz és spanyol, illetve észak-amerikai törzsekkel kiegészítve a szülői fajtákat.

A molekuláris biológiai munka eredményeiből a következő következtetéseket tudom levonni. Termeszthető „nagygombákkal kapcsolatos” fajta-elkülönítési vizsgálatok hazánkban korábban nem folytak, így azzal, hogy sikerült egy gombaipari vállalkozásnak egy molekuláris biológiai laboratóriumot és egy molekuláris fajta-elkülönítéssel foglalkozó kutatócsoportot létrehozni, ez mind komoly előrelépésnek számít. A mikológiai kutatás és a gombaipari tevékenység egyre szorosabb összefonódása következményeként egyre komolyabb eredményekre számíthatunk, mind a kutatás, mind a gombaipar területén.

A kutatóhelyünkön, ahol a laskagomba nemesítéssel kapcsolatos munkánkat megkezdtük, korábban nem rendelkezünk PCR laboratóriummal. Az elmúlt évek során, fejlesztéseink eredményeképpen sikerült létrehoznunk egy PCR vizsgálatokra épülő molekuláris biológiai laboratóriumot, amelyben meg tudtuk kezdeni a klasszikus nemesítési módszerek eredményeképpen előállított hibridek DNS alapú vizsgálatát. Mindezt abból a célból végeztük, hogy törzseinket, hibridjeinket egyértelmű morfológiai, élettani markerek hiányában molekuláris alapon, PCR módszerrel viszonylag könnyen el tudjuk különíteni. A fajta-elkülönítési tevékenység mindenképpen további kutatást, molekuláris markerek utáni intenzív munkát igényel. A disszertációmban szereplő molekuláris módszerek további, hasonló jellegű kutatási munkák alapjául szolgálhatnak.

ÖSSZEFOGLALÁS

A laskagomba termesztés terjedésével mind a termesztők, mind a fogyasztók részéről egyre újabb igények jelentkeztek az elmúlt tíz évben. Gazdasági szempontból előnyös, ha a laskagombafajta környezeti igényei egyszerű berendezésekkel olcsón kielégíthetők, és az évszakos változásoktól függetlenül folyamatosan, egész éven át termesztethető.

A megoldást abban látom, ha a fajtaválasztékot úgy bővítjük, hogy a termesztő a termesztési feltételeknek és a piaci igényeknek minél inkább a megfelelő fajtát választhassa ki.

Kutatási munkám során fő célkitűzésem volt, hogy vad laskagomba törzsek és a jelenleg is használt piaci hibridek bevonásával új, kedvező termesztési tulajdonságokkal rendelkező, nagyüzemi szinten is termeszthető laskagomba hibrideket állítsak elő.

Nemesítő munkám során felhasználtam a Gyurkó Pál által nemesített hibrideket, illetve az azok előállításánál alkalmazott módszerekkel igyekeztem új törzseket előállítani. A nemesítésbe bevontam több újonnan begyűjtött vad *P.ostreatus* törzset is.

Évente több száz keresztezést végeztem el 7 szülői törzs bevonásával. Az új hibridek közül szelektált törzseket laboratóriumi és termesztési körülmények között teszteltem, tovább szelektáltam. Évente 2-3 vonalat nagyüzemi termesztésbe vontunk, több ezer liter szaporítóanyagot értékesítettünk a KORONA cégcsoporton belülre és kívülre. A III. fejezetben közölt módszerekkel évente több száz hibridet állítottunk elő. Ezeket kezdetben kisparcellás kísérletekben szelektáltam. A kisparcellás termesztéseket üvegekben végeztem, steril alapanyagon. A vizsgálatok célja az volt, hogy megállapítsuk, melyek azok törzsek, amelyek a kontrol HK35 és HK44 törzsekhez viszonyítva azonos vagy jobb eredményeket mutatnak. A kisparcellás, üvegekben végzett termesztések nem alkalmasak természetlag számítására, viszont kiválóan alkalmazhatóak a primordiumképzés idejének, a termőtestek színének és morfológiájának vizsgálatára. A kisparcellás vizsgálatok az ismétlésekkel együtt 5-6 hónapig tartottak, s végül 5-8 törzset hagytunk meg további termesztési kísérletek céljából.

A kisparcellás termesztés szelekcióját követően a kiválasztott, ígéretes tulajdonságot mutató törzseket 10 literes steril szubsztrátumra oltottuk, és azokon termesztettük, már üzemi körülmények között.

Az összehasonlító termesztésikísérletekben már nemcsak a törzs morfológiai tulajdonságait lehet elemezni, hanem a kontroll fajtákhoz mérten megkaphatók a természetlagok eredményei is. Ezekről természetesen messzemenő következtetéseket levonni még nem szabad, de három ismétlés után már az adatok a végleges szelekció alapjául szolgálhatnak. A vizsgált 5-8 törzsből már csak egyet vagy maximum kettőt választunk ki, hogy a nagyüzemi szaporítóanyag-gyártásban alkalmazzuk, és a felhasználóknak értékesítsük.

Mielőtt azonban ez megtörténne a cég működtetésében lévő egzotikus gombákat termesztő és fajtakísérletnek helyet adó gombafarmon is termesztésbe vontuk, vizsgálva a törzsek környezeti hatásokkal szembeni toleranciáját, érzékenységét.

Ezzel a tesztelési módszerrel az elmúlt években piaci értékesítésre alkalmassá tettünk több új, a tudományos munkám eredményét képező hibridet. Az első hibridjeim a HK 44 és H7, továbbá a HK35 és G24 keresztezésével születtek. Az így készült Korona 3-as vonalak, a Korona 4-es törzsek 2000-től kerültek üzemi gyártásra, és természetesen kereskedelmi forgalomba.

A további években - 2000-től-, egy a *P.ostreatus.var.florida* és egy hazai Po5 törzs keresztezéséből előállított fajtát kereszteztem egy OL. törzsszel.

Az így kapott vonalak közül egy törzs ment keresztül a törzsszelektációs munkán, a Korona 312-es hibrid, terméseredményei határozottan elkülönítik a kontroll csoportoktól. A hibridet, a termesztési tesztelésével párhuzamosan, vizsgálatoknak vettem alá molekuláris biológiai módszereknek, annak érdekében, hogy a törzs PCR elkülönítésének lehetőségét is megvizsgáljuk.

Az 1999-től folytatott kutató munkám három nagy eredményét tudom megfogalmazni és kézzelfoghatóan a tudományos élet szereplői elé tárni.

Először is véghezvittünk egy 8 éve tartó nemesítő munkát, melynek több üzemi szaporított és kereskedelmi forgalomba került hibrid volt az eredménye, közöttük a Korona 312-re keresztelt új laskagomba hibrid. Ez a hibrid a termesztési kísérletek során bizonyította, hogy termésmennyiségében és a termés minőségében egyaránt a HK35 hibrid piaci konkurense, esetleg azt felváltó utóda lehet.

Másodsorban sikerült a klasszikus nemesítő módszereket alkalmazva, azokat tökéletesítve kidolgozni, egy a Kutató Laboratóriumunkban gyakorolt nemesítési protokolt, amelyet tudomásom szerint eddig ilyen részletességgel nem írtak le.

Harmadsorban pedig kidolgoztam egy törzsfenntartó technológiát, amely az igen intenzív növekedésű xilofág gombák fenntartására olyan eredményességgel sikerült alkalmazni, hogy az biztossá tette azok kölcségtakarékos és hosszú ideig tartó fenntartását. Alkalmaztam és tökéletesítettem a hagyományos fenntartó technikákat, de új tapasztalatokat szereztem a krioprezerválási technológia gyakorlásában is.

Nem utolsó sorban nagy eredménynek érzem a DNS laboratóriumunk megépítését, felszerelését és annak beindítását, mint termelő szaporítóanyag üzem, az országban elsőként és ezidáig is egyedülállóan.

A molekuláris biológiai vizsgálataim eredményeképpen elmondható, hogy az általam keresztezésekkel előállított és termesztési kísérletekben is vizsgált Korona 312-es hibridet, valamint más hazai nemesítők által előállított laskagomba hibridektől sikerült elkülönítenem a RAPD-PCR

differentiáló band-jeire tervezett primerekkel. Az OpA11, OpA15 dekamerek RAPD-PCR-ben történő használata esetén differentiáló bandeket találtam, azonban a klónozási, szekvenálási, primertervezési munka eredményeként tesztelt saját primerekkel a fajták között nem tudtam differenciálni. Az OpA01 primer esetében a konkrét cél az volt, hogy ne differenciáljon a primer a különböző laskagomba hibridek között, így azt a munka folyamányaként szóba kerülő multiplex PCR-ben lehet fölhasználni. Ezt, mint „univerzális” primerpárt sikerült előállítani, ugyanis az összes hibridben a kívánt mérettartományban visszakaptam a tervezett amplikont.

Az OpA 17-es dekamer használata esetén két differentiáló sávot sikerült izolálni. Az egyik sáv szekvenciaadataira tervezett primerekkel a vizsgálatba bevont laskatörzseket két csoportra lehetett bontani. A következő törzsek, hibridek esetében figyelhettük meg az amplikonok jelenlétét: *P.ostreatus.var.florida*, G24, valamint az általunk nemesített Korona 312. Ezek azt bizonyítják, hogy a Korona 312 hibridben dominálnak a *P.ostreatus.var.florida* tulajdonságai, hiszen ezeknél az egyik szülő törzs a *P.ostreatus.var.florida* volt.

Az OpA 17 egy másik differentiáló sávjából egy másik primert terveztem, melynek segítségével szintén két csoportra lehetett osztani a törzseket, hibrideket. A következőkben volt megfigyelhető a PCR termék: *P.ostreatus.var.florida*, Korona 312, G24, Po12, HK44.

Az OpA 4391 dekamerrel beállított RAPD-PCR-ből származó tervezett primerekkel 6 fajtánál volt megfigyelhető az amplikon jelenléte, így szintén két csoportra voltak bonthatóak a kísérletbe bevont laskagomba-törzsek. A termék a következő templátok használata esetén volt megfigyelhető: 1-0-30, Bu-La, GHK35, K357-1, *P.ostreatus.var.florida* és Korona 312.

Az OpA 20 random primer használatával tudtam azt elérni, hogy a saját nemesítésű Korona 312 esetében nem volt kb. 800 bp-nál amplikon, szemben a többi törzssel. Természetesen az lett volna a megfelelőbb, ha a Korona 312 esetében kaptam volna a differentiáló band-et, és a többi törzs esetében nem. Kb 40 random primer RAPD-PCR során történő tesztelésével sem tudtam ezt a célt elérni, azonban úgy gondolom, hogy az amplikon hiánya a saját tervezésű primerrel hasonlóan jó eredmény a fajta-elkülönítési vizsgálatokban. Ennek megfelelően a saját primerekkel beállított PCR eredményeképpen az összes hibrid esetében megfigyelhető volt az amplikonok jelenléte, kivéve a Korona 312 új hibridet. Ezzel a primerpárral sikerült elkülönítenem az általam termesztési kísérletekben is bizonyítottan jól szereplő új laskagomba hibridet a többi hibridtől. Ez a molekuláris biológiai munka egyik legjelentősebb eredménye.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEIM ÖSSZEFOGLALÁSA:

1. Nemesítési munkám során kinemesítettük a Korona 312 nevű hibridet, amely igen ígéretes fajta mind mennyiségi, mind minőségi szempontból.

2. Jelen dolgozatban publikáltam először a laskagomba nemesítést segítő molekuláris módszer első hazai alkalmazásának eredményeit.
3. A molekuláris biológiai módszerek közül a RAPD-PCR technikát eredményesen alkalmaztam új laskagomba fajták nemesítése során.
4. Az OpA 20 primerrel végzett RAPD-vizsgálat eredményeként egyes fajtákat szétválasztó bandeket találtam.
5. Kidolgoztam egy új törzsfenntartó technológiát intenzív növekedésű xilofág gombák hosszú ideig tartó tárolására.

Bízom benne, hogy a DNS technológiák alkalmazásával felgyorsul, és hatékonyabbá válik a nemesítő munka, és ezzel újra bekerülhetnek magyar kutatók a nemzetközi élvonalba.

Fontosnak érzem a kutatások, elsősorban a molekuláris markerek fejlesztésével kapcsolatos vizsgálatok folytatását, annál is inkább, mert a jövőben várhatóan ezen egységek segítségével lehet jogilag levédeni és megvédeni a hibrideket. Tudomásom szerint a brüsszeli törvényhozók dolgoznak a szabályozások és fajtavédelmek jogi hátterének a kidolgozásán. Az életbelépésig még sok munka vár ránk, hogy ne szoruljunk ki a nemzetközi piacról, ne tudják korlátozni a tevékenységünket a genetikai alapanyagaink védetlensége okán.

SUMMARY

As growing oyster mushroom has become widespread in the last ten years, both growers and consumers have set up new claims. From economical point of view it is advisable that oyster mushroom be produced in a cheap way using simple equipment and the production of it be continuous, all-year long and independent on changing weather conditions.

I thought it would be important to increase the number of strains in such way that growers could choose the most suitable strain when growing conditions and market claims are concerned. In my research my main goal was that using wild oyster species and currently used hybrids we could produce new hybrids having favourable growing characters and being productive in farm.

During my breeding work I used Gyurkó-hybrids and also his methods while producing new strains. I also used some newly collected wild *Pleurotus ostreatus* strains.

I made hundreds of crossing yearly using seven parents. The chosen strains of the new hybrids were tested and selected both in laboratory and during cultivation. We started cultivating 2-3 different strains a year in plants and we sold thousands of liters of spawn inside and outside KORONA Mushroom Union.

I can state and publicize three main results of my research work:

First of all we did an eight-year long breeding work which resulted in some new hybrids for cultivation among them a new oyster hybrid named KORONA 312. This hybrid proved to be able to rival HK35 hybrid both in quantity and quality and later HK35 might be substituted by our new strain.

Secondly, having applied and improved old classical breeding methods we managed to work out a new breeding protocol used in our research laboratory, which has not been described in such detailed way yet.

Last but not least I feel it a great result that we managed to set up, equip and start our DNA laboratory as the first and only spawn factory in the country. I hope the application of the new DNA technologies will result in quicker and more effective breeding work and it will help Hungarian researchers play significant role in the development of oyster mushroom cultivation in the world again.

In my opinion, it is very important that research to develop molecular markers should continue as in future hybrids will be able to be saved and patented with the help of these items.

MELLÉKLETEK

M1.: FELHASZNÁLT SZAKIRODALOM

1. ALBERT, L., LOCSMÁNDI, CS., VASAS, G. (1995): Ismerjük fel a gombákat! Miskolc. Borsodi Nyomda 129 p.
2. ARTHUR, R., HELL, F., STRAUSS, N., ANDERSON, J., P.A. HORGEN (1982): Characterization of the genome of the cultivated mushroom *Agaricus brunnescens*. *Exp. Mycologia*. 7:127-132.
3. BABOS, M. (1985): *Pleurotus eryngii* (DC.:Fr.) Quél. var. *ferulae* Lanzi előfordulása Magyarországon. - *Mikológiai Közlemények*. pp. 41–48.
4. BABOS, M. (1989): Magyarország kalaposgombáinak (Agaricales s.l.) jegyzéke I. - *Mikológiai Közlemények*. pp. 150 – 151.
5. BALÁZS, S. (1982): *Termesztett gombáink*. Akadémiai Kiadó, Budapest
6. BALÁZS, S., KOVÁCSNÉ, GY.M., (1988): Einige Erfahrungen über dem Substratbedarf der Kulturpilze. *Der Champignons* 28 (320): 31-36.
7. BASTIDE, P.Y., SONNENBERG, A.S.M., L.J.L.D. van GRIENSVEN, J.B. Anderson & P.A.Horgen (1997): The influence of mitochondrial haplotype on growth of *Agaricus bisporus* heterokaryons produced by controlled crosses. *Applied And Environmental Microbiology*. 63:3426-3431.
8. BOTSTEIN, D., WHITE, M., SKOLNICK, M., DAVIS, R.W. (1980): Construction of a genetic linkage map using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*. 32:314-321.
9. BRUNS, T.D., WHITE, T.J., TAYLOR, J.W. (1991): Fungal Molecular Systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 22:525-564.

10. BRUNS, T.D., SZARO, T.M., GARDES, M., CULLINGS, K.W., PAN, J.J., TAYLOR, D.L., HORTON, T.R., KRETZER, A., GARBELOTTO, M., Li, Y. (1998): A sequence database for the identification of ectomycorrhizal Basidiomycetes by phylogenetic analysis. *Molecular Ecology* 7:257-272.
11. CAETANO-ANOLLÉS, G., BASSAM, B. J., GRESSHOFF, P. M. (1992): Primer-template interactions during DNA amplification fingerprinting with single arbitrary oligonucleotides. *Mol. Gen. Genet.* 235, 157-165.
12. CALLAC, P., BILLETTE, C., IMBERNON, M., KERRIGAN R.W (1993): A new tetrasporic variety of *Agaricus bisporus* occurs below sea level in the Sonoran desert of California. *Mycologia* 85: 835-851.
13. CALLAC, P., IMBERNON, M., KERRIGAN, R.W., OLIVIER J.M. (1996.): The two life cycles of *Agaricus bisporus*. In Royse, D.J. (ed), *Mushroom Biology and Mushroom Products, Proceedings of the second conference*, Penn State, pp 57-66.
14. CALLAC, P., BILLETTE, C., KERRIGAN R.W., IMBERNON, M. (1997): Conservation of genetic linkage with map expansion in distantly related cross of *Agaricus bisporus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 146: 235-240.
15. CALLAC, P., MOQUET, F., IMBERNON, M., RAMOS GUESDES-LAFARGUE, M., MAMOUN, M., OLIVIER J-M. (1998.): Evidence for *PPCI*, a determinant of the pilei-pellis color of *Agaricus bisporus* fruitbodies. *Fung. Genet. & Biol.* 23: 181-188.
16. CASTLE, A.J., HORGAN, P.A., ANDERSON J. (1987): Restriction fragment length polymorphisms in the mushrooms *Agaricus brunnescens* and *Agaricus bitorquis*. *Applied And Environmental Microbiology.* 53:816-822.
17. CHOW, C. M., YAGUE, E., RAGUZ, S., D.A. WOOD & C. Thurston C. F. (1994): The *cel3* gene of *Agaricus bisporus* codes for a modular cellulase and is transcriptionally regulated by the carbon source. . *Applied And Environmental Microbiology* 60:2779-2785.

18. CHALLEN, M.P., GREGORY, K.E., SREENIVASAPRASAD, S., ROGERS, C.C., CUTLER, S.B., DIAPER, D.C., ELLIOTT, T.J. (2000): Transformation technologies for mushroom. *Mushroom Science* 15: 165-172.
19. CHANG, S. T., HAYES, W. (1978): The biology and cultivation of edible mushrooms. Academic Press, New York
20. CHANG, S. T., BUSWELL, J.A., MILLES, P.F.(1992):Genetics and breeding of edible mushrooms. Gordon and Breach Science Publishers, New York
21. CHANG, S. T. (1993): Mushroom biology: The impact on mushroom production and mushroom product. The Chinese University Press, Hong Kong.
22. CHANG, S. T. (1999): World production of cultivated edible and medicinal mushrooms in 1997 with emphasis on *Lentinula edodes* (Berk.) Sing in China. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 1:291-300.
23. CORNER, E. J. H (1981): The Agaric Genera *Lentinus*, *Panus* and *Pleurotus* with particular reference to Malaysian species. – *Beih. Nova Hedwigia*, 69, pp. 1-169.
24. EDWARDS, A., et al. (1991): DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *American J. Hum. Gen.* 49: 746-756.
25. EGER, G. (1978): Biology and Breeding of *Pleurotus*, *The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms*. Edited by CHANG - HAYES, Academic Press, New York p. 497-519.
26. ELLIOT, T. J. (1972): Sex and the single spore. *Mushroom Science* 8:11-18.
27. ELLIOT, T. J. (1985): The genetics and breeding of species of *Agaricus*. In FLEGG, P.B., SPENCER, D.M. & WOOD, D.A. (eds) *The Biology and Technology of the Cultivated Mushroom*: Wiley 111-139:.
28. FLEGG, P.B., SPENCER, D.M., WOOD, D.A. (1985):The biology and technology of the cultivated mushroom. *John Wiley and Sons*, Chichester

29. FRITSCHÉ, G. (1984): Breeding *Agaricus bisporus* at the mushroom experimental station, Horst. *Mushroom Journal* 122:49-53.
30. FRITSCHÉ, G. (1991): A personal view on mushroom breeding from 1957-1991. Genetics and Breeding of *Agaricus* In van GRIENSVEN L. J. L.D. (ed), *Genetics and Breeding of Agaricus Proceedings of the First International Seminar on Mushroom Science* , PudocWageningen pp 3-20.
31. GEML J., HAJDÚ Cs. /szerk./ (2000): A II. Nemzetközi Gombatermesztési Konferencia előadásai. A Magyar Gombatermesztők Országos Szövetségének kiadványa, Eger
32. GYÖRFI, J. (1986): A laskagomba baktériumos megbetegedése. Gombatermesztési tájékoztató, 1: 42-43
33. GYURKÓ P. (1984): Pleurotus Cultivars in Hungary. Termesztett laskagomba fajtáink. *Proceedings of the International Symposium on Substrates for Mushroom Growing and Cultivation of Pleurotus Species*.p. 18-34, 55-66.
34. HAJÓSNÉ, N. M. (1999): Genetikai variabilitás a növénynevelésben, Mezőgazda Kiadó, Budapest.
35. HARMSÉN, M.C., SCHUREN, F.H.J., MOUKHA, S.M., Van ZUILEN, C.M., P.J.PUNT, WESSELS, J.G.H. (1992): Sequence analysis of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes from the basidiomycetes *Schizophyllum commune*, *Phanerochaete chrysosporium* and *Agaricus bisporus*. *Curr. Genet.* 22:447-454.
36. HELTAY, I. (1970): Eljárás: Pleurotus gombák táptalajának előállítására, Szabadalom, Lajstromszám: 173414, a bejelentés napja: 1970.05.12.
Bejelentő és feltaláló: Heltay Imre, Tóth Ernő, Tóth László
37. HELTAY, I. (2000): Gomba oltóanyag készítésével, nemesítéssel, az étkezési gombák termesztésével kapcsolatos kutatásaim és azok gyakorlati alkalmazása. Doktori (PhD) értekezés, SzIE. Budapest
38. HILBER, O. (1982): Die Gattung Pleurotus (Fr.) Kummer. – Bibliotheca Mycol., J.Cramer, Vaduz 87.

39. HILBER, O. (1989): Valid, invalid, and confusion taxa of the genus *Pleurotus*. *Mushroom Science* XII. Part. II. Braunschweig. p 241-248..
40. HINTZ, W.E.A., J.B. ANDERSON, HORGEN P.A. (1988): Physical mapping of the mitochondrial genome of the cultivated mushroom *Agaricus brunnescens* (= *A. bisporus*). *Curr. Genet.* 14:43-49.
41. IMBERNON, M., BRIAN, C., LABORDE, J. (1984): Breeding in *Pleurotus* genus: selection of new strains for the development of cultivation in France. *Proceedings of the International Symposium on Substrates for Mushroom Growing and Cultivation of Pleurotus Species*. Budapest, Part.II. 34.42.p.
42. IMBERNON, M., CALLAC, P., GASQUI, P., KERRIGAN, R.W., VELCKO, A.J. (1996): *BSN*, The primary determinant of basidial spore number and reproductive mode in *Agaricus bisporus*, maps to chromosome I. *Mycologia* 88:749-761.
43. JAKUCS E. (1999): A mikológia alapjai. ELTE Eötvös Kiadó.
44. KALMÁR, Z. (1960): Termesztési kísérletek ördögsekér-tölcsérgombával. *Kísérletügyi közlemények, kertészet*, 52/c kötet, 4.füzet.119-125 p.
45. KERRIGAN, R.W., J.C. ROYER, L.M., BALLER, Y., KOHLI, P.A., HORGEN, ANDERSON, J.B. (1993): Meiotic behavior and linkage relationships in the secondarily homothallic fungus *Agaricus bisporus*. *Genetics* 133:225-236.
46. KERRIGAN, R.W. (2000): A brief history of marker assisted selection in *A. bisporus* *Mushroom Science* 15: 183-189.
47. KEVEI F., KUCSERA J. (1998): Mikrobiológia I., Szeged: JATEPress.
48. KEVEI F., KUCSERA J., VARGA J., VÁGVÖLGYI CS. (1999): Fejezetek a mikológiából. Szeged: JATEPress.

49. KHAN, S., ALI, M. (1981): Cultivation of oyster mushroom on ball locules. *Mushroom Science* 11:691-695
50. KHUSH, R. S. , BECKER, E., WACH M., (1992): DNA Amplification Polymorphisms of the Cultivated Mushroom *Agaricus bisporus*. *Appl. Env. Microbiol.* 58: 2971-2977.
51. KIDDER, J.W. (2000): The development of new spawn strains and related products. In: GEML, J., HAJDÚ, CS. (Eds.) *Proceedings of the 2nd International Conference on Mushroom Cultivation in Hungary*, Budapest. P. 13-18.
52. KOTHE, E. (2001): Mating-type genes for basidiomycete strain improvement in mushroom farming, *Appl. Microbiol Biotechnology*, 56: 602-612.
53. KORONCZYNÉ, UZONYINÉ, (1969): Gombatermesztési útmutató, Mezőgazdasági Kiadó, Budapest
54. KRONSTAD, J.W., STABEN, C. (1997): Mating Type in Filamentous Fungi, *Annu. Rev. Genetics.* 31: 245-76.
55. LARRAYA, L. M.,et al. (1999): Molecular caryotype of the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. . *Applied And Environmental Microbiology*. 1999. aug.p. 3413-3417.
56. LARRAYA, L. M.,et al. (2000): Genetic linkage maP of the edible Basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Applied And Environmental Microbiology*. Dec. 2000. p. 5290-5300.
57. LARRAYA, L. M.,et al. (2001): Relationship between Monokaryotic Growth Rate an Mating Type int he edible Basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. . *Applied And Environmental Microbiology*. Aug. 2001.p. 3385-3390.
58. LODDER, S.C., WOOD, D.A., GULL K. (1993): An electrophoretic karyotype of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *Curr. Genetics.* 24:496-499.

59. LOFTUS, M.G., MOORE, D., ELLIOTT T.J., (1988): DNA polymorphisms in commercial and wild strains of the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. *Theoretical and Applied Genetics* 76:712-718.
60. LOFTUS, M.G. (1995): Breeding new strains of Mushrooms. *Mushroom News* 1995 july, p 6-14.
61. LOFTUS, M.G., LODDER, S. C., LEGG, E. J.(1998): Mushroom caps with reduced scaling. U. S. Patent Number 5, 832, 659.
62. LOFTUS, M.G., BOUCHTI-KING, L. ROBLES, C. (2000,a) Use of a SCAR marker for cap color in *Agaricus bisporus* breeding programs. *Mushroom Science*..
63. LOFTUS, M.G., ROBLES, C. (2000,b): Mushroom breeding with molecular markers. In. GEML, J., HAJDÚ, CS. (Eds.) *Proceedings of the 2nd International Conference on Mushroom Cultivation in Hungary*, Budapest. P 19-26
64. MANCZINGER, L., PÓCSI, I., VETTER, J. (2003): Gombaélettan; In Jakucs Erzsébet, Vajna László: *Mikológia*, Agroinform Kiadó, Budapest.
65. MAY, B., ROYSE, D. (1982): Confirmation of crosses between lines of *Agaricus brunnescens* by isozyme analysis. *Exp. Mycologia* 6:283-292.
66. MARKERT, C.L., MOLLER, F.(1959): Multiple forms of enzymes: tissue,ontogenic and species specific patterns. *Proc Acad Sci U.S.A.*, 45: 753-763.
67. MILLER, R. (1971): Evidence of sexuality in the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *Mycologia* 63:630-634.
68. MOQUET, F., DESMERGER, C., MAMOUN, M., RAMOS-GUEDES-LAFARGUE, M., OLIVIER, J.-M.. (1999): A quantitative trait locus of *Agaricus bisporus* resistance to *Pseudomonas tolaasii* is closely linked to natural cap color. *Fung. Genet. Biol.* 28:34-42.

69. MOSER, M. (1983): Die Röhrlingr und Blatterpilze (Polyporales, Boletales, Agaricales, Russulales). – VEB GUSTAV FISCHER Verlag Jena. pp. 55-56.
70. MULLIS, K. B. – FALOONA, F. A. (1987):. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Method Enzymol* 155, 335-350.
71. MUSHWORLD (2004): Mushroom Grower's handbook, Oyster mushroom cultivation, Heineart Inc. Seoul, Korea
72. NÉMETH, K. (1998): A faanyag degradációja Mezőgazdasági Szaktudás Kiadó, Budapest
73. PARAN, I. MICHELMORE, R.W.. (1993): Sequence characterized amplified regions: PCR-based genetic markers for higher organisms. *Theor. Appl. Genet.* 85:9828-9832.
74. PERRY, C.R., SMITH, M., BRITNELL, C.H., WOOD, D.A., THURSTON, C. F. (1993): Identification of two laccase genes in the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *J. Gen. Microbiol.* 139:1209-1218.
75. PILAT, A (1935): Pleurotus Fries. In: Atlas des Champignons de l'Europe. Bd. 2. Praha.
76. POPPE, J. (2000): Use of agricultural waste materials in the cultivations of mushrooms. *Mushroom Science* 15: 3-23.
77. RAFALSKI, J.A., TINGEY, S. (1993): Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines. *Trends in Genetics* 9: 275-279.
78. RAGUZ, S., YAGUE, E., WOOD, D.A., THURSTON, C.F. (1992): Isolation and characterisation of a cellulose-growth-specific gene from *Agaricus bisporus*. *Gene* 119:193-190.
79. RAPEL, C.A., RAPER, J.R, MILLER, R.E. (1972): Genetic Analysis of the life cycle of *Agaricus bisporus*. *Mycologia* 64: 1088-1117.

80. RAMIREZ, L., LARRAYA, L., PISABARRO, A. (2000): Molecular tools for breeding basidiomycetes. *Internatl Microbio l*Springer-Verlag Ibéria 3: 147-152.
81. REESE, E.T., SIN, R.G.H., LEVINSON, H.J. (1950): *Bacteriol.* 59. p.485
82. RIMÓCZI, I. (1994): Nagygombáink cönológiai és ökológiai jellemzése. , *Mikológiai közlemények* 33:4-150.
83. RIMÓCZI, I. (2000): Gombaválogató 4. Mezőgazdasági Szaktudás Kiadó, Budapest
84. RIMÓCZI, I. (2004): Magyarország leggyakoribb gombái. Mezőgazda Kiadó, Budapest
85. ROYSE, D., MAY, B. (1982): Use of isozyme variation to identify genotypic classes of *Agaricus brunnescens*. *Mycologia* 74:93-102.
86. SEUNG WOO KONG (2004): What is Oyster mushroom, in *Oyster Mushroom Cultivation, Mushroom Growers' Handbook*, MushWorld, Seoul.
87. SEY, O., VARGA, J. (1997): *Evolúció*, Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest.
88. SINDEN, J. (1981): Strain Adaptability. *Mushroom Journal* 101:153-156.
89. SINGER, R. (1975): *The Agaricales in modern taxonomy*. 3. Aufl., Vaduz.
90. SONNENBERG, A. S., De GROOT, P. W. J., SCHAAP, P. J., BAARS, J. J. P., VISSER, J., L. J. L. D. Van GRIENSVEN,(1996): Isolation of expressed sequence tags of *Agaricus bisporus* and their assignment to chromosomes. *Applied And Environmental Microbiology*. 62: 4542-4547.
91. SONNENBERG, A. S., BAARS, J. P., MIKOSCH, T. S. P., SCHAAP, P. J. Van GRIENSVEN, L. J. L. D. (1999): *Abr1*, a transposon like element in the genome of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *Applied And Environmental Microbiology*. 65: 3347-3353.
92. SPEAR, M., MILLER, R. (1991): Mushroom plant named brown hybrid X618. US Patent No. Plant 7,636.

93. STAMETS, P. (1993): Growing gourmet and medicinal Mushrooms. Hong Kong. Ten Speed Press. Berkeley
94. SZABÓ, I. (1986): A laskagomba termesztése, Mezőgazdasági Kiadó, Budapest.
95. SZABÓ, I. (1990): A csiperke, a laska és más gombák termesztése. ILK MODUL Vállalkozási Iroda, Budapest
96. SZARVAS, J. (2002): A bazídiumos gombák szaporodása, életciklusa I. *Magyar Gombahíradó* MGOSZ Lapja, X: évf., 36. szám.
97. SZARVAS, J. (2003): A bazídiumos gombák szaporodása, életciklusa II. *Magyar Gombahíradó* MGOSZ Lapja, XI: évf., 37. szám.
98. SZARVAS, J. (2004): Mikrobiológiai törzsgyűjtemények kialakításának módszerei és jelentősége, *Magyar Gombahíradó* MGOSZ Lapja, XII: évf., 40. szám.
99. SZILI, I. (1970): Szaporodás, szexualitás, öröklődés a gombáknál, különös tekintettel a termesztett laskagombára és csiperkére, *Mikológiai közlemények*, 1970. évi 1. szám.
100. SZILI, I., VÉSSEY, E., (1980) A csiperke és más gombák háztáji termesztése, Mezőgazdasági Kiadó Kft., Budapest.
101. SZILI, I. (1994): Gombatermesztés. Mezőgazda Kiadó, Budapest.
102. TASNÁDI, G. (1985) A magyarországi gombakutatás és gombatermesztés története, irodalmi áttekintés (Egyetemi Doktori értekezés) KEÉ Egyetem.
103. TANKSLEY, S. D., ORTON, T. J. (1983): Isozymes in plant genetics and breeding. Elsevier Amsterdam – Oxford – New York.
104. TAUTZ, D. (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA. *Nucleic Acids Res.* 17:6463-6471.

105. Van GRIENSVEN, L.J.L.D., (1988) The cultivation of Mushrooms, Mushroom Experimental Station, Horst, Hollandia
106. VASAS, G. (1993): A kalaposgombák nemzetségeinek jellemzése. - *Mikológiai Közlemények*. Különszám. pp. 3.
107. VETTER, J. (1981): Pleurotus fajok exocelluláris enzimjeinek összehasonlító vizsgálata.- *Mikológiai Közlemények*. pp. 35-45.
108. VETTER, J. (1982): Pleurotus fajok fehérjéinek gélelektroforetikus vizsgálata - *Mikológiai Közlemények*. pp. 19-33.
109. VETTER, J. (1984): Pleurotus fajok sejten kívüli proteáz termeléséről.- *Mikológiai Közlemények* pp. 103-114.
110. VETTER, J. (1985, a): A Pleurotus nemzetség mai rendszeréről és biokémiai hátteréről - *Mikológiai Közlemények*. pp. 25-40..
111. VETTER, J. (1985, b): Enzymproduktion von Pleurotus-Arten. – *Mycologia Helvetica* Vol. I. (6), pp. 461-471
112. VETTER, J. (1986): Extracellular cellulase and xylanase production of Pleurotus species. - *Acta Botanica Hungarica*. 32 (1-4), pp. 285-293.
113. VETTER, J. (1989): Az általános mikológia alapjai. Tankönyvkiadó, Budapest.
114. VETTER, J. (1992, a): Különböző lignocellulázok bontása a Pleurotus ostreatus termesztése során.- - *Mikológiai Közlemények*. pp. 7-26.
115. VETTER, J. (1992, b): Der Abbau verschiedener Lignozellulosen durch Anbau des Austernpilzes (Pleurotus ostreatus). – *Zeitschrift für Mycologie*, 58 (2), pp. 161-172.
116. VETTER, J. (1999): A laskagomba (*Pleurotus ostreatus*) beltartalmáról Magyar Gomba III.évf. 11.sz. 21-23.

117. VILGALYS, R., MONCALVO, I.-M., LION, S.-R., VOLOVSEK, M. (1996): Recent Advances in Molecular Systematics of the Genus *Pleurotus*. *Proceedings of the second International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products*, Penn State, p. 91-101.
118. VILGALYS, R. (1997): Biodiversity of the Oyster Mushroom *Pleurotus*, *Mushroom News* 1997. february p. 32-35.
119. WELSH, J. et al.. (1990): Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18, 7213-7218
120. WILLIAMS, J.A., KUBELILKI, K., LIVAT, K. , RAFALSKI, J., TINGEY, S. (1991): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research.* 22:6351-6535.
121. WOOD, T.M., CRUE, S.J. (1978): *Biochem. J.* 171. p. 61
122. XU, J., KERRIGAN, R.W., HORGAN, P.A., ADERSON, J.B., (1993): Localization of the mating type gene in *Agaricus bisporus*. . *Applied And Environmental Microbiology.* 59:3044-3049.
123. ZADRAZIL, F.(1974): The ecology and industrial production of *Pleurotus ostreatus*, *P. Florida*, *P. cornucopioides* and *P. Eryngii*. *Mushroom Science IX./ 1:* 621-652.

MELLÉKLETEK

M2.: TÁBLÁZATOK ÉS ÁBRÁK JEGYZÉKE

Táblázatok:

- 11.oldal: 1. táblázat: Intersterilitási csoportok összefoglalása
12. oldal: 2. táblázat: A *Pleurotus* nemzetség „intersteril csoportjai” és földrajzi elterjedései
19. oldal: 3. táblázat: Laskagomba fajok fontosabb tápanyagainak egyszerűsített, összefoglaló táblázata
24. oldal: 4. táblázat: Nyershamu-, nyersfehérje- és nyerszsír-tartalom alakulása a *Pleurotus ostreatus* termőtesteinek kalapjában és tönkjében (minden adat a szárazanyag %-ában)
36. oldal: 5. táblázat: Bipoláris heterotallizmus
- 37.oldal: 6. táblázat: Tetrapoláris heterotallizmus
- 54.oldal: 7. sz. táblázat: A keresztezéseknél alkalmazott szülői törzsek összefoglalása
- 61.oldal: 8. sz. táblázat: A genotípusok lehetséges megoszlása tipikus bifaktoriális heterotallikus bazidiomicéteszeknél (mint pl. a laskagomba).

Ábrák:

- 51.oldal: 1-2. ábra: A H7-es fajta termesztési kísérletei
- 51.oldal: 3-4. ábra: A G24-es fajta termesztési kísérletei
- 52.oldal: 5-6. ábra: A HK hibridek termesztési kísérletei
- 52.oldal: 7-8. ábra: Vad *Pleurotus ostreatus* var. *europae* törzsek termesztési kísérletei
- 53.oldal: 9-10. ábra: A vad *Pleurotus ostreatus* var. *florida* termesztési kísérletei
- 62.oldal: 11-12. ábra Valódi kompatibilitás
- 63.oldal: 13-14. ábra Teljes inkompabilitás;
15-16. ábra Az A faktor azonossága esetén jelentkező hemikompatibilitás
- 64.oldal: 17-18. ábra A B faktor azonossága esetén jelentkező hemikompatibilitás
- 66.oldal: 19. ábra. A természetes faanyagon történő fenntartás két típusa
20. ábra Átszövetett gabonaszemek, agardarabok és falapok krioprezerválása
- 70.oldal: 21. ábra. A csatok ellenőrzése mikroszkóppal
- 85.oldal: 22-23. ábra Termesztési tesztek laboratóriumi körülmények között
- 86.oldal: 24. ábra Steril szubsztrátumok átszövetése

	25. ábra Termesztés steril blokkokon
87.oldal:	26-27. ábra Nagyüzemi termesztési kísérletek
	28. ábra A Korona 312 hibrid vaskos termőcsokra
92.oldal:	29. ábra Az OpA 11 primerrel végzett RAPD-vizsgálat gélmintázata
93.oldal:	30. ábra Az OpA 11 primerrel végzett RAPD-analízis differenciáló sávjaira tervezett primerek tesztelése PCR-reakcióban
94.oldal:	31. ábra OpA 15 primerrel végzett RAPD-vizsgálat gélmintázata
95.oldal:	32. ábra Az OpA 15 primerrel végzett RAPD-analízis differenciáló sávjaira tervezett primerek tesztelése PCR-reakcióban
96.oldal	33. ábra Az OpA17 primerrel végzett RAPD-analízis gélmintázata
97.oldal:	34. ábra Az OpA 17 primerrel végzett RAPD-analízis differenciáló sávjaira tervezett primerek tesztelése PCR-reakcióban
98.oldal:	35. ábra. OpA17 primerrel végzett RAPD-analízis gélmintázata, amelyből egy újabb differenciáló sávot izoláltunk (nyíllal jelzett band)
99.oldal:	36. ábra. Az OpA 17 primerrel végzett RAPD-analízis újabb differenciáló sávjaira tervezett primerek tesztelése PCR-reakcióban
100.oldal:	37. ábra. Az OpA4391 primerrel végzett RAPD-analízis gélmintázata
101.oldal	38. ábra. Az OpA 4391 primerrel végzett RAPD-analízis differenciáló sávjaira tervezett primerek tesztelése PCR-reakcióban
102.oldal:	39. ábra. Az OpA01 primerrel végzett RAPD-analízis gélmintázata
103.oldal	40. ábra. Az OpA 01 primerrel végzett RAPD-analízis differenciáló sávjaira tervezett primerek tesztelése PCR-reakcióban
104.oldal:	41. ábra. Az OpA20 primerrel végzett RAPD-analízis gélmintázata
105.oldal:	42. ábra. Az OpA 20 primerrel végzett RAPD-analízis differenciáló sávjaira tervezett primerek tesztelése PCR-reakcióban

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt köszönetet szeretnék mondani témavezetőmnek, Dr Rimóczi Imrének, aki lehetővé tette, hogy a doktori program keretein belül továbbfejleszthessem szaktudásomat és kifejthessem kutatási tevékenységemet. Köszönöm szakmai segítségét, vezetői munkáját és nem utolsó sorban erkölcsi támogatását.

Hálával tartozom Dr. Balázs Sándornak és Dr. Györfi Júliának, akik a magyar gombaipar szellemi és szakmai támogatóiként a legtöbbet segítették, hogy az egyetemi kutatói hátterem megteremtődhessen és fejlődhessen. Határozott fellépéseikkel igyekeztek a munkám lendületét fokozni, jó érzékkel tudták mindig lelkesedésemet fenntartani, a munkámban irányt mutatni. Köszönet a baráti, serkentő szavakért.

Külön köszönöm a Korona Gombaipari Egyesülés elnökének, Rácz Józsefnek, hogy termelői és vezetői feladataim mellett biztosította a szükséges időt a PhD felkészülésemhez, kutatásaimhoz. Nagyra értékelem, hogy a termelő cégei által finanszírozott gombakutató laboratóriumot létrehozta, ahol minden eszközfeltétel biztosított volt a nemesítési munkámhoz.

Hasonlóképpen nagyra értékelem a Korona Fajtakísérleti és Molekuláris Biológiai Laboratórium dolgozóinak a munkáját és áldozatkész segítségét, közöttük is Szarvas Józsefét, akinek kiemelkedő része volt a molekuláris biológiai módszereken alapuló fajta-elkülönítési technológia megalapozásában.

Köszönöm Dr. Vetter Jánosnak a mikológia és gombaélettan területén nyújtott meghatározó útmutatását, erkölcsi támogatását.

Köszönöm a Budapesti Corvinus Egyetem Élettudományi Területi Doktori Tanácsának a munkáját, adminisztrációs tevékenységeit.

Végezetül értekezésemet családomnak, feleségemnek és fiaimnak ajánlom, akik türelme és szeretete nélkül nem készült volna el a dolgozatom. Köszönet feleségemnek, Molnár Krisztinának és fiaimnak, Mártonnak, Mátyásnak és Gergelynek.