

Vizsgálati módszer

1. Mikroszkópos faj meghatározási módszer részletes leírása

A. *Tuber aestivum*

Szükséges tárgyi feltételek: sztereomikroszkóp, nagyméretű Petri-csésze, kutató mikroszkóp tárgylemezzel és fedőlemezzel, mikroszkóphoz rögzíthető kamera, csipeszek, ollók, mintavevő edény (Eppendorf) a DNS-mintának,

A. *Tuber aestivum* mikroszkópos faj meghatározási módszere

1. A sztereomikroszkóppal történő fajmeghatározás a következő határozóbélyegek segítségével történik. A *Tuber aestivummal* mikorrhizált gyökérsúcsokra jellemző:
 - a) A gyökérvégződés vastagabbak és a végük tompább, mint a nem mikorrhizált gyökereké.
 - b) A nem elágazó gyökérvégzódéseik egyenesek, görbeség és csavarodás nem figyelhető meg.
 - c) A mikorrhizált gyökérvégék vagy nem ágaznak el, vagy elágazásuk piramis/fenyőszerű (ld. Agerer leírás)
 - d) A fiatal gombaköpeny középbarna, a mikorrhizált vég okkersárga színű, az idősebb, sokszor cisztidia nélküli részek színe sötétbarna,
 - e) A köpenyből kiágazó cisztidiumok sűrűek, hosszúak (110-600 μm) és erősen hullámosak, nem elágazóak.
2. A szarvasgomba (*Tuber*) fajok pontos elkülönítéséhez a köpeny és a cisztidiumok vizsgálatát is el kell végezni, amelyhez kutató mikroszkóp szükséges.

A köpeny felszínének a struktúrájának vizsgálatához a gombaköpenyt le kell fejteni gyökérvégződésről. A mikorrhiza rendszerről csipesszel leválasztott végződést egy csepp vízzel ellátott tárgylemezre helyezük, vékony bonctűvel lefejtjük a köpenyt a gyökérsúcsról. Ezután a köpenydarabkát fedőlemezzel lefedjük. A tárgylemezt sztereomikroszkóp alá helyezük, a lehető legnagyobb nagyításon a mikrométer csavar mozgásával megfigyelhetjük a köpeny felszínének felépítését. A következő határozóbélyegek megléte feltétele a *Tuber aestivum* fajazonosításának:

- a) A köpeny pszeudoparenchimatikus szerkezetű.
- b) A köpeny felszínét anguláris sejtek alkotják egy vagy két rétegben
- c) A cisztidiumok ár alakúak, hosszúak 110-600 μm
- d) A cisztidiumok nem elágazóak.

1. Molekuláris genetikai vizsgálatok markerek segítségével

A DNS kinyerése száraz vagy friss termőtestből, a QIAGEN cég DNeasy plant mini kit használatával történik, a gyártó utasításait követve. A gyufahegynyi termőtest darabokat és a kezdő puffert tartalmazó Eppendorf-csöveket folyékony nitrogénbe merítjük, teljes átfagyásig, majd a 65°C-ra állított termosztátba tesszük 2-3 percig. A folyamatot háromszor meg kell ismételni, majd mikro-mozsárral a termőtest darabokat mechanikai roncsolása történik Retch malom segítségével.

A molekuláris vizsgálat esetében a riboszómális RNS kódoló DNS szakasz internal transcribed spacer (nrITS) régióját vizsgáljuk. A ehhez kapcsolódó primerek a következők: ITS1/ITS1F (forward) és ITS4 (reverse) névvel jelölt primerek.

1. A *Tuber aestivum* fajazonosításához a konzervatív 28S RNS gén (Large Subunit, LSU) és/vagy a Proteinkináz-C (PKC) alegységét használjuk.

A PCR reakcióhoz az UncI. – UncII. primerpárt használjuk

Az amplifikációhoz a Techne cég TC-512 típusú PCR (polimer-lánreakció) készülékét alkalmazzuk. A PCR elegy végső térfogata 50 µl a lent leírt összetétellel. A leggyakrabban alkalmazott PCR elegy összetétele (Kiindulási koncentráció térfogat 1 mintára (50 µl)):

Reakció termék kimutatása:

A PCR reakció sikerességét az amplifikált reakciótermékek 1% -os agaróz gélen történő megfuttatásával és annak etídium-bromidos festésével teszteljük TBE (Trisz-boric-EDTA pH:8,2-8,4) puffer használatával. Az elektroforézishez szükséges egyenáramot tápegység biztosítja. Agaróz gélelektroforézisnél 100 V - 120 V feszültséget és 60-80 mA áramerősséget alkalmazunk. Általunk használt 120 V feszültségen a futtatási idő- az agaróz gél nagyságától függően -80-90 perc.

A sikeres PCR termékről fénykép készül, amely dokumentálás része.