

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**AZ AFLATOXIN KÉPZŐDÉS VIZSGÁLATA
MEZŐGAZDASÁGI TERMÉKEKEN**

Kovács Szilvia

Témavezető:

Dr. Pusztahelyi Tünde
egyetemi docens



DEBRECENI EGYETEM

Kerpely Kálmán Doktori Iskola

Debrecen, 2020

1. A DOKTORI ÉRTEKEZÉS ELŐZMÉNYEI ÉS CÉLKITŰZÉSEI

A mikotoxinokat az aflatoxin tartalmú pulykatáp okozta tömeges pulykaelhalás kapcsán fedezték fel az 1960-as években. 1974-ben 100 ember halt meg aflatoxin mérgezésben, míg 2004-ben Kenyában 125 ember halálát okozta az aflatoxin tartalmú élelmiszer elfogyasztása következtében kialakult akut aflatoxikózis (Probst et al., 2007). A mikotoxinok közül az aflatoxinokat az IARC nemzetközi rákkutató ügynökség az 1. csoportba, vagyis a bizonyítottan humán rákkeltő hatású vegyületek csoportjába osztotta (2012). A gomba optimális fejlődésének feltétele a 36-38 °C hőmérséklet és a minimum 85 %-os páratartalom (Diener et al., 1987), így eddig elsősorban a melegebb, nedvesebb éghajlaton volt jellemző a toxin szennyezettség pl. Afrikában, Indiában, de sajnos a klímaváltozás hatására már egyre több országban, köztük Magyarországon is megjelent ez a penészgomba, és az általa termelt toxin. 2007-ben és 2012-ben a magyar gabonában magasabb aflatoxin-szennyezettséget mutattak ki a hazai kutatók, míg 2017-ben még nagyobb szintet ért el az *A. flavus* fertőzöttség (Szabó et al., 2018). Battilani és munkatársai (2016) szerint, ha az átlaghőmérséklet 2°C-kal emelkedik, akkor az aflatoxin szennyezettség jelentősen növekedni fog a Franciaországhoz közel eső területeken, a Kárpát-medencében, valamint a Balkáni térségben, viszont, ha az átlaghőmérséklet 5 °C-kal emelkedik, akkor Európa teljes területe, kivéve a Skandináv részeket, aflatoxinnal erősen szennyezett lesz. Ez is azt igazolja, hogy az aflatoxin szennyezettség kérdése, valamint az ellene való védekezés aktuális és igen komoly problémát jelent.

A természetben előforduló *A. flavus* törzsek kb. 60 %-a nem termel aflatoxint (Horn et al., 1999). Ezek az atoxinogén törzsek, a toxinogén *A. flavus* gombákkal való kompetíciójuk révén hatékonyan alkalmazhatóak szántóföldi körülmények között, vagy a betakarítás után is a kukorica, gyapot, földimogyoró aflatoxintartalmának a csökkentésére. Az Amerikai Egyesült Államokban már kereskedelmi forgalomba is hoztak biopeszticid készítményeket Afla-Guard (kukoricára és földimogyoróra) valamint *A. flavus* AF36 (pisztáciára, kukoricára és gyapotmagra) néven, amelyek képesek csökkenteni szántóföldön alkalmazva a növények aflatoxin szennyezettségét (Brown et al., 1991; Abbas et al., 2011). Ezeknek a termékeknek az összetevői endemikus *A. flavus* törzsek, azon a területen, ahol alkalmazzák őket (Mauro et al., 2015).

Céljaim között szerepelt, hogy olyan aflatoxint nem termelő *A. flavus*-t izoláljak, amely Magyarországon endemikus, megfelelő ellenállóképességgel rendelkezik a különböző stresszhatásokkal szemben, valamint más szekunder metabolitot nem termel, és így

potenciálisan alkalmazható az aflatoxin szennyezettség csökkentésére kukoricában. Valószínűleg a toxintermelő képesség elvesztése a gombában valamilyen mutáció eredménye (Adhikari et al., 2016), viszont fontos kizárnunk az atoxinogén *A. flavus* törzs biokontrollként történő alkalmazása előtt az egyéb toxintermelő képességet, hiszen ez is egészségügyi kockázatot jelenthet. Kutatásom célja:

1. Takarmányokról, mezőgazdasági termékekről, alapanyagokról aflatoxint nem termelő és termelő *A. flavus* izolátumokat gyűjtsek és identifikáljak PCR módszerrel
2. Vizsgáljam a referenciaként szolgáló, valamint az izolátum *A. flavus* törzsek stressztűrő képességét, növekedését, aflatoxin termelő képességét különböző táptalajokon
3. Vizsgáljam az izolátumok és a referencia törzs növekedését különböző kukoricahibrideken
4. Valamint a szekunder metabolit termelő képességüket kukoricaszemen.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1 Törzsek izolálása

72 db *Aspergillus sp.* izolátumot gyűjtöttünk össze takarmány alapanyagokról 2013-2014-ben a Debreceni Egyetem MÉK Agrárműszerközpontba beérkező mintákról, kontroll törzsként az *A. flavus* NRRL 11611, NCAIM F 00952 törzset használtuk fel, ami a Szent István Egyetem Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményéből származik.

2.2 Nukleinsav alapú azonosítás

MagNA Lyser Green (Roche) gyöngyök segítségével tártam fel a gombasejteket. A DNS izolálást a Nucleospin Plant II (Macherey-Nagel) kit segítségével végeztük el, a Genomic DNA from Plant leírás szerint.

Az *A. flavus* aflatoxin képzésért felelős gének közül hármat egy multiplex PCR elvégzésével azonosítottam. Ebben a PCR-ben három primerpárt alkalmaztam, amelyeknek a szekvenciája a következő volt (Varga et al., 2011):

nor1: 5-ACC GCT ACG CCGCA CTC TCG GCA-3

nor2: 5-GTT GGC CGC CAG CTT CGA CAC AGC-3

aflR-R: 5-TGG KGC CGA CTC GAG GAA YGG GT-3

aflR-F: 5-GGG ATA GCT GTA CGA GTT GTG CCA-3

omt1: 5-GTG GAC GGA CCT AGT CCG ACA TCA C-3

omt2: 5-GTC GGC GCC ACG CAC TGG GTT GGG G-3

A PCR reakcióhoz Phusion High-Fidelity Kit-et (Thermo Scientific) használtam.

Az izolátumok faji meghatározásához PCR segítségével az ITS1-ITS4 és cmd5-cmd6 (kalmodulin) DNS szakaszt szaporítottam fel (White et al., 1990; Hong et al., 2006).

Felhasznált primerek:

ITS1: 5-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3

ITS4: 5-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3

cmd5: 5-GTC TCC GAG TAC AAG GAG GC-3

cmd6: 5-TCG CCG ATA GAG GTC ATA ACG TG-3

A PCR reakcióhoz szintén Phusion High-Fidelity Kit-et (Thermo Scientific) használtunk. Az ITS1 és ITS4 primerek terméke esetében NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) kit segítségével történő PCR termék tisztítása után a kapott DNS szakaszokat

szekvenáltattam (BIOMI Kft.). A kapott adatokat MEGA 7 program segítségével elemeztem, és a GenBank (Benson et al., 2013) adatbázisával hasonlítottam össze.

2.3 Eltérő tenyésztési körülmények, stresszhatás vizsgálata

A referencia *A. flavus* törzs növekedését, aflatoxin B1 termelését vizsgáltam eltérő táptalajokon:

- eltérő nyerszsír tartalmú kukorica agarok
- malátás agar
- kukorica agar + szervetlen sók
- kukorica agar + glükóz
- Czapek- Dox agar

Az eredményeket páros t-próba segítségével, Microsoft Excel szoftver használatával elemeztem ($P < 0,05$ szignifikanciaszint mellett). A nyerszsír tartalom, a flavonoid, polifenol tartalom valamint a mért aflatoxin B1 koncentrációk közötti összefüggést korrelációanalízissel elemeztem, Microsoft Excel szoftver használatával.

Vizsgáltam a referenciatorzs morfológiai tulajdonságait és aflatoxin B1 produkcióját malátás agaron, a leoltás során eltérő mennyiségű spórát alkalmazva. Az eredményeket ez esetben is páros t-próba segítségével, Microsoft Excel szoftver használatával elemeztem ($P < 0,05$ szignifikanciaszint mellett).

A stresszvizsgálatok során az izolátumok és a referencia *A. flavus* NRRL11611 törzs növekedését, szklerócium képződését, a spóráképzést, valamint a pigmentációt vizsgáltam malátás agar és kukorica-kivonatos agar táptalajon. A stresszvizsgálatokhoz 1, 1,5, 2 és 2,5 M koncentrációjú NaCl-t; 0,05, 0,1, 0,5 és 0,75 g/l koncentrációjú SDS-t (sodium-dodecyl-sulfate) használtunk.

A tenyésztés minden esetben, sötétben, 30 °C-on, 5-7 napig történt.

Tápközegek összetételének analitikai vizsgálata:

- nyerszsírtartalom meghatározás: az MSZ EN ISO 11085: 2015 szabvány 8.3 szakasza szerint
- Összes fenolos vegyületek meghatározása: Folin-Ciocalteu módszerrel határoztuk meg és az eredményt galluszsav ekvivalensként adtam meg, Kaur és Kapoor (2002) alapján

- Összflavonoid meghatározás: Chang és munkatársai (2002) alapján határoztuk meg és katechin ekvivalensként adtam meg az eredményt
- D-glükóztartalom meghatározása: D-glucose Assay Kit (Megazyme, GOPOD-Format) kit segítségével
- Nitrogén-tartalom meghatározása: MSZ EN ISO 5983-2: 2009 szabvány alapján

2.4 Szemeskukorica oltása *Aspergillus flavus*-szal *in vitro* aflatoxin B1 és szekunder metabolitképződés vizsgálatához

Vizsgáltam az aflatoxin és szekunder metabolit termelést kukoricaszemen, amelyhez 50 g kukoricát 70 %-os etanollal fertőtlenítettem le és átmostam desztillált vízzel, majd steril Erlenmeyer lombikba helyeztem és leoltottam 500µl 10⁶/ml spóramennyiséggel. Az inkubáció 7 napig, 30 °C-on, sötétben történt.

2.5 Szekunder metabolitok HPLC analízise

2.5.1 Mintaelőkészítés HPLC méréshez kukoricaszemből

25 g mintát mértem be, majd ehhez 2,5 g NaCl- t és 50 ml 80%-os metanolt adtam. Blender (Commercial Blender, Waring) segítségével homogenizáltam magas fordulattal 3 percig. Majd átszűrtem a mintát redős szűrőpapír segítségével. Az átszűrt mintából 10 ml-t kivettem és 40 ml desztillált vízzel hígítottam fel. Mágneses keverőn történő kevertetés után 10 ml mintát átengedtem Afla-BTM immunaffin oszlopon (Romer), 1-2 csepp/perc sebességgel. Ezután átmostam az oszlopot 10 ml desztillált vízzel. Ezt követően 5 ml HPLC tisztaságú metanollal (Sigma-Aldrich) eluáltam az oszlopon megkötött aflatoxin B1-et. Majd bepároltam a mintát Büchi Rotavapor R114 készülékben.

2.5.2 Mintaelőkészítés HPLC-MS, valamint az agarból történő HPLC-méréshez

A gombát a Petri csészében lévő agarlemezrel együtt Stomacher-zacskóba helyeztem, majd 10 ml kloroformot adtam hozzá, és a mintát Masticator IUL Instruments Stomacher homogenizátor készülékkel homogenizáltam 2 percig. Aztán ismét 10 ml kloroformot adtam hozzá, majd ismét Stomacher segítségével homogenizáltam 1 percig. A mintát átszűrtem

szűrőpapíron egy gömblombikba és ezután Büchi Rotavapor R114 készülékben bepároltam, vákuum mellett, 50 °C-on. Ezt követően hozzáadtam a mobil fázist, mely MeOH: H₂O 45:55 arányú elegy volt, amelyből 2 ml-t adtam a bepárolt mintához. Majd a mintát szűrtem fecskendőszűrő segítségével (Millex-GV 0,22 µm Filter, Merck). A HPLC-MS méréshez a 2.4 fejezetben leírt módon leoltott és inkubált kukoricát darálás után kezeltem ugyanígy (Fente et al., 2001).

2.5.3 HPLC mérés

Mintavevő: Merck Hitachi AS-4000 Intelligent Autosampler

Pumpa: Merck Hitachi L-6200A Intelligent pump (áramlás sebesség: 1ml/min)

Detektor: Fluoreszcens ex360nm, em440nm

Kolonna: Genesis C18, 4,6x150 mm (4µm)

Mintahurok térfogata: 20 µl

Mobil fázis: metanol: víz (45:55) izokratikus

2.5.4 HPLC-MS mérés

A méréseket a Dr. Nagy Lajos (Debreceni Egyetem TEK TTK Kémiai Intézet Alkalmazott Kémiai Tanszék) végezte.

A HPLC-MS berendezés egy Waters Separations modult (2695), Waters 2996 Photodiode Array detektort tartalmazott. A metabolitokat Zorbax SB-C18, 4,6x75 mm, 3,5 µm oszlopon szeparáltuk. A folyási sebesség 0,5 ml min⁻¹ volt, az elúciós idő 60 min és a hőmérséklet 40°C. Az UV detektálás 225 nm-en történt. A metanol:H₂O gradienst alkalmaztak. A tömegspektum felvétele egy Atmospheric Pressure Photoionization (APPI) ion forrással felszerelt Bruker microTOF-Q tömegspektrométerrel történt. Az ionforrás hőmérséklete 390°C volt. Bruker Daltonics DataAnalysis szoftver segítségével értékeltük ki a kapott eredményeket.

HPLC-MS eredményeket analízisekor számos szekunder metabolit azonosítását végeztem el *Uka és munkatársai* (2017) publikációja alapján.

2.6 Kompetíciós teszt

50 g MV251 kukoricahibrid szemeket 500 ml-es steril Erlenmeyer lombikba mértem. Lemostam a kukoricaszemeket 70%-os HYPO-val, majd steril desztillált vízzel, aztán pedig

70%-os etanol oldattal, majd pedig ismét steril desztillált vízzel. Ezután 1 ml 10^6 spóramennyiséggel oltottam le a kukoricát, 100% toxinogén; 100% aflatoxint nem termelő; 50%:50% toxinogén: aflatoxint nem termelő; 30%:70% toxinogén: aflatoxint nem termelő; 70%:30% toxinogén: aflatoxint nem termelő *A. flavus* izolátumok arányában. Majd sötétben inkubáltam 7 napig 30 °C-on. Az inkubációs idő letelte után 48 óráig 60 °C-ra helyeztem a tenyészeteket, majd a szemek darálása után megmértem az oltott kukorica aflatoxin B1 tartalmát HPLC-vel. Az eredményeket páros t-próba segítségével, Microsoft Excel szoftver használatával elemeztem ($P < 0,05$ szignifikanciaszint mellett).

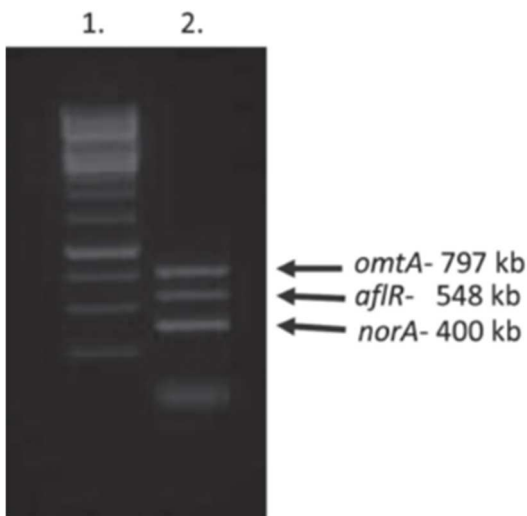
2.7 Szemes kukorica oltása *Aspergillus flavus*-szal a kukorica hibridek *in vitro* rezisztencia vizsgálatához

Az *A. flavus* NRRL 11611 törzset, valamint egy atoxinogén és egy toxinogén *A. flavus* izolátumot 6 különböző kukoricahibrid magra oltottam le. Petri csészére helyeztem 10-10 db 70%-os etanollal lefertőtlenített, majd desztillált vízzel lemosott kukoricaszemet, és leoltottam szemenként 10 μ l 10^6 /ml spóramennyiségű spórával, 3 ismétlésben. Az inkubáció 7 napig, 30 °C-on, sötétben történt (Luna-López et al., 2013; Rajasekaran et al., 2013). Vizsgáltam a gomba növekedését, kolonizációs képességét a kukoricahibrideken. Az eredményeket páros t-próba segítségével, Microsoft Excel szoftver használatával elemeztem ($P < 0,5$ szignifikanciaszint mellett).

3. EREDMÉNYEK

3.1 Az izolátumok nukleinsav alapú vizsgálata

A törzseket 2014-2015 között gyűjtöttem a Debreceni Egyetem MÉK Agrárműszerközpontba beérkező takarmányokból, illetve alapanyagokból. Az *Aspergillus* nemzetséget a többi penészgombától hagyományos morfológiai bélyegek alapján különítettem el maláta agaron (Diba et al., 2007; Varga et al., 2011). Elsősorban a zöldes-sárgás konídiumokkal rendelkező, esetenként szkleróciumot produkáló gombákat választottam ki, amelyek mikroszkópi vizsgálatok során gömbölyű konidiofórok és egy vagy két sorban lévő konídiumokat mutattak. Összesen 72 db izolátum vizsgálatára került sor, amelyek kukoricáról, kukorica alapú takarmányokról, búzáról, illetve búzalisztekről származtak. Ezután multiplex PCR segítségével vizsgáltam az aflatoxin termelésért felelős génklaszter három génjének, az *omtA*, *aflR* és a *norA* gének potenciális jelenlétét (Geisen, 1996; Varga et al., 2011) (1. ábra).



1. ábra Multiplex PCR jellegzetes eredménye a három génszakasz amplifikációja esetén. 1. 1 kb DNS létra, 2. a multiplex PCR eredménye.

A vizsgálataim során az izolált 72 *Aspergillus* izolátumból 33 tartalmazta a három aflatoxin génklaszterben lévő vizsgált gén valamelyikét, illetve ezen gombák közül 17 mindhárom gént tartalmazta. A 33 izolátum közül mindössze nyolc termelt aflatoxin B1-et maláta agaron. A

toxintermelő izolátumok közül hatban az *aflR*, *norA* és *omtA* gének együttes jelenléte kimutatható volt, viszont az egyik izolátumban az *omtA*, a másikban az *aflR* és az *omtA* nem volt felszaporítható, ennek ellenére kimutatható aflatoxin B1 termelést tapasztaltam, ami a gének módosult szekvenciájára utalt. 32 izolátum esetében *aflR* pozitivitást mutattam ki, de ennek ellenére ezek közül csak hét termelt aflatoxin B1-et. Ezeknél az izolátumoknál valószínűleg az aflatoxin B1 termelésért felelős génklaszter olyan mértékben módosult, vagy olyan gének sérültek, mutálódtak, hogy ezáltal a gomba nem képes aflatoxin B1 produkcióra.

Az ITS1-4 primerpár közötti DNS szakaszok szekvenáltatása során kapott eredményekből kiderült, hogy feltehetőleg 33 izolátum közül 22 *A. flavus*, négy izolátum *A. tritici* vagy a korábban szinonímjaként használt *A. candidus*, illetve egy izolátum *A. cristatus* vagy *A. amstelodami*. De a pontos faji azonosításhoz további vizsgálatok szükségesek. Az *A. amstelodami* esetében kimutatták, hogy képes az aflatoxin bioszintézis köztes termékének, a sterigmatocisztinnek a produkciójára (Bukelskienė et al., 2006). Ennél az izolátumnál a vizsgálataim alapján mindhárom, aflatoxin szintézisért felelős génklaszterbe tartozó gén jelenlétét ki tudtam mutatni.

Az ITS vizsgálat alapján *A. flavus*nak bizonyult törzsek közül kettőt kiválasztottam, egy aflatoxin B1 toxint termelőt és egy nem termelőt, valamint a referenciatörzset, és ezekkel a kalmodulin primerpárral végzett PCR reakciók során kapott DNS-szakaszokat szekvenáltattam. A szekvenálás bizonyította, hogy az általam azonosított törzsek is *A. flavus* fajhoz tartoznak.

Eredményeim alapján állíthatjuk, hogy míg az ITS szekvencia és a kalmodulin gén szekvencia a faji hovatartozás megállapításában, az aflatoxin génklaszterre kapott PCR eredmények pedig a potenciális toxinképzés megállapításában segítenek, egyik módszer sem ad segítséget az atoxinogén törzsek kiválasztásában. Ehhez a toxintermelés indukciója melletti toxin mérés szükséges.

A kutatásaim alapján az izolátumaink több mint 40%-a potenciálisan aflatoxin termelő. Ezek a gének kedvező környezeti hatásokra expresszáldhatnak, és az izolátumok toxint termelhetnek, így jelentős gazdasági, humánegészségügyi károkat okozva a mezőgazdaság számára.

1. táblázat *Aspergillus* izolátumokból kimutatott *aflR*, *norA* és *omtA* gének előfordulásának összegzése (Kovács et al., 2017)

	<i>aflR</i> <i>norA</i> <i>omtA</i>	<i>aflR</i>	<i>norA</i> <i>aflR</i>	<i>aflR</i> <i>omtA</i>	<i>norA</i>
<i>A. flavus</i> (n=22)	13	6	2	-	1
nem meghatározott (n=11)	4	4	2	1	-
teljes (n= 33)	17 (51,5%)	10 (30,3%)	4 (12,1%)	1	1

3.2 Eltérő tenyésztési körülmények, stressz vizsgálata

3.2.1 *Aspergillus flavus* NRRL 11611 törzs vizsgálata különböző táptalajokon

Vizsgáltam a referenciaként szolgáló *A. flavus* NRRL 11611 aflatoxin B1 termelését, a szklerócium produkcióját, illetve a micélium növekedésének mértékét malátás táptalajon, valamint kukoricaagaron. A kukoricaagar eltérő zsírtartalmú (1,7-7,2 m/m%) kukoricalisztből, ill. kukoricadarából készült, amelyhez glükózt, illetőleg sókat is adtam. A kukoricaagart azért alkalmaztam, mert jól reprezentálja a természetes környezetet. A Kjeldahl módszerrel mért nitrogén tartalom a 4,05 és 7,2 (m/m) % nyerszsír tartalmú táptalajok esetében 0,03± 0,01 (m/m)% (n=3) és a másik két alacsonyabb nyerszsírt tartalmazó kukoricaagar esetében 0,01 ± 0,01 (m/m)% (n=3) volt, tehát a módszer kimutatási határára esett. Az összes kukoricaagar esetében a szabad D-glükóz-tartalom a kimutatási határ (0,001 m/m%) alatt volt. A polifenol tartalom elég széles határok között mozgott a vizsgált négy kukoricaagar esetében (5,74-35,45 ± 0,5 mg GA ekvivalens /100 g, n=5), míg a flavonoid-tartalom szűkebb tartományba esett (3,24-7,16 ± 0,3 mg CE ekvivalens /100 g, n=5), és nem volt szignifikáns különbség a 2,6 és az 1,7 % nyerszsírt-tartalmazó kukoricaagar flavonoid tartalma esetében (P<0,05).

Azt tapasztaltam, hogy az 1,7 (m/m) % és 2,6 (m/m) % nyerszsírt-tartalmazó kukoricaagar esetében, amelyben a nitrogénforrás szerves eredetű, valamint a szénforrás poliszacharid az aflatoxin B1 termelés nem volt mérhető, viszont a magasabb zsírtartalmú tápközeg esetében, a növekedés gyengébb volt, valamint szklerócium sem képződött. Ugyanakkor az alacsonyabb zsírtartalmú kukoricaagart alkalmazva erőteljesebb volt a micélium növekedés, és volt szklerócium képződés is. A magasabb nyerszsír-tartalmú (4,05 és 7,2 m/m %) kukoricaagart alkalmazva tápközegként, ahol szintén szerves nitrogénforrás és poliszacharid szénforrás volt jelen, már volt aflatoxin B1 termelés, de a két táptalajon termelt aflatoxin B1 koncentrációk nem mutattak szignifikáns különbséget. A micéliumok növekedése is átlagos volt a magasabb

nyerszísírtartalmú tápközegen, viszont a szklerócium képződés a legmagasabb nyerszísírtartalmú kukoricaagaron volt a legerőteljesebb. A micélium növekedés, valamint az aflatoxin B1 termelődés a malátás táptalajon volt maximális, míg 2,6 (m/m)% nyerszísírtartalmú kukorica-glükóz agaron szintén megnőtt az aflatoxin B1 termelés és a szklerócium produkció, viszont a vegetatív növekedés csak kismértékű volt. A 2,6 (m/m)% nyerszísírtartalmú kukorica-szervetlen sókat tartalmazó agaron nem volt aflatoxin B1 termelődés, a micélium növekedés erőteljesebb volt, és itt volt a legnagyobb mértékű szklerócium produkció (2. táblázat). Tehát összességében megállapítható, hogy a monoszacharidok elősegítik az aflatoxinképződést, valamint a nagyobb mennyiségű zsírtartalom is, de ezeknek sokkal kisebb a jelentősége, mint a szénforrásnak. A vegetatív növekedést legjobban a malátás táptalaj segítette, közepes növekedést a legkisebb és a két legnagyobb zsírtartalmú kukoricaagaron tapasztaltam. A legnagyobb szintű szklerócium produkciót a szervetlen nitrogénforrás alkalmazásával tudtam elérni, de a legmagasabb zsírtartalmú kukoricaagar alkalmazásakor is jelentős szklerócium képződést tapasztaltam. Érdekes, hogy az intenzív szklerócium növekedés mellett nem vagy alig volt mérhető aflatoxin B1 termelés, ez is azt bizonyítja, hogy a szervetlen nitrogén forrás, a nitrát gátolja az aflatoxin termelést, de a szklerócium fejlődést nem (Price et al., 2005).

A magasabb zsírtartalmú hibridek előnyösebbek az aflatoxin produkció szempontjából, még akkor is, ha magas az antioxidáns tartalmuk.

2. táblázat Az eltérő összetételű táptalajok hatása az *Aspergillus flavus* micélium növekedésére, mikotoxin termelésére és a szklerócium képzésére. (n=3, #SD < 20 %).

Táptalaj	Szénforrás	Nitrogén forrás	Micélium növekedés ^{##}	AF B1 (ng/ml) [#]	Szklerócium képződés ^{###}
MA*	glükóz és más szerves	szerves	++++	3620	-
KDA**1.7	poliszacharid	szerves	+++	-	+
KDA 2.6	poliszacharid	szerves	+	-	-
KDA 2.6+G***	glükóz és poliszacharid	szerves	+	11,90	+
KDA 2.6+S****	poliszacharid	szerves és NaNO ₃	++	-	+++
KDA 4.05	poliszacharid	szerves	+++	1,115	+
KDA 7.2	poliszacharid	szerves	+++	1,060	++

*MA: malátás agar;

**KDA: kukoricadara agar eltérő nyerszísírtartalommal;

***G: glükóz;

****S: só

Micélium növekedés: +: maximum 25%; ++: 25-50%; +++: 50-75%; ++++: 75-100% -os Petri-csésze lefedettség

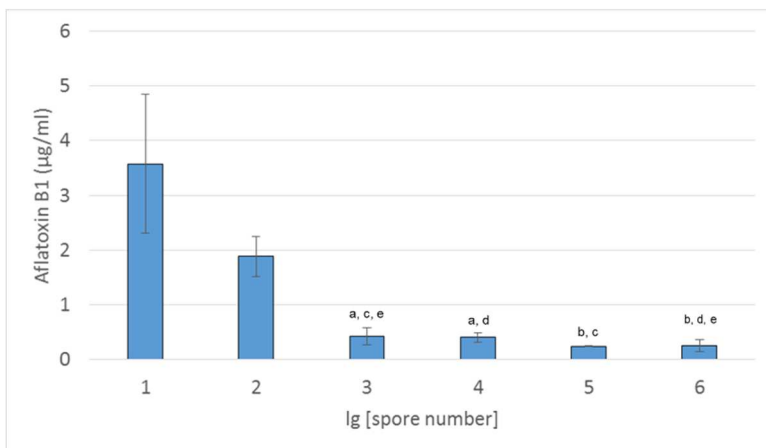
Szklerócium képződés: +: maximum 10 darab szklerócium; ++: 10-100 darab szklerócium; +++: minimum 100 darab szklerócium

Az emelkedett nyerszsír tartalom mellett, a polifenol- és flavonoid-tartalom emelkedése nem tudta gátolni az aflatoxin B1 termelését.

A korrelációanalízis során azt az eredményt kaptam, hogy minden változó között szoros az összefüggés, a legszorosabb összefüggést a táptalaj zsír és flavonoid (0,947) valamint a zsír és a termelt aflatoxin B1 tartalom között van (0,799).

3.2.2 A táptalajok leoltáshoz alkalmazott spóramennyiség és az aflatoxin B1 képződés összefüggése

Mértem, hogy malátás, illetve kukorica agar táptalajon, hogyan változik a termelt aflatoxin B1 mennyisége a leoltáshoz alkalmazott eltérő spóramennyiség függvényében. A kísérlethez a referencia *A. flavus* NRRL 11611 törzset használtam fel. Azt tapasztaltam, hogy a legkisebb, 100 μ l 10¹/ml spóramennyiségnél volt a legnagyobb mértékű az aflatoxin B1 termelés a malátás táptalajon, bár a nagyobb spóramennyiségek esetén (10³, 10⁴, 10⁵) nem volt szignifikáns a különbség a termelt aflatoxin B1 koncentrációk között (P<0,05). A 2,6 (m/m)% zsírtartalmú kukorica agaron különböző spórakoncentrációt alkalmazva sem volt mérhető aflatoxin B1 termelés.



2. ábra Az aflatoxin B1 mennyiségének változása az *Aspergillus flavus* NRRL 11611 spóraszám függvényében malátás táptalajon (n=3, SD = ± 10 %). Azonos betűjelzés a nem szignifikáns eltérést jelöli P<0,05 szinten.

3.2.3 *Aspergillus flavus* izolátumok és a referencia törzs stresszrezisztencia vizsgálata kukorica agaron

A referencia törzs esetében kukorica agaron az ozmotikus stressz elsősorban morfológiai változásokat, a pigmentáltság megváltozását, valamint a spóráképződést befolyásolta. Szklerócium minden általam alkalmazott NaCl koncentrációnál képződött, ami biztosítja a kedvezőtlen környezeti viszonyok közötti túlélést a gomba számára. Az izolátumok majdnem felénél szintén pigmentáció változást okozott a gombahifákban az ozmotikus stressz, két izolátum esetében semmilyen morfológiai változást nem tapasztaltunk, 8 izolátumnál már a kisebb, míg 17 izolátumnál csak a magasabb NaCl koncentráció gátolta a vegetatív növekedést vagy a spóráképződést kukorica agaron.

A referencia törzs kukorica agaron már kis koncentrációban alkalmazott SDS-hatására is nagymértékben termelt szkleróciumot, és 0,75 g/l SDS pedig teljesen gátolta a vegetatív növekedést. Az izolátumok nagy részére szintén hasonló hatást fejtett ki az SDS okozta stressz, 5 izolátumnál megváltozott a konidioforok pigmentációja, 2 izolátum spóráképződése, növekedése változott meg, már alacsonyabb SDS-stresszt sem volt képes tolerálni, míg 5 izolátumnál ez a hatás csak 0,75 g/l SDS alkalmazásakor volt megfigyelhető.

3.2.4 *Aspergillus flavus* izolátumok és a referencia törzs stresszvizsgálata malátás agaron

A referencia *A. flavus* törzset vizsgálva malátás agaron hasonló toleranciát tapasztaltam ozmotikus, valamint SDS-stresszel szemben is, mint kukorica agaron. A NaCl elsősorban a hifák pigmentáltóságának változását, valamint nagyobb szklerócium termelést, az SDS pedig nagyobb koncentrációban csökkentette a spóráképződést, 0,75 g/l koncentrációban pedig meggátolta a növekedést is.

Az aflatoxinogén izolátumok közül csupán négy esetben volt jelentős hatással az általam alkalmazott alacsonyabb NaCl koncentráció a gombák morfológiai jellemzőire, a többi izolátum esetében 2 M, vagy annál nagyobb koncentrációjú NaCl befolyásolta a növekedést vagy spóráképződést malátás agaron.

SDS kezelést alkalmazva malátás agaron azt tapasztaltam, hogy az izolátumok nagy része hasonló toleranciát mutatott ezzel a stresszel szemben, mint a referencia törzs, három izolátum esetében kisebb koncentrációjú SDS stressz hatásra megváltozott a gombák morfológiája, míg egy izolátumnál az általam alkalmazott legmagasabb SDS koncentráció okozott csak kisebb szklerócium termelést.

Összességében megállapítható, hogy a referencia törzs és az aflatoxinogén izolátumok ellenállóképessége nagymértékű volt só, valamint SDS-stresszel szemben kukoricaagaron és malátás agaron egyaránt, ami nagy jelentőségű lehet növényvédelmi szempontból.

3.3 A kukoricán termelt szekunder metabolitok vizsgálata

Az aflatoxint nem termelő izolátumokkal alkalmazásával szembeni legnagyobb ellenállást az egyéb, kevésbé ismert szekunder metabolitok megjelenésének lehetősége adja. Ezt *in vitro* szemeskukoricán végzett kísérlettel kívántam ellenőrizni. Kutatásom során elsősorban Uka és munkatársai (2017) által vizsgált másodlagos anyagszertermékek jelenlétét vizsgáltam az MV251 kukorica-hibridre oltott aflatoxint nem termelő *A. flavus* mintákból (3. táblázat). A vizsgált aflatoxint nem termelő izolátumok közül egy izolátum speradine F-et, míg egy másik izolátum 3-OH-speradine A-t, aspergilline D-t és speradine I-t, míg egy harmadik izolátum a kukoricaszemen kimutatható koncentrációjú aflatoxin B1-et termelt (3. táblázat), tehát nem tekinthetők atoxinogénnek. A többi aflatoxint nem termelő *A. flavus* izolátum nem termelt a vizsgált egyéb szekunder metabolitok közül egyiket sem HPLC-MS készülékkel kimutatható mennyiségben. A talált metabolitok CPA származékok, amelyek egészségkárosító hatása elmarad az aflatoxinokétól, emiatt kevésbé vizsgált vegyületek, viszont együttes kumulatív

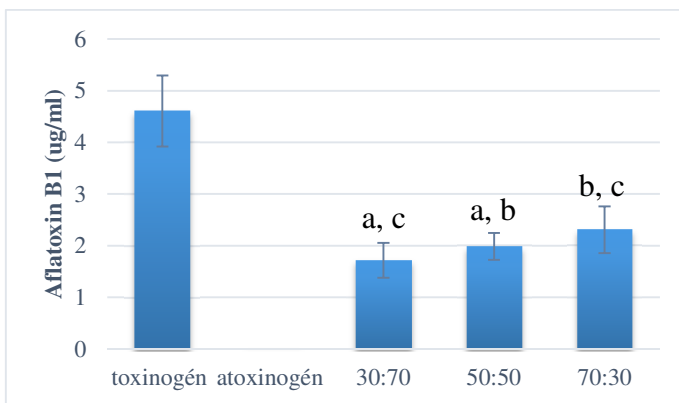
toxikológiai, valamint hosszútávú hatásuk miatt lényegesek lehetnek humán egészségügyi szempontból. Az atoxinogén gombák alkalmazása esetén az aflatoxin szennyezettséggel szembeni védekezésben biológiai kontrollként kiemelkedő jelentőségű a gomba szekunder metabolit termelésének ismerete. Valamint az ezért felelős genetikai háttér vizsgálata, hiszen, ha nem is termelődik szekunder metabolit, de jelen vannak a termeléshez szükséges gének, azok bizonyos körülmények hatására aktiválódhatnak, és káros szekunder metabolitok termelődését idézhetik elő.

3. táblázat Összefoglalás: az aflatoxint potenciálisan nem termelő izolátumok jellemzése

Izolátum jelzése	Termelt vegyület (HPLC-MS)	Növekedés MV 251 kukoricaszemen	Aflatoxin gén klaszterben lévő gének jelenléte (multiplex PCR)		
			<i>norA</i>	<i>aflR</i>	<i>omtA</i>
7	-	gyenge	+	+	+
27	-	gyenge	-	+	-
28	-	gyenge	+	+	+
30	3-OH-speradine A, aspergilline D, speradine I	intenzív	+	+	+
33	-	intenzív	+	+	+
34	-	intenzív	-	+	-
37	speradine F	intenzív	+	+	+
44	-	gyenge	+	+	-
53	-	intenzív	+	+	+
61	-	intenzív	-	+	-
70	-	intenzív	+	+	-
72	aflatoxin B1	intenzív	-	+	-

3.4 Kompetíciós képesség vizsgálata

A biológiai kontroll esetén aflatoxinokat nem termelő *A. flavus* törzseket alkalmazhatnak a kukorica aflatoxin szennyezettségének csökkentésére. Az atoxinogén törzs kompetíciós képessége révén képes megakadályozni a toxinogén *A. flavus* növekedését, szekunder metabolit produkcióját. Kutatásom során sikerült igazolni, hogy az általam alkalmazott aflatoxint nem termelő *A. flavus* izolátum is képes csökkenteni az aflatoxin szennyezettséget kukoricaszemen (3. ábra), viszont ez az izolátum későbbi HPLC-MS vizsgálatok alapján speradine F-t termel, emiatt szükséges a többi atoxinogén izolátum kompetíciós vizsgálata toxinogén *A. flavus* törzssel, valamint szántóföldi *in vivo* kísérletek is szükségesek az izolátumok hatékony aflatoxin termelést csökkentő hatásának bizonyítására.



3. ábra Aflatoxin B1 termelés MV 251 kukoricaszemen, toxinogén (9.), atoxinogén (37.) *Aspergillus flavus*, valamint a két izolátum eltérő arányban történő együttes fertőzése esetén (n=3, SD<20%). Azonos betűjelzés a nem szignifikáns eltérést jelöli P<0,05 szinten.

3.5 Kukoricahibridek ellenállóképessége és az *Aspergillus flavus* fertőzőképessége

A kukoricaszemek rezisztenciáját vizsgáló kísérlethez szükséges inokulációt *Rajasekaran és munkatársai* (2013) alapján végeztük el, amely segítségével meg lehet határozni az egyes kukoricahibridek *A. flavus*-szal szembeni érzékenységét. Kutatásaim során a különböző hibrid kukoricaszemeket a referencia, valamint a toxinogén és az aflatoxint nem termelő *A. flavus* -szal megfertőződő szemek arányát vizsgáltam. A különböző kukorica hibridek eltérő ellenállóképességet, valamint eltérő szennyezettséget mutattak a különböző *A. flavus* törzsekkel

szemben is. Az izolátumok kolonizációs képessége hasonló volt, de különbözött a referencia törzsetől, ami magyarázható azzal, hogy a referencia törzs nem kukoricáról izolált törzs, hanem mogyoróról, viszont kukoricán is képes növekedni, valamint aflatoxin B1-et termelni.

Jelenleg teljes rezisztenciával rendelkező kukoricahibrid nem ismert ebben a régióban, de vannak az egyes gombafajokkal való fertőzésre nézve alacsony, közepes és magas érzékenységgű kukoricahibridek (Szabó et al., 2018).

Vizsgálataim alapján ki tudtam választani olyan kukoricahibridet, amelyet az aflatoxint nem termelő és toxinogén *A. flavus* izolátumokkal szemben lényegében egyformán viselkedett, az *in vitro* kísérletben, ezért alkalmazható további kutatások során.

4. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. **Felmértem az endemikus *Aspergillus flavus* izolátumok aflatoxin termelő képességét.** 72 db *Aspergillus sp.* izolátumot gyűjtöttem össze takarmányokról, takarmány alapanyagokról. Multiplex PCR segítségével az aflatoxin B1 termelésért felelős génklaszter három génjének jelenlétét vizsgáltam (*aflR*, *norA*, *omtA*). A 72 db izolátumból 33 tartalmazta legalább az egyik gént, tehát potenciálisan aflatoxin termelő volt. Majd a potenciálisan aflatoxinogén izolátumok faji identifikálását elvégeztem az ITS régió alapján, ITS1 és ITS4 primer segítségével. Ez alapján 22 izolátum potenciálisan *A. flavus*-nak bizonyult. Egy atoxinogén, és egy toxinogén *A. flavus* izolátumot a kalmodulin gén szekvencia alapján is *A. flavus*-nak azonosítottam.

2. **Megállapítottam a kukorica nyerszsír tartalma, a szklerócium képzés és az aflatoxin termelés közötti kapcsolatot.** Az aflatoxintermelő *A. flavus* referenciatörzs a magasabb nyerszsír tartalmú kukoricaagaron és a malátás agaron termelt aflatoxin B1-et, illetve az alacsonyabb nyerszsír tartalmú kukoricaagaron glükóz hozzáadásával szintén sikerült aflatoxin B1 produkciót kimutatnom. A gomba szklerócium termelődését pedig elsősorban a magas zsírtartalom, valamint alacsonyabb nyerszsír tartalom esetén a szervesetlen nitrogénforrás alkalmazása indukálta. Intenzív szkleróciumprodukciónak mellett nem, vagy csak alig volt mérhető aflatoxin B1 termelés.

3. **Azonosítottam *in vitro* kedvező körülmények között az inokulum mennyiség és az aflatoxin B1 termelés közötti fordított arányosságot.** Az inokuláció során felhasznált legkisebb mennyiségű spóra esetén tapasztaltam a legnagyobb koncentrációjú aflatoxin B1 termelést malátás agaron a referencia *A. flavus* törzset alkalmazva, illetve, itt volt a legnagyobb a gombatelepek mérete és a legkisebb a Petri csésze hifákkal történő lefedettsége.

4. **Jellemeztem a referencia és a saját izolálású *Aspergillus flavus* törzs stressztűrését.** A referencia *A. flavus* törzs malátás, valamint kukoricaagaron táptalajon is az ozmotikus stresszre pigmentáltság változással reagált, illetve malátás agaron nőtt a szklerócium produkció is, viszont a sejtmembránt károsító SDS kis koncentrációban fokozott szklerócium képződést, nagyobb koncentrációban alkalmazva pedig csökkent vegetatív növekedést okozott. Az általam gyűjtött *A. flavus* izolátumok mintegy fele hasonlóképpen reagált az ozmotikus stresszre kukoricaagaron, mint a referencia törzs, de az izolátumok egy

részénél csak a magasabb koncentrációban alkalmazott NaCl gátolta a növekedést vagy a konidiospóra képződést, míg malátás agaron csak négy izolátum esetében okozott morfológiai változást a kisebb ozmotikus stressz, a többi izolátum esetében nem befolyásolta a növekedést vagy a spóráképződést sem. Kukoricaagaron kettő, míg malátás agaron három izolátum már az alacsonyabb SDS-stresszre is csökkent spóráképződéssel, vegetatív növekedéssel reagált, míg az izolátumok nagyobb része hasonlóképpen viselkedett, mint a referencia törzs.

5. **Azonosítottam olyan izolátumokat, amelyekből HPLC-MS módszerrel sem volt kimutatható feltételezhetően toxikus metabolit termelése.** Kilenc olyan atoxinogén *A. flavus* izolátumot sikerült találni, amelyek kukoricára oltva nem termelt a vizsgált 30 szekunder metabolit közül egyiket sem.

6. ***In vitro* kísérletben a saját kiválasztott aflatoxint nem termelő izolátumom sikeresen gátolta a toxinogén izolátum növekedését és toxin képzését.** Igazoltam, hogy a jellemzett és alkalmazott atoxinogén *A. flavus* izolátum képes csökkenteni a toxinogén *A. flavus* izolátum általi aflatoxin B1 szennyezettséget kukoricaszemen.

7. **Eltérő kukorica hibrideken teszteltem toxinogén és aflatoxint nem termelő *Aspergillus flavus* növekedését.** Hat különböző kukoricahibridet vizsgálva sikerült *A. flavus* gombafertőzéssel szemben ellenálló és érzékeny fajtákat elkülöníteni, valamint olyan hibridet találni, amely egyforma mértékben fertőződött atoxinogén és toxinogén izolátumokkal is.

5. GYAKORLATBAN ALKALMAZHATÓ EREDMÉNYEK

1. Az általam gyűjtött aflatoxinogén *A. flavus* izolátumok nagy ellenállóképességet mutattak ozmotikus, valamint sejtmembránra ható stresszel szemben, ami fontos lehet növényvédelmi szempontból.
2. Kimutattam, hogy a vizsgált kukoricahibridek rezisztenciája *A. flavus*-szal szemben eltérő, valamint eltérőek a különböző, toxinogén, atoxinogén és referencia *A. flavus*-szal szemben is. A toxinogén és atoxinogén *A. flavus* izolátumokkal szemben találtam egyforma rezisztenciával rendelkező hibridet, a további, *in vivo* kísérletek megalapozására.
3. Azonosítottam olyan kukoricán aflatoxin B1-et nem termelő *A. flavus* izolátumokat, amely HPLC-MS módszerrel a vizsgált 30 szekunder metabolit közül egyiket sem termelte. Ezáltal ezek sikeresen alkalmazhatók szántóföldi körülmények között a kukorica aflatoxin B1 szennyezettségének biokontrolljaként.
4. A kompetíciós vizsgálat során bebizonyítottam, hogy az aflatoxin B1-et nem termelő *A. flavus* gátolta a kukoricán az aflatoxin B1 termelést, ezáltal hatékonyan alkalmazható biokontrollként is.

6. IRODALOM

1. Abbas, H. K. - Weaver, M. A. - Horn, B.W. - Carbone, I. - Monacell, J. T. - Shier, W.T.: 2011. Selection of *Aspergillus flavus* isolates for biological control of aflatoxins in corn. *Toxin Reviews*. 30: 59-70.
2. Adhikari, B. N. - Bandyopadhyay, R. - Cotty, P. J.: 2016. Degeneration of aflatoxin gene clusters in *Aspergillus flavus* from Africa and North America. *AMB Express*. 6: 62.
3. Battilani, P. - Toscano, P. - van der Fels-Klerx, H. J. - Moretti, A. - Camardo Leggieri, M. - Brera, C. - Rortais, A. - Goumperis, T. - Robinson, T. : 2016. Aflatoxin B1 contamination in maize in Europe increases due to climate change. *Scientific Reports*. 6: 24328.
4. Benson, D. A. - Cavanaugh, M. - Clark, K. - Karsch-Mizrachi, I. - Lipman, D. J. - Ostell, J. - Sayers, E. W.: 2013. GenBank. *Nucleic Acids Research* 41 (Database issue): D36-42.
5. Brown, R. L. – Cotty, P. J. – Cleveland, T. E.: 1991. Reduction in aflatoxin content of maize by atoxigenic strains of *Aspergillus flavus*. *Journal of Food Protection*. 54: 623–626.
6. Bukelskienė, V. - Baltriukienė, D. - Repečkienė, J.: 2006. Study of health risks associated with *Aspergillus amstelodami* and its mycotoxic effects. *Ekologija*. 3: 42–47.
7. Chang, C. - Yang, M. - Wen, H. - Chern, J.: 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food Drug Analysis*. 10:178-182.
8. Diba, K. – Kordbacheh, P. – Sh, M. – Rezaie, S. – Mahmoudi, M.: 2007. Identification of *Aspergillus* species using morphological characteristics. *Pakistan Journal of Medical Sciences*. 23: 867-872.
9. Diener, U. L. – Cole, R. J. – Sanders, T. H. – Payne, G. A. – Lee, L. S. – Klich, M. A.: 1987. Epidemiology of aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. *Annual Review of Phytopathology*. 25: 240-270.
10. Fente, C. A. – Jaimez Ordaz, J. – Vázquez, B. I. – Franco, C. M. – Cepeda, A.: 2001. New additive for culture media for rapid identification of aflatoxin-producing *Aspergillus* strains. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 4858-4862.
11. Geisen, R.: 1996. Multiplex polymerase chain reaction for the detection of potential aflatoxin and sterigmatocystin producing fungi. *Systematic and Applied Microbiology*. 19: 388–392.
12. Hong, S. B. - Cho, H. S. - Shin, H. D. - Frisvad, J. C. - Samson, R. A.: 2006. Novel *Neosartorya* species isolated from soil in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 56: 477–486.
13. Horn, B. W. - Dorner, J. W.: 1999. Regional differences in production of aflatoxin B and cyclopiazonic acid by soil isolates of *Aspergillus flavus* along a transect within the United States. *Applied and Environmental Microbiology*. 65:1444-1449.
14. IARC (International Agency for Research on Cancer): 2012. A review of human carcinogens. Vol. 100F: Chemical agents and related occupations. Lyon, France: IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans.

15. Kaur, C. - Kapoor, H. C.: 2002. Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *International Journal of Food Science and Technology*. 37: 153-161.
16. Luna-Lopez, M. C. – Valdivia-Flores, A. G. – Jaramillo - Juarez, F. – Reyes, J. L. – Ortíz-Martínez, R. – Quezada - Tristan, T.: 2013. Association between *Aspergillus flavus* colonization and aflatoxin production in immature grain of maize. *Journal of Food Science and Engineering*. 3: 688-689.
17. Mauro, A. – Battilani, P. – Cotty, P. J.: 2015. Atoxigenic *Aspergillus flavus* endemic to Italy for biocontrol of aflatoxins in maize. *Journal of the International Organization for Biological Control*. 60:125-134.
18. Price, M. S. - Connors, S. B. - Tachdjian, S. - Kelly, R. M. - Payne, G. A.: 2005. Aflatoxin conducive and non-conductive growth conditions reveal new gene associations with aflatoxin production. *Fungal Genetics and Biology*. 42: 506-518.
19. Probst, C. - Njapau, H. - Cotty, P. J.: 2007. Outbreak of an acute aflatoxicosis in Kenya in 2004: Identification of the causal agent. *Applied and Environmental Microbiology*. 73: 2762-2764.
20. Rajasekaran, K. - Sickler, C. M. - Brown, R. L. - Cary, J. W. - Bhatnaga, D.: 2013. Evaluation of resistance to aflatoxin contamination in kernels of maize genotypes using a GFP-expressing *Aspergillus flavus* strain. *World Mycotoxin Journal*. 6 (2): 151-158.
21. Szabó, B. - Tóth, B. - Toldiné, Tóth, É. - Varga, M. - Kovács, N. - Varga, J. - Kocsube, S. - Palagyi, A. - Bagi, F. - Budakov, D. - Stojšin, V. - Lazić, S. - Bodroža-Solarov, M. - Čolović, R. - Bekavac, G. - Purar, B. - Jocković, D. - Mesterházy, Á.: 2018. A new concept to secure food safety standards against *Fusarium* species and *Aspergillus flavus* and their toxins in maize. *Toxins*. 10: 372.
22. Uka, V. - Moore, G. G. - Arroyo-Manzanares, N. - Nebija, D. - De Saeger, S. - Di Mavungu, J. D.: 2017. Unravelling the diversity of the cyclopiazonic acid family of mycotoxins in *Aspergillus flavus* by UHPLC Triple-TOF HRMS. *Toxins*. 9: 35.
23. Varga, J. - Frisvad, J. C. - Samson, R. A.: 2011. Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section Flavi. *Studies in Mycology*. 69: 57-80.
24. White, T. J. - Bruns, T. D. - Lee, S. B. - Taylor, J. W.: 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics.[In: Innis, M. A. - Gelfand, D. H. – Sninsky, J. J. – White, T. J. (eds) *PCR Protocols – a Guide to Methods and Applications*.] Academic Press, San Diego, CA, 315-322.

7. Publikációk az értekezés témakörében



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/28/2020.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Kovács Szilvia
Neptun kód: EYAIRS
Doktori Iskola: Kerpely Kálmán Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10049087

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

Idegen nyelvű tudományos közlemények hazai folyóiratban (2)

1. **Kovács, S.**, Pusztahelyi, T.: Investigation of polyphenol resistance of *Aspergillus flavus* on Cornmeal media.
Acta Phytopathol. Entomol. Hung. 53 (2), 163-170, 2018. ISSN: 0238-1249.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/038.53.2018.009>
2. **Kovács, S.**, Pusztahelyi, T.: Survey of the aflatoxin gene cluster in *Aspergilli* from Hungarian crops.
Acta Phytopathol. Entomol. Hung. 52 (2), 169-176, 2017. ISSN: 0238-1249.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/038.52.2017.026>

Magyar nyelvű absztrakt kiadványok (1)

3. **Kovács, S.**, Pusztahelyi, T.: Endemikus *A. flavus* törzssel az aflatoxin szennyezettség ellen, a biológiai kontroll lehetősége.
In: LIX. Georgikon Napok : Kivonat-kötet : A múltmér földkövei és a jövő kihívásai: 220 éves a Georgikon. Szerk.: Nagy Zita Barbara, Pannon Egyetem Georgikon Kar, Keszthely, 111, 2017. ISBN: 9789639639881

Idegen nyelvű absztrakt kiadványok (1)

4. **Kovács, S.**, Juhos, E., Pusztahelyi, T.: Aflatoxin B1 production of *Aspergillus flavus* under different medium composition.
Acta Microbiol. Immunol. Hung. 62 (Suppl.), 171, 2015. ISSN: 1217-8950.





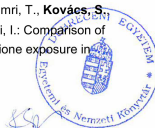
További közlemények

Idegen nyelvű tudományos közlemények hazai folyóiratban (1)

5. Pusztahelyi, T., Radócz, L., Gellért, C., **Kovács, S.**, Szabó, Z., Pócsi, I., Vad, A.: Effect of preventive and curative fungicide treatment on *Fusarium proliferatum* infected maize - a field trial.
Acta Phytopathol. Entomol. Hung. 52 (1), 29-38, 2017. ISSN: 0238-1249.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/038.52.2017.015>

Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (5)

6. Pusztahelyi, T., Szabó, J., Dombrádi, Z. R., **Kovács, S.**, Pócsi, I.: Foodborne *Listeria monocytogenes*: A Real Challenge in Quality Control.
Scientifica. 2016, 1-6, 2016. ISSN: 2090-908X.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/5768526>
7. Pusztahelyi, T., **Kovács, S.**, Pócsi, I., Prokisch, J.: Selenite-stress selected mutant strains of probiotic bacteria for Se source production.
J. Trace Elem. Med. Biol. 30, 96-101, 2015. ISSN: 0946-672X.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtemb.2014.11.003>
IF: 2.55
8. Kovács, Z., Szarka, M., **Kovács, S.**, Boczonádi, I., Emri, T., Abe, K., Pócsi, I., Pusztahelyi, T.: Effect of cell wall integrity stress and RlmA transcription factor on asexual development and autolysis in *Aspergillus nidulans*.
Fungal Genet. Biol. 54, 1-14, 2013. ISSN: 1087-1845.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2013.02.004>
IF: 3.262
9. **Kovács, S.**, Szabó-Papp, Z., Borbélyné Varga, M., Pusztahelyi, T.: Investigation of the biological state as good indicator of the quality of common wheat.
Anal. Univ. Oradea Fac. Ecotoxicologie, Zootehnie și Tehnologii de Industrie Alimentară. 12/B, 271-275, 2013. ISSN: 1583-4301.
10. Pusztahelyi, T., Klement, É., Szájli, E., Klem, J., Miskei, M., Karányi, Z., Emri, T., **Kovács, S.**, Orosz, G., Kovács, K. L., Medzihradszky-Fölkl, K., Prade, R. A., Pócsi, I.: Comparison of transcriptional and translational changes caused by long-term menadione exposure in *Aspergillus nidulans*.
Fungal Genet. Biol. 48 (2), 92-103, 2011. ISSN: 1087-1845.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2010.08.006>
IF: 3.737





Magyar nyelvű absztrakt kiadványok (2)

11. **Kovács, S.**, Pusztahelyi, T., Borbélyné Varga, M.: Az aflatoxin képződése mezőgazdasági termékeken.

Agrártud. Közl. 56, 67-72, 2014. ISSN: 1587-1282.

12. **Kovács, S.**, Pusztahelyi, T.: Tejminták aflatoxin M1 tartalmának vizsgálata ELISA-módszerrel.

In: A magyar és nemzetközi agrár- és élelmiszer-gazdaság lehetőségei, Nyugat-magyarországi Egyetem Kiadó, Sopron, 1, 2014.

Idegen nyelvű absztrakt kiadványok (1)

13. Pusztahelyi, T., **Kovács, S.**, Pócsi, I., Prokisch, J.: Selenite-stress selected probiotic bacteria for dietary Se source production.

Acta Microbiol. Immunol. Hung. 62 (Suppl.), 89-90, 2015. ISSN: 1217-8950.

Ismeretterjesztő, népszerűsítő cikkek (1)

14. **Kovács, S.**: Mikotoxinok az élelmiszerláncban. A láthatatlan veszély.

Élet Tud. 72 (50), 1574-1576, 2017. ISSN: 0013-6077.

A közlő folyóiratok összesített impact faktora: 9,549

A közlő folyóiratok összesített impact faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 0

A DEENK a Jelölt által az IDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2020.02.13.

