

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Kovács Szilvia

Debrecen

2020

DEBRECENI EGYETEM

KERPELY KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA

Doktori Iskola vezető:

Dr. Nagy János

egyetemi tanár, az MTA doktora

Témavezető:

Dr. Pusztahelyi Tünde, PhD

egyetemi docens

**AZ AFLATOXIN KÉPZŐDÉS VIZSGÁLATA
MEZŐGAZDASÁGI TERMÉKEKEN**

Készítette:

Kovács Szilvia

doktorjelölt

Debrecen

2020

Az aflatoxin képződés vizsgálata mezőgazdasági termékeken

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
a növénytermesztési és kertészeti tudományok tudományágban

Írta: Kovács Szilvia, okleveles biológus

Készült a Debreceni Egyetem Kerpely Kálmán Doktori Iskolája
(Növénytermesztés és kertészeti tudományok doktori programja) keretében

Témavezető: Dr. Pusztahelyi Tünde PhD, egyetemi docens

A doktori szigorlati bizottság:

Név	Tud. fokozat
elnök: Prof. Dr. Kovács Béla	PhD
tagok: Prof. Dr. Karaffa Erzsébet	PhD
Dr. Olasz Ferenc	PhD

A doktori szigorlat időpontja: 2020.02.05.

Az értekezés bírálói:

név	tudományos fokozat	aláírás
.....		
.....		

A bírálóbizottság:

név	tudományos fokozat	aláírás
elnök:		
tagok:.....		

titkár:.....

Az értekezés védésének időpontja: 20... .

Tartalomjegyzék

1.	Bevezetés	7
2.	Irodalmi áttekintés	8
2.1	<i>Aspergillus</i> genus	8
2.2	<i>Aspergillus</i> fajok szaporodása.....	10
2.3	Fonalas gombák szekunder metabolit képzése	13
2.3.1	Trichotecének	14
2.3.2	Zearalenon	14
2.3.3	Fumonizinek	15
2.3.4	<i>Aspergillus</i> szekunder metabolitok.....	15
2.3.4.1	Patulin.....	15
2.3.4.2	Ochratoxinok	16
2.3.4.3	Sterigmatocisztin	16
2.3.4.4	Ciklopiazonsav és egyéb <i>Aspergillus</i> toxinok.....	17
2.4	Aflatoxinok	18
2.5	Mikotoxinok kimutatása.....	19
2.6	Az aflatoxin bioszintézisének genetikai szabályozása.....	20
2.7	Szántóföldi mikotoxintermelés kontrollja.....	24
2.7.1	Agrotechnikai kontroll.....	25
2.7.2	Kémiai kontroll.....	28
2.7.3	Biológiai kontroll.....	28
2.8	Mikotoxintermelés kontrollja a betakarítás után.....	29
2.8.1	Fizikai kontroll.....	29
2.8.2	Kémiai kontroll.....	30
2.8.3	Biológiai kontroll.....	30
3.	Anyagok és módszerek.....	31

3.1	Törzsek izolálása.....	31
3.2	Nukleinsav alapú azonosítás	31
3.3	Eltérő tenyésztési körülmények, stresszhatás vizsgálata	32
3.3.1	<i>Aspergillus flavus</i> vizsgálata különböző táptalajokon.....	32
3.3.1.1	Malátás táptalaj.....	33
3.3.1.2	Kukorica kivonatot tartalmazó táptalaj	33
3.3.1.3	Kukorica kivonat + só táptalaj.....	33
3.3.1.4	Kukorica kivonat +glükóz táptalaj	33
3.3.1.5	Tápközegek összetételének analitikai vizsgálata.....	34
3.3.1.5.1	Nyerszsír tartalom meghatározás	34
3.3.1.5.2	Összes fenolos vegyületek meghatározása	34
3.3.1.5.3	Összflavonoid meghatározás	35
3.3.1.5.4	Glükóztartalom meghatározása	36
3.3.1.5.5	Nitrogén-tartalom meghatározása	36
3.3.2	Leoltáshoz alkalmazott spóramennyiség aflatoxinképződésre gyakorolt hatásának vizsgálata	36
3.3.3	<i>Aspergillus flavus</i> izolátumok stresszvizsgálata.....	36
3.4	Szemes kukorica oltása <i>Aspergillus flavus</i> -szal <i>in vitro</i> aflatoxin B1 és szekunder metabolitképződés vizsgálatához.....	37
3.5	Szekunder metabolitok HPLC analízise.....	37
3.5.1	Mintaelőkészítés HPLC méréshez kukoricaszemből.....	37
3.5.2	Mintaelőkészítés HPLC-MS, valamint az agarból történő HPLC-méréshez	37
3.5.3	HPLC mérés.....	38
3.5.4	HPLC-MS mérés	38
3.6	Kompetíciós teszt	39
3.7	Szemes kukorica oltása <i>Aspergillus flavus</i> -szal kukorica hibridek <i>in vitro</i> rezisztencia vizsgálatához	39

4.	Eredmények	40
4.1	<i>Aspergillus sp.</i> izolálása	40
4.2	Az izolátumok nukleinsav alapú vizsgálata	40
4.3	Eltérő tenyésztési körülmények, stressz vizsgálata.....	46
4.3.1	<i>Aspergillus flavus</i> NRRL 11611 törzs vizsgálata különböző táptalajokon	46
4.3.2	A táptalajok leoltásához alkalmazott spóramennyiség és az aflatoxin B1 képződés összefüggése	50
4.3.3	<i>Aspergillus flavus</i> törzsek stressz-rezisztenciájának vizsgálata	52
4.3.3.1	<i>Aspergillus flavus</i> izolátumok és a referencia törzs stresszvizsgálata kukorica agaron.....	52
4.3.3.2	<i>Aspergillus flavus</i> izolátumok és a referencia törzs stresszvizsgálata malátás agaron	53
4.4	Szekunder metabolit képzés vizsgálata	53
4.5	Kompetíciós képesség vizsgálata.....	57
4.6	Kukoricahibridek ellenállóképességének vizsgálata.....	58
5.	Következtetések, javaslatok	60
5.1	Az izolátumok nukleinsav alapú vizsgálata	60
5.2	Eltérő tenyésztési körülmények, stressz vizsgálata.....	62
5.2.1	<i>Aspergillus flavus</i> NRRL 11611 törzs vizsgálata különböző táptalajokon	62
5.2.2	A táptalajok leoltáshoz alkalmazott spóramennyiség és az aflatoxin B1 képződés összefüggése	63
5.2.3	<i>Aspergillus flavus</i> izolátumok és a referencia törzs stresszrezisztencia vizsgálata	64
5.2.3.1	<i>Aspergillus flavus</i> izolátumok és a referencia törzs stresszvizsgálata kukorica agaron.....	66

5.2.3.2	<i>Aspergillus flavus</i> izolátumok és a referencia törzs stresszvizsgálata malátás agaron	67
5.3	A kukoricán termelt szekunder metabolitok vizsgálata	67
5.4	Kompetíciós képesség vizsgálata	69
5.5	Kukoricahibridek ellenállóképessége és az <i>Aspergillus flavus</i> fertőzőképessége	70
6.	Új tudományos eredmények	72
7.	Gyakorlatban alkalmazható eredmények	74
8.	Összefoglalás	75
9.	Summary.....	78
10.	Irodalomjegyzék	80
11.	Publikációk az értekezés témakörében	97
12.	Mellékletek	100
13.	Nyilatkozatok.....	110
14.	Köszönetnyilvánítás	111

Rövidítések jegyzéke

cAMP - ciklikus-adenozin-monofoszfát

CE - katechin ekvivalens

CPA - Cyclopiazonic acid (ciklopiazonsav)

dNTP - deoxinukleotid

DON - dezoxinivalenol

ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay (enzimmel kapcsolt immunszorbens vizsgálat)

FAD - flavin-adenin-dinukleotid

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations (Egyesült Nemzetek Szervezetének Élelmezésügyi és Mezőgazdasági Szervezete)

G fehérje - guanin nukleotid kötő fehérje

GAE - galluszsav ekvivalens

GFP - Green Fluorescent Protein (zöld fluoreszcens fehérje)

GOPOD - Glucose oxidase / peroxidase (glükóz-oxidáz/peroxidáz)

GPCR - G protein-coupled receptors (G fehérjéhez kapcsolt receptor)

GTP - guanozin-trifoszfát

HMG - high mobility group (nagy mobilitású peptid csoport)

HOG - High-osmolarity glycerol pathway (magas ozmolaritású glicerol útvonal)

HPLC - High Performance Liquid Chromatography (nagynyomású folyadékkromatográfia)

HPLC-FLD - High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection (nagynyomású folyadékkromatográfia fluoreszcens detektálással)

HPLC-MS - High Performance Liquid Chromatography with Mass Spectrometry (nagynyomású folyadékkromatográfia tömegspektrométerrel)

IARC - International Agency for Research on Cancer (Nemzeti Rákkutató Ügynökség)

ITS - Internal transcribed spacer (belső átíródó elválasztó szakasz)

kbp - ezer bázispár

MAPK - mitogen-activated protein kinase (mitogén-aktivált protein kináz)

MAT – mating type (szaporodáshoz kapcsolódó) gének

PCR - polymerase chain reaction (polimeráz-láncreakció)

PKA - protein kináz A

PKS A - poliketid szintáz A

PR fehérje - Pathogenesis-related proteins (patogenezissel összefüggő fehérje)

ROS - Reactive Oxygen Species (reaktív oxigén részecskék)

SDS - Sodium dodecyl sulfate (Nátrium-dodecil-szulfát)

1. Bevezetés

A penészgombák szaprofiták, endofiták és igen nagy jelentőséggel bíró mezőgazdasági kártevők lehetnek, elszaporodásuk, valamint az általuk termelt mikotoxinok nagy termésvesztést okozhatnak a mezőgazdaság számára. A mikotoxinok közül az aflatoxinokat az IARC nemzetközi rákkutató ügynökség az 1. csoportba, vagyis a bizonyítottan humán rákkeltő hatású vegyületek csoportjába osztotta (2002). Az aflatoxinok több típusa ismert, amelyek közül az aflatoxin B1 a legtoxikusabb. Mivel az aflatoxin-termelő gombák elszaporodásához, valamint az aflatoxin termeléséhez magas hőmérséklet és nedvesség szükséges, ezért aflatoxin szennyezettség korábban főként a trópusi, szubtrópusi területeken volt jellemző. Mára ez a helyzet megváltozott, a klímaváltozás hatására növekvő átlaghőmérséklet és a szélsőséges időjárási viszonyok miatt. 2007-ben és 2012-ben a magyar gabonában magas aflatoxin-szennyezettséget mutattak ki a hazai kutatók, míg 2017-ben még nagyobb szintet ért el az *Aspergillus 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, erősen aflatoxinnal 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 *Aspergillus flavus* törzsek kb. 60 %-a nem termel aflatoxint (Horn et al., 1999). Ezek az atoxinogén törzsek, a toxinogén *Aspergillus 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 *Aspergillus flavus* AF36 (pisztáciára, kukoricára és gyapotmagra) néven, amelyek képesek csökkenteni szántóföldön alkalmazva a növények aflatoxin szennyezettségét (Brown et al., 1991; Abbas et al., 2011a). Ezeknek a termékeknek az összetevői endemikus *Aspergillus flavus* törzsek, azon a területen, ahol alkalmazzák őket (Mauro et al., 2015).

Kutatásom célja:

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

Céljaim között szerepelt, hogy olyan aflatoxint nem termelő *Aspergillus flavus* izoláljak, amely Magyarországon endémikus, megfelelő ellenállóképességgel rendelkezik a különböző stresszhatásokkal szemben, valamint egyéb ismert szekunder metabolitot nem termel, és így potenciálisan alkalmazható az aflatoxin szennyezettség csökkentésére kukoricában. Valószínűleg a toxintermelő képesség elvesztése a gombában esetlegesen valamilyen mutáció eredménye (Adhikari, et al., 2016), viszont fontos kizárnunk az aflatoxint nem termelő *Aspergillus flavus* törzs biokontrollként történő alkalmazása előtt az egyéb toxintermelő képességet, hiszen ez is egészségügyi kockázatot jelenthet.

2. Irodalmi áttekintés

2.1 *Aspergillus* genus

Az *Aspergillus* nevet először 1729-ben írta le Pier Antonio Micheli olasz pap és biológus, aki először kísérte meg a fonalas gombák vizsgálatát. Az elnevezés a latin „aspergere”, azaz szenteltvíz szóró eszközből származik (Micheli, 1729).

Az *Aspergillus* nemzetség egy filogenetikailag, morfológiai és élettani szempontból is diverz csoport, amely jelentős szerepet játszik a biotechnológiában, élelmiszeriparban (pl. rizsitalok, miso, szójaszószt gyártás), például a citromsav, hidrolitikus enzimek, illetve a gyógyszergyártásban alkalmazott anyagok (pl. kojisav, echinocandin, lovasztatin) termelésével. Az ebbe a nemzetségbe tartozó fajok elsősorban szaprofita gombák, amelyek elhalt növényi részek szerves anyagainak degradációjával jutnak tápanyagokhoz, például a zsírok, olajok, kitin, keratin, cellulóz, hemicellulóz, pektin

bontása révén. Az *Aspergillus versicolor*-t azonosítottak a Ghirlandaio freskóból származó izolátumok között Olaszországban (Ciferri, 1999). Vannak köztük elsősorban raktári, de vannak szántóföldi kártevők is, előfordulhatnak kukoricában, gyapotmagban, olajos magvakban, szárított gyümölcsökben, fűszerekben. Az alacsony pH, alacsony vízaktivitás, magas cukortartalom nem kedvez a gombanövekedésnek. Kivételt képez ez alól az *Aspergillus glaucus*, amely képes tolerálni az alacsony vízaktivitást, és sózott, szárított halban is kimutatták a jelenlétét (Wheeler et al., 1993). Számos *Aspergillus* faj képes szekunder metabolitok termelésére, amelyek gazdaságilag jelentős kárt okoznak; ilyenek például az aflatoxinok, amelyet az *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* és az *Aspergillus nomius* termel, valamint az ochratoxin, amelyet elsősorban az *Aspergillus ochraceus* termel.

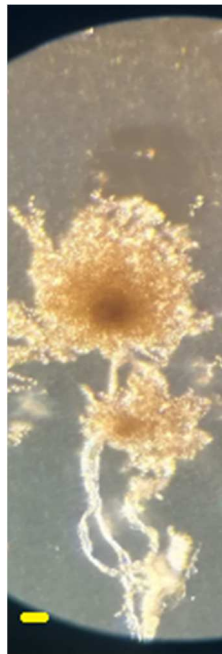
Az *Aspergillus* nemzetségbe tartozó penészgombák nagy része ártalmas az emberi, állati egészségre nézve: egyrészt az általuk termelt mikotoxinok káros hatásúak (mikotoxikózis), másrészt allergiás reakciókat válthatnak ki, valamint lokális vagy szisztémás fertőzéseket (mikózist) is okozhatnak. A gazdaszervezet pillanatnyi immunológiai állapotától függ az, hogy a penészgomba által okozott betegség milyen súlyosságú lesz.

Az *Aspergillus* nemzetségbe tartozó fajok besorolása, identifikációja eddig nagyrészt fenotípusos markereken alapult, viszont az utóbbi évtizedekben ezt már jelentős részben kiegészítették a kemotaxonómiai módszerek, amelyek elsősorban a lipidprofil, fehérjék, illetve az exometabolitok alapján történő identifikációt tesztelhetővé. A DNS szekvenálási technika fejlődésével, a DNS szekvencia adatbázisok elérhetőségével a molekuláris alapú identifikáció került előtérbe (Tsang et al., 2018).

Az *Aspergillus* nemzetség meghatározó jellemzője a jellegzetes alakú konidiumtartó, amelyek mérete, és a fialidok elrendezése (1. ábra) jellegzetes, valamint a spórák színe is fontos taxonómiai bélyeg. Emellett kiemelkedő jelentőségű még a fajok azonosítása szempontjából a kleisztotécium, a Hülle sejtek jelenléte, valamint a szklerócium mérete, alakja is.

Az *Aspergillus* genus új taxonómiai osztályozása filogenetikai megközelítést alkalmaz, kiegészítve fenotípusos, fiziológiai és/ vagy extrolit adatokkal (Houbraken et al., 2020). Ez alapján hat alnemzetséget, azon belül pedig 27 szekciót (öt újat) különíthetünk el. A hat alnemzetség a Fumigati, Circumdati, *Aspergillus* és a Nidulantes, Cremei, Polypaecilum (Houbraken et al., 2020). A 2011. évi Melbourne-i Nemzetközi

Botanikai Kongresszus Nevezéktani Szekciójában fogadták el, hogy egy gombának csak egy binomiális, tudományos neve legyen, akkor is, ha a gombának mind anamorf, mind teleomorf alakja ismert. A Nemzetközi Aspergillus és Penicillium Bizottság döntése szerint az *Aspergillus* név használata kötelező a teleomorf alakoknál, több kisebb genus esetében is. Frissítették az *Aspergillus* genus fajainak listáját is, amelyben 446 faj szerepelt. A lista tartalmazza MycoBank adatokat, a típus- és ex-típus törzs gyűjtemény számát, az alnemzetség, szekciók és sorozatok adatait, a reprodukció módjára vonatkozó információkat, valamint az ITS, a béta tubulin (BenA), kalmodulin (CaM) és RNS polimeráz II második legnagyobb alegység (RPB2) génszekvenciák GenBank adatait (Houbraken et al., 2020).



1. ábra *Aspergillus flavus* izolátum mikroszkópos képe (saját forrás) Skála: 10 µm.

2.2 *Aspergillus* fajok szaporodása

Sok gombafaj képes ivaros (szexuális) és ivartalan (aszexuális) szaporodásra is, és, ha kedvezőek a környezeti feltételek, akkor a vegetatív növekedés és aszexuális szaporodás kerül előtérbe, mitotikus spórákat képeznek (anamorf állapot) (Dyer et al., 1992). Míg kedvezőtlen feltételek esetén a szexuális reprodukció kezdődhet el (teleomorf állapot) (Dyer et al., 2005). A fonalagombák fajai közül körülbelül 20 %-nak nem ismert az ivaros szaporodása. Az ivartalan szaporodás ugyanakkor evolúciós szempontból nem jelent előnyt az egyedek számára, hiszen nem történik meiotikus osztódás, DNS rekombináció (Dyer et al., 2005; Lee et al., 2010). Az *Aspergillus* fajok szaporodása is

történhet ivaros, ivartalan és paraszexuális módon, de a fajok körülbelül 64%-nál nem ismert a szexuális szaporodás (Ojeda-López et al., 2018). Ugyanakkor minden *Aspergillus* faj termel konídiumokat, aszexuális spórákat.

Az aszexuális reprodukciós ciklusnak két fő szakasza van: a vegetatív növekedés és a szaporítóképletek fejlődése. A vegetatív növekedési fázis egy konídium csírázásával kezdődik, majd ebből fejlődik ki a micélium, aztán bizonyos sejtek ivartalan szaporítóképletekké, konídiofórokká differenciálódnak (a hifa lábszerű sejté, szárrá és vezikulává, metulává, fialiddá majd konídiforrá alakul), ezt pedig a konídiumok képződése, érése követi (Ni et al., 2007). A konídiofórok az *Aspergillus* fajokra jellemző szaporítóképletek (Ojeda-López et al., 2018). Az aszexuális szaporodás eredményeképp kialakult utódok a szülői sejtrel azonos genetikai állománnyal rendelkeznek (Adams et al., 1998).

A paraszexuális ciklus során két hifasejt, amelyek genetikailag kompatibilisek, egyesül, a haploid sejtmagok fúzióval heterokarionokat hoznak létre és genetikai rekombináció megy végbe. A szomatikus diploidia után a paraszexuális ciklusban nincs meiózis, mitotikus crossing-over megy végbe a homológ kromoszómapárok között, majd a kromoszómaszám-csökkenés random kromoszómavesztéssel, ún. haploidizációval megy végbe (Pontecorvo, 1956; Casselton et al., 2002). Ez a szaporodás lehetőséget nyújt genetikai megújulásra, genetikai rekombináció révén az ivaroson nem szaporodó gombák számára.

A gombák speciális kompatibilitási rendszerrel rendelkeznek önmaguk felismerésére, ennek a rendszernek kétféle típusa létezik: szexuális kompatibilitás, valamint szomatikus, vegetatív, heterokarion vagy heterotallikus inkompatibilitás (Dyer et al., 1992; Leslie, 1993). Ezek a rendszerek teszik lehetővé a gének áramlását, a nagyobb genetikai variabilitást, és nagyobb lehetőséget arra, hogy a fajok képesek legyenek túlélni a változó környezeti körülményeket is (Milgroom, 1996). A heterokarion inkompatibilitás gátolja az eltérő hifák közötti anasztomózis létrejöttét, *het* lokuszokban lévő gének segítségével. Ha a heterokarion inkompatibilis hifák mégis egyesülnek vagy gyorsan széttagolódnak, az így létrejött hifa elpusztul, vagy gátolt lesz a hifa növekedése (Pál et al., 2007; Pel et al., 2007). Ennek a folyamatnak a funkciója még nem egészen ismert, vagy a genetikai egyediség megőrzésében van szerepe (Debets et al., 1998), vagy ezek a *het* gének az evolúció során véletlenszerűen jöttek létre és más funkcióik is vannak (Saupe, 2000), vagy pedig a szexuális szaporodást inicializálják (Dyer et al., 1992). Az ivaros

párosodásnak két alaptípusát különböztetjük meg: homotallikusnak nevezzük a gombát, ha önmegtermékenyítésre képes, vagyis minden sejtje képes a tenyészet többi sejtjével ivaros párosodásra. A heterotallikus gombáknál viszont a szexuális ciklus csak egymással kompatibilis, ellentétes párosodási típust képviselő, gaméta jellegű sejtjei között mehet végbe. Az *Aspergillus* fajok nagy része homotallikus (a homotallikus: heterotallikus taxonok aránya körülbelül 13:1) (Dyer, 2007; Ojeda-López et al., 2018). Sok *Aspergillus* faj pedig nem képes ivaros szaporodásra (Ojeda-López et al., 2018), pl. *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, ennek ellenére találtak a genomjukban olyan géneket, amelyek a szexuális szaporodáshoz köthetőek. Ez is bizonyítja, hogy az aszexuális fajok a szexuális szaporodásra képes egyedekből származtathatók, a filogenetikai törzsfaelemzések kimutatták, hogy ezekben a fajokban is előfordult a rekombináció, csak a szexuális szaporodó képességüket elvesztették (Geiser et al., 1996), az utóbbi néhány évtizedben nem volt megfigyelhető genetikai rekombináció közöttük (Watarai et al., 2019). A szaporodáshoz kapcsolódó gének közül a MAT (mating-type) gének részt vesznek a meiózis szabályozásában, a plazmogámiában, a feromon jelátvitelben, a szexuális kompatibilitás kialakításában a heterotallikus gombáknál (Poggeler, 2002; Paoletti et al., 2007). Két típusuk ismeretes: az egyik egy olyan szabályozó fehérjét kódol, amelyben egy high-mobility group (HMG), DNS-kötő domén található (MAT-2), a másik pedig egy olyan fehérjét, amelyben egy alfa box domén található (MAT-1) (Turgeon et al., 2000). A MAT gének részt vesznek a homotallikus gombák ivaros szaporodásában is, ezekben a MAT-1 és MAT-2 gén egyaránt megtalálható különböző kromoszómákon, pl. *Aspergillus nidulans*-ban (Paoletti et al., 2007; Kronstad, 2007). A heterotallikus gombáknál ezek a MAT gének felelősek a két különböző tallusz gaméta sejtjeinek egyesüléséért, és ezek a gombák vagy a MAT-1, vagy a MAT-2 gént hordozzák a genomjukban (Turgeon et al., 2000) és a szexuális szaporodásukhoz szükség van egy partnerre, amely hordozza az ellentétes MAT lokuszt pl. *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus oryzae* esetében találkozunk ezzel (Galagan et al., 2005).

A szexuális szaporodás a kleisztotécium képződésével kezdődik. A kleisztotéciumban két hifa egyesülésével jön létre a dikarion. A dikarion nukleáris fúziója után meiózis majd posztmeiótikus mitózis következik, amely 8 haploid askospórát tartalmazó askuszkok kifejlődését eredményezi a kleisztotéciumon belül. A kleisztotéciumot Hülle sejtek veszik körül, amelyek speciális védő funkciót töltenek be. Egy kleisztotécium akár több tízezer askospórát is tartalmazhat (Sohn et al., 2002).

Az *Aspergillus flavus* egy heterotallikus gomba, amely ivaros stádiumában szkleróciumokat képez (Horn et al., 2014). Ezen szkleróciumok mérete alapján az *Aspergillus flavus* törzset két csoportra lehet osztani, vannak az úgynevezett nagy (L) törzsek, amelyeknél a szklerócium átmérője nagyobb, mint 400 μm , és vannak a kicsi (S) törzsek, amelyeknél a szklerócium mérete kisebb, mint 400 μm és általában több szkleróciumot képeznek, mint az előző típus (Cotty, 1989). A szkleróciumok a kedvezőtlen környezeti feltételekkel szemben ellenálló struktúrák (Coley-Smith et al., 1971). Laboratóriumban történt, eltérő MAT gént hordozó egyedek keresztezésekor a szkleróciumban askospórát tartalmazó askokarpok jöttek létre (Carbone et al., 2007; Horn et al., 2009; Moore et al., 2009; Olarte et al., 2012). A szexuális reprodukció okozta genetikai variabilitás az aflatoxin termelésért felelős géneket is érinti, így jöhet létre magas genetikai sokféleség az *Aspergillus flavus* populációkban, és az aflatoxin termelő egyedektől elválhatnak a nem termelők (Horn et al., 1996, 1999).

2.3 Fonalas gombák szekunder metabolit képzése

A fonalas gomba szekunder metabolitok olyan vegyületek csoportja, amelyek nem szükségesek a gomba növekedéséhez, életbenmaradásához, de hozzájárulnak a gomba természetes környezetéhez való alkalmazkodásához. Számos vegyület ezek közül igen fontos szerepet tölt be az életünkben (Georgianna et al., 2009). Ezek között vannak gyógyászatban használt antibiotikumok (pl. penicillin), immunszuppresszív szerek (pl. ciklosporin A), koleszterin bioszintézist szabályozók (pl. lovasztatin), tumorellenes szerek (pl. taxol), gombák által termelt pigmentek, többszörösen telítetlen zsírsavak (Adrio et al., 2003). A fonalas gombák szekunder metabolit termelésért felelős gének gyakran csoportosulnak különböző méretű génklaszterbe. Az olyan egyszerű szénforrás jelenléte, mint például a glükóz, kedvez a gyors vegetatív növekedésnek, viszont a szekunder metabolit termelődésének általában nem, míg az oligo-, és poliszacharidok, esetleg az olajok elősegíthetik a másodlagos anyagcseretermékek képződését (Davis et al., 1968).

A mikotoxinok csoportja szintén a penészgombák által termelt másodlagos metabolitok, de hatásukat tekintve mérgezők az állati, vagy emberi szervezetre. A mikotoxinokat 1962-ben fedezték fel, amikor több mint 100 000 pulyka pusztult el Angliában, az aflatoxinnal szennyezett földimogyoró tartalmú táp következtében (Wannop, 1961).

A szekunder metabolitok általában kis molekulatömegűek (kisebb a tömegük, mint 1000 Dalton), és kémiaiilag összetettebb szerkezetűek. Igen ellenállóak, például a gyomor savas pH-jával, és magas hőmérséklettel szemben, ezért toxikus hatásuk megmarad mind az állati, mind az emberi szervezetben. Toxicitásuk lehet akut vagy krónikus. Összesen több mint 300 mikotoxint sikerült eddig azonosítani, amelyet több mint 100 penészgomba termel. A mikotoxinok közül hatot nevezhetünk a legjelentősebbnek és legveszélyesebbnek az egészségre nézve az élelmiszerekben, takarmányokban előfordulók közül: aflatoxinok, trichotecének, zearalenon, fumonizinek, patulin, ochratoxinok. Ezeket főleg *Aspergillus*, *Fusarium* valamint *Penicillium* fajok termelnek (Alshannaq et al., 2017). A FAO (The Food and Agriculture Organization) becslése alapján a mezőgazdasági termékek körülbelül 25 %-a mikotoxinokkal szennyezett, ami komoly gazdasági és egészségügyi kockázatot jelent (Wu, 2007).

2.3.1 Trichotecének

A trichotecének körülbelül 150 típusát azonosították, ezek közül a legismertebb és a legkevésbé mérgező a deoxinivalenol (DON) (Yazar et al., 2008; Marin et al., 2013). Elsősorban a *Fusarium graminearum* és a *Fusarium culmorum* termeli ezeket a toxinokat, de *Trichoderma*, *Trichothecium*, *Myrothecium*, *Stachybotrys*, *Acremonium* fajok is képesek előállítani (Bottalico et al., 2002). Főként szántóföldön termelődik ez a toxintípus, és jórészt gabonafélékben fordul elő (búza, árpa, zab, rozs, kukorica, rizs), de fellelhető még szójababban, burgonyában, olajos magvakban, és banánban is (Bennett et al., 2003). A trichotecének behatolnak a sejtmembrán kettős lipidrétegébe, gátolják a riboszómális fehérjeszintézist és ezáltal megszakad a DNS, RNS szintézis folyamata is (Richard, 2007). Embereknél a DON hasi fájdalmat, émelygést, hányást, hasmenést, fejfájást, szédülést és lázat okoz (Sobrova et al., 2010). Állatoknál lassú növekedést, a szarvasmarhákban a tejtermelés csökkenését, míg tojótyúkknál a tojáshozam csökkenését, bélvérzést, csökkent immunválaszt okoz (Pestka, 2007).

2.3.2 Zearalenon

A zearalenon egy főként a *Fusarium graminearum* és *Fusarium semitectum* által termelt ösztrogén hatású mikotoxin (Bhatnagar et al., 2002). Főként kukoricában, búzában, árpában, rozsban, zabban fordul elő és főként DON toxin mellett kísérőként, míg aflatoxin szennyeződés mellett ritkább (Hussein et al., 2001; Yazar et al., 2008). A

zearalenon kompetitíven kötődik az ösztrogén receptorokhoz, ez meddőséget okoz a szarvasmarhákban, sertésekben, nyulakban. Szarvasmarhában a zearalenon csökkent tejtermeléshez vezet, sertéseknél petefészkek atrófiát, gyenge, deformálódott malacokat eredményez (Kallela et al., 1984; Kowalska et al., 2016).

2.3.3 Fumonizinek

A fumonizineket 1988-ban fedezték fel kukoricában (Bennett et al., 2003). Elsősorban a *Fusarium verticilloides* és *Fusarium proliferatum* által termelődnek, de az *Aspergillus niger* és az *Aspergillus welwitschiae* is képes fumonizin B2 és más fumonizin típusú vegyületek szintetizálására (Samson et al., 2007). A fumonizinek négy csoportra oszthatók (A, B, C és P). Számos fumonizin toxint azonosítottak eddig, de a fumonizin B csoportba tartozó fumonizin B1 fordul elő leggyakrabban az élelmiszerekben és a takarmányokban (Rheeder et al., 2002; Dall'Asta et al., 2016). Főként a kukoricában fordul elő, de kimutatták már árpában, búzában, cirokban, szójababban, fügében, fekete teában, és gyógynövényekben is (Sweeney et al., 1998; Bennett et al., 2003). Szerkezetileg a fumonizin a szfinganinhoz hasonló. A fumonizin B1 blokkolja a szfingolipidek bioszintézisét, főként a májat, vesét károsítja, nyelőcsőrákot, valamint a szövetek apoptózisát is okozhatja (Yazar et al., 2008). Hidrofil jellege miatt a tejbe nem választódik ki, valamint nem halmozódik fel nagymértékben a szövetekben sem (Richard, 2007).

2.3.4 *Aspergillus* szekunder metabolitok

2.3.4.1 Patulin

A patulint főként a *Penicillium expansum*, *Aspergillus* fajok (*Aspergillus clavatus*, *Aspergillus giganteus*, *Aspergillus terreus*), valamint *Byssosclamyces* fajok termelik, elsősorban magas vízaktivitású termékekben, gyümölcsökben, gyümölcslevekben, zöldségekben előforduló mikotoxin (Harrison, 1989; Moake et al., 2005; Yang et al., 2014). Antibiotikus hatású, de emberre nézve toxikus, hányást, hányingert, fekélyesedést, vérzést is okozhat (Puel et al., 2010). A patulin alacsony pH-n stabilabb mikotoxin.

2.3.4.2 Ochratoxinok

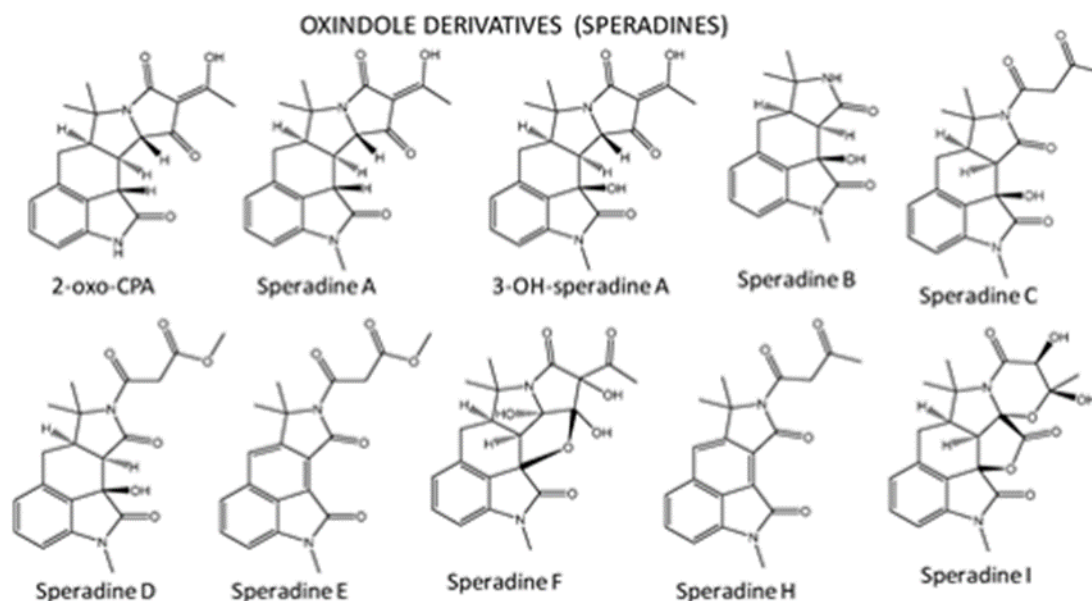
A hűvösebb, mérsékelt éghajlatot kedvelő *Penicillium verrucosum*, valamint a forró, trópusi éghajlatot kedvelő *Aspergillus ochraceus* termeli ezt a szekunder metabolitot. A legfontosabb toxin ebben a csoportban az ochratoxin A (Bennett et al., 2003; Duarte et al., 2010; Scudamore, 2005). Az ochratoxin A széles körben elterjedt mikotoxin a mezőgazdasági termékekben, előfordul például kukoricában, búzában, árpában, zabban, rizsben, rozsban, vegyes takarmányokban, babban, borsóban, kávéban, de a borban, szőlőlében, szárított gyümölcsökben is (Magnoli et al., 2007). Ezenkívül az állati eredetű termékekben pl. húspan, tejben is megjelenhet (Stoev, 2013). Az ochratoxin A magas hőkezeléssel, savas pH-val szemben is ellenálló. Akut nefrotoxikus, hepatotoxikus hatása van, ezenkívül teratogén, neurotoxikus, genotoxikus, nefropátiát, veserákot okozhat (Pitt, 2000; Mantle, 2002). Mivel zsírban oldódik, felhalmozódik az állatok húspanban, és szerkezetileg hasonlít a fenilalaninhoz, emiatt képes a fehérjeszintézist is gátolni a vesében és a májban, illetve gátolja az RNS-, DNS-szintézist is (Žanic-Grubišić, 2000; Stoev et al., 2002).

2.3.4.3 Sterigmatocisztin

Az aflatoxin bioszintézis prekursorának tekinthető poliketid típusú vegyület; szintén rákkeltő hatású, főként a májra és a vesére nézve, viszont akut és krónikus toxicitása jelentősen elmarad az aflatoxinokétól. Néhány *Aspergillus* faj csak sterigmatocisztint termel, ezek főként a *Nidulantes* és az *Ochraceo-rosei* szekciókba tartoznak (Varga et al., 2010, 2015; Rank et al., 2011), míg mások képesek sterigmatocisztin és aflatoxin képzésére is, ilyen pl. az *Aspergillus togoensis*, amely az *Aspergillus* nemzetség *Flavi* szekciójába tartozik (Rank et al., 2011), ebbe a szekcióba tartozó többi faj a sterigmatocisztint képes átalakítani 3-metil-sterigmatocisztinné, majd aflatoxin B1-é (Rank et al., 2011). A legjelentősebb sterigmatocisztin termelő faj az *Aspergillus versicolor*, amely magasabb vízáktivitású környezetben, élelmiszerben, gabonában képes toxintermelésre (Samson et al., 2010). Más nemzetségeknél is leírtak már sterigmatocisztin termelést, ilyen például az *Aschersonia*, *Bipolaris*, *Botryotrichum*, *Chaetomium*, *Humicola*, *Moelleriella*, *Monicillium* egyes fajtái (Rank et al., 2011).

2.3.4.4 Ciklopiazonsav és egyéb *Aspergillus* toxinok

1968-ban fedezték fel, azóta körülbelül 30 CPA-típusú vegyületet azonosítottak *Penicillium*, illetve *Aspergillus* tenyészetekben (Holzapfel, 1968). A ciklopiazonsav (CPA) szerkezetét tekintve egy indol tetraminsav, amit főként a *Penicillium* fajok termelnek, az *Aspergillus*-ok közül pedig az *Aspergillus flavus*, *Aspergillus minisclerotigenes*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus pseudocaelatus*, *Aspergillus parvisclerotigenus*, *Aspergillus tamarii*, *Aspergillus pseudotamarii*, *Aspergillus bertholletius*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus lentulus*, *Aspergillus fumisynnematus* képes CPA bioszintézisére (Varga et al., 2011). A CPA nem tekinthető akut hatású mikotoxinnak, de megváltoztatja a normál intracelluláris kalciumáramlást, a kalciumfelvételhez nélkülözhetetlen szarkoplazmatikus vagy endoplazmatikus retikulum kalciumfüggő ATP-áz specifikus gátlásán keresztül, így sejtkárosodáshoz és sejthalálhoz vezet. Fő célszervei a vázizomzat, máj, lép, de kimutattak már a hasnyálmirigyben, gyomor-béltraktusban, szívben, vesében is a kóros elváltozásokat, illetve neurológiai tüneteket is a hatására. Embereknél elsősorban hányingert, hányást, depressziót, eszméletvesztést okoz. Gabonafélékben, diófélékben, sajtban, húskészítményekben, tejben, tojásban írtak le eddig CPA szennyezettséget (Uka et al., 2017). Szerkezetüket tekintve vannak köztük indol származékok, például α -CPA, iso - α -CPA, β -CPA, α -CPA imin; speradinok például 2-oxo-CPA, speradine A, B, C, D, E, F, H, I; aspergillinek, például aspergilline A, B, C, D, E; illetve ciklopiamidok, például ciklopiamid A, B, C, D, E, F, G, H, J (2. ábra). Ezek hatásait gyakran elfedik a többi mikotoxin káros hatásai, ezért kevésbé vizsgáltak (Lee et al., 1991). Az α -CPA, a 2-oxoCPA és a speradin A esetében a szarkoplazmatikus retikulum kalciumion intracelluláris áramlására gyakorolt blokkoló hatást már leírták, viszont a többi CPA-típusú metabolit toxikológiai hatásai még nem ismertek, ezenkívül ezek előfordulásáról az élelmiszerekben, takarmányokban nincsenek adatok (Burdock et al., 2000; Tsuda et al., 2003; Uka et al., 2017).



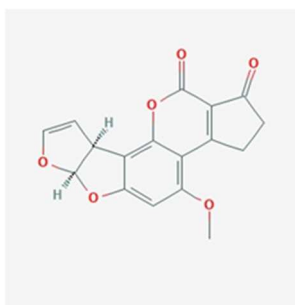
3. ábra: Speradine típusú vegyületek szerkezete (Uka et al., 2017)

2.4 Aflatoxinok

Az aflatoxinokat 1960-as években fedezték fel, amikor Angliában több mint százezer pulyka elpusztult az ún. pulyka-X-kórban. Rájöttek, hogy ezért a pulyka takarmányában lévő, aflatoxint tartalmazó földimogyoró a felelős (Wannop, 1961). Az aflatoxin elnevezésben az „a” az *Aspergillus*, a „fla” a *flavus*, míg a „toxin” a toxikusságra utal.

Az aflatoxinokat elsősorban az *Aspergillus flavus* és *Aspergillus parasiticus* termeli (Mayer et al., 2003; Schmidt-Heydt et al., 2008), de más *Aspergillus* és *Rhizopus* fajok esetében is kimutatták ennek a mikotoxinnak a termelődését (Erdogan, 2004; Cary et al., 2005; Varga et al., 2009). A gomba toxintermelésének 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. 1974-ben 100 ember halt meg aflatoxin mérgezésben Indiában, míg 2004-ben Kenyában 125 ember halálát okozta az aflatoxin tartalmú élelmiszer elfogyasztása következtében kialakult akut aflatoxikózis (Probst et al., 2007). Az aflatoxinok UV-fényben kék vagy zöld fluoreszcenciát mutatnak, és ez alapján történt a különböző aflatoxin csoportok elkülönítése és elnevezése is. Így megkülönböztetünk kék (blue) színű aflatoxin B1 és B2 (4. ábra), valamint zöld (green) aflatoxin G1 és G2 csoportokat. Ezek a csoportok

szerkezetükben eltérnek egymástól, a B-csoport ciklopentán gyűrűt, a G csoport pedig lakton gyűrűt tartalmaz (Gourama et al., 1995). Főként gabonafélékben, olajos magvakban, fűszerekben, szárított gyümölcsökben, gyapotmagban, tejben, sörben fordulnak elő. Az aflatoxin M1 és M2 az aflatoxin B1 és B2 toxinok hidroxilált metabolitja, amelyek leginkább a tejből mutathatók ki. Az aflatoxinok közül az aflatoxin B1 az élelmiszerekben és a takarmányokban leggyakrabban előforduló toxin, és ez a legtoxikusabb. Az aflatoxin B1-ből biotranszformáció eredményeképpen epoxid jön létre, amely kovalens kölcsönhatásba képes lépni a DNS-ben, RNS-ben, proteinekben lévő nukleofil helyekkel, így képes kifejteni mutagén, teratogén, karcinogén hatását (Oliveira et al., 1997). Az aflatoxin B1 elsősorban a májban okoz rákos elváltozásokat. Összefüggést fedeztek fel a hepatitisz B és C, valamint az aflatoxinnak való kitettség között, a kettő együttes előfordulása növeli a májrák kialakulásának kockázatát (Williams et al., 2004).



4. ábra: Aflatoxin B1 kémiai szerkezete

(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/186907#section=2D-Structure>)

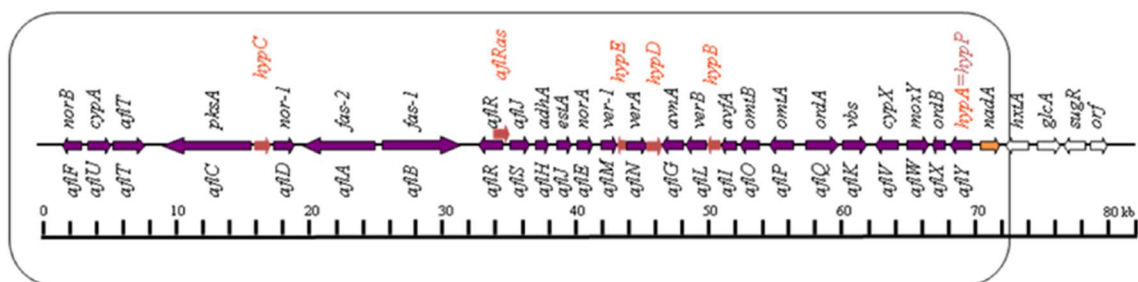
2.5 Mikotoxinok kimutatása

A toxintartalom meghatározásának első lépése az extrakció, amely történhet különféle szerves oldószerekkel, mint például metanol, acetonitril, etanol, aceton, illetve immunaffin oszlop kromatográfiával, amelyben a toxin specifikusan és reverzibilisen kötődik a megfelelő antitesthez. Kezdetben vékonyréteg kromatográfias módszerekkel detektálták a különböző toxinokat, de ma már számos módszer rendelkezésre áll a toxinok kimutatására. A vékonyréteg kromatográfias módszer előnye, hogy egyszerre többféle toxin is kimutatható, érzékeny, viszont kevésbé pontos módszer (Papp et al., 2002; Wacoo et al., 2014). Az aflatoxinok kvalitatív és kvantitatív kimutatására legmegbízhatóbb és legpontosabb kémiai-analitikai módszer a nagynyomású-folyadékkromatográfia (HPLC). Ezen kívül széles körben alkalmazzák az antitest alapú kimutatási módszereket (pl.

ELISA). ELISA-val történő aflatoxin mérés egyszerűbb, olcsóbb, gyorsabb, viszont a HPLC-vel specifikusabb, érzékenyebb, de szignifikáns különbséget nem mutattak ki a mérések között (tej- és takarmányminták vizsgálata alapján). Mindkét módszer pontos, érzékeny, reprodukálható és a HPLC alkalmas alacsony koncentráció kimutatására is (Pirestani et al., 2011; Traistaru et al., 2012).

2.6 Az aflatoxin bioszintézisének genetikai szabályozása

A másodlagos anyagcseretermékek bioszintézisét lehetővé tevő gének gyakran egy génklaszterbe csoportosulnak. Az *Aspergillus flavus*ban kb. 40 szekunder metabolit termelésért felelős génklaszter van (Keller et al., 2005) és a legtöbb klaszter eddig még ismeretlen metabolitok szintézisében vesz részt. Az *Aspergillus nidulans*ban a 60 kbp méretű sterigmatocisztin bioszintézis génklaszter 25 génterméket és legalább 21 enzimátikus lépést kódol (Brown et al., 1991; Yu et al., 2004b). Az *Aspergillus flavus*ban és az *Aspergillus parasiticus*ban az aflatoxin bioszintézist szabályozó génklaszter 75 kbp méretű (Yu et al., 2004a, 2004b) (5. ábra) és a harmadik kromoszóma telomer régiójának közelében helyezkedik el (Chang et al., 1993; Woloshuk et al., 1994; Payne et al., 2006; Yu et al., 2004a; 2004b).



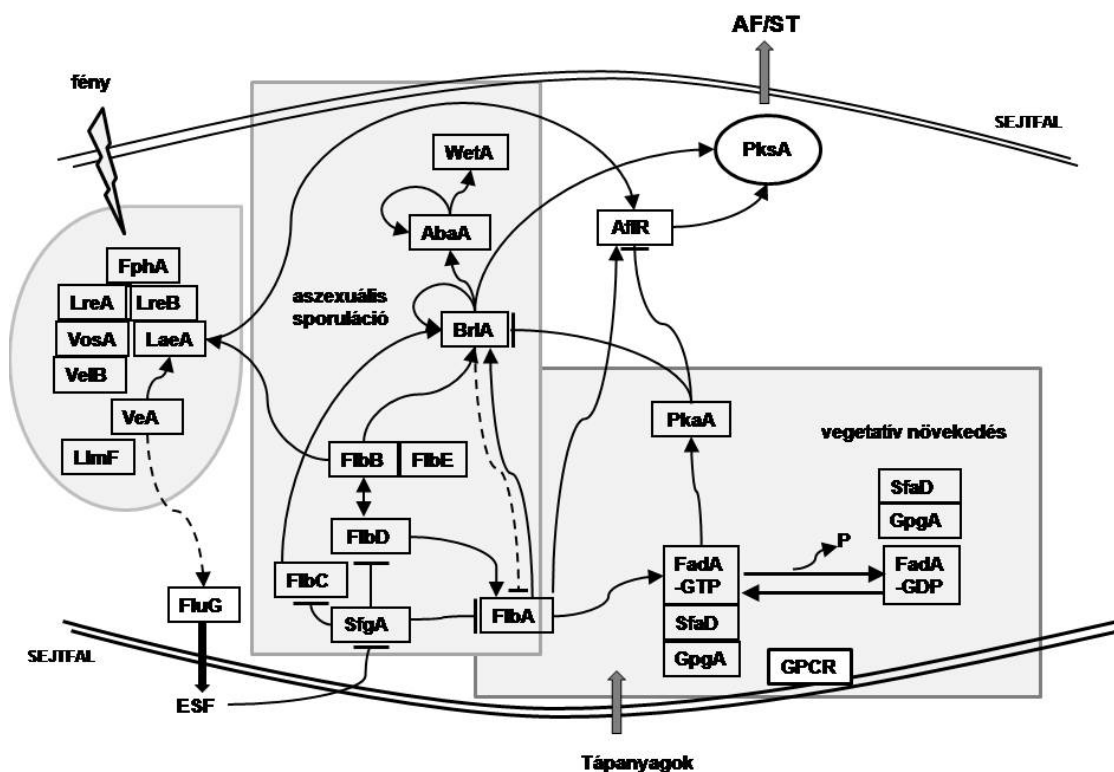
5. ábra Aflatoxin képződést szabályozó génklaszter *Aspergillus flavus*ban (Yu, 2012). Az ábra felső sorában a gének régi elnevezései vannak feltüntetve. A nyilak jelzik a géntranszkripció irányát.

Az aflatoxinok poliketid típusú vegyületek, amelyek több aromás gyűrűből állnak. Termelődésükért a poliketid szintáz A (PKS A) megaszintáz felelős, ami hat enzimet tartalmaz. Elsőként a 7 db malonil-koenzim A és egy hexanoil-csoport egyesül egy 20 szénatomos intermedierré, norsolorinsavvá. Majd ebből több lépés során sterigmatocisztin, végül aflatoxin B1 keletkezik, amely B2-vé alakulhat, vagy pedig az

B1-ből G1, majd G2 keletkezik (Ames et al., 2009). A poliketid szintáz gén (*pksA*) expressziójára az AflR transzkripció faktor, a BrlA (aszexuális fejlődést reguláló transzkripció faktor), a CreA (szén katabolit represszor) és a PacC (pH-függő regulációs transzkripció faktor) hat (Chang et al., 1995; Ehrlich et al., 2003; Pusztahelyi et al., 2013). Az *aflR* gén egy szekvencia specifikus DNS kötő két-magvú cink fehérjét kódol. A legtöbb aflatoxin bioszintézisben résztvevő struktúrgén transzkripció aktivációjához szükséges (Payne et al., 1993; Woloshuk et al., 1994; Chang et al., 1993, 1995; Yu et al., 1996; Flaherty et al., 1997; Ehrlich et al., 1998; Price et al., 2006). Az *Aspergillus fumigatus*ban és az *Aspergillus nidulans*ban is megvan az *aflR* gén, de ezek génszekvenciája eltérő (Carbone et al., 2007). Az *Aspergillus flavus* aflatoxin génklaszterében hat gén expressziója független az AflR szabályozásától (Georgianna et al., 2009). Az *aflR* gén mellett elhelyezkedő *aflS* gén szintén részt vesz az aflatoxin bioszintézis szabályozásában, bár az ebben betöltött pontos funkciója még nem teljesen tisztázott. Annyit bebizonyítottak, hogy az *aflS* fokozza az aflatoxin bioszintézis korai és középső szakaszában részt vevő gének transzkripcióját (Georgianna et al., 2009). Fonális gombákban szoros összefüggés van a másodlagos anyagcsere és a differenciálódás között. A szignál transzdukciós útvonalak együttesen szabályozzák a sterigmatocisztin/aflatoxin szintézist és a konídium képződést. Ennek az útvonalnak szerves részét képezik a sejtmembránban található receptorok, amelyek érzékelik az extracelluláris jeleket, mint például fény, ionok, cukrok, aminosavak, polipeptidek, zsírsavak, szteroidok jelenléte (Pierce et al., 2002). A GPCR receptorok által közvetített extracelluláris jelek révén aktiválódnak a G proteinek, amelyek GTP-t kötő fehérjék. A G-protein jelátvitel a G proteín/cAMP (ciklikus AMP)/PKA (protein kináz A) szignál transzdukciós útvonalon keresztül köti össze a sterigmatocisztin/aflatoxin bioszintézis szabályozását és az aszexuális sporulációt az *Aspergillus*okban. A heterotrimer G proteín α alegységét a *fadA* kódolja (Yu et al., 1996). A FadA fehérje aktivációjával gátolt lesz a sterigmatocisztin képződés és az ivartalan konídium képződés az *Aspergillus nidulans*ban, míg az *Aspergillus flavus*ban, illetve *Aspergillus parasiticus*ban pedig az aflatoxin és a CPA bioszintézist gátolja (Hicks et al., 1997; McDonald et al., 2004). A FadA GTP hatására aktiválódik és így aktiválja az adenilát cikláz enzimet, ami hatására cAMP keletkezik, és ez szabályozza a PkaA-t, ami viszont gátolja az *aflR* aktivitását (Hicks et al., 1997). Az FlbA G-protein regulátor fehérje gátolja a FadA-GTP keletkezését, és ezáltal közvetett módon gátolja a PkaA-t (Yu et al., 1996; Hicks et al.,

1997; Shimizu et al., 2001); ugyanakkor az FlbA az aflR-t PkaA és cAMP jelenlététől függetlenül is szabályozza (Shimizu et al., 2003). A PkaA az *aflR* gén expresszióját negatív transzkripciós szabályozással, az AflR fehérjét pedig foszforilációs poszttranszkripciós szabályozással inaktíválja (Shimizu et al., 2001; Shimizu et al., 2003). A PkaA esetében sem az alacsony, sem a magas expressziós szint nem kedvez az aflatoxin termelésének (Shimizu et al., 2003). Viszont a FluG fehérje az FlbA közvetítésével stimulálja a sterigmatocisztin termelést, szükséges a konídium képződésben is, és közvetett módon gátolja a vegetatív növekedést (Lee et al., 1994a, b, 1996; Hicks et al., 1997; D'Souza et al., 2001). A BrlA szintén befolyásolja az aflatoxin képződést, illetve elősegíti a konídiumképződést (Ehrlich et al., 2003). A VeA (6. ábra) számos szabályozásban részt vevő gén transzkripcióját befolyásolja (pl. *brlA*, *aflR*) és a LaeA aktivációja segítségével szabályozza az aflatoxin bioszintézist (Kato et al., 2003; Calvo, 2008), ugyanakkor a szexuális szaporodást is irányítja (Kato et al., 2003). A LaeA egy protein metiltranszferáz, amely kiemelkedő jelentőségű, de nem nélkülözhetetlen a szekunder metabolit képződéséhez. A szabályozás pontos mechanizmusa még nem ismert, valószínűleg a kromatin állomány átrendeződésén keresztül fejti ki hatását (Zhang et al., 2004; Yu et al., 2005; Bok et al., 2006). A VeA kölcsönhatásban van a fitokrómokkal, amelyek érzékelik a fényt: az *Aspergillus nidulans*-ban a kék fény stimulálja, a vörös és fehér fény pedig gátolja a mikotoxin bioszintézist (Purschwitz et al., 2008). A LaeA, VeA és VelB kölcsönhatások szabályozzák a fejlődést, a szkleróciumok kialakulását és a másodlagos anyagcseretermékek képződését (Atoui et al., 2010). A LaeA stimulálja az *aflR* génexpresszióját, ugyanakkor a PkaA és az AflR negatívan, a VeA pedig pozitívan szabályozza a LaeA expresszióját (Bok et al., 2006; Cary et al., 2007; Roze et al., 2007; Bayram et al., 2008).

Számos környezeti tényező befolyásolja az aflatoxin bioszintézist, ilyen például a hőmérséklet (O'Brian et al., 2007), fény, pH, szénforrás, nitrogén forrás (Calvo et al., 2002; Price et al., 2005). Az egyszerű cukrok (Davis et al., 1968) és az acetát stimulálják (Shantha et al., 1981), a trikarbonsav ciklus intermedierei pedig gátolják az aflatoxin képződését (Buchanan et al., 1977; Shantha et al., 1981). Ugyanakkor a szénforrás nem szabályozza specifikusan az aflatoxin bioszintézis útvonal génjeit, vagy a prekursorok révén, vagy a cAMP jelátviteli útvonalon keresztül befolyásolják az aflatoxin szintézist (Georgianna et al., 2009).



6. ábra A ST/AF szabályozásához kapcsolódó szignál transzdukciós szabályozó útvonalak (Kovács et al., 2014)

A nitrogénformák közül a nitrát gátolja az aflatoxin képződését, az *aflS* gének expresszióját növeli, a többi aflatoxin szintézisben részt vevő gének expresszióját csökkenti (Price et al., 2005). Viszont a tényleges aflatoxin szintézist egy másik, az aflatoxin szintézisen kívüli útvonal gátolja, ami az egyik hipotézis szerint a nitrát okozta redoxpotenciál változással hozható összefüggésbe, ez befolyásolja a poliketid szintézis prekursorának keletkezését, a mannit dehidrogenáz aktivitásának növelése révén (Niehaus et al., 1989).

A savas pH kedvez az aflatoxin szintézisnek, a PacC transzkripciós faktor révén, amelynek a kötőhelye az *aflR* promóterében található, míg a lúgos pH aflatoxin szintézisre gyakorolt gátló hatása a pka-n keresztül valósul meg (Tilburn et al., 1995, Ehrlich et al., 1999, Shimizu et al., 2003; Shimizu et al., 2001).

A réz, vas, cink keveréke növeli az összes RNS mennyiségét, a biomasszát, az *aflP*, az *aflH* transzkripciót és az aflatoxin szintézisét (Cuero et al., 2003, 2005). A hőmérséklet hatása az aflatoxin szintézisre reverzibilis, a szintézishez szükséges optimális hőmérséklet fölött az aflatoxin génklaszter génjei represszálódnak, kivéve az *aflR*-t és

aflS-t, amelyeknek a szintje egy állandó értéken marad (O'Brian et al., 2007), viszont az AflR fehérje szintje sokkal alacsonyabb magasabb hőmérsékleten, ami az aflatoxin génklaszter génjeinek transzkripciós gátlásával, valamint a fehérjék inaktiválásával magyarázható (Liu et al., 1998).

A sejtek antioxidáns rendszerükkel védekeznek a reaktív oxigén gyökök ellen, amelyek képesek a DNS-sel, fehérjékkel és a lipidekkel reakcióba lépni, és károsítani azok funkcióit. Amikor megszűnik az egyensúly az antioxidánsok és a reaktív oxigén gyökök szintje között oxidatív stressz lép fel (Apel et al., 2004). Az oxidatív stressz stimulálja az aflatoxin szintézist, míg az antioxidánsok, mint például a galluszsav kedvezőtlenül befolyásolja az aflatoxin képződését, az *aflM* és *aflD* gének gátlása révén (Jayashree et al., 2000; Mahoney et al., 2004; Reverberi et al., 2008). Az oxidatív stressz aflatoxin képződésre gyakorolt hatásában fontos szerepe van a szuperoxid-dizmutáznak, amely a szuperoxidot hidrogén-peroxiddá és vízzé alakulását katalizálja, és szintén gátolja az aflatoxin keletkezését (Furukawa et al., 2019).

A lipidszintézis korrelál az aflatoxin termeléssel, hiszen az első lépésben acetyl-coenzim A keletkezik, ami szükséges a sterigmatocisztin és így az aflatoxin képződéséhez (Dutton, 1988). Az oxilipinek olyan szignál molekulák, amelyek zsírsavakból származtathatók, és fontos szerepük van a fejlődés, a patogén folyamatok, valamint a szekunder metabolitok termelésének szabályozásában (Tsitsigiannis et al., 2006, 2007). A zsírsav oxigenázokat kódoló gének (*ppoA*, *ppoB*, *ppoC*) hatással vannak a *brlA* és *veA* gének expressziójára, a *veA* gén szabályozza az aszexuális szaporodást befolyásoló *brlA* gént is, amely hatást lehetséges, hogy az oxilipineken keresztül fejt ki (Tsitsigiannis et al., 2005; Calvo, 2008). A *ppo* gének *aflR*-re gyakorolt hatásuk kifejezhetik a PKA-n, vagy G-fehérje által közvetített útvonalon keresztül (Tsitsigiannis et al., 2006).

2.7 Szántóföldi mikotoxintermelés kontrollja

A penészgombák vagy a szántóföldön fertőzik meg a növényeket, vagy a tárolás során szaporodnak el rajtuk, így elkülöníthetünk szántóföldi és raktári penészeket (Glenn, 2007). A szántóföldi penészek elterjedésének a megakadályozására és így a toxintermelés megelőzésére számos lehetőség áll rendelkezésre.

2.7.1 Agrotechnikai kontroll

A vetés idejét célszerű helyesen megválasztani, hogy a virágzás, a termésképződés, és az érés ne aszályos, vagy időjárási szempontból kritikus időszakra essen. Ez a gyakorlatban sajnos nehezen megvalósítható, hiszen az időjárási szempontból kritikus időszakot nehéz előre megjósolni, valamint minden növényfaj rendelkezik egy vetési idő optimummal. A kukoricaszemek fertőződése gombával elsősorban a szemek érése előtt következik be szántóföldi körülmények között (Dolezal et al., 2014). A növény gombával való fertőzöttségének kedvez a párás, kevésbé forró időjárás, viszont az aflatoxintermeléshez a forró, száraz időszak szükséges. A korai és megfelelő növényesűrűséggel történő vetés, korábbi betakarítás is csökkenti a képződő aflatoxin mennyiségét (Munkvold, 2003).

Megfelelő ellenálló képességű hibrideket kell alkalmazni a vetés során. A megfelelő ellenállóképességű hibridek létrehozása elég nehéz feladat, hiszen a növénynek megfelelő terméshozamot kell produkálnia, valamint nemcsak az *Aspergillus flavus*-szal szemben kell nagy ellenállóképességgel bírnia, hanem más toxinogén gomba fajokkal szemben, illetve a különböző szélsőséges környezeti hatásokkal szemben is. A toxin szennyezettség, valamint a fertőzöttség mértéke között egyértelmű korreláció figyelhető meg, viszont a rezisztencia mértéke a toxintermeléssel és a fertőzöttséggel nem minden esetben mutat ilyen egyértelmű összefüggést (Mesterházy et al., 2012; Szabó et al., 2018). A természetes penészgomba fertőzés nem elegendő a nem megfelelő ellenállóképességű hibridek szelektálására (Szabó et al., 2018), ezért mesterséges fertőzést kell alkalmazni, hogy megfelelő rezisztenciájú hibrideket tudjunk tesztelni. Illetve ezek genotípusos és fenotípusos jellemzőit is vizsgálni kell, hiszen ezek összefüggenek a növény rezisztenciájával. Ezek alapján a kukorica hibrideket alacsony, közepes és magas kockázatú csoportba osztják (Szabó et al., 2018). A rezisztencia a kukoricában poligénikus, genetikailag stabil, viszont a gének expressziója a különböző környezeti hatásokra változhat. Így vannak olyan hibridek, amelyeken az aflatoxintermelés számára kedvező időszakban kevesebb toxint termelődik, mint a kedvezőtlen időszakban. Ezért a rezisztens hibridek kifejlesztése, vizsgálata még további kutatásokat igényel. Egyes vizsgálatok kimutatták, hogy az érzékeny kukoricahibridekben az *Aspergillus flavus* általi kolonizáció több kukoricagént indukál, mint a rezisztens hibridekben (Luo et al., 2011). Ezek a gének résztvesznek a gazdaszervezet védekezési mechanizmusában. A fertőzés hatására például csökken a kukoricában a keményítősintézis, az invertáz enzim

megnövekedett transzkripciója révén hexózok mobilizálódnak a növény védekezési útvonalaiba (Dolezal et al., 2014), ezáltal megváltozik a mag endospermiumának szerkezete is. Viszont annak ellenére, hogy ezek a mechanizmusok a növény védekező mechanizmusának részei, elősegítik a gomba kolonizációját, azáltal, hogy kedvező körülményeket biztosítanak számukra a szaporodáshoz. Például, ha a hexózok nagyobb koncentrációban vannak jelen, nő a növény érzékenysége a fertőzőtősséggel szemben, és több aflatoxin képződhet (Dolezal et al., 2014). A növények képesek ún. PR fehérjéket termelni, amelyek produkcióját a gazdanövényben a patogén fertőzés indukálja (Luo et al., 2011). A növényi hidrolitikus enzimek, mint pl. β -1,3-glükánázok és kitinázok hatékonyak a gombafertőzések elleni védekezésben, hiszen képesek a gomba sejtfalának degradációjára (Dolezal et al., 2014), valamint lizozim aktivitással rendelkeznek és hatékonyan megakadályozzák a micéliumok fejlődését is (Collinge et al., 1987). A toxinogén és aflatoxint nem termelő törzsekkel leoltott kukorica vizsgálata során hét kitináz gén expressziója nőtt a fertőzés következtében (Hawkins et al., 2015). A kitinázokon kívül a lektineknek is fontos szerepük van a növény védekező folyamataiban (Hawkins et al., 2015).

A növényi hormonok is szerepet játszanak a gomba-növény interakciókban. Az abszcizinsav termelődésért felelős gének intenzívebben expresszálódtak érzékeny földimogyoróban, mint a rezisztensben (Wang et al., 2016a). Az etilén hatása az aflatoxin termelődésére ellentmondásos, bizonyos irodalmak szerint gátolja az aflatoxin produkciót (Huang et al., 2009), mások szerint elnyomja a növény aflatoxin termeléssel szembeni ellenállóképességét (Wang et al., 2016b), míg megint mások azt állítják, hogy elősegíti ugyan az *Aspergillus flavus* kolonizációját, de az aflatoxin termelődését nem (Wang et al., 2017). A szalicilsav is gátolta a gomba micéliumok növekedését és az aflatoxin képződést gyümölcsökben (Seyfferth et al., 2014). A jázminsav, valamint az arachidonsav szintén részt vesz a növények védelmi mechanizmusainak szabályozásában *Aspergillus flavus* infekció esetén (Savchenko et al., 2010; Bedre et al., 2015).

A fertőzés hatására bekövetkező fokozott növényi oxilipin produkció befolyásolja a gombák konídiospóra képzését (Burow et al., 1997). A 9S-hidroperoxi-zsírsav növeli a kukorica érzékenységét, indukálja az *Aspergillus sp.* aszkospóra képzését, míg egy másik oxilipin, a 13S-hidroperoxi-zsírsav gátolja a gomba aflatoxin/sterigmatocisztin termelésért felelős gének expresszióját, így fontos rezisztencia faktor a növényi patogének elleni védekezésben (Tsitsigiannis et al., 2005). Viszont a gomba is képes

oxilipineket termelni a növény-gomba interakció során. Az *Aspergillus flavus* csak egy lipoxigenázt kódol, amely képes befolyásolni a gazdanövény válaszát a patogén gombával szemben. A gomba oxilipinek képesek befolyásolni a növényi oxilipinek konídiumképződésre gyakorolt hatását (Prost et al., 2005).

A növény-gomba interakció kezdeti szakaszában a patogén gomba oxidatív stressz támadást indíthat el a növény felé, amelyben reaktív oxigén gyökök szabadulnak fel (Reverberi et al., 2008). A növényekben a különböző környezeti stressz hatásokra (Fountain et al., 2014), valamint a lipoperoxidációs folyamatok eredményeképpen szintén ROS vegyületek halmozódnak fel, ami elősegíti a gomba aflatoxin képződését (Reverberi et al., 2008). A ROS felhalmozódás, valamint az aflatoxin képződés eredményeképp a növényben aktiválódnak a különböző peroxidáz, oxidáz enzimek termelődéséért felelős gének, ezek az enzimek részt vesznek a ROS feldolgozásában (Bedre et al., 2015). A rezisztens növényekben a peroxidázok magasabb expressziós szintet mutatnak *Aspergillus flavus* fertőzés hatására, tehát ezeknél a növényeknél hatékonyabban valósul meg az oxidatív stressz megszüntetése (Wang et al., 2016b).

A növényekben a fenilpropanoid bioszintézis út során termelődő flavonoidok, polifenolos vegyületek szintén részt vesznek a növény védelmét biztosító folyamatokban, mint például az UV-val, betegségekkel szembeni ellenállóképesség kialakításában (Pierpoint, 2000). Ezek a vegyületek a membránfehérjékkel való kölcsönhatásuk révén befolyásolják a gombasejtek permeabilitását, így számos membránhoz kötött folyamat károsodik (De Oliveira et al., 2011; El-Mogy et al., 2012), amelyek a spóra csírázását és a hifák növekedését gátolják (Hassan et al., 2012). A kukoricában képződött szeszkviterpén fitoalexin, az ún. zealexin fitopatogén gombákkal (*Rhizopus microsporus*) szemben gombaellenes hatású (*Aspergillus flavus*, *Fusarium graminearum*) (Huffaker et al., 2011). Kimutatták, hogy a rutin (quercetin-3-rutinozid) (Chitarrini et al., 2014), a quercetin, a p-kumarinsav (Bagheri-Gavkosh et al., 2009), a β -karotin, a β -kriptoxantin, és a provitamin A vegyületek (Suwarno et al., 2019) hatékonyan gátolják az aflatoxin B1 termelődését. A provitamin A hatékonyan alkalmazható a kukorica aflatoxin termelés megelőzésére (Suwarno et al., 2019).

A vetésforgó alkalmazása is csökkenti a mikotoxin termelődését. Például, amikor a búza követte a kukoricát a vetésforgóban, a DON toxin mennyisége kétszer akkora volt (Schaafsma et al., 2001), viszont, ha más növényeket, például zöldségeket, lucernát,

lóherét alkalmaznak a vetésforgóban, a fonalas gomba fertőzöttség csökkent (Krebs et al., 2000).

Mivel a gomba spórák képesek túlélni a talaj felső rétegében, illetve az elhalt növényi részekben, ezért fontos a megfelelően mély szántás. Kiemelkedő jelentőségű ezen kívül még a megfelelő időszakban, megfelelő vízmennyiséggel történő öntözés az időjárás figyelembevételével.

2.7.2 Kémiai kontroll

Az inszekticidek alkalmazása kiemelkedő jelentőségű: a kukoricacsöveket károsító kukoricamoly, gyapottok bagolylepke, kukoricabogár elleni védekezés elengedhetetlen. A rovarok egyrészt megsértik a rágásukkal a maghéjat, valamint a gombaspórák hordozó vektorai is lehetnek (Cotty et al., 2007). A sérült magok pedig sokkal érzékenyebbek lesznek a gombás fertőzésekre (Prandini et al., 2009).

A nem megfelelő minőségű, mennyiségű műtrágya használata, például a magasabb nitrogéntartalmú műtrágya alkalmazása, a növények túlságosan gyors vegetatív fejlődéséhez vezethet, ezek hatására viszont érzékenyebb lesz a növény a rovarokkal és a gombákkal szemben (Munkvold, 2003).

2.7.3 Biológiai kontroll

Néhány baktérium, mint pl. a *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Burkholderia spp.*, *Ralstonia spp.* laboratóriumi körülmények között hatékonyan csökkentik az *Aspergillus flavus* növekedését és toxintermelését, viszont ezek *in vivo* alkalmazása nehézségekbe ütközik (Dorner, 2004).

Bizonyos élesztő fajok, mint például a *Candida krusei* és a *Pichia anomala* szintén alkalmasak a gomba növekedésének gátlására és a toxintermelésének csökkentésére laboratóriumi körülmények között, viszont ezek alkalmazhatóságának vizsgálata potenciális biokontrollként a szántóföldön még további vizsgálatokat, kísérleteket igényel (Hua et al., 1999; Masoud et al., 2006).

A legnagyobb eredményeket az aflatoxin szennyezettség biológiai módszerekkel való csökkentésére mind a betakarítás előtt, mind a betakarítás után az aflatoxint nem termelő *Aspergillus flavus* alkalmazásával érték el. A különböző területeken eltérő a toxintermelő és nem termelő *Aspergillus flavus* törzsek megoszlása (Cotty et al., 2006). A biokontroll

lényege, hogy olyan aflatoxint nem termelő *Aspergillus flavus* törzset alkalmazunk, amely képes kiszorítani kompetitív képességeivel a toxinogén *Aspergillus flavus* törzseket a szántóföldön (Mehl et al., 2010). Ez a módszer hatékony, nem költséges, környezetbarát, innovatív, valamint a növényre kijutatott atoxinogén törzs az elhalt növényi maradványokkal bekerül a talajba a szántás során, így következő években is védelmet nyújt a toxinogén gombák elszaporodása ellen, és amely a betakarítás után is hat a tárolt szemek raktári szennyező *Aspergillus flavus* toxin termelésével szemben (Lewis et al., 2019). Ennek a biokontroll lehetőségnek a hatékonysága függ az atoxinogén gombával történő fertőzés módjától, a fertőzés idejétől és a fertőzésre használt gomba mennyiségétől (Jane et al., 2014).

2.8 Mikotoxintermelés kontrollja a betakarítás után

Aratás után a különböző területekről származó gabonák toxintartalmának meghatározása nagyon fontos, mert így elkerülhető, hogy keveredjen a gabonátároló silókban a toxinnal szennyezett és a nem szennyezett termés.

2.8.1 Fizikai kontroll

A raktározás során a magas hőmérséklet és magas páratartalom elősegíti a penészgombák elszaporodását, így a toxintermelést is. A tárolás előtt, lehetőleg a betakarítás után minél hamarabb csökkenteni kell a magok nedvességtartalmát szárítással. Ha a kukorica tárolása hosszútávú, akkor érdemes 12% alatti nedvességtartalmat elérni, vagy pedig alacsonyabb (12 °C alatti) hőmérsékletet alkalmazni (Prandini et al., 2009). A raktározást célszerű minél alacsonyabb hőmérsékleten végezni, és közben gondoskodni kell a magok megfelelő szellőztetéséről is, illetve fontos, hogy a silókban a hőmérséklet mindenhol azonos, szabályozott legyen. A magokat a tárolás előtt célszerű tisztítani (Veres et al., 2002; Prandini et al., 2009). A sérült magok jelenléte is növeli a keletkező mikotoxin mennyiségét. A gabonátárolókat a raktározás befejeztével alaposan ki kell tisztítani (Prandini et al., 2009).

2.8.2 Kémiai kontroll

A kukorica betakarítás után propionsavval, ammónium-izobutiráttal, vagy kalcium-propionáttal történő kezelése csökkentheti a mikotoxin termelődést (Bintvihok et al., 2006; Prandini et al., 2009).

Takarmányozásnál toxinkötő anyagokat használnak. A mikotoxin kötők anyagok általában nagyméretű molekulák, amelyek képesek adszorbeálni a mikotoxinokat, komplexet alkotva a mikotoxinnal gátolják azok felszívódását és így megakadályozzák, hogy az toxikus hatást fejtsen ki az állat szervezetében. Ezek az adszorbensek lehetnek szerves és szervetlen anyagok vagy szintetikus polimerek. Szervetlen mikotoxinkötők például a szilikát ásványok, amelyek maximum 2% mennyiségben alkalmazhatók a takarmányokban, mert megkötik a takarmányokban lévő mikroelemek, vitaminok egy részét is (Huwig et al., 2001). A duzzasztott nátrium-kalcium-aluminium szilikát az egyik leghatékonyabb aflatoxinkötő. Összeségében elmondható, hogy a szilikátok főként az aflatoxin, ochratoxin, zearalenon megkötésére képesek, a trichotecén vázas mikotoxinokkal szemben kevésbé hatékonyak (Huwig et al., 2001). Az aktív szén szintén szervetlen adszorbens, amely kevésbé specifikusan, de hatékonyan köti meg a mikotoxinokat, és sajnos a takarmányban lévő tápanyagokat, vitaminokat is (Huwig et al., 2001). A polimerek közül a kolesztiramin hatékonyan köti a zearalenont, fumonizint (Avantaggiato et al., 2005), viszont ez költséges eljárás lenne a mikotoxin eliminálására.

2.8.3 Biológiai kontroll

Takarmány előállításakor a silózás folyamán keletkező szerves savak csökkentik a keletkező toxin mennyiségét (Prandini et al., 2009). Kulcsfontosságú, hogy a silózáskor a tejsavas erjedés minél hamarabb meginduljon, hiszen a keletkező szerves sav meg fogja gátolni a gombák elszaporodását, toxintermelését, és ehhez biztosítani kell a megfelelő feltételeket. Valamint a silóban lévő baktériumok, mint például a *Lactobacillus buchneri* alkalmasak az aflatoxin B1 lebontására (Inês et al., 2015), míg a *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici* pedig képesek az AFB1 megkötésére. Ezeknek a detoxifikációs folyamatoknak a hatékonyságát számos tényező befolyásolja, mint például a baktérium populáció életképessége, a környezet hőmérséklete, pH-ja (Ma et al., 2017).

A tejben lévő aflatoxin M1 koncentrációja csökkenthető előlt *Saccharomyces cerevisiae*, vagy *Lactobacillus* sejtekkel, hiszen a sejtfalukban lévő poliszacharid, illetve peptidoglükán komponensek megkötik a toxint (Corassin et al., 2012).

3. Anyagok és módszerek

3.1 Törzsek izolálása

72 db *Aspergillus sp.* izolátumot gyűjtöttem takarmány alapanyagokról. Az izolátumokat maláta kivonatot tartalmazó agaron vizsgáltam, tartottam fenn. Maláta agar: 20 g/l agar, 20 g/l glükóz, 10 g/l maláta, 5 g/l élesztőkivonat, pH=7,3. Az izolátumok spóráit -76°C-on tároltam maláta-glicerol stock-ban.

Kontroll törzsként az *Aspergillus flavus* NRRL 11611, NCAIM F 00952 törzset használtam fel, ami a Szent István Egyetem Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményéből származott. A liofilezett törzset szintén maláta tápagarra oltottam ki és tartottam fenn.

3.2 Nukleinsav alapú azonosítás

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

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

nor1: 5-ACC GCT ACG CCGGCA 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. A PCR reakcióhoz szükséges anyagokat jégen mértem össze: 12,4 µl ultratiszta H₂O-t, 4 µl 5x Phusion HF puffert, 0,4 µl 10mM d NTP-s-t, 1 µl 10µM/µl forward primert, 1 µl 10µM/µl reverz primert, 1 µl templát DNS-t és 0,2 µl Phusion DNS polimeráz enzimet. Rövid centrifugálás után PCR készülékbe (BioRad) helyeztem: 98 °C 30 sec, majd 98 °C

10 sec - 65 °C 30 sec - 72 °C 30 sec harmincszoros ismételés, 72 °C 10 perc, majd a végterméket 4 °C-ra hűtöttem le.

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

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 Phusion High-Fidelity Kit-et (Thermo Scientific) használtam. A PCR reakcióhoz szükséges anyagokat jégen mértem össze: 12,4 µl ultratiszta H₂O-t, 4 µl 5x Phusion HF puffert, 0,4 µl 10mM d NTP-s-t, 1 µl 10µM/µl forward primert, 1 µl 10µM/µl reverz primert, 1 µl templát DNS-t és 0,2 µl Phusion DNS polimeráz enzimet. Rövid centrifugálás után PCR készülékbe helyeztem (BioRad): 98 °C 30 sec, majd 98 °C 10 sec 56 °C 30 sec 72 °C, 30 sec harmincszoros ismételés, 72 °C 10 perc, majd a végterméket 4 °C-ra hűtöttem. A kalmodulin primerek esetében a PCR reakciónál a következő hőmérsékletet alkalmaztam: 98 °C 30 sec, majd 98 °C 10 sec, 58 °C, 30 sec 72 °C 30 sec harmincszoros ismételés, 72 °C 10 min, majd a végterméket szintén 4 °C-ra hűtöttem. Az ITS1 és ITS4 primerek terméke esetében NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) kit segítségével történő tisztítás után 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.

3.3 Eltérő tenyésztési körülmények, stresszhatás vizsgálata

3.3.1 *Aspergillus flavus* vizsgálata különböző táptalajokon

A tápközegek sterilizálása minden esetben autoklávban történt, 121 °C-on, 30 percig.

A spóraszuszpenzió készítése során a tenyészetről lemostam a spórákat steril, 0,01% Tween 80 oldat segítségével. Körülbelül 1 ml spóramosót használtam fel 1 Petri csésze lemosásához. A szuszpenziót összegyűjtöttem és meghatároztam a spóraszámot Bürker kamra segítségével mikroszkóp alatt.

A leoltott tenyészetek inkubációja minden esetben, sötétben, 30 °C-on, 5-7 napig történt.

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.

3.3.1.1 Malátás táptalaj

A gombatörzsek tenyésztését elvégeztem malátás táptalajon, Petri csészében. A táptalaj tartalma: 20 g/l glükóz, 10 g/l maláta, 5 g/l élesztő kivonat és 20 g/l agar.

3.3.1.2 Kukorica kivonatot tartalmazó táptalaj

A gombatörzseket kukorica agaron is vizsgáltam. A táptalaj készítéséhez 15 g kukoricadarát 1 l vízhez adtam, majd főztem fél óráig, gézlapon átszűrtem és 20 g/l agar hozzáadása után steriliztem. A leoltás során pedig 10^2 /ml spóramennyiséget használtam.

3.3.1.3 Kukorica kivonat + só táptalaj

Ehhez a táptalajhoz 15 g/l kukoricadarát főztem 30 percig desztillált vízben, majd átszűrtem gézlapon és ezután 3 g/l NaNO_3 , 0,5 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g/l NaCl , 0,01 g/l $\text{FeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ és 20 g/l agart adtam. Ezen a táptalajon is vizsgáltam az *Aspergillus flavus* NRRL11611 törzs növekedését és aflatoxin képzését 10^2 spóramennyiséggel történő leoltás után.

3.3.1.4 Kukorica kivonat +glükóz táptalaj

Ehhez a táptalajhoz szintén 15 g/l kukoricadarát főztem 30 percig desztillált vízben, majd átszűrtem gézlapon és ezután 20 g/l glükózt és 20 g/l agart adtam hozzá. Ezen a táptalajon is vizsgáltam az *Aspergillus flavus* NRRL11611 törzs növekedését 10^2 spóramennyiséggel történő leoltás után, és az aflatoxin képzését az inkubációt követően.

3.3.1.5 Tápközegek összetételének analitikai vizsgálata

3.3.1.5.1 Nyerszsír tartalom meghatározás

Nyerszsír tartalomnak a mátrix petroléterrel extrahálható mennyiségét nevezzük.

A meghatározást folyamatos extrakcióval, és gravimetriás módszerrel végeztem. A nyerszsír tartalmat az MSZ EN ISO 11085: 2015 szabvány 8.3 szakasza szerint, Soxtec zsírmeghatározó segítségével végeztem el. A légszáraz, őrlött mintából 1 g-ot papírhüvelybe helyeztem, majd lemértem az üres, száraz, tiszta fémtégely tömegét. A Soxtec zsírmeghatározót bekapcsoltam, beindítottam a vízhűtést, 60 ml petrolétert mértem a fémtégelybe, majd a hüvelyek belemerültek a fémtégelybe és a készülék a kívánt hőmérséklet beállításával megkezdte a zsírok extrakcióját. 1 óra elteltével kiemeltam a hüvelyeket a tégelyből és folytattam az extrakciót, amíg az oldószer teljesen el nem párologott. Majd a tégelyeket szárítószekrényben súlyállandóságig szárítottam 103 °C ± 2 °C-on, és ismételten lemértem a tégely tömegét.

A nyerszsír tartalmat az alábbi képlet alapján számoltam ki:

$$\text{Zsír m/m\%} = (m_1 - m) \times 100 / A$$

ahol m= edény tömege, (g)

m₁= zsír+edény tömege, g-ban

A = bemért minta tömege, g-ban

Megengedett vizsgálati eltérés: ± 0,5 (m/m) %

3.3.1.5.2 Összes fenolos vegyületek meghatározása

Ennek a mérési módszernek a lényege az, hogy a mintából extrahált összes fenolos vegyület Folin-Ciocalteu reagenssel és nátrium-karbonáttal egy olyan elegyet képez, amelynek 760 nm hullámhosszon spektrofotométerrel mérhető az abszorbanciája. Ismert koncentrációjú galluszsav oldatok abszorbanciáját szintén megmértem 760 nm hullámhosszon, és ehhez viszonyítottam a minták abszorbancia értékeit, amiből kiszámítható a minták pontos koncentrációja, amelyet mg GAE (galluszsav ekvivalens)/100 g mértékegységben adtam meg (Kaur et al., 2002).

5 g mintát 50 ml-es polarizáló lombikba mértem, és metanol-desztillált víz 80:20 arányú elegyével kiegészítettem 50 cm³-re, majd ezt az oldatot redős szűrőpapíron szűrtem át. Ebből az oldatból kémcsőbe pipettáztam 0,5 ml-et és 2,5 ml Folin-Ciocalteu

reagenst adtam hozzá, majd 5 perc múlva 2 ml 75 g/l nátrium-karbonát oldatot pipettáztam a kémcsőbe és 2 órán át szobahőmérsékleten inkubáltam. Ezután mértem az oldatok abszorbanciáját 760 nm hullámhosszon, Perkin Elmer Precisely Lambda 25 spektrofotométeren metanol-desztillált víz vak oldattal szemben. Az eredményeket Excel programmal számoltam ki, kalibrációs görbe segítségével, amelyeket a standard oldatok abszorbancia értékei alapján vettem fel.

Megengedett vizsgálati eltérés: $\pm 10\%$ R

3.3.1.5.3 Összflavonoid meghatározás

Ezzel a módszerrel a flavonokat és flavanoloikat tudjuk kimutatni a mintából (Chang et al., 2002). Az extrahált flavonoidokat nátrium-nitrittel, alumínium-kloriddal és nátrium-hidroxiddal elegyítjük és így 510 nm hullámhosszon mérhető színváltozás következik be. A kapott értékeket az ismert koncentrációjú katechin oldat 510 nm-en mért abszorbanciájához viszonyítottam, és a kapott értékeket mg CE (katechin ekvivalens)/100 g mértékegységben adtam meg.

5 g mintát kimértem és 50 ml-re egészítettem ki 80:20 metanol: desztillált vízzel, összeráztam és redős szűrőpapíron szűrtem. A standard oldathoz 0,1 g katechint mértem ki és ezt is, ugyanúgy, mint a mintát 50 ml-re egészítettem ki 80:20 metanol: desztillált vízzel, aztán ezt még tízszeresére hígítottam, és a hígított oldatból kivettem 1, 2, 3, 4, 5 ml-t és 10 ml-re egészítettem ki.

4 ml desztillált vízhez 1 ml mintát, illetve 0,3 ml 5% Na-nitritet adtam, majd 5 perc elteltével 0,3 ml 10% alumínium-kloridot, 1 perc múlva pedig 2 ml 1 mol/l nátrium-hidroxid oldatot és 10 ml-re egészítettem ki desztillált vízzel. A vak ugyanígy készült csak a minta helyett 1 ml desztillált vizet használtam. Az eredményeket szintén Excel programmal számoltam ki, kalibrációs görbe segítségével, amelyeket a standard oldatok abszorbancia értékei alapján vettem fel.

Megengedett vizsgálati eltérés: $\pm 10\%$ R

3.3.1.5.4 Glükóztartalom meghatározása

A kukoricaagar glükóz-tartalmát D-glucose Assay Kit (Megazyme, GOPOD-Format) segítségével mértem. A D-glükóz víz és oxigén jelenlétében a GOPOD reagens hatására színes kinonimin vegyületet képez.

Centrifugálás és szűrés után a Kitben lévő GOPOD (Glükóz Oxidáz / Peroxidáz Reagens) segítségével inkubálás után (40-50 °C, 20 perc) meghatároztam a kukoricaagar szabad D-glükóz tartalmát spektrofotométer segítségével 510 nm hullámhosszúságon.

Kimutatási határ: 100 mg/l

3.3.1.5.5 Nitrogén-tartalom meghatározása

A kukoricaagar nitrogén-tartalmát Kjeldahl módszer szerint mértem, az MSZ EN ISO 5983-2:2009 szabvány alapján. Kénsavas roncsolás révén a minta nitrogén tartalma ammónium szulfáttá alakul, majd főlegben hozzáadott bázissal desztilláltam ammóniává (VELP automata desztillálóval), aminek a mennyiségét kondenzáció és sósavval történő titrálás (VELP automata titrátor) segítségével határoztam meg.

Megengedett vizsgálati eltérés: $\pm 0,5$ (m/m) %

3.3.2 Leoltáshoz alkalmazott spóramennyiség aflatoxinképződésre gyakorolt hatásának vizsgálata

Az *Aspergillus flavus* NRRL 11611 törzs spóraszuszpenziójából decimális hígítási sort készítettem és 100 μ l spóraszuszpenziót helyeztem a malátás táptalajra, és szélesztőbot segítségével szélesztettem. Az inkubációt követően megfigyeltem a morfológiai különbségeket az eltérő spórakoncentrációk mellett. Ezután előkészítettem a mintákat HPLC mérésre az aflatoxin B1 koncentráció meghatározásához, a 3.5.2 szakaszban leírtak szerint. Az eredményeket páros t-próba segítségével, Microsoft Excel szoftver használatával elemeztem (P<0,05 szignifikanciaszint mellett).

3.3.3 *Aspergillus flavus* izolátumok stresszvizsgálata

A stresszvizsgálatok során a gombatörzsek növekedését, szkleróciumpépződését, a spórapépzést, valamint a pigmentációt vizsgáltam malátás agar és kukorica-kivonatos

agar táptalajon (A. Melléklet). A stresszvizsgálatokhoz 0; 1; 1,5; 2 és 2,5 M koncentrációjú NaCl-t; 0; 0,05; 0,1; 0,5 és 0,75 g/l koncentrációjú SDS-t (nátrium-dodecil-szulfát) használtam.

3.4 Szemes kukorica oltása *Aspergillus flavus*-szal *in vitro* aflatoxin B1 és szekunder metabolitképződés vizsgálatához

Vizsgáltam a különböző kukoricahibrideken az aflatoxin B1 és egyéb szekunder metabolit termelést is, amelyhez 50 g kukoricát szintén 70 %-os etanollal kezeltem és mostam desztillált vízzel, majd steril Erlenmeyer lombikba helyeztem és leoltottam 500µl 10⁶/ml spóramennyiséggel. Az inkubáció 7 napig, 30 °C-on, sötétben történt.

3.5 Szekunder metabolitok HPLC analízise

3.5.1 Mintaelőkészítés HPLC méréshez kukoricaszemből

A 3.4 fejezetben leírt módon leoltott és inkubált kukoricából 25 g-ot mértem be, majd ehhez 2,5 g NaCl-ot 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 ebből 10 ml mintát átengedtem Afla-BTM immunaffin oszlopon (Vicom). 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 [Forrás: Vicam method (AflaB GN-MC9514-3 Rev B)].

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

Ennek során a gombát a Petri csészében lévő agarlemezzel 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 metanol: víz 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 3.4 fejezetben leírt módon leoltott és inkubált kukoricát darálás után kezeltem ugyanígy (Fente et al., 2001).

3.5.3 HPLC mérés

A magok oltása a 3.4, a mintaelőkészítés a 3.5.1 szakasz szerint történt. A kísérlet során az MV 251 kukorica hibridet használtam fel.

A HPLC műszer Merck Hitachi AS-4000 Intelligent Autosampler mintavevőt és Merck Hitachi L-6200A Intelligent pumpát tartalmazott. A detekció fluoreszcens detektor segítségével extinkció 360 nm és emisszió 440 nm hullámhosszon történt. Genesis C18 oszlopot alkalmaztam, ami 4,6 x 150 mm méretű, és a töltet részecskéinek átmérője 4 μm volt. 20 μl volt az alkalmazott injektálási térfogat, valamint 1 ml min^{-1} az áramlási sebesség. A mérés során metanol: víz, 45:55 oldatot használtam eluensként [Vicom method (AflaB GN-MC9514-3 Rev B)].

Alsó méréshatár: 1 $\mu\text{g/kg}$

Megengedett vizsgálati eltérés: $\pm 15\%$ R

3.5.4 HPLC-MS mérés

A méréseket a Debreceni Egyetem TEK TTK Kémiai Intézet Alkalmazott Kémiai Tanszéke végezte. A magok oltása a 3.4, a mintaelőkészítés a 3.5.2 szakasz szerint történt (A. Melléklet). A kísérlet során az MV 251 kukorica hibridet használtam fel.

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 szeparálták. 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:víz gradiens a következő volt (1. táblázat). 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 értékeltem ki a kapott eredményeket.

1. táblázat A HPLC-MS vizsgálat során alkalmazott elúciós gradiens

Idő (perc)	MeOH (%)	H ₂ O (%)
0	10	90
50	80	20
54	80	20
54,1	10	90
60	10	90

A vizsgálataim során a számos szekunder metabolit azonosítását végeztem el *Uka* és munkatársai (2017) publikációja alapján (B. *Melléklet*).

3.6 Kompetíciós teszt

50 g MV251 kukoricahibridet 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 10⁶/ml 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 *Aspergillus flavus* izolátumok arányával (A. *Melléklet*). 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 a 3.5.3. szerint. Az eredményeket páros t-próba segítségével, Microsoft Excel szoftver használatával elemeztem (P<0,05 szignifikanciaszint mellett).

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

Az *Aspergillus flavus* NRRL 11611 törzset, valamint egy atoxinogén és egy toxinogén *Aspergillus flavus* izolátumot 6 különböző kukoricahibrid szemre (MV251, DEKALB440, BC442, DKC5031, L6, ARSANO O.) oltottam le (A. *Melléklet*). Petri csészére 10-10 db 70%-os etanollal kezelt, majd desztillált vízzel mosott kukoricaszemet helyeztem, és leoltottam szemenként 10 µl 10⁶/ml spóramennyiségű spórával, 3 ismétlésben. Vizsgáltam a gomba növekedését, kolonizációs képességét a kukoricahibrideken. Az inkubáció 7 napig, 30 °C-on, sötétben történt (Luna-López et al.,

2013; Rajasekaran et al., 2013). Az eredményeket páros t-próba segítségével, Microsoft Excel szoftver használatával elemeztem ($P < 0,5$ szignifikanciaszint mellett).

4. Eredmények

4.1 *Aspergillus sp.* izolálása

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 (7. ábra) (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 konidiofórokat és egy vagy két sorban lévő konídiumokat mutattak. Összesen 72 db izolátum vizsgálatára került sor, amelyek kukoricáról, kukorica alapú takarmányokról, búzáról, illetve búzalisztekről származtak. A morfológiai vizsgálat után a gombákból DNS-t izoláltam, amit felhasználtam a feltételezetten toxinogén és aflatoxint nem termelő izolátumok elkülönítésére, valamint a faji identifikációra szolgáló PCR reakciók elvégzéséhez.

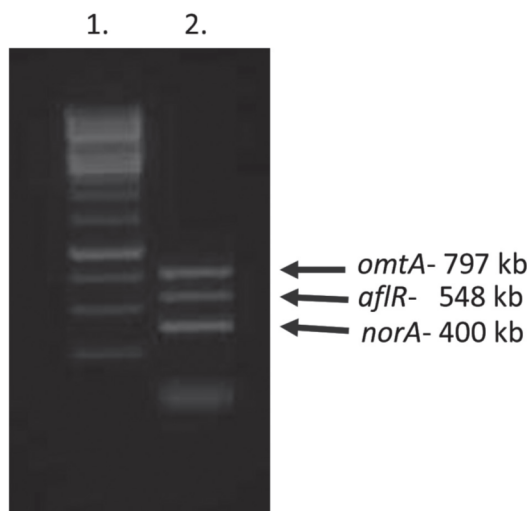


7. ábra *Aspergillus flavus* izolátum oltási felszíne és fonákja maláta agaron

4.2 Az izolátumok nukleinsav alapú vizsgálata

Az első kérdés, amire választ vártam, hogy az izolátumokból mennyi tartalmazta legalább egy, az aflatoxin génklaszterből származó *omtA*, *aflR* vagy *norA* gént, és ezáltal potenciálisan aflatoxint nem termelő vagy termelő törzsről van-e szó. Ezeket a vizsgálatokat multiplex PCR segítségével végeztem el, tehát a három gén szakaszát

egyetlen PCR-ben amplifikáltam, majd jelenlétüket agaróz gélelektroforézis segítségével mutattam ki (8. ábra).



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

A PCR eredmények alapján megállapítottam, hogy a 72 izolátumból 33 (2. táblázat) tartalmazta legalább az egyik vizsgált gént, tehát potenciálisan aflatoxinogén izolátum volt, és ezekből 17 izolátum esetében mind a három gén, tíz izolátum esetében csak az *aflR*, egy izolátum esetében csak a *norA*, négy izolátum esetében a *norA* és *aflR* együttesen, míg egy izolátum esetében az *aflR* és *omtA* együtt volt jelen (3. táblázat). Az izolátumok közül malátás táptalajon csak nyolc termelt aflatoxin B1-et (2. táblázat).

A multiplex PCR szerint pozitív izolátumokból (A. Melléklet) a potenciálisan aflatoxinogén törzsek faji identifikálását az ITS régió amplifikálásával és szekvenálásával végeztem, amelyhez az ITS1 és ITS4 primer párt (White et al., 1990) használtam. A kapott szekvenciák kiértékelését a Mega 7 program segítségével végeztem és azt a GenBank adatbázisával vettem össze. Ez alapján valószínűsíthetően, egy izolátum *Aspergillus tritici*, három izolátum *Aspergillus tritici* vagy *Aspergillus candidus*, egy izolátum *Aspergillus cristatus* vagy *Aspergillus amstelodami* (9. ábra), a többi 22 izolátum *Aspergillus flavus* volt, de a pontos faji identifikációhoz szükség van a kalmodulin gén amplifikálására és szekvenálására is.

Két izolátumot (egy aflatoxin termelőt és egy nem termelőt) illetve a referencia törzset választottam ki további vizsgálati célokra és ezeket a kalmodulin génszekvencia (C. Melléklet) segítségével meg is határoztam. Ezeket a szekvenciákat szintén a Mega 7 program segítségével értékeltem ki és azt a GenBank adatbázisával vettem össze.

Mindhárom vizsgált izolátum (9., 37. és a referencia *Aspergillus flavus* törzs) (A. Melléklet) *Aspergillus flavus*-nak bizonyult.

2. táblázat A potenciálisan toxinogén *Aspergillus* izolátumok és a referencia *Aspergillus flavus* NRRL11611 ITS1 és ITS4 szekvencia alapján történő azonosítása, az aflatoxin termelésért felelős génklaszter *norA*, *aflR*, *omtA* gének jelenlétének és az izolátumok aflatoxin B1 termelésének vizsgálata malátás táptalajon (Kovács et al., 2017). A megjelölt izolátumokkal végeztem további kísérleteket.

n.d.: kimutatási határ alatt

Izolátum sorszám	<i>norA</i>	<i>aflR</i>	<i>omtA</i>	ITS szekvencia alapján (a típus törzshöz viszonyított homológia % megadva)	Aflatoxin B1 termelés
<i>Aspergillus flavus</i> NRRL 11611	+	+	+	<i>Aspergillus flavus</i> O58 ITS1-100%, ITS4-100%	3,62 µg/ml +/- 0,5 µg/ml
1	+	+	+	<i>Aspergillus flavus</i> GFRS9 ITS1-99%, ITS4-99%	n.d.
6	+	-	-	<i>Aspergillus flavus</i> MBBP1 ITS1-100%, ITS4-99%	0,0108 µg/ml +/- 0,0015 µg/ml
7	+	+	+	<i>Aspergillus flavus</i> GFRS30 ITS1-98%, ITS4-84%	n.d.
9	+	+	+	<i>Aspergillus flavus</i> GFRS30 ITS1-100%, ITS4-100%	0,643 µg/ml +/-0,09 µg/ml
11	+	+	+	-	n.d.
12	+	+	+	<i>Aspergillus flavus</i> var. <i>flavus</i> CBS 130026 ITS1-99%, ITS4-99%	0,0127 µg/ml +/- 0,0015 µg/ml

Izolátum sorszám	<i>norA</i>	<i>aflR</i>	<i>omtA</i>	ITS szekvencia alapján (a típustörzshöz viszonyított homológia % megadva)	Aflatoxin B1 termelés
14	+	+	-	<i>Aspergillus tritici</i> CBS 266.81 ITS4-99%	n.d.
15	+	+	+	<i>Aspergillus cristatus</i> HNYW.21, <i>Aspergillus amstelodami</i> <i>E.amstelodami</i> /TMP/Cro ITS1-100%, ITS4-100%	n.d.
18	-	+	-	-	n.d.
21	+	+	-	<i>Aspergillus tritici</i> CBS 266.81 ITS1-100%, ITS4-100%	0,0014 µg/ml +/- 0,0002 µg/ml
23	-	+	-	-	n.d.
27	-	+	-	<i>Aspergillus flavus</i> ISO 14 ITS1-99%, ITS4-99%	n.d.
28	+	+	+	<i>Aspergillus flavus</i> YY5 ITS1-99%, ITS4-99%	n.d.
29	+	+	+	<i>Aspergillus flavus</i> GFR40 ITS1-99%, ITS4-100%	0,009 µg/ml +/- 0,001 µg/ml
30	+	+	+	<i>Aspergillus flavus</i> PHY35 ITS1-97%, ITS4-99%	n.d.
33	+	+	+	<i>Aspergillus flavus</i> isolate 7100210L1 ITS1-94%, ITS4-99%	n.d.
34	-	+	-	<i>Aspergillus flavus</i> GFRS30 ITS1-97%, ITS4-100%	n.d.
36	-	+	-	-	n.d.

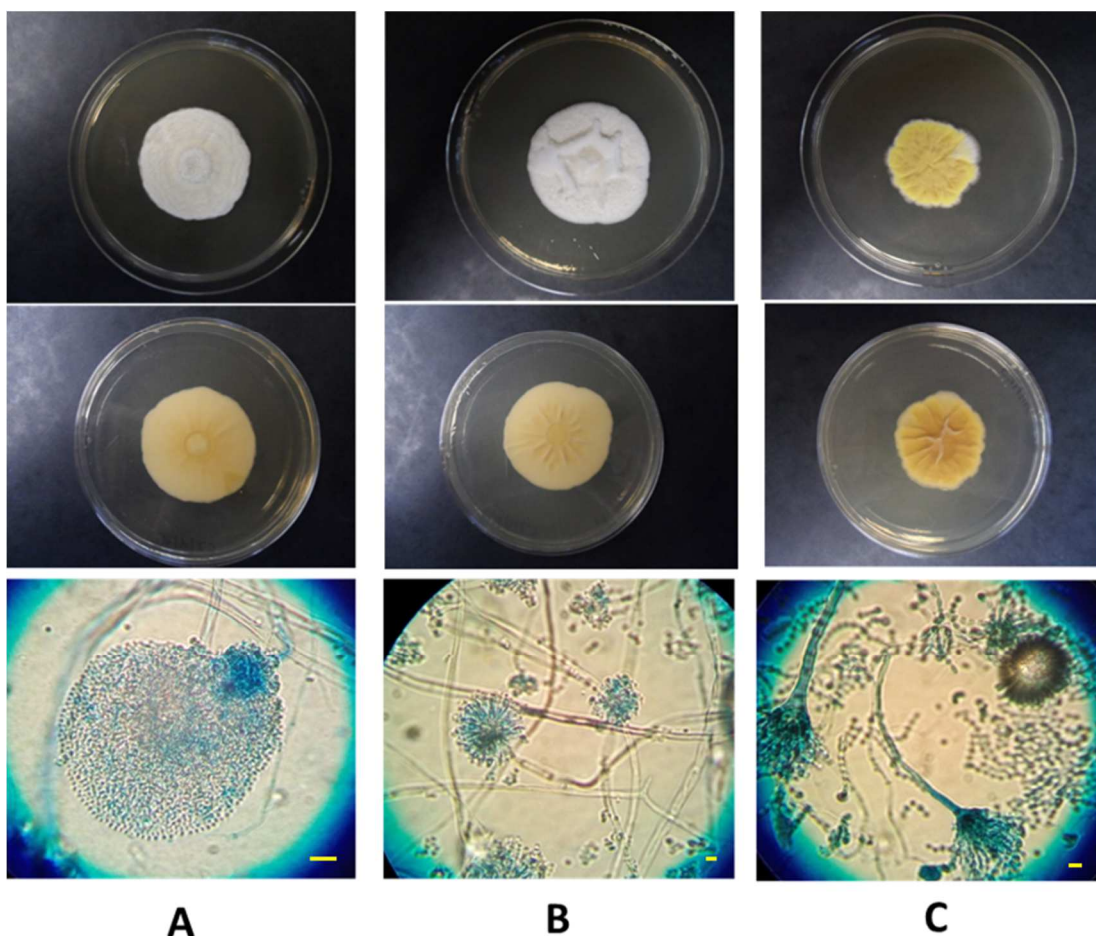
Izolátum sorszám	<i>norA</i>	<i>aflR</i>	<i>omtA</i>	ITS szekvencia alapján (a típustörzshöz viszonyított homológia % megadva)	Aflatoxin B1 termelés
37	+	+	+	<i>Aspergillus flavus</i> GFRS30 ITS1-98%, ITS4-100%	n.d.
38	+	+	+	<i>Aspergillus flavus</i> GFR40 ITS1-99%, ITS4-100%	0,081 µg/ml +/- 0,012 µg/ml
44	+	+	-	<i>Aspergillus flavus</i> isolate Asp.f.01 ITS1-99%, ITS4-99%	n.d.
47	-	+	+	-	n.d.
51	+	+	+	<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 16883 ITS1-99%, ITS4-99%	n.d.
53	+	+	+	<i>Aspergillus flavus</i> var. <i>flavus</i> CBS 130026 ITS1-99%, ITS4-99%	0,0025 µg/ml +/- 0,0003 µg/ml
56	-	+	-	<i>Aspergillus flavus</i> GFRS30 ITS1-100%, ITS4-99%	n.d.
59	+	+	+	<i>Aspergillus tritici</i> CBS 266.81 ITS1-100%, ITS4-99%	n.d.
60	+	+	+	-	n.d.
61	-	+	-	<i>Aspergillus flavus</i> isolate A1S3_D84 ITS1-99%, ITS4-99%	n.d.
62	+	+	+	<i>Aspergillus flavus</i> ITS1-99%, ITS4-100% <i>Aspergillus flavus</i>	0,0042 µg/ml +/- 0,0006 µg/ml

Izolátum sorszáma	<i>norA</i>	<i>aflR</i>	<i>omtA</i>	ITS szekvencia alapján (a típustörzshöz viszonyított homológia % megadva)	Aflatoxin B1 termelés
65	-	+	-	-	n.d.
70	+	+	-	<i>Aspergillus flavus</i> GFRS9 ITS1-99%, ITS4-99%	n.d.
71	-	+	-	<i>Aspergillus flavus</i> CB-JC-3-2 ITS1-100%, ITS4-99%	n.d.
72	-	+	-	<i>Aspergillus flavus</i> CME 18 ITS1-99%, ITS4-87%	n.d.

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

Faj*	<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>Aspergillus flavus</i> ” (n=22)	13	6	2	-	1
egyéb (n=11)	4	4	2	1	-
teljes (n= 33)	17 (51,5%)	10 (30,3%)	4 (12,1%)	1	1

*ITS alapján vizsgálva



9. ábra A., *Aspergillus tritici* (21.) (ITS szekvencia alapján); B., *Aspergillus tritici* (59.) (ITS szekvencia alapján); C., *Aspergillus cristatuslamstelodami* (15.) (ITS szekvencia alapján) malátá agaron, Petri csészén, valamint a konídiumok mikroszkópi vizsgálata. Skála: 10 μ m.

4.3 Eltérő tenyésztési körülmények, stressz vizsgálata

4.3.1 *Aspergillus flavus* NRRL 11611 törzs vizsgálata különböző táptalajokon

Vizsgáltam a referenciaként szolgáló *Aspergillus 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. Mértem a kukoricaagarak szerves nitrogéntartalmát Kjeldahl-módszerrel, a D-glükóz tartalmát Megazyme-kittel, spektrofotometriás módszerrel, valamint az összpolicenol, és flavonoid tartalmát és nyerszsír tartalmát. A Kjeldahl módszerrel mért

nitrogén tartalom a 4,05 és 7,2 (m/m) % nyerszsír tartalmú táptalajok esetében $0,03 \pm 0,01$ (m/m)% (n=3) és a másik két alacsonyabb nyerszsírt tartalmazó kukoricaagar esetében $0,01 \pm 0,01$ (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 ($5,74-35,45 \pm 0,5$ mg GA ekvivalens /100 g, n=5), míg a flavonoid-tartalom szűkebb tartományba esett ($3,24-7,16 \pm 0,3$ mg CE ekvivalens /100 g, n=5) (10. ábra), 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 kukoricagart 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 termelődés, de a két táptalajon termelt aflatoxin B1 koncentrációk nem mutattak szignifikáns különbséget. A micéliumok növekedése is átlagos volt a magasabb nyerszsír tartalmú tápközegen, viszont a szklerócium képződés a legmagasabb nyerszsírtartalmú kukoricaagaron volt a legerőteljesebb. A micélium növekedés, valamint az aflatoxin B1 termelődés a malátás táptalajon volt maximális, míg 2,6 (m/m)% nyerszsírtartalmú 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)% nyerszsírtartalmú kukorica-szervetlen sókat tartalmazó agaron nem volt aflatoxin B1 termelődés, a micélium növekedés erőteljesebb volt, és itt volt a legnagyobb mértékű szklerócium produkció (4. 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 szervesetlen nitrogén forrás, a nitrát gátolja az aflatoxin termelést, de a szklerócium fejlődést nem (Price et al., 2005).

4. táblázat Az eltérő összetételű táptalajok hatása a referencia *Aspergillus flavus* NRRL11611 törzs micéliumának növekedésére, mikotoxin termelésére és a szklerócium képzésére (n=3, #SD < 20 %).

Táptalaj	Szén forrás	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 nyerszsír tartalommal;

***G: glükóz;

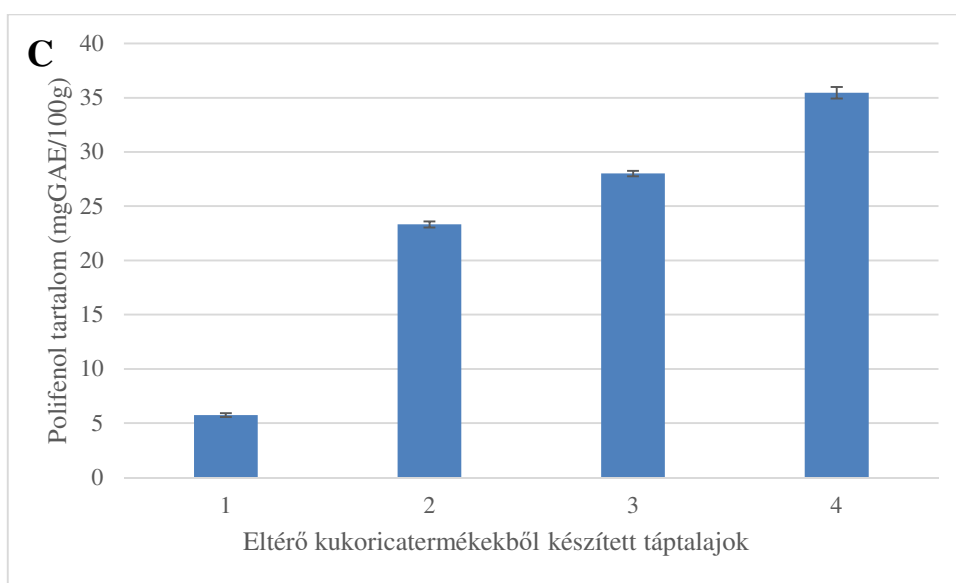
****S: só

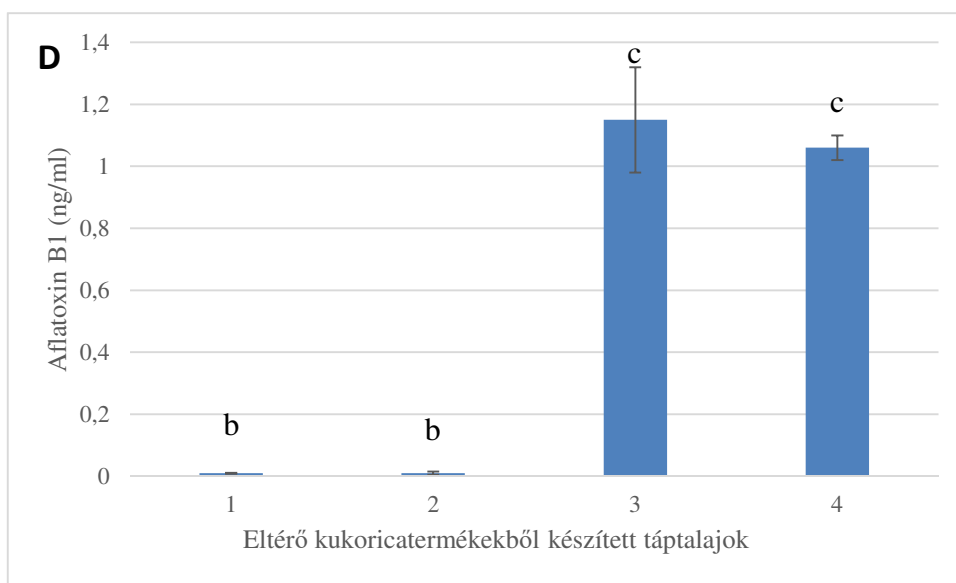
^{##} Micélium növekedés: +: maximum 25%; ++: 25-50%; +++: 50-75%; ++++: 75-100% -os Petri-csésze lefedettség

^{###} 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 (10. ábra).

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).

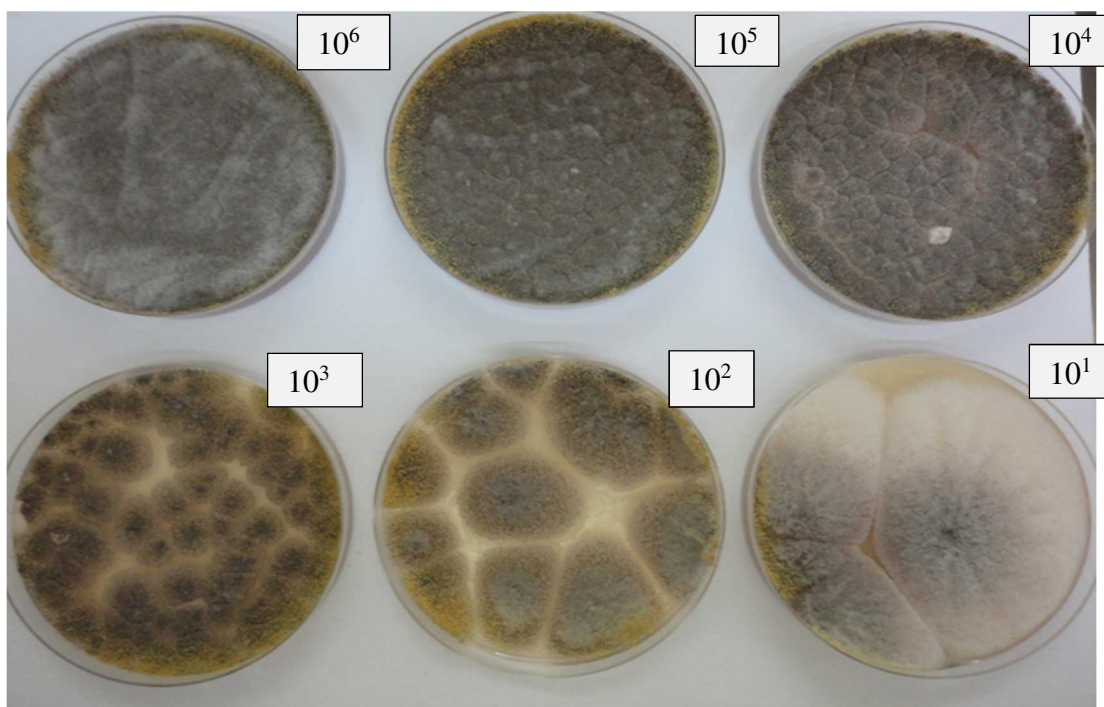




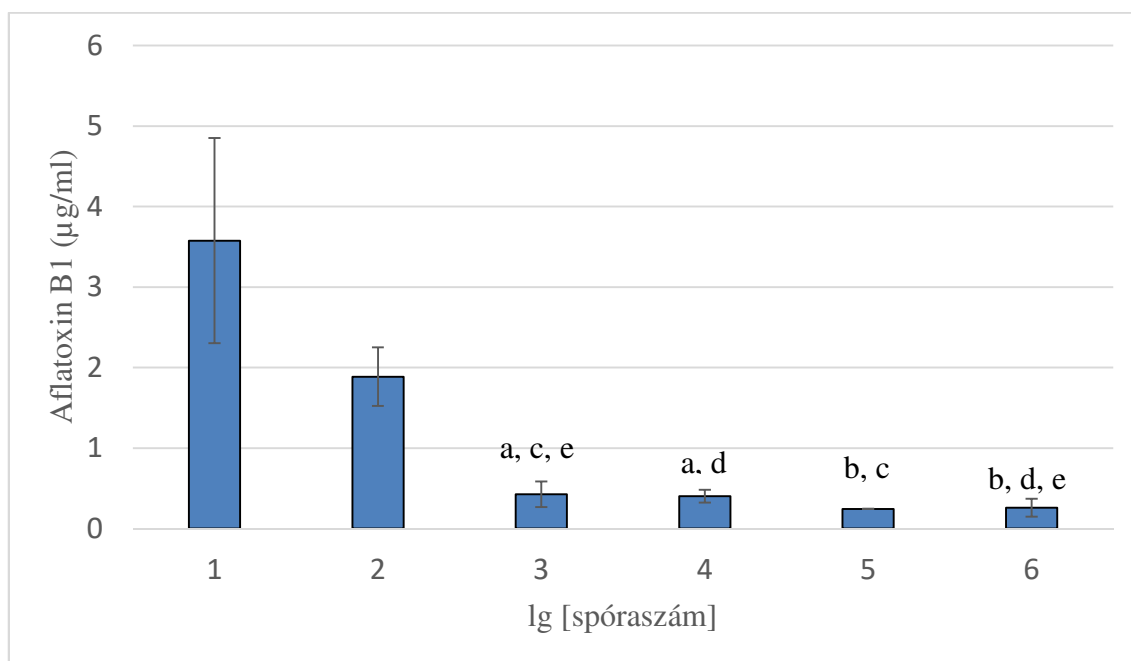
10. ábra Eltérő kukoricatermékekből készített táptalajok nyerszsír tartalma (A), flavonoid (B)- és polifenol (C)-tartalma, valamint a különböző kukoricatermékekből készített táptalajon a referencia *Aspergillus flavus* NRRL 11611 aflatoxin B1 termelése (D). 1.: 2,6 (m/m)%; 2.: 1,7 (m/m)%; 3.: 4,05 (m/m)%; 7,2 (m/m)% nyerszsír tartalmú kukoricatermékekből készített táptalajok. Azonos betűjelzés a nem szignifikáns eltérést jelöli $P < 0,05$ szinten.

4.3.2 A táptalajok leoltásához alkalmazott spóramennyiség és az aflatoxin B1 képződés összefüggése

Az általam alkalmazott legnagyobb spóramennyiség esetén malátás agaron a gombatelepek mérete kicsi, viszont a Petri-csésze közel teljes mértékben fedett szürkés, zöldes gombahifákkal (11. ábra). Ahogy csökken az inokuláció során felhasznált spóramennyiség, úgy nő a gombatelepek mérete, csökken a Petri-csésze hifákkal történő lefedettsége. Kukorica agaron csökkent vegetatív növekedést és erőteljes szklerócium produkciót tapasztaltam az alkalmazott spórakoncentrációtól függetlenül. Mértem továbbá, hogy malátás, illetve kukorica agar táptalajon, hogyan változik a termelt aflatoxin B1 mennyisége a leoltáshoz alkalmazott eltérő spóramennyiség függvényében. A kísérlethez a referencia *Aspergillus flavus* törzset használtam fel. Azt tapasztaltam, hogy a legkisebb, 10^1 /ml spóramennyiségnél volt a legnagyobb mértékű az aflatoxin B1 termelés, malátás táptalajon, illetve különböző spórakoncentrációt alkalmazva sem volt a 2,6 (m/m)% zsírtartalmú kukorica agaron aflatoxin B1 termelés (12. ábra), bár a nagyobb spóramennyiségek esetén (lg 3, lg 4, lg 5) nem volt szignifikáns a különbség a termelt aflatoxin B1 koncentrációk között ($P < 0,05$).



11. ábra Malátás táptalajon *Aspergillus flavus* NRRL 11611 növekedése 10^6 - 10^1 /ml spóraszámmal szélesztve.



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

4.3.3 *Aspergillus flavus* törzsek stressz-rezisztenciájának vizsgálata

Kétféle táptalajon (2,6 m/m% zsírtartalmú kukoricaagar, malátaagar) kétféle stresszfaktort (NaCl és SDS) különböző koncentrációban alkalmazva vizsgáltam azoknak az izolátumoknak a növekedését, morfológiai tulajdonságait, amelyek potenciálisan toxinogén törzsek, tehát legalább egyet tartalmaztak az aflatoxin génklaszterbe tartozó, általam vizsgált gének közül (*aflR*, *omtA*, *norA*) (A. Melléklet). Illetve vizsgáltam ugyanilyen körülmények között a referencia *Aspergillus flavus* NRRL11611 morfológiai tulajdonságait.

4.3.3.1 *Aspergillus flavus* izolátumok és a referencia törzs stresszvizsgálata kukorica agaron

A vizsgálataim eredményeit a (D. Melléklet) tartalmazza.

A referencia *Aspergillus flavus* NRRL 11611 esetében azt tapasztaltam, hogy a 1 M és 1,5 M NaCl kezelés a konidiofórok sárga pigmentációját eredményezte, illetve szklerócium képződés megfigyelhető volt, míg a magasabb koncentrációknál a pigmentált konidiofórok nem alakultak ki, nem volt spóráképződés, de szkleróciumok ugyanúgy létrejöttek ezekben a tenyészetekben is.

0,05-0,1 g l⁻¹ SDS-t tartalmazó kukoricaagaron a referencia törzs nagy mennyiségű szkleróciumot produkált, míg a 0,5 g l⁻¹ SDS-t tartalmazó kukoricaagar esetében már csökkent a konidiofór képződés, nem termelődött spóra, 0,75 g l⁻¹ SDS-t tartalmazó kukoricaagaron pedig már nem volt vegetatív növekedés sem.

Kukoricaagaron NaCl stressz mellett két izolátum jól nőtt minden koncentrációnál, három izolátumnál nem volt, kettőnél alig volt aszexuális spóráképződés már 1M NaCl mellett, hat izolátumnál 1,5 M NaCl mellett kevesebb konidiospóra, vagy kisebb mértékű micéliumnövekedés következett be, 13 izolátumnál 2 M NaCl, míg négy izolátumnál csak 2,5 M NaCl váltott ki hasonló hatást. 16 izolátumnál pedig a konidiofórok sárga pigmentációja volt megfigyelhető.

Kukoricaagaron egy izolátum esetében már a 0,05 g l⁻¹ SDS koncentráció esetében is gyengült növekedést és spóráképződést tapasztaltunk, két izolátumnál 0,1 g l⁻¹ SDS-nél kevesebb spóra képződött. 21 izolátumnál 0,5 g l⁻¹ SDS hatására kevés, vagy semmi spóra nem képződött, és egy izolátum esetében növekedés sem következett be, míg öt

izolátumnál ez a hatás csak 0,75 g l⁻¹ SDS-nél következett be. Öt izolátumnál pedig a konidiofórok kifejezetten zöld pigmentációja volt detektálható.

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

A vizsgálataim eredményeit a (E. Melléklet) tartalmazza.

A 2,5 M NaCl sem gátolta jelentősen az *Aspergillus flavus* NRRL 11611 vegetatív növekedését, viszont minden koncentrációban alkalmazva, a konidiofórok sárga pigmentációját eredményezte.

A referencia törzs csökkent spóra-, nagyobb szkleróciumképződést mutatott 0,5 g l⁻¹ SDS-t alkalmazva, míg 0,75 g l⁻¹ SDS már a gombahifák növekedését is gátolta.

Malátás táptalajon 26 esetben 0,5 g l⁻¹ koncentrációjú SDS megváltoztatta a gombák morfológiai jellemzőit, tíz esetben ki sem nőtt a gomba, míg a többi esetben kisebb növekedést, csökkent spóraszámot, a spórák, konidiofórok megváltozott pigmentációját vagy szkleróciumok megjelenését eredményezte. Három izolátum esetében már 0,1 g l⁻¹ SDS alkalmazása morfológiai változásokat eredményezett, kisebb méretű szkleróciumok termelődtek, és a konidiofórok pigmentációja megváltozott, vagy csökkent a spóráképződés. Egy izolátumnál 0,75 g l⁻¹ SDS a szkleróciumképződést már gátolta.

A NaCl stressz hatását vizsgálva azt tapasztaltam, hogy négy izolátum esetében még a 2,5 M-os NaCl sem fejtett ki semmiféle hatást sem a gomba növekedésére, míg 15 izolátumnál a 2,5 M-os NaCl már okozott valamilyen morfológiai változást, kisebb növekedést, világosabb vagy kevesebb spórát, barnásabb táptalajt, hét esetben ezek a morfológiai változások már 2 M NaCl-nál megjelentek, és négy izolátumnál már az 1 M NaCl kezelés mellett vagy konidiospóra, vagy szklerócium nem képződött.

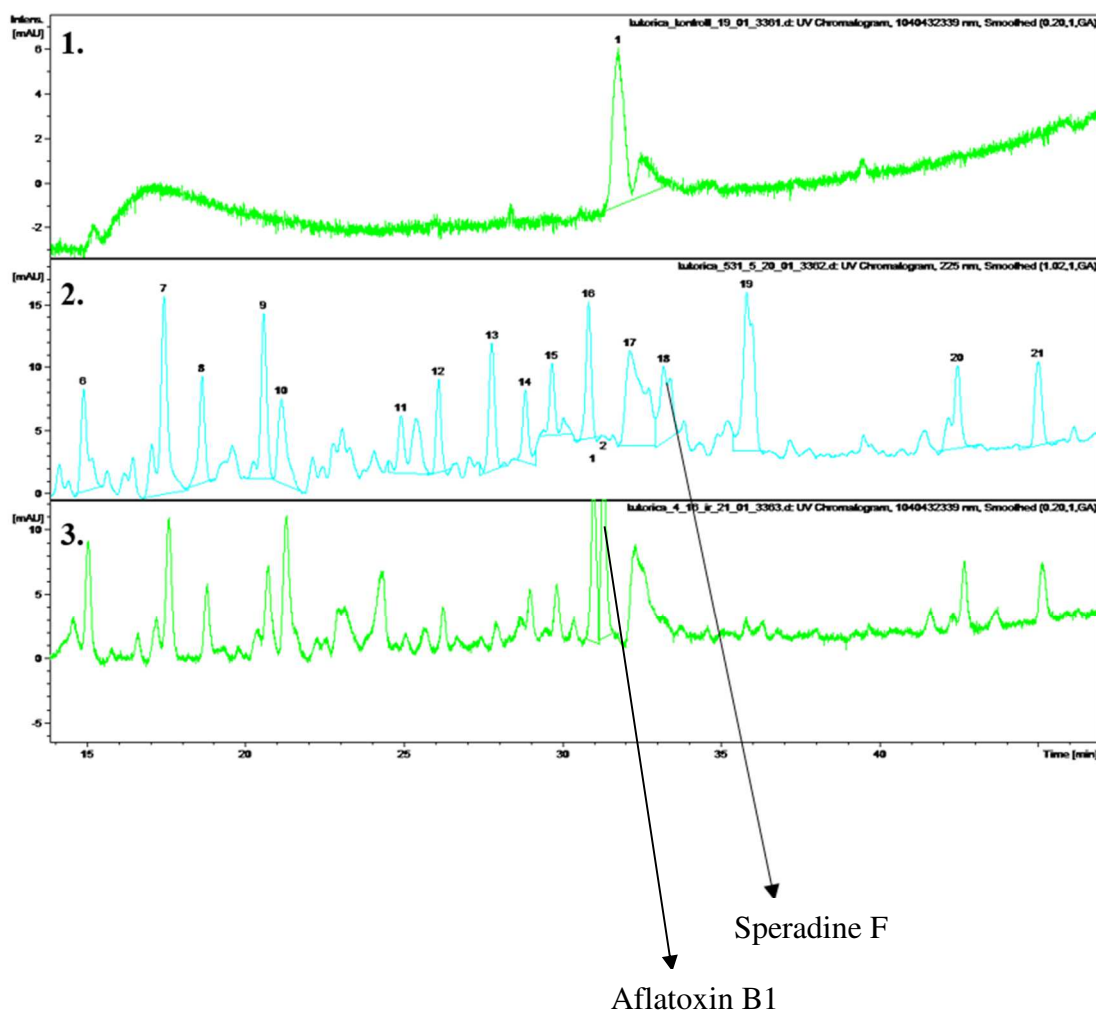
Az *Aspergillus flavus* NRRL 11611 esetében azt tapasztaltam, hogy a só és SDS stresszel szemben ellenállóbb maláta agaron, mint kukorica agaron.

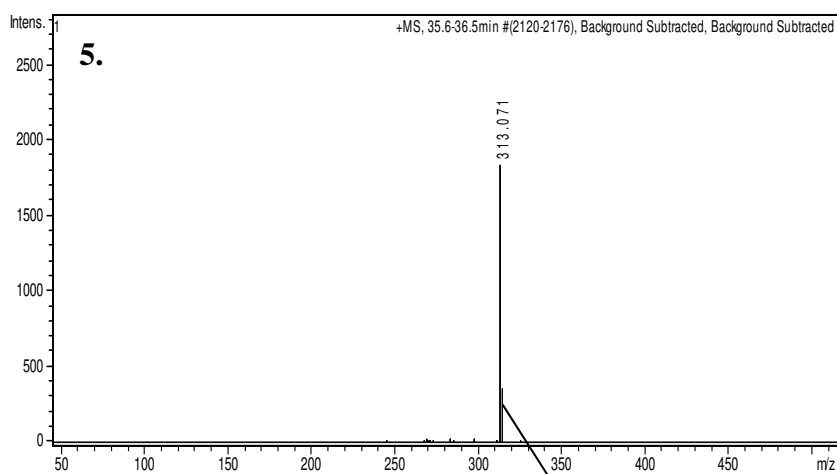
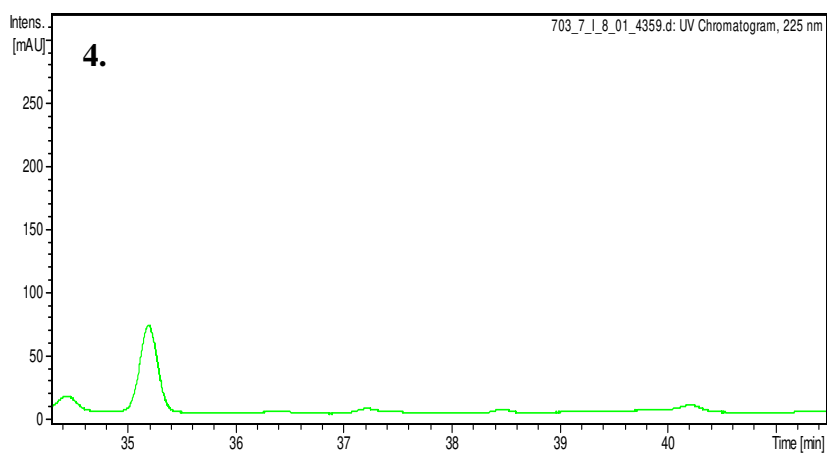
4.4 Szekunder metabolit képzés vizsgálata

Vizsgáltuk a kukoricaszemre (MV251 hibrid) oltott különböző *Aspergillus flavus* izolátumok (A. Melléklet) szekunder metabolit termelését HPLC-MS módszerrel. Az UV tartományban kapott kromatogramok kiértékelése során a kapott csúcsok közül

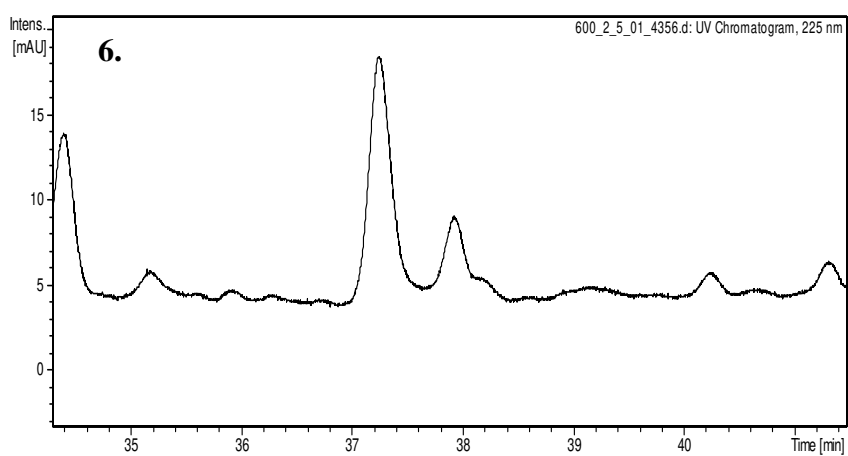
elsősorban azokat vettük figyelembe, amelyek eltértek az oltatlan kukorica kontroll vagy a toxinogén izolátum által kolonizált kukorica HPLC-MS UV kromatogramjától és ezek tömegspektrumát elemeztük. Az atoxinogén izolátumok közül a 37. számú izolátum speradine F-et, a 30. izolátum pedig 3-OH-speradine A-t, aspergilline D-t és speradine I-t is termelt, míg a 72-es izolátum a kukoricaszemen HPLC-MS készüléken kimutatható koncentrációjú aflatoxin B1-et termelt (13. ábra), ellentétben a HPLC-FLD vizsgálattal, tehát nem tekinthető atoxinogénnek. A többi atoxinogén izolátum viszont nem termelte a 30 keresett szekunder metabolit (B. Melléklet) közül egyiket sem.

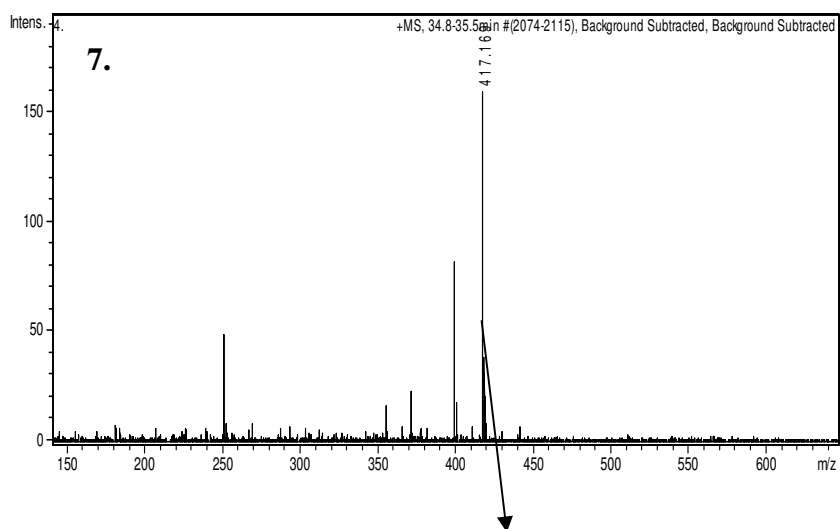
13. ábra HPLC-MS kromatogram: 1. kukoricaszem kontroll, 2. atoxinogén (37.) izolátum, 3. toxinogén (9.) *Aspergillus flavus* izolátum, 4. atoxinogén (72.) izolátum, 5. atoxinogén (72.) izolátum tömegspektruma, 6. atoxinogén (30.) izolátum, 7. atoxinogén (30.) izolátum tömegspektruma, 8. atoxinogén (30.) izolátum tömegspektruma, 9. atoxinogén (30.) izolátum tömegspektruma



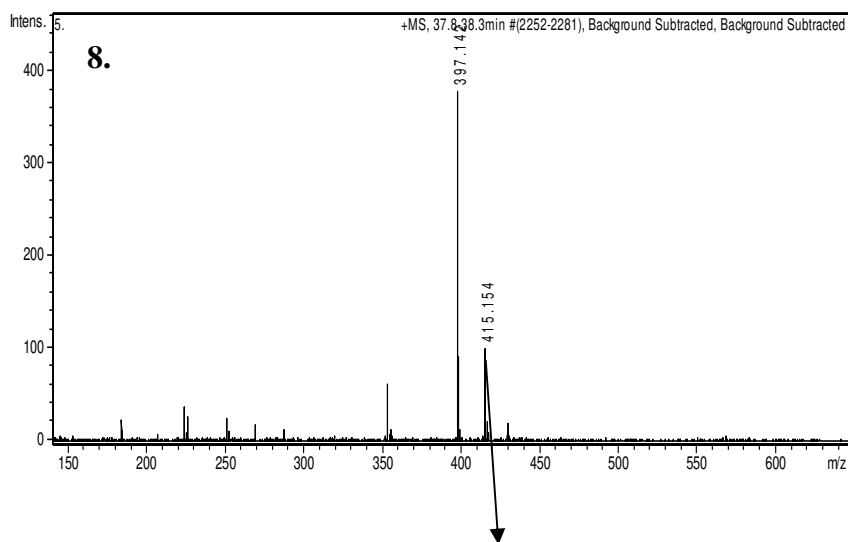


Aflatoxin B1

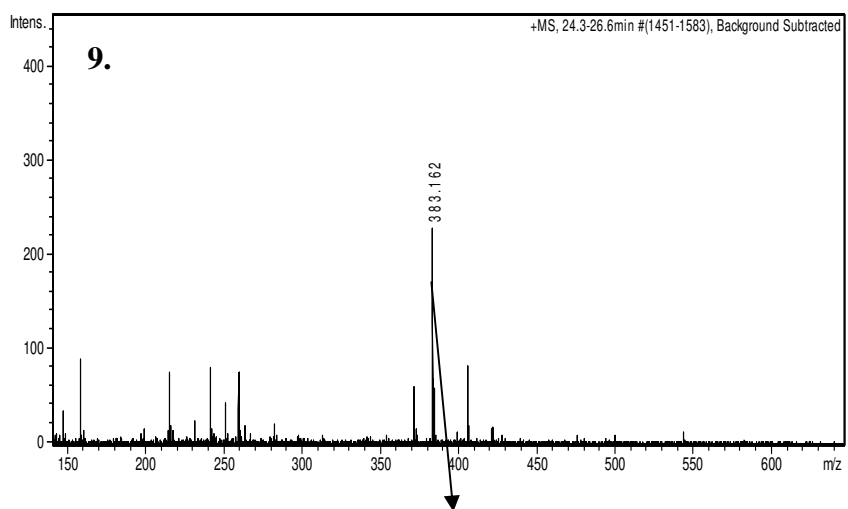




Aspergilline D



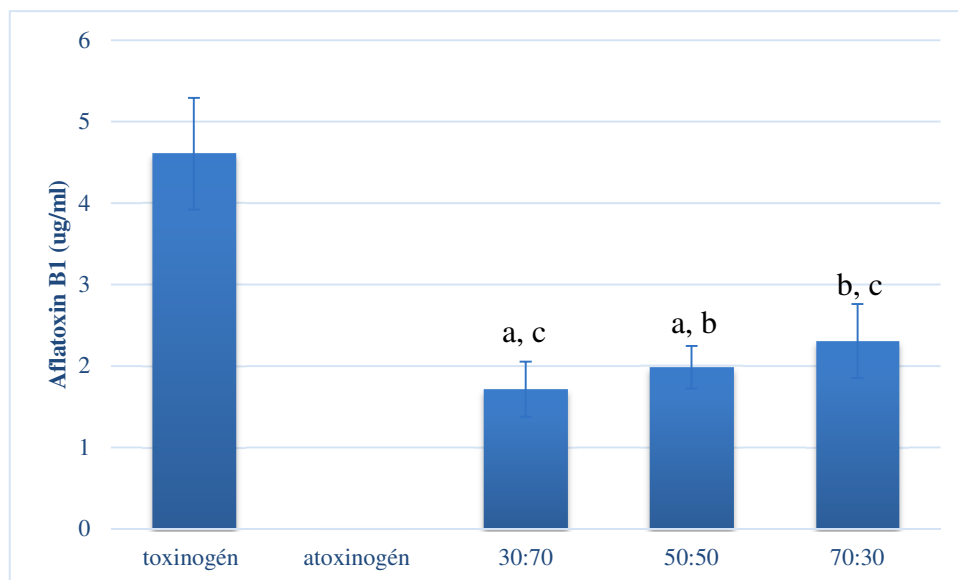
Speradine I



3-OH-speradine A

4.5 Kompetíciós képesség vizsgálata

A kompetíciós teszt során steril kukoricaszemre oltottam különböző arányban toxinogén (9. izolátum) és atoxinogén gomba izolátum (37. izolátum) törzseket (A. Melléklet). Legnagyobb koncentrációjú aflatoxin B1 termelést a 100%-ban toxinogén izolátum alkalmazása során tapasztaltunk. Ahogy csökkentettem az inokulációhoz használt toxinogén gomba és növeltem az atoxinogén gomba arányát, úgy csökkent az aflatoxin B1 koncentrációja. Amikor csak atoxinogén *Aspergillus flavus* izolátummal történt a leoltás, akkor nem volt aflatoxin B1 termelés a kukoricaszemen. Az aflatoxin B1 termelés mintegy a felére csökkent, amikor 30:70 arányban alkalmaztunk a leoltás során toxinogén: atoxinogén *Aspergillus flavus* izolátumot (14. ábra). T-próbával igazoltuk a szignifikáns eltérést, ami a toxinogén-30:70, a toxinogén-50:50 és a toxinogén-70:30 oltásoknál termelt aflatoxin B1 koncentrációk között volt kimutatható. A leoltás során különböző arányban egyidejűleg alkalmazott toxinogén: atoxinogén *Aspergillus flavus* izolátumok aflatoxin B1 termelése (30:70-50:50; 70:30-50:50; 30:70-70:30) között nem volt szignifikáns eltérés.



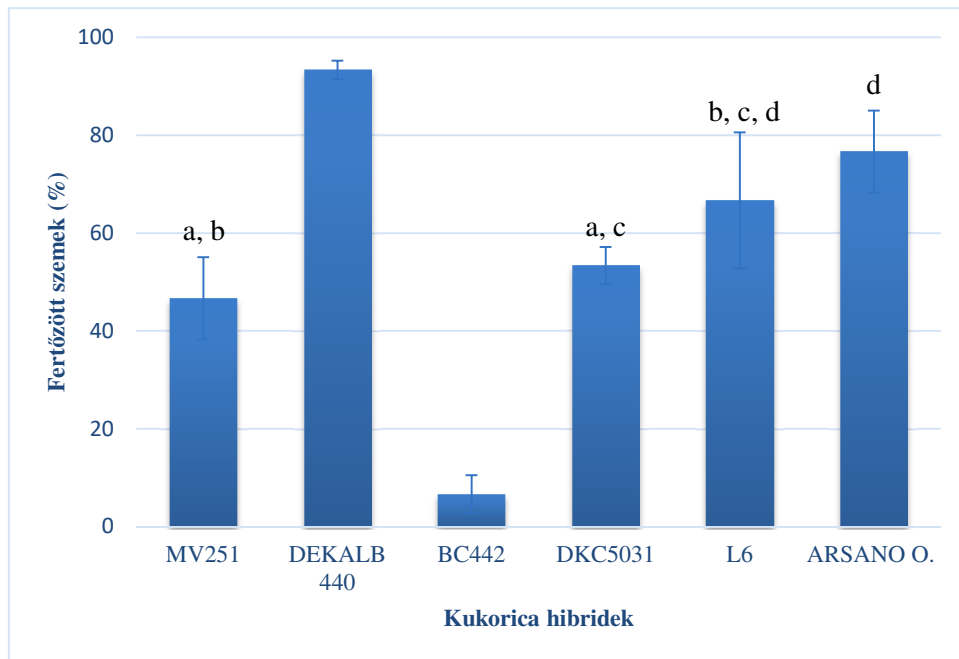
14. ábra Aflatoxin B1 termelés MV 251 kukoricaszemen, toxinogén (9.), atoxinogén (37.) *Aspergillus flavus*, valamint a két törzs izolátumainak eltérő arányban történő együttes fertőzése esetén (n=3, SD<20%). Azonos betűjelzés a nem szignifikáns eltérést jelöli P<0,05 szinten.

4.6 Kukoricahibridek ellenállóképességének vizsgálata

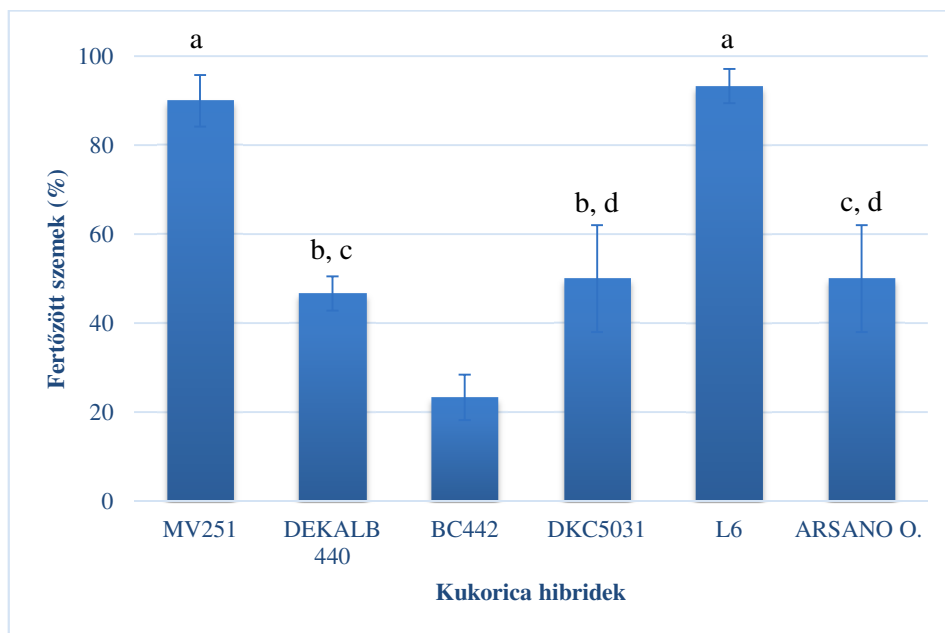
A vizsgálataim során eltérő eredetű kukoricahibridek szemeit oltottam be *Aspergillus flavus* (12. ábra, 15. ábra, 16. ábra) törzsekkel (A. Melléklet). Az így kapott eredményeim alapján megállapíthatóvá vált a gombák kolonizációs képessége, valamint a kukorica hibridek ellenálló képességének alakulása. Az ellenálló kukoricáknál alacsonyabb volt a gombák kolonizációs képessége. A kukoricaszemek legalább 10 %-a fertőzött volt, míg a felsőérték pedig 90% volt. Tehát, a kukorica hibrideket összehasonlítva nagy eltérések mutatkoztak.

A referencia *Aspergillus flavus* NRRL 11611 esetében a szemfertőzések eltérően alakultak (15. ábra), de az atoxinogén (16. ábra) és toxinogén törzsek (17. ábra) esetén is eltérő volt a szemfertőzöttség mértéke a különböző hibridek között. Ezek alapján megállapítható, hogy a referencia, illetve az atoxinogén *Aspergillus flavus* törzs esetében a BC442 nevű hibrid szemtermésén történt a legkisebb arányú fertőzés, tehát ennek a fajtának a rezisztenciája a legnagyobb, a többi vizsgált hibriddel összevetve és ez az eltérés szignifikánsnak bizonyult a legtöbb kukoricahibriddel szemben, a két vizsgált törzs esetében. A toxinogén *Aspergillus flavus* izolátum esetében is a BC442 kukoricahibrid bizonyult a leginkább rezisztensnek, de ez nem mutatott szignifikáns eltérést az ARSANO O. kukoricahibrid ellenállóképességétől $P < 0,5$ szinten.

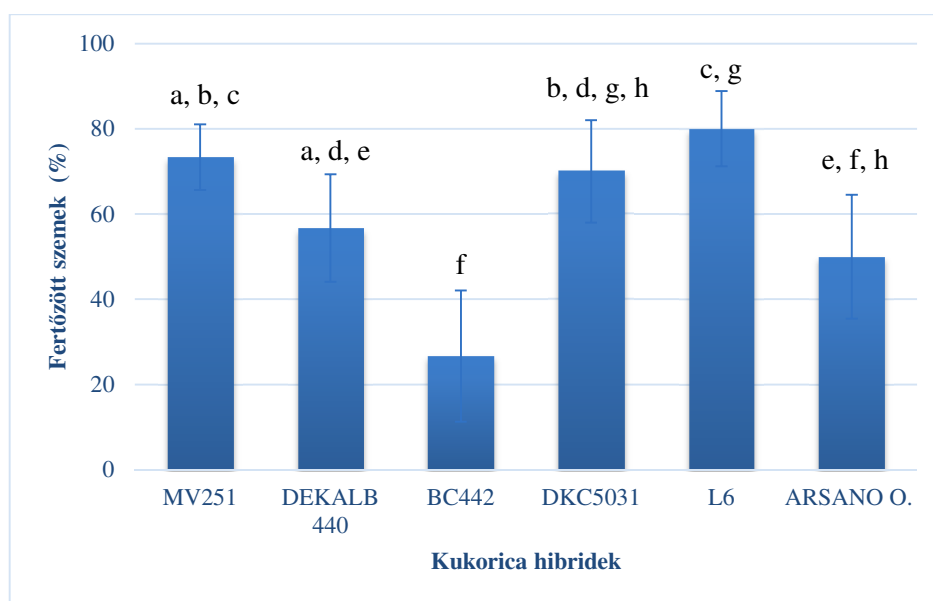
Az atoxinogén (16. ábra) és toxinogén (17. ábra) izolátum törzsek az L6 kukorica hibridek szemtermésén szaporodtak el a legnagyobb arányban, tehát ennek a hibridnek a leggyengébb az ellenállóképessége az izolátumokkal szemben, bár az eltérés nem volt szignifikáns az MV251, valamint a toxinogén izolátum esetében a DKC5031 kukoricahibridek esetében. Az *Aspergillus flavus* NRRL11611 a DEKALB 440 nevű hibridnél okozott a legnagyobb mértékű szemfertőzést. A gombák eltérő kolonizációs képessége a kukorica hibridek különbözőségével magyarázható, vagyis szemterméseiket felépítő kémiai anyagoktól, illetve, hogy azok milyen módon reagálnak a gombák támadásaira. A toxinogén és atoxinogén izolátumok kolonizációs képessége a kísérleteim alapján eltérőnek bizonyult referencia törzséhez képest a különböző kukorica hibrideken. A kukoricahibridek ellenállóképessége jelentősen eltért.



15. ábra Fertőzött szemek százalékos aránya az egyes hibrid kukoricáknál referencia *Aspergillus flavus* NRRL 11611 törzs alkalmazásával (n=3). Azonos betűjelzés a nem szignifikáns eltérést jelöli P<0,5 szinten.



16. ábra Fertőzött szemek százalékos aránya az egyes hibrid kukoricáknál atoxinogén *Aspergillus flavus* izolátum (37.) alkalmazásával (n=3). Azonos betűjelzés a nem szignifikáns eltérést jelöli P<0,5 szinten.



17. ábra Fertőzött szemek százalékos aránya az egyes hibrid kukoricáknál toxinogén *Aspergillus flavus* izolátum (9.) alkalmazásával (n=3). Azonos betűjelzés a nem szignifikáns eltérést jelöli $P < 0,5$ szinten.

5. Következtetések, javaslatok

5.1 Az izolátumok nukleinsav alapú vizsgálata

Az aflatoxin termelésért felelős, 75 kbp méretű génklaszter jelenlétét három génszakasz, az *aflR*, *norA* és az *omtA* kimutatásával vizsgáltam egyidejűleg multiplex PCR segítségével (8. ábra). Ezt a kísérletet Geisen (1996) munkája alapján végeztem, aki megállapította, hogy az ezekre a génekre tervezett primerpárok segítségével jól elkülöníthetők a többi gombától az *Aspergillus flavus* és *Aspergillus parasiticus* fajok, de ezek alapján viszont a toxinogén és az aflatoxint nem termelő izolátumok nem különíthetők el egyértelműen. Rashid és munkatársai (2008) is ennek a három génnek, valamint a *ver1* génnek a jelenlétét, és az aflatoxintermelő képességét vizsgálták 157 *Aspergillus flavus*, valamint 36 *Aspergillus parasiticus* izolátum esetében. Mind a négy gén egyidejű jelenléte csak egy toxintermelő *Aspergillus parasiticus* izolátumra volt jellemző. Lee és munkatársai (2006) szerint az *aflR* gént fel lehet használni az aflatoxinogén *Aspergillus flavus* törzsek kimutatására. Varga és munkatársai (2011) szintén ezt a három gént alkalmazták az *Aspergillus* izolátumok aflatoxintermelő képességének bizonyítására.

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 *Aspergillus flavus*, négy izolátum *Aspergillus tritici* vagy a korábban szinonímájaként használt *Aspergillus candidus*, illetve egy izolátum *Aspergillus cristatus* vagy *Aspergillus amstelodami*. De a pontos faji azonosításhoz további vizsgálatok szükségesek. Az *Aspergillus 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 régió vizsgálata alapján *Aspergillus 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 valóban az *Aspergillus 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.

Összességében megállapítottam, hogy a potenciálisan toxinogén izolátumok nukleinsav-alapú vizsgálata alapján csak feltételezni tudjuk a mikotoxin produkciót, a toxintermelés intenzitását számos tényező befolyásolja, mint pl. a környezeti hatások

(Prandini et al., 2009). Medina és munkatársai (2014) szerint a vízaktivitás, a hőmérséklet és a kibocsátott CO₂ együttes hatása *in vitro* vizsgálatokban, a kukorica gazdanövényen nem befolyásolja jelentősen a gomba növekedését, viszont az aflatoxin termeléséért felelős gének expresszióját jelentősen növeli. 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. Ezért manapság, amikor a klímaváltozás ilyen jelentős hatással bír, különös figyelmet kell fordítani a penészgombák, mikotoxinok vizsgálatára.

5.2 Eltérő tenyésztési körülmények, stressz vizsgálata

5.2.1 *Aspergillus flavus* NRRL 11611 törzs vizsgálata különböző táptalajokon

A mikotoxin képződést számos tényező befolyásolja, köztük az egyik legjelentősebb a megfelelő mennyiségű és minőségű szubsztrát jelenléte a tápközegben. A maláta agar az *Aspergillus* gomba vegetatív növekedését, aszexuális sporulációját segíti elő, de a szekunder metabolit képződést is indukálja, hiszen nagy koncentrációban tartalmaz glükózt és szerves nitrogént. Minimum 0,1 M koncentrációjú glükóz indukálta az aflatoxin B1 bioszintézist *Aspergillus parasiticus* tenyészetben Wiseman és Buchanan (1987) kutatása szerint. A fonalas gombák mikotoxin szintéziséhez alapvető fontosságú a megfelelő nitrogén forrás jelenléte is. Ezek a gombák a könnyebben asszimilálható nitrogénformákat szelektíven hasznosítják, aminek egy komplex transzkripciós kontroll az alapja. A szerves nitrogénformák, mint például az NH₄⁺, glutamin, illetve ezek hiányában az aminok, amidok, purinok, pirimidinek, és az egyéb szerves nitrogén vegyületek indukálják az aflatoxin B1 képződését, míg a nitrát gátolja azt (Kachholz et al., 1983; Wong et al., 2008; Payne et al., 1983).

Az oxidatív stressz, a reaktív oxigén gyökök jelenléte serkenti a lipid peroxidációt és az aflatoxin termelésében résztvevő gének expresszióját is (Reverberi et al., 2006). Viszont a növényi eredetű antioxidánsok gátolják az aflatoxin bioszintézisét, a reaktív oxigén gyökök inaktiválásával, valamint az oxidatív enzimek specifikus gátlásán keresztül, de a gombák vegetatív növekedésére kevésbé vannak hatással (Holmes et al., 2008). A flavonoidok gátolják az aflatoxin termelődést, de a hatásuk a toxintermelésre,

valamint a gomba növekedésére függ a flavonoid kémiai szerkezetétől és koncentrációjától (Holmes et al., 2008).

A kutatásom bemutatta, hogy a malátás táptalajon volt a legnagyobb aflatoxin B1 produkció, ahol glükóz volt a szénforrás, és szerves a nitrogénforrás. Illetve aflatoxin B1 termelődést mértünk a glükózzal kiegészített kukoricaagar esetében is, ahol szintén glükóz szénforrás volt jelen, illetve szerves nitrogénforrás a tápközegben. Az általam készített kukoricaagarban viszonylag magas antioxidáns-, és zsírsav tartalmat mértem, viszont alacsony volt a szabad nitrogén és glükóz tartalom, ami magyarázattal szolgálhat arra, hogy ezekben a tenyészetekben nem volt detektálható aflatoxin B1 termelés. Kivéve a két legnagyobb zsírtartalmú kukoricaagar, valamint a glükózzal kiegészített kukoricaagar esetében, de ezeknél is a toxintartalom viszonylag alacsony volt a malátás agarhoz viszonyítva. Ezen esetben a magas antioxidáns tartalom és alacsony N-tartalom ellenére volt mikotoxin szintézis, ami vagy a kukoricaagarhoz adott egyszerű cukor, vagy a magas zsírsavtartalomból mobilizálható, és az aflatoxin bioszintézis fontos elemének tekinthető acetyl-coenzim A-val indokolható (Howlett, 2006).

A magas antioxidáns-tartalom és a kevés szabad cukor-tartalom mellett a kukoricaagar-só tartalmú táptalajon intenzív szklerócium produkció volt megfigyelhető, ami azzal magyarázható, hogy a kedvezőtlen környezeti feltételek esetén a szkleróciumok biztosítják a gomba számára a túlélést (Coley-Smith et al., 1971).

Szántóföldi körülmények között a kukorica hidrolitikus aktivitása indukálja a gomba aflatoxin B1 szintézisét (Dolezal et al., 2014), megfelelő mennyiségű szénforrás jelenlétében. A magasabb zsírtartalmú hibridek előnyösebbek az aflatoxin produkció szempontjából, még akkor is, ha magas az antioxidáns tartalmuk. Viszont, ha nincs megfelelő szén és nitrogén forrás jelen a tápközegben, akkor aktiválódik a gomba szklerócium fejlődése, ami segíti a gomba túlélését kedvezőtlen környezeti feltételek mellett (Coley-Smith et al., 1971; Cotty, 1989; Horn et al., 2014). A klímaváltozás hatására növekedhet a stressz rezisztens, aflatoxin produkcióra képes gombák jelentősége, száma, ami aggodalomra adhat okot (Medina et al., 2014).

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

A kukorica agaron (2,6 % zsírtartalom) nem mértem kimutatható aflatoxin B1 koncentrációt, 10^1 - 10^7 spóramennyiséget alkalmazva sem. Ennek okát az előző fejezetben

is tárgyaltam, vagyis, hogy nem volt elegendő szabad szénforrás jelen a táptalajban, a zsírsavtartalom is viszonylag kevés volt, viszont antioxidánsokat tartalmazott a tápközeg.

Maláta agaron viszont a leoltáskor alkalmazott legkisebb spóraszám mellett tapasztaltam a legmagasabb koncentrációjú aflatoxin B1 produkciót. Amit azzal magyarázhatunk, hogy a kisebb mennyiségű spóra növekedéséhez nagyobb mennyiségű glükóz állt rendelkezésre, mintha ugyanazt a mennyiségű szénforrást nagyobb mennyiségű gomba növekedéséhez, toxintermeléséhez kellene felhasználni. Az inokulációkor használt nagyobb spóramennyiség esetében a trikarbonsav-ciklus során felszabaduló intermedierek is gátolhatták a toxinprodukción.

Yan és munkatársai (2012) azt tapasztalták, hogy a glükóztartalmú tápközegekben a kezdeti magas spórakoncentráció növelte a keletkező aflatoxin B1 mennyiségét, míg a pepton tartalmú tápközeg esetén fordítva volt, a kezdeti magas spórakoncentráció alacsonyabb aflatoxin B1 szintet és nagyobb micélium növekedést eredményezett. A metabolikus vizsgálatok azt mutatták, hogy ennek az oka az volt, hogy gátolt volt a zsírsav bioszintézis, redukálódtak a trikarbonsav ciklus intermedierei és fokozott volt a pentóz-foszfát ciklus. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az *Aspergillus*ok képesek érzékelni a rendelkezésükre álló tápanyagforrások mennyiségét, így tudják befolyásolni a micélium növekedés vagy az aflatoxin szintézis intenzitását, ami szelekciós előnyhöz juttatja őket, hiszen képesek lesznek ezáltal alkalmazkodni szűkebb tápanyagforrás esetén is.

5.2.3 *Aspergillus flavus* izolátumok és a referencia törzs stresszrezisztencia vizsgálata

Az *Aspergillus parasiticus* növekedését és aflatoxintermelő képességét vizsgálták szintetikus (glükóz-élesztő-só) táptalajon különböző koncentrációjú NaCl-ot alkalmazva és azt tapasztalták, hogy nagyobb koncentrációjú NaCl kezelés indukálja a gombák növekedésének lag fázisba kerülését, amikor is a sejtek nyugalmi fázisban vannak, alkalmazkodnak a környezeti körülményekhez és a sejten belül elkezdődik a szaporodáshoz szükséges enzimek, fehérjék szintetizálása, valamint kevesebb aflatoxin termelődik (El-Gazzar et al., 1985). Shih és Marth (1972) arról számoltak be *Aspergillus flavus* és *Aspergillus parasiticus* törzseket vizsgálva, hogy a gombák növekedése 6% NaCl-t felhasználva csökkent, folyékony tápközegekben, amely 2% élesztőkivonatot és 20% szacharózt tartalmaz és teljesen gátolt a növekedés, aflatoxin termelés 14% NaCl-t

alkalmazva. Kulik és Hanlin (1968) kutatása szerint 15% NaCl-t tartalmazó maláta agarban a megváltozott vízaktivitás miatt csökkent az aflatoxin termelődés és a gombák növekedése. Egy tanulmány szerint a hőmérséklet befolyásolhatja az *Aspergillus* törzsek növekedését, valamint a poliolo, cukrok felhalmozását a sejtekben. Ebben a tanulmányban vizsgálták azt is, hogy az ozmotikus viszonyok (NaCl) valamint a mátrix potenciál (glicerol) változtatása kukorica agaron milyen változásokat idéz elő az *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* gombák növekedésében és a poliolo, cukrok intracelluláris akkumulációjában. A növekedési ráta érzékenyebben reagált a mátrix potenciál változás okozta stresszre, mint az ozmotikus potenciál okozta stresszre, viszont a cukrok felhalmozásában nem tapasztaltak különbséget. Magasabb hőmérsékleten glicerolt alkalmazva a mátrix potenciál növelésére magasabb cukor felhalmozódást tapasztaltak a kutatók, mint a NaCl-val módosított tápközegben, ez arra utal, hogy ezek a törzsek nagyobb mértékben képesek tolerálni a megváltozott körülményeket, amely képes lehet ökológiai előnyökhöz juttatni őket (Nesci et al., 2004). Másik tanulmány szerint viszont a NaCl, KCl vagy a szorbit hiperozmotikus mennyiségben nem befolyásolta az aflatoxin bioszintézisét (Duran et al., 2010). Ez kapcsolatban állhat azzal a szabályozással, amit az *Aspergillus nidulans* gombánál írtak le: az ozmotikus stresszre adott válasz genetikai szabályozásában részt vesz a RcoA gén, amely nemcsak a gomba növekedésével, fejlődésével, de a sterigmatocystin termeléssel is kapcsolatba volt hozható (Hicks et al., 2001). Illetve az ozmotikus stressz *Aspergillus*-okban befolyásolja a pigmentek termelődését is (Duran et al., 2010). A gombák a külső környezet ozmotikus nyomásának változásait a MAPK (mitogén-aktivált-protein-kináz) kaszkád által közvetített HOG jelátviteli útvonalon keresztül érzékelik. Az aktivált MAPK-k számos transzkripciós faktort foszforilálnak, ezáltal szabályozzák a génexpressziót és a fehérjeszintézist is. Az ozmotikus stresszre adott válasza a gombáknak különböző lehet, például az ozmózisnyomás ellen glicerol termelődhet a citoplazmában, vagy a citoskeleton, illetve a sejtfal megváltozik, vagy a konídiumképződés fokozódik. A konídiumok képesek a szél által terjedni és így a kedvezőtlen környezeti körülményekből kikerülve a gombának nagyobb lesz az esélye a túlélésre. A gazdanövény-gomba interakció során a gomba megváltozott ozmotikus viszonyok közé kerülhet, például a növényi sejtek lízise által. Az ozmotikus stresszválasz konzervált, de nem azonos a különböző gombákban és szorosan összefügg a morfogenezissel. A természetben való túlélésben szerepet játszik az is, hogy a gomba milyen mértékben tudja a morfológiai

tulajdonságait megváltoztatni a változó ozmotikus viszonyok hatására (Duran et al., 2010).

A PkcA protein-kináz aktiválja az *Aspergillus nidulans*-ban a sejtfal integritási válaszban részt vevő MAPK egységeket. A csökkent PkcA aktivitással rendelkező *Aspergillus nidulans* mutánsok érzékenyebbek lesznek például az SDS okozta stresszre, ezeknek az enzimeknek nagy szerepük van a sejtfal metabolizmusában. A gombasejtfalat ért károsító hatásokra válaszul megindul a gombában a *mpkA-lacZ* génnek fokozott expressziója (Valiante et al., 2008). A MAPK jelátviteli útvonal fontos szerepet játszik az *Aspergillus flavus* növekedésében, a szklerócium és konídium képződésében és az aflatoxin produkcióban, ezt bizonyítják a foszforilált fehérjék deléciós, komplementációs, pontmutációs mutánsokkal elvégzett kísérletek (Ren et al., 2016).

5.2.3.1 *Aspergillus flavus* izolátumok és a referencia törzs stresszvizsgálata 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⁻¹ SDS pedig teljesen gátolta a vegetatív növekedést. Az izolátumok nagy részére szintén hasonló hatást fejtett ki az SDS okozta stressz, 5 izolátumnál megváltozott a konidiofórok 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⁻¹ SDS alkalmazásakor volt megfigyelhető.

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

A referencia *Aspergillus flavus* törzset vizsgálva malátás agaron hasonló toleranciát tapasztaltam ozmotikus, valamint SDS-stresszel szemben is, mint kukorica agaron. A NaCl elsősorban a hifák pigmentáltságának változását, valamint nagyobb szklerócium produkciót, az SDS pedig nagyobb koncentrációban csökkentette a spóráképződést, 0,75 g l⁻¹ koncentrációban pedig meggátolta a növekedést is.

Az aflatoxinogén izolátumok közül csupán 4 esetben volt jelentős hatással az általam alkalmazott alacsonyabb NaCl 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 produkciót.

Összeségében 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.

5.3 A kukoricán termelt szekunder metabolitok vizsgálata

Az atoxinogén 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 anyagcseretermékek (B. Melléklet) jelenlétét vizsgáltuk MV251 kukorica hibridre oltott aflatoxint nem termelő *Aspergillus flavus* mintákból (5. 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 (5. táblázat), tehát nem volt tekinthető atoxinogénnek. A többi atoxinogén *Aspergillus flavus* izolátum nem termelt a vizsgált szekunder metabolitok közül egyiket sem HPLC-MS készülékkel kimutatható mennyiségben. A talált

metabolitok CPA származék vegyületek, amelyek egészségkárosító hatása elmarad az aflatoxinokétól, emiatt kevésbé vizsgált vegyületek, viszont együttes kumulatív toxikológiai, valamint hosszútávú hatásuk miatt lényegesek lehetnek humán egészségügyi szempontból. Az általunk kimutatott 3-OH speradine A-t először *Aspergillus tamaraii* tenyészetben mutatták ki (Wang et al., 2013), de sikerült *Aspergillus flavus* tenyészetekben is detektálni (Uka et al., 2017). A speradine F-et először *Aspergillus oryzae* (Hu et al., 2014), majd *Aspergillus flavus*, valamint *Penicillium spp.*, tenyészetekből, a speradine I-t *Aspergillus flavus* (Ma et al., 2015), az aspergilline D-t pedig *Aspergillus versicolor* és *Penicillium commune* tenyészetekből sikerült kimutatni (Xu et al., 2015). Az atoxinogén gombák alkalmazása esetén biológiai kontrollként, az aflatoxin szennyezettséggel szembeni védekezésben 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. Abbas és munkatársai (2011a) három atoxinogén törzs aflatoxin és CPA csökkentő hatását vizsgálták szántóföldi körülmények között, és azt tapasztalták, hogy az egyik törzs ugyan csökkentette a keletkező aflatoxin mennyiségét, viszont CPA felhalmozódást idézett elő a kukoricában (Abbas et al., 2011b).

5. 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	-	+	-

5.4 Kompetíciós képesség vizsgálata

A biológiai kontroll esetén aflatoxinokat nem termelő *Aspergillus flavus* törzseket alkalmazhatnak a kukorica aflatoxin szennyezettségének csökkentésére. Az atoxinogén törzs kompetíciós képessége révén képes megakadályozni a toxinogén *Aspergillus flavus* növekedését, szekunder metabolit produkcióját. Szántóföldi körülmények között is sikerült igazolni az aflatoxint nem termelő *Aspergillus flavus* (NRRL 21882) aflatoxin szennyezettség csökkentő hatását kukoricán, és az Amerikai Egyesült Államokban Afla-Guard néven kereskedelmi forgalomba is hozták (Brown et al., 1991; Abbas et al., 2011a). Abbas és munkatársai (2011a) kukoricán vizsgálták három atoxinogén *Aspergillus flavus*

aflatoxin koncentrációra gyakorolt hatását az USA-ban, ugyanolyan mennyiségű toxinogén *Aspergillus flavus* törzset alkalmazva. Azt tapasztalták, hogy két atoxinogén törzs (K49 és NRRL 21882 /Afla-Guard/) 83 % és 98 %-al, míg a harmadik törzs (AF36) 20 %-al csökkentette a kukorica aflatoxin B1 tartalmát. Nigériában pedig az La3279 atoxinogén *Aspergillus flavus* törzset találták a leghatékonyabbnak, mivel az több mint 99 %-kal csökkentette a kukorica aflatoxin B1 szennyezettségét (Atehnkeng et al., 2008).

Kutatásom során sikerült igazolni, hogy az általam alkalmazott aflatoxint nem termelő *Aspergillus flavus* izolátum is képes csökkenteni az aflatoxin szennyezettséget kukoricaszemen, viszont ez az izolátum későbbi HPLC-MS vizsgálatok alapján speradine F-t termel, emiatt szükséges a többi atoxinogén izolátum kompetíciós vizsgálata toxinogén *Aspergillus flavus* törzsszel, valamint szántóföldi *in vivo* kísérletek is szükségesek az izolátumok hatékony aflatoxintermelést csökkentő hatásának bizonyítására.

5.5 Kukoricahibridek ellenállóképessége és az *Aspergillus flavus* fertőzőképessége

A kukoricaszemes kísérlethez szükséges inokulációt Rajasekaran és munkatársai (2013) kísérlete alapján végeztük el, amely segítségével információt kaphatunk az egyes kukoricahibridek *Aspergillus flavus*-szal szembeni érzékenységről. Ebben a tanulmányban a gombafertőzöttség mértékére az *Aspergillus flavus* termelte zöld fluoreszcens fehérje (GFP) által kibocsátott fluoreszcencia mérése és statisztikai elemzése alapján következtettek, valamint mérték a termelődő aflatoxin mennyiségét is. Luna-López és munkatársai (2013) szintén *in vitro* különböző kukorica hibrid szemtermésére oltottak aflatoxint termelő *Aspergillus flavus*-t, és vizsgálták a különböző hibrideken megfigyelhető gombanövekedést és aflatoxin termelést, és ezáltal következtetni lehetett a kukoricahibridek rezisztenciájára szántóföldi körülmények között, amely megegyezett más tanulmányokban leírtakkal. Viszont a növény rezisztenciáját számos tényező befolyásolhatja, ezért ezek az információk csak tájékoztató jellegűek.

Kutatásaim során a különböző hibrid kukoricaszemeken a referencia, valamint a toxinogén és az aflatoxint nem termelő *Aspergillus flavus* –szal fertőzött szemek arányát vizsgáltuk. A különböző kukorica hibridek eltérő ellenállóképességet mutattak, valamint eltérően viselkedtek a különböző *Aspergillus 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 nincs ebben a régióban (Szabó et al., 2018), de vannak az egyes gombafajokkal való fertőzésre nézve alacsony, közepes és magas érzékenységgű kukoricahibridek (Szabó et al., 2018). Fontos a kukoricahibridek ellenállóképességének meghatározása, előrejelzése élelmiszer és takarmánybiztonsági szempontból, így kiválaszthatjuk a magasabb rezisztenciával rendelkező kukoricahibrideket, amelyek ellenállóbbak lesznek gombafertőzésekkel szemben, és így kisebb mértékű toxinszennyezettség alakulhat ki.

Vizsgálataim alapján olyan kukoricahibridet választottam ki, amelyet az aflatoxint nem termelő és toxinogén *Aspergillus flavus* izolátumunkkal szemben lényegében egyformán viselkedett, az *in vitro* kísérletben, ezért alkalmazható a további kutatások során.

6. Új tudományos eredmények

1. **Felmértem az endemikus *A. 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 *Aspergillus flavus*-nak bizonyult. Egy atoxinogén, és egy toxinogén *A. flavus* izolátumot a kalmodulin gén szekvencia alapján is *Aspergillus 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 szerves 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 *Aspergillus 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 *A. flavus* törzs stressztűrését.** A referencia *Aspergillus flavus* törzs malátás, valamint kukoricaagaron is 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 *Aspergillus 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 spóráképződést, 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 *Aspergillus flavus* izolátumot sikerült találni, amelyek kukoricára oltva nem termeltek 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 *Aspergillus flavus* izolátum képes csökkenteni a toxinogén *Aspergillus flavus* izolátum általi aflatoxin B1 szennyezettséget kukoricaszemen.
7. **Eltérő kukorica hibrideken teszteltem toxinogén és aflatoxint nem termelő *A. flavus* növekedését.** Hat különböző kukoricahibridet vizsgálva sikerült *Aspergillus flavus* gombafertőzéssel szemben ellenálló és érzékeny fajtákat elkülöníteni, valamint olyan hibridet találni, amely egyforma mértékben fertőződött atoxinogén és toxinogén izolátumokkal is.

7. Gyakorlatban alkalmazható eredmények

1. Az általam gyűjtött aflatoxinogén *Aspergillus flavus* izolátumok nagy ellenállóképességet mutattak ozmotikus, valamint sejtmembránra ható stresszel szemben, ami fontos lehet növényvédelmi szempontból.
2. Kimutattam, hogy a vizsgált kukoricahibridek rezisztenciája *Aspergillus flavus*-szal szemben eltérő, valamint eltérőek a különböző, toxinogén, atoxinogén és referencia *Aspergillus flavus*-szal szemben is. A toxinogén és atoxinogén *Aspergillus flavus* izolátumokkal szemben találtam egyforma rezisztenciával rendelkező hibridet, a további, *in vivo* kísérletek megalapozására.
3. Azonosítottam olyan kukoricán aflatoxin B1-et nem termelő *Aspergillus 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 *Aspergillus flavus* gátolta a kukoricán az aflatoxin B1 termelést, ezáltal hatékonyan alkalmazható biokontrollként is.

8. Összefoglalás

Az *Aspergillus sp.* penészgombák az egyik legjelentősebb mezőgazdasági kártevők, amelyek mind szántóföldi, mind raktári körülmények között megjelenhetnek. Főként kukoricában és kukorica tartalmú takarmányokban, olajos magvakban, fűszerekben, szárított gyümölcsökön fordulnak elő. Ebbe a csoportba tartoznak a legtoxikusabb mikotoxint, az aflatoxint termelő *Aspergillus flavus* és *Aspergillus parasiticus* gombák. Ezek a gombák a növekedésükhöz, szaporodásukhoz, szekunder metabolit termelésükhöz magasabb hőmérsékletet és magasabb páratartalmat igényelnek, ezért eddig elsősorban trópusi területeken fordultak elő. Azonban manapság a klímaváltozás és a szélsőséges időjárási viszonyok miatt hazánkban is megjelentek, ezért vizsgálatuk kiemelkedő jelentőségű.

Munkám során 72 db endemikus *Aspergillus sp.* izolátumot gyűjtöttem össze morfológiai bélyegek alapján, takarmányokról, illetve alapanyagokról. A 72 db izolátum közül 33 db bizonyult potenciálisan aflatoxinogénnek, a toxin szintéziséért felelős génklaszter 3 génjének (*aflR*, *norA*, *omtA*) multiplex PCR-rel való kimutatása alapján. A fajmeghatározást az ITS régió bizonyos szakaszának (ITS1 és ITS4 primerrel) amplifikálása és szekvenálása alapján végeztem. Így valószínűsíthetőleg a 33 db potenciálisan aflatoxint termelő izolátumok közül 22 db bizonyult *Aspergillus flavus*-nak, míg egy *Aspergillus tritici*, három *Aspergillus tritici* vagy *Aspergillus candidus*, és egy *Aspergillus cristatus* vagy *Aspergillus amstelodami* volt, de a pontos faji azonosításhoz további PCR alapú vizsgálatok szükségesek. Majd a további vizsgálatokhoz kiválasztottam a 22 db izolátum közül egy toxinogént, amely aflatoxintermelését sikerült detektálni maláta agaron, egy atoxinogént, amely nem termelt aflatoxint maláta agaron és a referencia *Aspergillus flavus* törzset, amelyek faji meghatározását kalmodulin génszekvencia alapján is elvégeztem, ami alapján szintén *Aspergillus flavus* fajba sorolhatóak be.

A természetes közeg modellezésére kukoricaagart vezettem be. A referenciatörzset eltérő tápközegekben vizsgálva azt tapasztaltam, hogy a kukoricaagar esetében elsősorban a magasabb zsírtartalom, valamint a glükóz hozzáadása indukálta az aflatoxintermelést, illetve a malátás agaron volt a legnagyobb mértékű az aflatoxintermelés. Tehát a magas antioxidáns tartalom és az alacsony szerves nitrogén tartalom ellenére is volt toxinszintézis, ami a glükózból, illetve a zsírsavakból képződő acetyl-coenzim A-val

magyarázható. A szklerócium produkció, ami a túlélést biztosítja kedvezőtlen környezeti feltételek mellett, kevésbé volt jellemző a malátás agaron, kukoricaagaron pedig elsősorban a magas zsírtartalom és a szerves nitrát vegyületek alkalmazása segítette elő a képződését. Tehát nem tapasztaltam szoros összefüggést a szkleróciumprodukció és a termelt aflatoxin B1 mennyisége között.

A referencia *Aspergillus flavus* törzset különböző spóramennyiséggel leoltva malátás agarra azt tapasztaltam, hogy a legkisebb alkalmazott spórakoncentráció eredményezte a legnagyobb mértékű aflatoxin B1 produkciót, valószínűleg a rendelkezésre álló nagyobb mennyiségű tápanyagforrás miatt. Tehát negatív relációs összefüggés mutatható ki a leoltáshoz alkalmazott spóramennyiség, valamint az aflatoxin B1 produkció között malátás agaron.

Stresszvizsgálataimat malátás agaron, valamint kukoricaagaron végeztem. Kiderült, hogy a referencia törzs ozmotikus stresszre pigmentáltság változással, valamint növekedett szklerócium produkcióval reagált, mindkét vizsgált táptalajon, míg a sejtmembránt károsító SDS-sel szemben kis koncentrációban fokozott szklerócium képződést, nagyobb koncentrációban pedig csökkent vegetatív növekedést tapasztaltam. Az izolátumok fele hasonlóképpen reagált a NaCl okozta ozmotikus stresszre kukoricaagaron, mint a referencia törzs, viszont az izolátumok egy része nagyobb, néhány izolátum pedig kisebb rezisztenciát mutatott. Malátás agaron pedig csupán négy izolátumnál figyeltem meg nagyobb mértékű szenzitivitást ozmotikus stresszre, az izolátumok nagy részénél csak nagyobb koncentrációban okozott változást a NaCl a vegetatív növekedésben vagy a spóráképződésben. Az SDS hasonló hatást fejtett ki az izolátumokra, mint a referencia törzsre, kukoricaagaron kettő, míg malátás agaron három izolátum már kisebb SDS koncentrációt is nehezen tolerált, csökkent a vegetatív növekedés, spóráképződés, míg a kukoricaagaron öt, malátás agaron egy izolátum bizonyult rezisztensebbnek SDS-el szemben. Tehát összességében megállapítható, hogy az *Aspergillus flavus* általánosan magas rezisztenciával rendelkezik a vizsgált stresszfaktorokkal szemben, ami fontos lehet növényvédelmi szempontból.

Az atoxinogén jelleget HPLC-MS módszerrel erősítettem meg kukoricára oltott izolátumokban. Kiderült, hogy kilenc aflatoxint nem termelő izolátum nem termel egyik vizsgált szekunder metabolitot sem, így alkalmazhatóak lennének biokontrollként szántóföldeken, a kukorica aflatoxin szennyezettségének csökkentésére. Ehhez viszont a további kutatások folyamatban vannak.

A kompetíciós képesség vizsgálata során pedig sikerült bebizonyítani, hogy az alkalmazott atoxinogén *Aspergillus flavus* izolátum képes a kukorica aflatoxin tartalmának csökkentésére toxinogén *Aspergillus flavus* izolátum alkalmazása mellett. Így tehát alkalmas lehet szántóföldi körülmények között is a kukorica aflatoxin szennyezettségének mérséklésére.

A kutatásom folytatásához megfelelő rezisztenciájú kukorica hibridre volt szükség. Különböző kukoricahibridek *Aspergillus flavus*-szal szembeni ellenállóképességét vizsgálva sikerült találni ellenálló és érzékeny kukoricahibrideket, illetve találtam olyan hibridet is, amely hasonló rezisztenciával rendelkezett a kiválasztott toxinogén és atoxinogén *Aspergillus flavus*-szal szemben. Ez a későbbi vizsgálataink szempontjából is nagy jelentőségű.

9. Summary

Aspergillus sp. molds are one of the most significant agricultural pests that may appear in both arable and storage conditions. They mainly occur in maize and maize feeds, oilseeds, spices and dried fruits. This group includes the most toxic mycotoxins, and *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* producing aflatoxin. These fungi require higher temperatures and higher humidity for their growth, reproduction, secondary metabolite production, and have so far mainly occurred in tropical areas. However, these days, due to climate change and extreme weather conditions, they have also appeared in Hungary, so their investigation is of paramount importance.

In our work, we collected 72 endemic *Aspergillus sp.* isolates based on morphological characteristics from feeds and raw materials. Of the 72 isolates, 33 were potentially aflatoxinogens as three genes (*aflR*, *norA*, *omtA*) of the aflatoxin gene cluster were detected by multiplex PCR. The species determination was carried out based on the amplification and sequencing of a certain section of the ITS region (ITS1 and ITS4 primers). Thus, of the 33 potentially aflatoxin-producing isolates, 22 were *Aspergillus flavus*, while one appeared to be *Aspergillus tritici*, three *Aspergillus tritici* or *candidus*, and one *Aspergillus cristatus* or *amstelodami*. For further studies, from the 22 isolates a toxinogen isolate was selected, which aflatoxin B1 production was detected on malt agar, an atoxinogen that did not produce aflatoxin B1 on malt agar and the reference *Aspergillus flavus* strain were also identified on the basis of calmoduline gene sequence and they were also classified as *Aspergillus flavus*.

I introduced corn agar to model the natural medium. Examining the reference strain in different media, I found that the aflatoxin production in the corn agar was primarily due to the higher fat content and the addition of glucose, but malate agar induced the highest aflatoxin production. So, despite the high antioxidant content and low inorganic nitrogen content, there was mycotoxin synthesis, which can be explained by acetyl coenzyme A from glucose and fatty acids. The sclerotium development, which ensures survival under unfavourable environmental conditions, was less typical of malate agar, and its formation was primarily facilitated by high fat content and the use of inorganic nitrate compounds on corn agar. So, we did not detect a close link between the sclerotium production and the amount of aflatoxin B1 produced.

The reference *Aspergillus flavus* strain, which was extinguished with different spore number, was found to have the lowest spore concentration used resulting in the highest aflatoxin B1 production, probably due to the higher available nutrient source. Therefore, there is a negative relationship between the amount of spore used for inoculation and the aflatoxin B1 production.

I tested stress on malate agar and corn agar. The reference strain responded with a change in pigmentation to osmotic stress and increased sclerotium production both on the culture medium tested, compared to cell membrane damaging SDS, which increased sclerotium number in low SDS concentrations and reduced vegetative growth at higher SDS concentrations. Half of the isolates reacted similarly to NaCl-induced osmotic stress on corn agar than the reference strain, but some isolates have increased and some isolates showed less resistance. In only four isolates, I observed greater sensitivity to osmotic stress, and in most isolates, NaCl only caused a change in vegetative growth or spore formation in a higher concentration. SDS had a similar effect on isolates as the reference strain, and two isolates on maize agar, and three isolates on malate agar hardly tolerate low SDS, they suffered decreased vegetative growth, spore formation, while five on corn agar, an isolate of malate agar has been found to be more resistant to SDS. So overall, it can be concluded that *Aspergillus flavus* has a generally high resistance to the stress factors studied, which may be important from a plant protection point of view.

To continue my research, a maize hybrid with sufficient resistance was needed. By examining the resistance of various maize hybrids to *Aspergillus flavus*, I was able to find resistant and sensitive maize hybrids, as well as a hybrid with similar resistance to the selected toxinogenic and atoxinogenic *Aspergillus flavus*. This has also a great importance for our future investigations.

In the study of the to competition ability, I demonstrated that the atoxinogenic *Aspergillus flavus* isolate could reduce the aflatoxin content of maize inoculated with toxinogenic *Aspergillus flavus* isolate. This isolate may therefore be suitable for reducing the contamination of maize with aflatoxin even under arable conditions.

Atoxinogenicity was confirmed by HPLC-MS in isolates inoculated on corn. It was found that nine isolates did not produce aflatoxins neither produce any of the secondary metabolites tested and could therefore be used as biocontrol in arable fields to reduce the aflatoxin contamination of maize. To do this, however, further research is ongoing.

10. Irodalomjegyzék

1. Abbas, H. K. - Weaver, M. A. - Horn, B.W. - Carbone, I. - Monacell, J. T. - Shier, W.T.: 2011a. Selection of *Aspergillus flavus* isolates for biological control of aflatoxins in corn. *Toxin Reviews*. 30: 59-70.
2. Abbas, H. K. – Zablotowicz, R. M. – Horn, B.W. – Phillips, N. A. – Johnson, B. J. – Jin, X. – Abel, C. A.: 2011b. Comparison of major biocontrol strains of non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* for the reduction of aflatoxins and cyclopiazonic acid in maize. *Food Additives and Contaminants*. 28: 198–208.
3. Adams, T. H. - Wieser, J. K. – Yu, J. H.: 1998. Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62: 35-54.
4. 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.
5. Adrio, J. L. - Demain, A. L.: 2003. Fungal biotechnology. *International Microbiology*. 6: 191-199.
6. Alshannaq, A. - Yu, J. H.: 2017. Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. *International Journal Environmental Research Public Health*. 14: 632.
7. Ames, B. D.–Tsai, S. C.: 2009. Structural enzymology of polyketide synthases. *Methods Enzymology*. 459: 17.
8. Apel, K. - Hirt, H.: 2004. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*. 55: 373–399.
9. Atehnkeng, J. – Ojiambo, P. S. – Ikotun, T. – Sikora, R. A. – Cotty, P. J. Bandyopadhyay, R.: 2008. Evaluation of atoxigenic isolates of *Aspergillus flavus* as potential biocontrol agents for aflatoxin in maize. *Food Additives and Contaminants*. 25: 1264–1271.
10. Atoui, A. - Kastner, C. - Larey, C. M. - Thokala, R. - Etxebeste, O. - Espeso, E. A. - Fischer, R. - Calvo, A. M.: 2010. Cross-talk between light and glucose regulation controls toxin production and morphogenesis in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology*. 47: 962–972.
11. Avantaggiato, A. - Solfrizzo, M. - Visconti, A.: 2005. Recent advances on the use of adsorbent materials for detoxification of *Fusarium* mycotoxins. *Food Additives and Contaminants*. 22: 379-388.
12. Bagheri-Gavkosh, S. - Bigdeli, M. - Shams-Ghahfarokhi, M. - Razzaghi-Abyaneh, M.: 2009. Inhibitory effects of Ephedra major host on *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production. *Mycopathologica*. 168: 249–255.
13. 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.
14. Bayram, O. - Krappmann, S. - Ni, M. - Bok, J. W. - Helmstaedt, K. : 2008. VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. *Science*. 320: 1504–1506.

15. Bedre, R. - Rajasekaran, K. - Mangu, V. R. - Sanchez Timm, L. E. - Bhatnagar, D. - Baisakh, N.: 2015. Genome-wide transcriptome analysis of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) identifies candidate gene signatures in response to aflatoxin producing fungus *Aspergillus flavus*. PLOS One. 10 (9): e0138025.
16. Bennett, J. W. – Klich, M.: 2003. Occurrence of *Fusarium* species and associated T2-toxin in Kenyan wheat. Mycotoxins. Clinical Microbiology Reviews. 16: 497-516.
17. 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.
18. Bhatnagar, D. - Yu, J. - Ehrlich, K. C.: 2002. Toxins of filamentous fungi. Chemical immunology. 81: 167-206.
19. Bintvihok, A. - Kositcharoenkul, S. : 2006. Effect of dietary calcium propionate on performance, hepatic enzyme activities and aflatoxin residues in broilers fed a diet containing low levels of aflatoxin B1. Toxicon. 47: 41-46.
20. Bok, J. W. - Hoffmeister, D. - Maggio-Hall, L. A. - Murillo, R. - Glasner, J. D.: 2006. Genomic mining for *Aspergillus* natural products. Chemistry and Biology. 13: 31–37.
21. Bottalico, A. - Perrone, G. : 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. European Journal of Plant Pathology. 108: 611–624.
22. 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.
23. Buchanan, R. L. - Ayres, J. C.: 1977. Effect of various glycolytic and tea intermediates on aflatoxin production. Journal of Food Safety. 1: 19–28.
24. Bukelskienė, V. - Baltriukienė, D. - Repečkienė, J.: 2006. Study of health risks associated with *Aspergillus amstelodami* and its mycotoxic effects. Ekologija. 3: 42–47.
25. Burdock, G. A. - Flamm, W. G. : 2000. Review Article: Safety assessment of the mycotoxin cyclopiazonic acid. International Journal of Toxicology. 19: 195–218.
26. Burow, G. B. - Nesbitt, T. C. - Dunlap, J. - Keller, N. P.: 1997. Seed lipoxxygenase products modulate *Aspergillus* mycotoxin biosynthesis. International Society for Molecular Plant-Microbe Interactions. 10: 380–387.
27. Calvo, A. M. - Wilson, R. A. - Bok, J. W. - Keller, N. P.: 2002. Relationship between secondary metabolism and fungal development. Microbiology and Molecularbiology Reviews. 66: 447–459.
28. Calvo, A. M.: 2008. The VeA regulatory system and its role in morphological and chemical development in fungi. Fungal Genetics and Biology. 45 (7):1053-61.
29. Carbone, I. - Jakobek, J. L. - Ramirez-Prado, J. H. - Horn, B. W.: 2007. Recombination, balancing selection and adaptive evolution in the aflatoxin gene cluster of *Aspergillus parasiticus*. Molecular Ecology. 16: 4401-4417.
30. Cary, J. W. - Klich, M. A. - Beltz, S. B.: 2005. Characterization of aflatoxin-producing fungi outside of *Aspergillus* section Flavi. Mycologia. 97: 425–432.
31. Cary, J. W. - O'Brian, G. R. – Nielsen, D. M. – Nierman, W. - Harris-Coward, P.: 2007. Elucidation of veA-dependent genes associated with aflatoxin and sclerotial

- production in *Aspergillus flavus* by functional genomics. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 76: 1107–1118.
32. Casselton, L. - Zolan, M.: 2002. The art and design of genetic screens: filamentous fungi. *Nature Reviews Genetics*. 3: 683–697.
 33. Chang, P. K. - Cary, J. W. - Bhatnagar, D. - Cleveland, T. E. - Bennett, J. W. – Linz, J. E. – Woloshuk, C. P. – Payne, G. A.: 1993. Cloning of the *Aspergillus parasiticus* apa-2 gene associated with the regulation of aflatoxin biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology*. 59: 3273–3279.
 34. Chang, P. K.–Cary, J. W.–Yu, J.–Bhatnagar, D.–Cleveland, T. E.: 1995. The *Aspergillus parasiticus* polyketide synthase gene pksA, a homolog of *Aspergillus nidulans* wA, is required for aflatoxin B1 biosynthesis. *Molecular Genetics and Genomics*. 248: 270–277.
 35. 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.
 36. Chitarrini, G. - Nobili, C. - Pinzari, F. - Antonini, A. - De Rossi, P. - Del Fiore, A. - Procacci, S. - Tolaini, V. - Scala, V. - Scarpari, M. - Reverberi, M.: 2014. Buckwheat achenes antioxidant profile modulates *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production. *International Journal of Food Microbiology*. 189: 1–10.
 37. Ciferri, O: 1999. Microbial degradation of paintings. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(3): 879–885.
 38. Coley-Smith, J. R. - Cooke, R. C.: 1971. Survival and germination of fungal sclerotia. *Annual Review of Phytopathology*. 9: 65-92.
 39. Collinge, D. B. - Slusarenko, A. J.: 1987. Plant gene-expression in response to pathogens. *Plant Molecular Biology*. 9: 389–410.
 40. Corassin, C. H. – Bovo, F. – Rosim, R. E. – Oliveira, C. A. F.: 2012. Efficiency of *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria strains to bind aflatoxin M1 in UHT skim milk. *Food Control*. 31: 80–83.
 41. Cotty, P. J. :1989. Virulence and cultural characteristics of two *Aspergillus flavus* strains pathogenic on cotton. *Phytopathology*. 78: 1250-1253.
 42. Cotty, P. J. - Mellon, J. E.: 2006. Ecology of aflatoxin producing fungi and biocontrol of aflatoxin contamination. *Mycotoxin Research*. 22: 110-117.
 43. Cotty, P. J. - Jaime-Garcia, R.: 2007: Influences of climate on aflatoxin producing fungi and aflatoxin contamination. *International Journal of Food Microbiology*. 119: 109-115.
 44. Cuero, R. - Ouellet, T. - Yu, J. - Mogongwa, N.: 2003. Metal ion enhancement of fungal growth, gene expression and aflatoxin synthesis in *Aspergillus flavus*: RT-PCR characterization. *Journal of Applied Microbiology*. 94: 953–961.
 45. Cuero, R. - Ouellet, T.: 2005. Metal ions modulate gene expression and accumulation of the mycotoxins aflatoxin and zearalenone. *Journal of Applied Microbiology*. 98: 598–605.
 46. Dall'Asta, C. - Battilani, P.: 2016. Fumonisin and their modified forms, a matter of concern in future scenario? *World Mycotoxin Journal*. 9(5): 727-739.
 47. Davis, N. D. - Diener, U. L.: 1968. Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* from various carbon sources. *Applied Microbiology*. 16: 158–159.

48. De Oliveira, T. L. C. - De Araújo, S. R. – Ramos, E. M. - Das Graças Cardoso, M. – Alves, E. – Piccoli, R. H.: 2011. Antimicrobial activity of *Satureja montana* L. essential oil against *Clostridium perfringens* type A inoculated in mortadella-type sausages formulated with different levels of sodium nitrite. *International Journal of Food Microbiology*. 144: 546–555.
49. Debets, A. J. M. – Griffiths, A. J. F.: 1998. Polymorphism of *het*-genes prevents resource plundering in *Neurospora crassa*. *Mycological Research*. 102: 1343-1349.
50. 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.
51. 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.
52. Dolezal, A. L. – Shu, X. – O'Brian, G. R. – Nielsen, D. M. – Woloshuk, C. P. – Boston, R. S. – Payne, G. A.: 2014. *Aspergillus flavus* infection induces transcriptional and physical changes in developing maize kernels. *Frontiers in Microbiology*. 5: 384.
53. Dorner, J. W.: 2004. Biological control of aflatoxin contamination of crops. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews*. 23: 425-450.
54. D'Souza, C. A.–Lee, B. N.–Adams, T. H. (2001): Characterization of the role of the FluG protein in asexual development of *Aspergillus nidulans*. *Genetics*. 158: 1027–1036.
55. Duarte, S. C. - Pena, A. - Lino, C. M.: 2010. A review on ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal derived food products. *Food Microbiology*. 27: 187–198.
56. Duran, R. - Carry, J. W. - Calvo, A. M.: 2010. Role of the osmotic stress regulatory pathway in morphogenesis and secondary metabolism in filamentous fungi. *Toxins*. 2(4): 367-381.
57. Dutton, M. F.: 1988. Enzymes and aflatoxin biosynthesis. *Microbiology Reviews*. 52: 274–295.
58. Dyer, P. S. – Ingram, D. S. – Johnstone, K.: 1992. The control of sexual morphogenesis in the Ascomycotina. *Biological Reviews*. 67: 421-458.
59. Dyer, P. S. – Paoletti, M.: 2005. Reproduction in *Aspergillus fumigatus*: sexuality in a supposedly asexual species? *Medical Mycology*. 43 (*Supplement1*): S7-S14.
60. Dyer, P. S.: 2007. Sexual Reproduction and Significance of MAT in the aspergilli. [In: Heitman J., Kronstad J. W., Taylor J. W., Casselton L. A. *Sex in Fungi: Molecular Determination and Evolutionary Principles*]. American Society for Microbiology. Washington, 123-142.
61. Ehrlich, K. C.–Montalbano, B. G.–Bhatnagar, D.–Cleveland, T.: 1998. Alteration of different domains in AflR affects aflatoxin pathway metabolism in *Aspergillus parasiticus* transformants. *Fungal Genetics and Biology*. 23: 279–287.
62. Ehrlich, K. C. - Cary, J. W. - Montalbano, B. G.: 1999. Characterization of the promoter for the gene encoding the aflatoxin biosynthetic pathway regulatory protein AflR. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*. 1444: 412–417.

63. Ehrlich, K. C. - Montalbano, B. G. - Cotty, P. J.: 2003. Sequence comparison of *aflR* from different *Aspergillus* species provides evidence for variability in regulation of aflatoxin production. *Fungal Genetics and Biology*. 38: 63–74.
64. El-Gazzar, F. E. - Rusul, G. - Marth, E. H.: 1985. Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* in the presence of sodium chloride. *Journal of Food Protection*. 49. 6: 461–466.
65. El-Mogy, M. M. – Alsanius, B. W.: 2012. Cassia oil for controlling plant and human pathogens on fresh strawberries. *Food Control*. 28:157–162.
66. Erdogan, A.: 2004. The aflatoxin contamination of some pepper types sold in Turkey. *Chemosphere*. 56: 321–325.
67. 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.
68. Flaherty, J. E.–Payne, G. A.: 1997. Overexpression of *aflR* leads to upregulation of pathway gene transcription and increased aflatoxin production in *Aspergillus flavus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 3995–4000.
69. Fountain, J. C. - Scully, B. T. - Ni, X. - Kemerait, R. C. - Lee, R. D. - Chen, Z.-Y. - Guo, B.: 2014. Environmental influences on maize-*Aspergillus flavus* interactions and aflatoxin production. *Frontiers in Microbiology*. 5: 40.
70. Furukawa, T. – Sakuda, S.: 2019. Inhibition of aflatoxin production by paraquat and external superoxide dismutase in *Aspergillus flavus*. *Toxins*. 11:107.
71. Galagan, J. E. - Calvo, S. E. - Cuomo, C. - Ma, L. J. - Wortman, J. R. - Batzoglou, S. - Lee, S. - I. - Basturkmen, M. - Spevak, C. C. - Clutterbuck, J. - Kapitonov, V. - Jurka, J. - Scazzocchio, C. - Farman, M. - Butler, J. - Purcell, S. - Harris, S. - Braus, G. H. - Draht, O. - Busch, S. - D’Enfert, C. - Bouchier, C. - Goldman, G. H. - Bell-Pedersen, D. - Griffiths-Jones, S. - Doonan, J. H. - Yu, J. - Vienken, K. - Pain, A. - Freitag, M. - Selker, E. U. - Archer, D. B. – Penalva, M. A. - Oakley, B. R. - Momany, M. - Tanaka, T. - Kumagai, T. - Asai, K. - Machida, M. - Nierman, W. C. - Denning, D. W. - Caddick, M. - Hynes, M. - Paoletti, M. - Fischer, R. - Miller, B. - Dyer, P. - Sachs, M. S. - Osmani, S. A. – Birren, B. W.: 2005. Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature*. 438: 1105–1115.
72. Geisen, R.: 1996. Multiplex polymerase chain reaction for the detection of potential aflatoxin and sterigmatocystin producing fungi. *Systematic and Applied Microbiology*. 19: 388–392.
73. Geiser, D. M. – Timberlake, W. E. – Arnold, M. L.: 1996. Loss of meiosis in *Aspergillus*. *Molecular Biology and Evolution*. 13: 809–817.
74. Georgianna, D. R. – Payne, G. A.: 2009. Genetic regulation of aflatoxin biosynthesis: from gene to genome. *Fungal Genetics and Biology*. 46: 113–125.
75. Glenn, A. E.: 2007. Mycotoxigenic *Fusarium* species in animal feed. *Animal Feed Science and Technology*. 137(3–4):213–240.
76. Gourama, H. - Bullerman, L. B.: 1995. Detection of molds in foods and feeds: potential rapid and selective methods. *Journal of Food Protection*. 58. 12: 1389–1394.

77. Harrison, M. A.: 1989. Presence and stability of patulin in apple products: A review. *Journal of Food Safety*. 9: 147–153.
78. Hassan, S. – Mathesius, U.: 2012. The role of flavonoids in root-rhizosphere signalling: opportunities and challenges for improving plant-microbe interactions. *Journal of Experimental Botany*. 63: 3429–3444.
79. Hawkins, L. K. - Mylroie, J. E. - Oliveira, D. A. - Smith, J. S. - Ozkan, S. - Windham, G. L. – Williams, W. P. – Warburton, M. L.: 2015. Characterization of the maize chitinase genes and their effect on *Aspergillus flavus* and aflatoxin accumulation resistance. *PLOS One* 10: 0126185.
80. Hicks, J. K.–Yu, J. H.–Keller, N. P.–Adams, T. H.: 1997. *Aspergillus* sporulation and mycotoxin production both require inactivation of the FadA G α protein-dependent signaling pathway. *The EMBO Journal*. 16: 4916–4923.
81. Hicks, J. - Lockington, R. A. - Strauss, J. - Dieringer, D. - Kubicek, C. P. - Kelly, J. - Keller, N.: 2001. RcoA has pleiotropic effects on *Aspergillus nidulans* cellular development. *Molecular Microbiology*. 39: 1482–1493.
82. Holmes, R. A. – Boston, R. S. – Payne, G. A.: 2008. Diverse inhibitors of aflatoxin biosynthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 78: 559-572.
83. Holzapfel, C.W.: 1968. The isolation and structure of cyclopiazonic acid, a toxic metabolite of *Penicillium cyclopium* Westling. *Tetrahedron*. 24: 2101–2119.
84. 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.
85. Horn, B. W. - Greene, R. L. - Sobolev, V. S. - Dorner, J. W. - Powell, J. H. - Layton, R. C.: 1996. Association of morphology and mycotoxin production with vegetative compatibility groups in *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, and *A. tamarii*. *Mycologia*. 88: 574-587.
86. 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.
87. Horn, B. W. - Ramirez-Prado, J. H. - Carbone, I.: 2009. Sexual reproduction and recombination in the aflatoxin-producing fungus *Aspergillus parasiticus*. *Fungal Genetics and Biology*. 46: 169-175.
88. Horn, B. W. – Sorensen, R. B. – Lamb, M.C. – Sobolev, V. S. – Olarte, R. A. – Worthington, C. J. – Carbone, I.: 2014. Sexual reproduction in *Aspergillus flavus* sclerotia naturally produced in corn, *The American Phytopathological Society Journals*, 104: 75-85.
89. Houbraken, J. - Kocsubé, S. - Visagie, C.M. - Yilmaz, N. - Wang, X.-C. - Meijer, M. - Kraak, B. - Hubka, V. - Bensch, K. - Samson, R.A. – Frisvad, J. C.: 2020 Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (*Eurotiales*): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. *Studies in Mycology*. 95: 5–169.
90. Howlett, B. J. : 2006. Secondary metabolite toxins and nutrition of plant pathogenic fungi. *Current Opinion in Plant Biology*. 9: 371-375.
91. Hu, X. - Xia, Q. W. - Zhao, Y.Y. - Zheng, Q. H. - Liu, Q. Y. - Chen, L. - Zhang, Q. Q. : 2014. Speradines F-H, three new oxindole alkaloids from the marine-

- derived fungus *Aspergillus oryzae*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin. 62:942–946.
92. Hua, S. S. T. - Baker, J. L. - Flores-Espiritu, M.: 1999. Interactions of saprophytic yeasts with a nor mutant of *Aspergillus flavus*. Applied and Environmental Microbiology. 65(6): 2738- 2740.
 93. Huang, J.Q. - Jiang, H. F. - Zhou, Y.Q. - Lei, Y. - Wang, S.Y. - Liao, B.S.: 2009. Ethylene inhibited aflatoxin biosynthesis is due to oxidative stress alleviation and related to glutathione redox state changes in *Aspergillus flavus*. International Journal of Food Microbiology. 130: 17-21.
 94. Huffaker, A. - Kaplan, F. - Vaughan, M. M. - Dafoe, N. J. - Ni, X. - Rocca, J. R. - Alborn, H. T. - Teal, P. E. A. - Schmelz, E. A.: 2011. Novel acidic sesquiterpenoids constitute a dominant class of pathogen-induced phytoalexins in maize. Plant Physiology. 156: 2082–2097.
 95. Hussein, H. S. - Brasel, J. M.: 2001. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. Toxicology. 167: 101–134.
 96. Huwig, A. - Freimund, S. - Kappeli, O. - Dutler, H.: 2001. Mycotoxin detoxification of animal feed by different adsorbents. Toxicology Letters. 122: 179-188.
 97. 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.
 98. Inês, A. - Guimarães, A. - Maria, J. C. - Laranjo, V. - Venâncio, A. - Abrunhosa, L.: 2015. Biodetoxification of mycotoxins by lactic acid bacteria from different food matrices. World Academy of Science, Engineering and Technology International Journal of Nutrition and Food Sciences. 2: 7.
 99. Jane, C. - Kiprop, E. K. - Mwamburi, L. A.: 2014. Biocontrol of aflatoxins in corn using atoxigenic *Aspergillus flavus*: Review. International Journal of Science and Research. 358 (12): 1954-1958.
 100. Jayashree, T. - Subramanyam, C.: 2000. Oxidative stress as a prerequisite for aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. Free Radical Biology and Medicine. 29: 981–985.
 101. Kachholz, T. - Demain, A. L.: 1983. Nitrate repression of averufin and aflatoxin biosynthesis. Journal of Natural Products. 46: 499-506.
 102. Kallela, K. - Ettala, E.: 1984. The oestrogenic *Fusarium* toxin (zearalenone) in hay as a cause of early abortions in the cow. Nordisk Veterinaermedicin. 36: 305–309.
 103. Kato, N. - Brooks, W. - Calvo, A. M.: 2003. The expression of sterigmatocystin and penicillin genes in *Aspergillus nidulans* is controlled by *veA*, a gene required for sexual development. Eukaryotic Cell. 2: 1178–1186.
 104. 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.
 105. Keller, N. P. - Turner, G. - Bennett, J. W.: 2005. Fungal secondary metabolism from biochemistry to genomics. Nature Reviews Microbiology. 3: 937–947.
 106. Kovács, Sz. – Pusztahelyi, T. – Borbélyné, Varga, M.: 2014. Az aflatoxin képződése mezőgazdasági termékeken. Agrártudományi Közlemények. 2014: 56.

107. Kovács, Sz.- Pusztahelyi, T.: 2017. Survey of the aflatoxin gene cluster in *Aspergilli* from Hungarian crops. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* 52 (1): 1–8.
108. Kowalska, K. - Habrowska-Górczyńska, D. E. - Piastowska-Ciesielska, A. W.: 2016. Zearalenone as an endocrine disruptor in humans. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 48: 141–149.
109. Krebs, H. – Streit, B. – Forrer, H. R. : 2000. Effect of tillage and preceding crops on *Fusarium* infection and deoxynivalenol content of wheat. *Proceedings of the 13th International IFOAM ScientiEc Conference*. 113: 2.
110. Kronstad, J. W. : 2007. Self-fertility: the genetics of sex in lonely fungi. *Current Biology*. 17: 843–845.
111. Kulik, M. M. – Hanlin, R. T. : 1968. Osmophilic strains of *Aspergillus* species. *Mycologia*. 60: 961-964.
112. Lee, Y. J. - Hagler, W. M. Jr.: 1991. Aflatoxin and cyclopiazonic acid production by *Aspergillus flavus* isolated from contaminated maize. *Journal of Food Science*. 56: 871–872.
113. Lee, B. N. - Adams, T. H.: 1994a. The *Aspergillus nidulans* fluG gene is required for production of an extracellular developmental signal and is related to prokaryotic glutamine synthetase I. *Genes and Development*. 8: 641–651.
114. Lee, B. N. - Adams, T. H.: 1994b. Overexpression of flbA, an early regulator of *Aspergillus* asexual sporulation leads to activation of *brlA* and premature initiation of development. *Molecular Microbiology*. 14: 323–334.
115. Lee, B. N.–Adams, T. H.: 1996. FluG and *flbA* function interdependently to initiate conidiophore development in *Aspergillus nidulans* through *brlA* beta activation. *The EMBO Journal*. 15: 299–309.
116. Lee, C. Z. - Liou, G. Y. – Yuan, G. F.: 2006. Comparison of *aflR* gene sequences of strains in *Aspergillus* section flavi. *Microbiology*. 152(1): 161-170.
117. Lee, S. C. – Ni, M. – Li, W. – Shertz, C. – Heitman, J.: 2010. The evolution of sex: a perspective from the fungal kingdom. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 74: 298-340.
118. Leslie, J. F.: 1993. Fungal vegetative incompatibility. *Annual Review of Phytopathology*. 31: 127-150.
119. Lewis, M. H. - Carbone, I. - Luis, J. M. - Payne, G. A. - Bowen, K. L. Hagan, A. K. - Kemerait, R. – Heiniger, R. – Ojiambo, P. S.: 2019. Biocontrol strains differentially shift the genetic structure of indigenous soil populations of *Aspergillus flavus*. *Frontiers in Microbiology*. 10: 1738.
120. Liu, B. H. - Chu, F. S.: 1998. Regulation of *aflR* and its product, AflR, associated with aflatoxin biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology*. 64: 3718-3723.
121. 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.
122. Luo, M. – Brown, R. L. – Chen, Z. Y. – Menkir, A. – Yu, J. – Bhatnagar, D.: 2011. Transcriptional profiles uncover *Aspergillus flavus*-induced resistance in maize kernels. *Toxins (Basel)*. 3: 766-786.

123. Ma, X. - Peng, J. - Wu, G. - Zhu, T. - Li, G. - Gu, Q. - Li, D.: 2015. Speradines B-H, oxygenated cyclopiazonic acid alkaloids from the sponge-derived fungus *Aspergillus flavus* MXH-X104. *Tetrahedron*. 71: 3522-3527.
124. Ma, Z. X. - Amaro, F. X. - Romero, J. J. - Pereira, O. G. - Jeong, K. C. - Adesogan, A. T.: 2017. The capacity of silage inoculant bacteria to bind aflatoxin B1 *in vitro* and in artificially contaminated corn silage. *Journal of Dairy Science*. 100, 9: 7198-7210.
125. Magnoli, C. E. - Astoreca, A. L. - Chiacchiera, S. M. - Dalcero, A. M.: 2007. Occurrence of ochratoxin A and ochratoxigenic mycoflora in corn and corn based foods and feeds in some South American countries. *Mycopathologia*. 163: 249-260.
126. Mahoney, N. - Molyneux, R. J.: 2004. Phytochemical inhibition of aflatoxigenicity in *Aspergillus flavus* by constituents of walnut (*Juglans regia*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52: 1882-1889.
127. Mantle, P. G.: 2002. Risk assessment and the importance of ochratoxins. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 50: 143-146.
128. Marin, S. – Ramos, A. J. - Cano-Sancho, G. – Sanchis, V.: 2013. Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology*. 60: 218-237.
129. Masoud, W. - Kaltoft, C. H.: 2006. The effects of yeasts in-volved in the fermentation of coffea arabica in East Africa on growth and ochratoxin A (OTA) production by *Aspergillus ochraceus*. *International Jorunal of Food Microbiology*. 106(2): 229-234.
130. 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.
131. Mayer, Z. - Färber, P. - Geisen, R.: 2003. Monitoring the production of aflatoxin B1 in wheat by measuring the concentration of nor-1 mRNA. *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 1154-1158.
132. McDonald, T. - Devi, T. - Shimizu, K. - Sim, S. C. - Keller, N. P.: 2004. Signaling events connecting mycotoxin biosynthesis and sporulation in *Aspergillus* and *Fusarium* spp. [In: Yoshizawa, T. (ed.) *New Horizon of Mycotoxicology for Assuring Food Safety*.] Takamatsu: Bookish Co. 139-147.
133. Medina, A. - Rodriguez, A. - Magan, N.: 2014. Effect of climate change on *Aspergillus flavus* and aflatoxin B1 production. *Frontiers in Microbiology*. 5: 348.
134. Mehl, H. L. - Cotty, P. J.: 2010. Variation in competitive ability among isolates of *Aspergillus flavus* from different vegetative compatibility groups during maize infection. *Phytopathology*. 100: 150-159.
135. Mesterházy, A. - Lemmens, M. - Reid, L. M.: 2012. Breeding for resistance to ear rots caused by *Fusarium* spp. in maize—A review. *Plant Breeding*. 131: 1-19.
136. Micheli, P.A.: 1729. *Iuxta Tournefortii methodum disposita*. *Nova Plantarum Genera*. 212.
137. Milgroom, M. G.: 1996. Recombination and the multilocus structure of fungal populations. *Annual Review of Phytopathology*. 34: 457-477.

138. Moake, M. M. - Padilla-Zakour, O.I. - Worobo, R. W.: 2005. Comprehensive review of patulin control methods in foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 1: 8-21.
139. Moore, G. G. - Singh, R. - Horn, B. W. - Carbone, I.: 2009. Recombination and lineage specific gene loss in the aflatoxin gene cluster of *Aspergillus flavus*. *Molecular Ecology*. 18: 4870-4887.
140. Munkvold, G. P.: 2003. Cultural and genetic approaches to managing mycotoxins in maize. *Annual Review of Phytopathology*. 41: 99-116.
141. Nesci, A. - Etcheverry, M. - Magan, N.: 2004. Osmotic and matric potential effects on growth, sugar alcohol and sugar accumulation by *Aspergillus* section *Flavi* strains from Argentina. *Journal of Applied Microbiology*. 96: 965-972.
142. Ni, M. - Yu, J.-H.: 2007. A novel regulator couples sporogenesis and trehalose biogenesis in *Aspergillus nidulans*. *PLOS One* 2(10): 970.
143. Niehaus, W. G. - Jiang, W. P.: 1989. Nitrate induces enzymes of the mannitol cycle and suppresses versicolorin synthesis in *Aspergillus parasiticus*. *Mycopathologia*. 107: 131-137.
144. O'Brian, G. R. - Georgianna, D. R. - Wilkinson, J. R. - Yu, J. - Abbas, H. K. - Bhatnagar, D. - Cleveland, T. E. - Nierman, W. - Payne, G. A. : 2007. The effect of elevated temperature on gene transcription and aflatoxin biosynthesis. *Mycologia*. 99: 232-239.
145. Ojeda-López, M. - Chen, W. - Eagle, C. E. - Gutiérrez, G. - Jia, W. L. - Swilaiman, S. S. - Huang, Z. - Park, H.-S. - Yu, J.-H. - Cánovas, D. - Dyer, P. S.: 2018. Evolution of asexual and sexual reproduction in the aspergilli. *Studies in Mycology*. 91: 37-59.
146. Olarte, R. A. - Horn, B. W. - Dorner, J. W. - Monacell, J. T. - Singh, R. - Stone, E. A. - Carbone, I.: 2012. Effect of sexual reproduction on population diversity in aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and evidence for cryptic heterokaryosis. *Molecular Ecology*. 21: 1453-1476.
147. Oliveira, C. A. F. - Germano, P. M. L.: 1997. Aflatoxins: current concepts on mechanisms of toxicity and their involvement in the etiology of hepatocellular carcinoma. "Revista de Saude Publica" *Journal of Public Health*. 31(4): 417-424.
148. Paoletti, M. - Seymour, F. A. - Alcocer, M. J. C. - Kaur, N. - Calvo, A. M. - Archer, D. B. - Dyer, P. S.: 2007. Mating type and the genetic basis of self-fertility in the model fungus *Aspergillus nidulans*. *Current Biology*. 17: 1384-1389.
149. Papp, E. - H-Otta, K. - Záray, Gy. - Mincsovics, E.: 2002. Liquid chromatographic determination of aflatoxins. *Microchemical Journal*. 73, 1-2: 39-46.
150. Payne, G. A. - Hagler, Jr. W. M.: 1983. Effect of specific amino acids on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus* in defined media. *Applied and Environmental Microbiology*. 46: 805-812.
151. Payne, G. A. - Nystrom, G. J. - Bhatnagar, D. - Cleveland, T. E. - Woloshuk, C. P.: 1993. Cloning of the afl2 gene involved in aflatoxin biosynthesis from *Aspergillus flavus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 59: 156-162.
152. Payne, G. A. - Nierman, W. C. - Wortman, J. R. - Pritchard, B. L. - Brown, D. - Dean, R. A. - Bhatnagar, D. - Cleveland, T. E. - Mashida, M. - Yu, J. J.: 2006.

- Whole genome comparison of *Aspergillus flavus* and *A. oryzae*. Medical Mycology. 44: 9-11.
153. Pál, K. - van Diepeningen, A. D. - Varga, J. - Hoekstra, R. F. - Dyer, P. S. - Debets, A. J. M.: 2007. Sexual and vegetative compatibility genes in the aspergilli. Studies in Mycology. 59: 19–30.
 154. Pel, H. J. - de Winde, J. H. - Archer, D. B. - Dyer, P. S. - Hofmann, G. - Schaap, P. J. - Turner, G. - de Vries, R. P. - Albang, R. - Albermann, K. - Andersen, M. R. - Bendtsen, J. D. - Benen, J. A. - van den Berg, M. - Breestraat, S. - Caddick, M. X. - Contreras, R. - Cornell, M. - Coutinho, P. M. - Danchin, E. G. - Debets, A. J. - Dekker, P. - van Dijck, P. W. - van Dijk, A. - Dijkhuizen, L. - Driessen, A. J. - d'Enfert, C. - Geysens, S. - Goosen, C. - Groot, G. S. - de Groot, P. W. - Guillemette, T. - Henrissat, B. - Herweijer, M. - van den Hombergh, J. P. - van den Hondel, C. A. - van der Heijden, R. T. - van der Kaaij, R. M. - Klis, F. M. - Kools, H. J. - Kubicek, C. P. - van Kuyk, P. A. - Lauber, J. - Lu, X. - van der Maarel, M. J. - Meulenbergh, R. - Menke, H. - Mortimer, M. A. - Nielsen, J. Oliver, S. G. - Olsthoorn, M. - Pal, K. - van Peij, N. N. - Ram, A. F. - Rinas, U. - Roubos, J. A. - Sagt, C. M. - Schmoll, M. - Sun, J. - Ussery, D. - Varga, J. - Vervecken, W. - van de Vondervoort, P. J. - Wedler, H. - Wösten, H. A. - Zeng, A. P. - van Ooyen, A. J. - Visser, J. - Stam, H.: 2007. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. Nature Biotechnology. 25: 221-231.
 155. Pestka, J. J.: 2007. Deoxynivalenol: Toxicity, mechanisms and animal health risks. Animal Feed Science and Technology. 137: 283-298.
 156. Pierce, K. L. - Premont, R. T. - Lefkowitz, R. J.: 2002. Seven transmembrane receptors. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 3: 639–650.
 157. Pierpoint, W. S.: 2000. Why should plants make medicine – don't they do enough for mankind already? Biochemistry. (London) 22: 37-40.
 158. Pirestani, A. - Tabatabaei, S. N. - Fazeli, M. H. - Antikchi, M. - Baabaei, M.: 2011. Comparison of HPLC and ELISA for determination of aflatoxin concentration in the milk and feeds of dairy cattle. Journal of Research in Agricultural Science 7: 71-78.
 159. Pitt, J. I.: 2000. Toxigenic fungi: Which are important? Medical Mycology. 38: 17–22.
 160. Poggeler, S.: 2002. Genomic evidence for mating abilities in the asexual pathogen *Aspergillus fumigatus*. Current Genetics. 42: 153-160.
 161. Pontecorvo, G.: 1956. The parasexual cycle in fungi. Annual Reviews of Microbiology. 10: 393-400.
 162. Prandini, G. - Tansini, S. - Sigolo, L. - Filippi, M. - Laporta, G.: 2009. On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. Food and Chemical Toxicology. 47: 984-991.
 163. Price, M. S. - Connors, S. B. - Tachdjian, S. - Kelly, R. M. - Payne, G. A.: 2005. Aflatoxin conducive and non-conducive growth conditions reveal new gene associations with aflatoxin production. Fungal Genetics and Biology. 42: 506-518.
 164. Price, M. S. - Yu, J. - Nierman, W. C. - Kim, H. S. - Pritchard, B. - Jacobus, C. A. - Bhatnagar, D. - Cleveland, T. E. - Payne, G. A.: 2006. The aflatoxin pathway

- regulator AfIR induces gene transcription inside and outside of the aflatoxin biosynthetic cluster. *FEMS Microbiology Letters*. 255: 275-279.
165. 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.
 166. Prost, I. - Dhondt, S. - Rothe, G. - Vicente, J. - Rodriguez, M. J. - Kift, N. - Carbonne, F. - Griffiths, G. - Esquerré-Tugayé, M.-T. - Rosahl, S. - Castresana, C. - Hamberg, M. - Fournier, J.: 2005. Evaluation of the antimicrobial activities of plant oxylipins supports their involvement in defense against pathogens. *PLANT Physiology*. 139: 1902–1913.
 167. Puel, O. - Galtier, P. - Oswald, I. P.: 2010. Biosynthesis and toxicological effects of patulin. *Toxins*. 2: 613–631.
 168. Purschwitz, J. - Müller, S. - Kastner, C. - Schöser, M. - Haas, H. - Espeso, E. A. - Atoui, A. - Calvo, A. M. - Fisher, R.: 2008. Functional and physical interaction of blue- and red-light sensors in *Aspergillus nidulans*. *Current Biology*. 18: 255–259.
 169. Pusztahelyi, T. - Pócsi, I.: 2013. Functions, cooperation and interplays of the vegetative growth signaling pathway in the aspergilli. *Journal of Mycology*. Paper 83252: 11.
 170. 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.
 171. Rank, C. - Nielsen, K. F. - Larsen, T. O. - Varga, J. - Samson, R. A. - Frisvad, J. C.: 2011. Distribution of sterigmatocystin in filamentous fungi. *Fungal Biology*. 115: 406-420.
 172. Rashid, M. - Khalil, S. - Ayub, N. - Ahmed, W. - Khan, G.: 2008. Categorization of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* isolates of stored wheat grains in to aflatoxinogenics and non-aflatoxinogenics. *Pakistan Journal of Botany*. 40: 2177–2192.
 173. Ren, S. - Yang, M. - Li, Y. - Zhang, F. - Chen, Z. - Zhang, J. - Yang, G. - Yue, Y. - Li, S. - Ge, F. - Wang, S.: 2016. Global phosphoproteomic analysis reveals the involvement of phosphorylation in aflatoxins biosynthesis in the pathogenic fungus *Aspergillus flavus*. *Scientific Reports*. 6: 34078.
 174. Reverberi, M. - Zjalic, S. - Ricelli, A. - Fabbri, A. A. - Fanelli, C.: 2006. Oxidant/antioxidant balance in *Aspergillus parasiticus* affects aflatoxin biosynthesis. *Mycotoxin Research*. 22: 39-47.
 175. Reverberi, M. - Zjalic, S. - Ricelli, A. - Punelli, F. - Camera, E. - Fabbri, C. - Picardo, M. - Fanelli, C. - Fabbri, A. A.: 2008. Modulation of antioxidant defence in *Aspergillus parasiticus* is involved in aflatoxin biosynthesis: a role for ApyapA gene. *Eukaryotic Cell*. 7(6): 988-1000.
 176. Rheeder, J. P. - Marasas, W. F. - Vismer, H. F.: 2002. Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 2101-2105.
 177. Richard, J. L.: 2007. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses—An overview. *International Journal of Food Microbiology*. 119: 3-10.

178. Roze, L. V. - Arthur, A. E. - Hong, S. Y. - Chanda, A. - Linz, J. E.: 2007. The initiation and pattern of spread of histone H4 acetylation parallel the order of transcriptional activation of genes in the aflatoxin cluster. *Molecular Microbiology*. 66: 713–726.
179. Samson, R. A. - Noonim, P. - Meijer, M. - Houbroken, J. - Frisvad, J. C. - Varga, J.: 2007. Diagnostic tools to identify black *Aspergilli*. *Studies in Mycology*. 59: 129-145.
180. Samson, R. A. - Houbroken, J. - Thrane, U. - Frisvad, J. C. - Andersen, B.: 2010. *Food and Indoor Fungi*. CBS KNAW Fungal Biodiversity Center, Utrecht.
181. Samson, R. A. – Visagie, C. M. – Houbroken, J.: 2014. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology*. 78: 141-173.
182. Saupe, S. J.: 2000. Molecular genetics of heterokaryon incompatibility in filamentous ascomycetes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64: 489-502.
183. Savchenko, T. - Walley, J. W. - Chehab, E. W. - Xiao, Y. - Kaspi, R. - Pye, M. F.: 2010. Arachidonic acid: an evolutionarily conserved signaling molecule modulates plant stress signaling networks. *The Plant Cell*. 22: 3193–3205.
184. Schaafsma, A. W. - Tamburic-Ilinic, L. – Miller, J. D. – Hooker, D. C.: 2001. Agronomic considerations for reducing deoxynivalenol in wheat grain. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 23: 279–85.
185. Schmidt-Heydt, M. - Magan, N. - Geisen, R.: 2008. Stress induction of mycotoxin biosynthesis genes by abiotic factors. *FEMS Microbiology Letters*. 284: 142–149.
186. Scudamore, K. A.: 2005. Prevention of ochratoxin A in commodities and likely effects of processing fractionation and animal feeds. *Food Additives & Contaminants*. 22: 17–25.
187. Seyfferth, C. - Tsuda, K.: 2014. Salicylic acid signal transduction: the initiation of biosynthesis, perception and transcriptional reprogramming. *Frontiers in Plant Science*. 5: 697.
188. Shantha, T. - Murthy, V. S.: 1981. Influence of tricarboxylic acid cycle intermediates and related metabolites on the biosynthesis of aflatoxin by resting cells of *Aspergillus flavus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 42: 758-761.
189. Shih, C. N. - Marth, E. H.: 1972. Production of aflatoxin in a medium fortified with sodium chloride. *Journal of Dairy Science*. 55: 1415-1419.
190. Shimizu, K. - Keller, N. P.: 2001. Genetic involvement of a cAMP-dependent protein kinase in a G protein signaling pathway regulating morphological and chemical transitions in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 157: 591–600.
191. Shimizu, K. - Hicks, J. K. - Huang, T. P. - Keller, N. P.: 2003. Pka, Ras and RGS protein interactions regulate activity of AflR, a Zn(II)2Cys6 transcription factor in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*. 165: 1095–1104.
192. Sobrova P. - Adam V. - Vasatkova A. - Beklova M. - Zeman L. - Kizek R.: 2010. Deoxynivalenol and its toxicity. *Interdisciplinary Toxicology*. 3:94–99.
193. Sohn, K. T. – Yoon, K. S.: 2002. Ultrastructural study on the cleistothecium development in *Aspergillus nidulans*. *Mycobiology*. 30:117–127.

194. Stoev, S. D.: 2013. Food safety and increasing hazard of mycotoxin occurrence in foods and feeds. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 53: 887–901.
195. Stoev, S. D. - Paskalev, M. - MacDonald, S. - Mantle, P. G.: 2002. Experimental one year ochratoxin A toxicosis in pigs. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 53: 481–487.
196. Suwarno, W. B. - Hannok, P. - Palacios-Rojas, N. - Windham, G. - Crossa, J. - Pixley, K. V.: 2019. Provitamin A carotenoids in grain reduce aflatoxin contamination of maize while combating vitamin a deficiency. *Frontiers in Plant Science*. 10: 30.
197. Sweeney, M. J. - Dobson, D.W.: 1998. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *International Journal of Food Microbiology*. 43: 141–158.
198. 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.
199. Tilburn, J. - Sarkar, S. - Widdick, D. A. - Espeso, E. A. - Orejas, M. – Mungroo, J. - Peñalva, M. A. - Arst, H. N.: 1995. The *Aspergillus* PacC zinc-finger transcription factor mediates regulation of both acid-expressed and alkaline-expressed genes by ambient pH. *The EMBO Journal*. 14: 779-790.
200. Traistaru, E. - Moldovan, R. C.: 2012. Comparative study regarding the application of HPLC and ELISA methods for aflatoxins detection in peanuts. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*. 18 (1): 81-85.
201. Tsang, C. C. - Tang, J. Y. M. - Lau, S. K. P. - Woo, P. C. Y.: 2018. Taxonomy and evolution of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* in the omics era – Past, present and future. *Computational and Structural Biotechnology Journal* 16: 197–210.
202. Tsitsigiannis, D. I. - Kunze, S. - Willis, D. K. - Feussner, I. - Keller, N. P.: 2005. *Aspergillus* infection inhibits the expression of peanut 13 S -HPODE-forming seed lipoxygenases. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 18: 1081-1089.
203. Tsitsigiannis, D. I. - Keller, N. P.: 2006. Oxylipins act as determinants of natural product biosynthesis and seed colonization in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology*. 59: 882-892.
204. Tsitsigiannis, D. I. - Keller, N. P.: 2007. Oxylipins as developmental and host–fungal communication signals. *Trends in Microbiology*. 15: 109-118.
205. Tsuda, M. - Mugishima, T. - Komatsu, K. - Sone, T. - Tanaka, M. - Mikami, Y. - Shiro, M. - Hirai, M. - Ohizumie, Y. - Kobayashi, J.: 2003. Speradine A, a new pentacyclic oxindole alkaloid from a marine-derived fungus *Aspergillus tamarii*. *Tetrahedron*. 59: 3227-3230.
206. Turgeon, B. G. - Yoder, O. C.: 2000. Proposed nomenclature for mating type genes of filamentous ascomycetes. *Fungal Genetics and Biology*. 31: 1-5.
207. 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.
208. Valiante, V. - Heinekamp, T. - Jain, R. - Härtl, A. - Brakhage, A. A.: 2008: The mitogen-activated protein kinase MpkA of *Aspergillus fumigatus* regulates cell wall signaling and oxidative stress response. *Fungal Genetics and Biology*. 45: 618-627.
 209. Varga, J. - Frisvad, J. C. - Samson, R. A.: 2009. A reappraisal of fungi producing aflatoxins. *World Mycotoxin Journal*. 2: 263-277.
 210. Varga, J. - Frisvad, J. C. - Samson, R. A.: 2010. *Aspergillus* sect. *Aenei* sect. nov., a new section of the genus for *A. karnatakaensis* sp. nov. and some allied fungi. *IMA Fungus*. 1: 197-205.
 211. 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.
 212. Varga, J. – Baranyi, N. – Chandrasekaran, M. – Vágvölgyi, Cs. – Kocsubé, S.: 2015. Mycotoxin producers in the *Aspergillus* genus: an update, *Acta Biologica Szegediensis*. 59 (2):151-167.
 213. Veres, E. – Borbély, M. – Győri, Z. – Kátai, J.: 2002. A tárolási feltételek hatása a kukorica *Fusarium* fertőzöttségére és toxin szennyezettségére. *Agrártudományi Közlemények*. 1: 28-32.
 214. Wacoo, A. P. - Wendi, D. - Vuzi, P. C. - Hawumba, J. F.: 2014. Methods for detection of aflatoxins in agricultural food crops - Review article. *Journal of Applied Chemistry*. 12: 1-15.
 215. Wang, N. – Hu, J. C. – Liu, W. – Wang, S. J.: 2013. Cyclopiazonic acid compound, and preparation and application thereof. A. CN Patent. 103, 183, 666.
 216. Wang, H. - Lei, Y. - Wan, L. - Yan, L. - Lv, J. - Dai, X. - Ren, X. - Gou, W. - Jiang, H. - Liao, B.: 2016a. Comparative transcript profiling of resistant and susceptible peanut post-harvest seeds in response to aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. *BMC Plant Biology*. 16: 54.
 217. Wang, H. - Lei, Y. - Yan, L. - Wan, L. - Ren, X. - Chen, S. - Dai, X. - Guo, W. - Jiang, H. - Liao, B.: 2016b. Functional genomic analysis of *Aspergillus flavus* interacting with resistant and susceptible peanut. *Toxins*. 8: 46.
 218. Wang, S. - Park, Y.-S. - Yang, Y. - Borrego, E. J. - Isakeit, T. - Gao, X. – Kolomiets, M. V.: 2017. Seed-derived ethylene facilitates colonization but not aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in maize. *Frontiers in Plant Science*. 8: 415.
 219. Wannop, C. C.: 1961. The histopathology of turkey "X" disease in Great Britain. *Avian Diseases*. 5: 371-381.
 220. Watarai, N. - Yamamoto, N. - Sawada, K. - Yamada, T.: 2019. Evolution of *Aspergillus oryzae* before and after domestication inferred by large-scale comparative genomic analysis. *DNA Research*. 26: 465-472.
 221. Wheeler, K. A. - Hocking, A. D.: 1993. Interactions among xerophilic fungi associated with dried salted fish. *Journal of Applied Bacteriology*. 74: 164-169.
 222. 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.
223. Williams, J. H. – Phillips, T. D. – Jolly, P. E. – Stiles, J. K. – Jolly, C. M. - Aggarwal, D.: 2004. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences and interventions. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 80: 1106-1122.
 224. Wiseman, D. W. - Buchanan, R. L.: 1987. Determination of glucose level needed to induce aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus*. *Canadian Journal of Microbiology*. 33: 828-830.
 225. Woloshuk, C. P. - Foutz, K. R. - Brewer, J. F. - Bhatnagar, D. - Cleveland, T. E.: 1994. Molecular characterization of *aflR*, a regulatory locus for aflatoxin biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology*. 60: 2408–2414.
 226. Wong, K. H. - Hynes, M. J. - Davis, M. A.: 2008. Recent advances in nitrogen regulation: a comparison between *Saccharomyces cerevisiae* and filamentous fungi. *Eukaryotic Cell*. 7: 917-925.
 227. Wu, F.: 2007. Measuring the economic impacts of *Fusarium* toxins in animal feeds. *Animal Feed Science and Technology*. 137: 363–374.
 228. Xu, X. – Zhang, X. – Nong, X. – Wei, X. – Qi, S.: 2015. Oxindole alkaloids from the fungus *Penicillium commune* DFFSCS026 isolated from deep-sea-derived sediments. *Tetrahedron*. 71: 610–615.
 229. Yan, S. - Liang, Y. - Zhang, J. - Liu, C.-M.: 2012. *Aspergillus flavus* grown in peptone as the carbon source exhibits spore density- and peptone concentration-dependent aflatoxin biosynthesis. *BMC Microbiology*. 12: 106.
 230. Yang, J. - Li, J. - Jiang, Y. - Duan, X. - Qu, H. - Yang, B. - Chen, F. - Sivakumar, D.: 2014. Natural occurrence, analysis, and prevention of mycotoxins in fruits and their processed products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 54: 64–83.
 231. Yazar, S. - Omurtag, G. Z.: 2008. Fumonisin, trichothecenes and zearalenone in cereals. *International Journal of Molecular Sciences*. 9: 2062–2090.
 232. Yu, J. H. - Butchko, R. A. E. - Fernandes, M. - Keller, N. P. - Leonard, T. J. - Adams, T. H.: 1996. Conservation of structure and function of the aflatoxin regulatory gene *aflR* from *Aspergillus nidulans* and *A. flavus*. *Current Genetics*. 29: 549–555.
 233. Yu, J. - Bhatnagar, D. - Cleveland, T. D.: 2004a. Completed sequence of aflatoxin pathway gene cluster in *Aspergillus parasiticus*. *FEBS Letters*. 564: 126-130.
 234. Yu, J. - Chang, P. K. - Ehrlich, K. C. - Cary, J. W. - Bhatnagar, D. - Cleveland, T. E. - Payne, G. A. - Linz, J. E. - Woloshuk, C. P. - Bennett, J. W.: 2004b. Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology*. 70: 1253–1262.
 235. Yu, J. H. - Keller, N.: 2005. Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi. *Annual Review of Phytopathology*. 43: 437–458.
 236. Yu, J.: 2012. Current understanding on aflatoxin biosynthesis and future perspective in reducing aflatoxin contamination. *Toxins*, 4 (11): 1024-1057.
 237. Žanic- Grubišić, T. - Zrinski, R. - Čepelak, I. - Petrik, J. - Radić, B. - Pepelnjak, S.: 2000. Studies of ochratoxin A-induced inhibition of phenylalanine

hydroxylase and its reversed by phenylalanine. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 167: 132–139.

238. Zhang, Y. Q. - Keller, N. P. - Tsitsigiannis, D. - Wilkinson, J. R.: 2004. Secondary metabolite gene clusters. [In: An, Z. (Ed.), *Handbook of Industrial Mycology*] Marcel Dekker, New York, 355-387.

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/186907#section=2D-Structure>

11. 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: EYAISR
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., Szájlí, 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.

Idegén 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 impakt faktora: 9,549

A közlő folyóiratok összesített impakt 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.



12. Mellékletek

A. Melléklet Összefoglalás a kísérletekben szereplő törzsekről: „+” kísérletben, szerepel, „-”

kísérletben nem szerepel

<i>Aspergillus</i> <i>sp.</i> izolátumok száma	PCR <i>aflR</i> , <i>norA</i> , <i>omtA</i>	PCR ITS	PCR kalmodulin	stresszvizsgálat	HPLC-MS vizsgálat	kukoricahibridek rezisztenciájának vizsgálata	kompetíciós vizsgálat
1	+	+	-	+	-	-	-
2	+	-	-	-	-	-	-
3	+	-	-	-	-	-	-
4	+	-	-	-	-	-	-
5	+	-	-	-	-	-	-
6	+	+	-	+	-	-	-
7	+	+	-	+	+	-	-
8	+	-	-	-	-	-	-
9	+	+	+	+	+	+	+
10	+	-	-	-	-	-	-
11	+	-	-	+	-	-	-
12	+	+	-	+	-	-	-
13	+	-	-	-	-	-	-
14	+	+	-	+	-	-	-
15	+	+	-	+	-	-	-
16	+	-	-	-	-	-	-
17	+	-	-	-	-	-	-
18	+	-	-	+	-	-	-
19	+	-	-	-	-	-	-
20	+	-	-	-	-	-	-
21	+	+	-	+	-	-	-
22	+	-	-	-	-	-	-
23	+	-	-	+	-	-	-
24	+	-	-	-	-	-	-
25	+	-	-	-	-	-	-
26	+	-	-	-	-	-	-
27	+	+	-	+	+	-	-
28	+	+	-	+	+	-	-
29	+	+	-	+	-	-	-
30	+	+	-	+	+	-	-
31	+	-	-	-	-	-	-
32	+	-	-	-	-	-	-
33	+	+	-	+	+	-	-
34	+	+	-	+	+	-	-
35	+	-	-	-	-	-	-
36	+	-	-	+	-	-	-

<i>Aspergillus</i> <i>sp.</i> izolátumok száma	PCR <i>aflR</i> , <i>norA</i> , <i>omtA</i>	PCR ITS	PCR kalmodulin	stresszviz sgálat	HPLC-MS vizsgálat	kukoricahibridek rezisztenciájának vizsgálata	kompetíciós képesség vizsgálata
37	+	+	+	+	+	+	+
38	+	+	-	+	-	-	-
39	+	-	-	-	-	-	-
40	+	-	-	-	-	-	-
41	+	-	-	-	-	-	-
42	+	-	-	-	-	-	-
43	+	-	-	-	-	-	-
44	+	+	-	+	+	-	-
45	+	-	-	-	-	-	-
46	+	-	-	-	-	-	-
47	+	+	-	+	-	-	-
48	+	-	-	-	-	-	-
49	+	-	-	-	-	-	-
50	+	-	-	-	-	-	-
51	+	+	-	+	-	-	-
52	+	-	-	-	-	-	-
53	+	+	-	+	+	-	-
54	+	-	-	-	-	-	-
55	+	-	-	-	-	-	-
56	+	+	-	+	-	-	-
57	+	-	-	-	-	-	-
58	+	-	-	-	-	-	-
59	+	+	-	+	-	-	-
60	+	+	-	+	-	-	-
61	+	+	-	+	+	-	-
62	+	+	-	+	-	-	-
63	+	-	-	-	-	-	-
64	+	-	-	-	-	-	-
65	+	-	-	+	-	-	-
66	+	-	-	-	-	-	-
67	+	-	-	-	-	-	-
68	+	-	-	-	-	-	-
69	+	-	-	-	-	-	-
70	+	+	-	-	+	-	-
71	+	+	-	-	-	-	-
72	+	+	-	-	+	-	-

B. Melléklet HPLC-MS vizsgálata az *Aspergillus flavus* szekunder metabolitoknak (Uka et al., 2017)

Vegyület neve	Összegképlet	Tömeg (g)
α-CPA	C ₂₀ H ₂₀ N ₂ O ₃	336,1474
Iso- α -CPA	C ₂₀ H ₂₀ N ₂ O ₃	336,1474
β-CPA	C ₂₀ H ₂₂ N ₂ O ₃	338,1630
cAATrp	C ₁₅ H ₁₄ N ₂ O ₃	270,1004
α -CPA imine	C ₂₀ H ₂₁ N ₃ O ₂	335,1634
Pseuboydone E	C ₁₉ H ₂₀ N ₂ O ₃	324,1474
2-oxoCPA	C ₂₀ H ₂₀ N ₂ O ₄	352,1423
Speradine A	C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O ₄	366,1580
3-OH-speradine A	C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O ₅	382,1529
Speradine B	C ₁₆ H ₁₈ N ₂ O ₃	286,1317
Speradine C	C ₂₀ H ₂₂ N ₂ O ₅	370,1529
Speradine D	C ₂₀ H ₂₂ N ₂ O ₆	386,1478
Speradine E	C ₂₀ H ₁₈ N ₂ O ₅	366,1216
Speradine F	C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O ₇	414,1427
Speradine H	C ₂₀ H ₁₈ N ₂ O ₄	350,1267
Speradine I	C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O ₇	414,1427
Aspergilline A	C ₁₉ H ₂₀ N ₂ O ₆	372,1321
Aspergilline B	C ₂₃ H ₂₆ N ₂ O ₈	458,1689
Aspergilline C	C ₂₄ H ₂₈ N ₂ O ₆	440,1947
Aspergilline D	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₇	416,1584
Aspergilline E	C ₂₅ H ₃₀ N ₂ O ₉	502,1951
Cyclopiamide A	C ₁₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	266,1055
Cyclopiamide B	C ₂₀ H ₂₀ N ₂ O ₄	352,1423
Cyclopiamide C	C ₁₉ H ₁₈ N ₂ O ₄	338,1267
Cyclopiamide D	C ₁₉ H ₁₆ N ₂ O ₄	336,1110
Cyclopiamide E	C ₂₀ H ₁₇ N ₃ O ₂	331,1321
Cyclopiamide F	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O ₂	252,0899
Cyclopiamide G	C ₁₅ H ₁₆ N ₂ O ₃	272,1161
Cyclopiamide H	C ₁₆ H ₁₈ N ₂ O ₃	286,1317
Cyclopiamide J	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₇	428,1584

C. Melléklet Kalmodulin gén szekvenciák a cmd6 irányból szekvenálva

Aspergillus flavus kalmmodulin gén

-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN--GNNNNGAGCCGTTGNNNNNNNTNNNNANNT
 GNCNTGAAAGCCTCCCGGATCTCCTCCTCAG--AGTC---GGTATCCTTCATCTTTCTC-
 --GCCATCATCGTAAGGAACTCTATTTGAACATTAACAGCTATTTTCATTTTATGAATCGTA
 CGG-----AAGCCGTCTCGTACCAGGGAAGTCAATG---GTGCCATTGTTGTGCGGCGT
 CAACCTCG-TTAATCATGTCTCTGGAGTTC----CGACTCAGAGGGGTTTTGGCCCAGAGA
 -GCGCATGACAGTGCC-CAGCTCCTTGGTGGTGATCTGGCCTGCATATCAAGTCAATTCA
 TGAATGCCAAGACTTCAGCCGATCGAACAGAAACTGGATAAAATTATGGCGGCTAAAACA
 TATTGGTCGCATTTGAAGGGAGAATGAATAAAATAAACTGTACTAACCATCACCGTCCTT
 GTCCTATAGGAAACCCAAGAAAAGCCAAGTCAGCTTGTGTTCAAATCATGACGACTAACA
 AAACCAATTTTCAG--AACGACGATAACTACTTACGAATAGGGAGAAGGCCTCCTGACT
 NGAANANANNANNANGTGAACACNGNCCAAGGGTCCACGGGAGGCTCGGGGTTGTTTCTGT
 TCATGACNCTCNNCGNCAAA-----

9. izolátum kalmodulin gén

-----NNNNNTNCNNNNNNNGNCNNNCNCNNG-----TGATGTGG--TTCCTGGTCAAC
CGC-TGANTGTCCTCCA-----CCTCCTCCGTTAGCC--GGTATCCTTCATCTTTCTC-
--GCCATCATCGTCAGGAACTCTATTTGAACATTAACAGCTATTTTCATTTTATGAATCGTA
CGG-----AAGCCGTCTCTGTACCAGGGAAGTCAATG---GTGCCATTGTTGTCTGGCGT
CAACCTCG-TTAATCATGTCTCTGGAGTTC----CGACTCAGAGGGGTTTTGGCCCAGAGA
-GCGCATGACAGTGCC-CAACTCCTTGGTGGTGATCTGGCCTGCATATCAAGTCAATTCA
TCAATGCCAAGACTTCAGCCGATCGAACAGAAACTGGATAAAATTATGGCGGCTAAAACA
TATTGGTCGCATTTGAAGGGAGAATGAATAAAATAAACTGTACTAACCATCACCGTCCTT
GTCCTATAGGAAACCCAAGAAAAGCCAAGTCAGCTTGTGTTCAAATCATGACGACTAACA
AAACCAATTTTCACG--AACGACGATAACTACTTACGAATAGGGAGAAGGCCTC-----
-----CTTGN-----
-----NCNNAAAAAANA---

37. izolátum kalmodulin gén

[illegible]

D. Melléklet *Aspergillus flavus* izolátumok és a referencia törzs stresszvizsgálata kukorica
agaron. „n” növekedés, „k” konídiospóra képződés, „sz” szklerócium képződés; „+” jelenlét, „-”
hiány, a színek jelölése a kontrollhoz viszonyított eltérést jelzi

<i>Aspergillus</i> <i>sp.</i> törzsek	0,05g/l SDS kukorica agaron	0,1g/l SDS kukorica agaron	0,5g/l SDS kukorica agaron	0,75g/l SDS kukorica agaron	1M NaCl kukorica agaron	1,5M NaCl kukorica agaron	2M NaCl kukorica agaron	2,5M NaCl kukorica agaron
<i>Aspergillus</i> <i>flavus</i> NCAIM F00952, NRRL 11611	n: +, sárga k: + sz: +	n: +, sárga k: + sz: +	n: +, sárga k: - sz: +	-	n: +, sárga k: + sz: +	n: +, sárga k: + sz: +	n: +, sárga k: - sz: +	n: +, sárga k: - sz: +
1	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: - sz: -	-	n: +, sárga k: + sz: -	n: +, sárga k: + sz: -	n: + k: - sz: -	n: + k: - sz: -
6	n: +, zöld k: + sz: -	n: +, zöld k: - sz: -	n: +, zöld k: - sz: -	n: +, zöld k: - sz: -	n: +, sárga k: + sz: -	n: +, sárga k: - sz: -	n: +, sárga k: - sz: -	n: + k: - sz: -
7	n: + k: + sz: +	n: + k: + sz: +	n: + k: - sz: -	n: + k: - sz: -	n: +, sárga k: + sz: -	n: +, sárga k: + sz: -	n: +, sárga k: + sz: -	n: + k: - sz: -
9	n: + k: + sz: +	n: + k: + sz: +	n: + k: + sz: +	-	n: + k: - sz: -	n: + k: - sz: -	n: + k: - sz: -	n: + k: - sz: -
11	n: + k: + sz: +	n: + k: + sz: +	n: + k: - sz: -	-	n: + k: + sz: +	n: + k: + sz: +	n: + k: - sz: -	n: + k: - sz: -
12	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: - sz: -	-	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: - sz: -	n: + k: - sz: -
14	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	-	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -
15	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	-	n: + k: + sz: -	n: + k: - sz: -	n: + k: - sz: -	-
18	n: + k: - sz: -	n: + k: - sz: -	n: + k: - sz: -	n: + k: - sz: -	n: + k: - sz: -	n: + k: - sz: -	n: + k: - sz: -	n: + k: - sz: -
21	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	-	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -

<i>Aspergillus</i> <i>sp. törzsek</i>	0,05g/l SDS kukorica agaron	0,1g/l SDS kukorica agaron	0,5g/l SDS kukorica agaron	0,75g/l SDS kukorica agaron	1M NaCl kukorica agaron	1,5M NaCl kukorica agaron	2M NaCl kukorica agaron	2,5M NaCl kukorica agaron
23	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: - sz: -	-	n: + k: - sz: -	n: + k: - sz: -	n: + k: - sz: -	n: + k: - sz: -
27	n: +, zöld k: + sz: -	n: +, zöld k: + sz: -	n: + k: - sz: -	n: + k: - sz: -	n: +, sárga k: + sz: -	n: +, sárga k: + sz: -	n: +, sárga k: - sz: -	n: + k: - sz: -
28	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: - sz: -	-	n: +, sárga k: + sz: -	n: +, sárga k: + sz: -	n: + k: - sz: -	n: + k: - sz: -
29	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: - sz: -	n: + k: - sz: -	n: +, sárga k: + sz: -	n: +, sárga k: + sz: -	n: + k: - sz: -	n: + k: - sz: -
30	n: + k: + sz: +	n: + k: + sz: +	n: + k: - sz: -	-	n: +, sárga k: + sz: -	n: +, sárga k: + sz: -	n: +, sárga k: + sz: -	n: + k: - sz: -
33	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: - sz: -	-	n: +, sárga k: + sz: -	n: +, sárga k: + sz: -	n: + k: - sz: -	n: + k: - sz: -
34	n: +, zöld k: + sz: -	n: +, zöld k: + sz: -	n: +, sárga k: - sz: -	-	n: +, sárga k: + sz: -	n: +, sárga k: + sz: -	n: + k: - sz: -	n: + k: - sz: -
36	n: + k: - sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: - sz: -	-	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: - sz: -	n: + k: - sz: -
37	n: + k: + sz: +	n: + k: + sz: +	n: + k: - sz: +	n: + k: - sz: +	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: - sz: -	n: + k: - sz: -
38	n: +, zöld k: + sz: -	n: +, zöld k: + sz: -	n: +, zöld k: + sz: -	-	n: +, sárga k: + sz: -	n: +, sárga k: + sz: -	n: +, sárga k: - sz: -	n: +, sárga k: - sz: -
44	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	-	-	n: +, sárga k: + sz: -	n: +, sárga k: + sz: -	-	-
47	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: - sz: -	n: + k: - sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: - sz: -	n: + k: - sz: -	n: + k: - sz: -
51	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: - sz: -	-	n: +, sárga k: + sz: -	n: +, sárga k: + sz: -	n: + k: - sz: -	n: + k: - sz: -

<i>Aspergillus</i> <i>sp. törzsek</i>	1M NaCl kukorica agaron	1,5M NaCl kukorica agaron	2M NaCl kukorica agaron	2,5M NaCl kukorica agaron	0,05g/l SDS kukorica agaron	0,1g/l SDS kukorica agaron	0,5g/l SDS kukorica agaron	0,75g/l SDS kukorica agaron
53	n: + k: + sz: -	n: + k: - sz: -	n: + k: - sz: -	n: + k: - sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: - sz: -	n: + k: - sz: -
56	n: +, sárga k: + sz: -	n: +, sárga k: + sz: -	n: +, sárga k: + sz: -	n: +, sárga k: - sz: -	n: +, zöld k: + sz: -	n: +, zöld k: + sz: -	n: + k: - sz: -	n: +, sárga k: + sz: -
59	n: + k: - sz: -	n: + k: - sz: -	n: + k: - sz: -	n: + k: - sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: - sz: -	-
60	n: +, sárga k: + sz: -	n: +, sárga k: + sz: -	n: +, sárga k: + sz: -	n: + k: - sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: - sz: -	-
61	n: +, sárga k: + sz: -	n: +, sárga k: + sz: -	n: +, sárga k: + sz: -	n: + k: - sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: - sz: -	-
62	n: +, sárga k: + sz: -	n: +, sárga k: + sz: -	n: +, sárga k: + sz: -	n: + k: - sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: - sz: -	-
65	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: - sz: -	-	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: - sz: -	-

E. Melléklet *Aspergillus flavus* izolátumok és a referencia törzs stresszvizsgálata maláta agaron.

„n” növekedés, „k” konídiospóra képződés, „sz” szklerócium képződés; „+” jelenlét, „-” hiány,
a színek jelölése a kontrollhoz viszonyított eltérést jelzi

<i>Aspergillus</i> sp. törzsek	0,05 g/l SDS MA	0,1 g/l SDS MA	0,5 g/l SDS MA	0,75 g/l SDS MA	1M NaCl MA	1,5M NaCl MA	2M NaCl MA	2,5M NaCl MA
<i>Aspergillus</i> <i>flavus</i> NCAIM F00952, NRRL 11611	n: + k: + sz: +	n: + k: + sz: +	n: + k: - sz: +	-	n: +, sárga k: + sz: +	n: +, sárga k: - sz: +	n: +, sárga k: - sz: +	n: +, sárga k: - sz: +
1	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	-	-	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -
6	n: + k: - sz: +	n: + k: - sz: +	n: + k: - sz: +	-	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -
7	n: +, barna k: + sz: -	n: +, barna k: + sz: -	n: +, sárgászöld k: + sz: -	-	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -
9	n: + k: + sz: +	n: + k: + sz: +	n: + k: - sz: -	-	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -
11	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: +, zöld k: + sz: -	-	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -
12	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: +, sárgászöld k: + sz: -	n: +, sárgászöld k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -
14	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: - sz: -	-	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -
15	n: + k: + sz: +	n: + k: + sz: +	-	-	n: + k: - sz: -	n: + k: - sz: -	n: + k: - sz: -	n: + k: - sz: -
18	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	-	-	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: +, barna táptalaj k: + sz: -

<i>Aspergillus</i> sp. törzsek	0,05 g/l SDS MA	0,1 g/l SDS MA	0,5 g/l SDS MA	0,75 g/l SDS MA	1M NaCl MA	1,5M NaCl MA	2M NaCl MA	2,5M NaCl MA
21	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	-	-	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: +, barna táptalaj k: + sz: -
23	n: + k: + sz: -	n: + k: - sz: -	-	-	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -
27	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: +, sárga k: + sz: -	n: +, sárga k: + sz: +	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -
28	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: +, sárga k: + sz: -	-	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: +, barna k: + sz: -
29	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: +, zöld k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -
30	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: +, sárgászöld k: + sz: -	n: +, sárga k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: +, sárga k: + sz: -
33	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: +, sárga k: + sz: -	-	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: +, sárga k: + sz: -
34	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: - sz: -	-	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: +, sárga k: + sz: -
36	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	-	-	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: +, barna k: + sz: -
37	n: + k: + sz: +	n: + k: + sz: +	n: + k: + sz: +	-	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -
38	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: - sz: -	n: + k: - sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: +, barna k: + sz: -
44	n: + k: + sz: +	n: +, barna k: + sz: +	n: +, sárga k: + sz: -	-	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: +, sárgászöld k: + sz: -

<i>Aspergillus</i> <i>sp. törzsek</i>	0,05 g/l SDS MA	0,1 g/l SDS MA	0,5 g/l SDS MA	0,75 g/l SDS MA	1M NaCl MA	1,5M NaCl MA	2M NaCl MA	2,5M NaCl MA
47	n: +, sárgászöld k: + sz: -	n: +, sárgászöld k: + sz: -	-	-	n: +, barna k: + sz: -	n: +, barna k: + sz: -	n: + k: - sz: -	n: + k: - sz: -
51	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: +, sárga k: + sz: -	-	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: +, sárga k: + sz: -
53	n: +, zöld k: + sz: +	n: +, zöld k: + sz: +	n: + k: - sz: +	-	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: +, sárgászöld k: + sz: -
56	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	-	-	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: +, sárga k: + sz: -
59	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	-	-	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -
60	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	-	-	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: +, sárga k: + sz: -
61	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: +, sárgászöld k: + sz: +	-	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: +, sárga k: + sz: -
62	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: - sz: -	-	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: +, sárga k: + sz: -
65	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: - sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -	n: + k: + sz: -

13. Nyilatkozatok

Ezen értekezést a Debreceni Egyetemen a Kerpely Kálmán Doktori Iskola keretében készítettem el a Debreceni Egyetem doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából.

Debrecen, 20.....

.....
a jelölt aláírása

Tanúsítom, hogydoktorjelölt 200..... - 200..... között a fent megnevezett Doktori Iskola keretében irányításommal – irányításunkkal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult, az értekezés a jelölt önálló munkája. Az értekezés elfogadását javaslom – javasoljuk.

Debrecen, 20

.....
a témavezető(k) aláírása

14. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet fejezem ki Dr. Pusztahelyi Tünde egyetemi docensnek a témavezetőként nyújtott segítségért, hogy a tapasztalataival, tudásával, hasznos szakmai tanácsaival segítette munkámat.

Köszönöm továbbá a Debreceni Egyetem MÉK Agrárműszerközpont valamennyi dolgozójának: Kiss Csabának a mintaelőkészítésben, Sörös Istvánnénak az aflatoxin mérésekben, Pákozdi Hajnalkának és Tóth Gábornénak az összes fenolos vegyület, összflavonoid, nyerszsírtartalom meghatározásban, Tőzsér Martinnak a nitrogén-tartalom meghatározásban, valamint Őri Nórának a D-glükóztartalom meghatározásban nyújtott segítségét.

Köszönöm a Debreceni Egyetem TTK Alkalmazott Kémiai Tanszéken dolgozó Dr. Nagy Lajos és Dr. Nagy Tibor HPLC-MS vizsgálatokban nyújtott segítségét.

Köszönöm továbbá a Debreceni Egyetem TTK Molekuláris Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék dolgozóinak a technikai segítséget, valamint a Debreceni Egyetem MÉK Élelmiszertudományi Intézet dolgozóinak segítségét.

Köszönettel tartozom továbbá az AGRI-CORN Kft.-nek (cím: 4275 Monostorpályi, Szalmás tanya), hogy biztosítottak a kutatásomhoz különféle kukorica hibrideket.

Végül pedig szeretném megköszönni szüleimnek, családomnak, páromnak, gyermekeimnek a sok támogatást és türelmet.