

DIPLOMADOLGOZAT

Kőműves Kata
Növényorvosi mesterképzési szak

Gödöllő
2024



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Szent István Campus
Növényvédelmi Intézet
Növényorvos mesterképzési szak

**Szemes cirok (*Sorghum bicolor* L. Moench) szemterméséből
izolált *Aspergillus* fajok faj szintű azonosítása, és a bennük
előforduló mikotoxin-termelést elősegítő gének detektálása**

Belső konzulens: Dr. Körösi Katalin Orsolya
egyetemi docens

**Belső konzulens
intézete/tanszéke:** Növényvédelmi Intézet,
Integrált Növényvédelmi
Tanszék

Készítette: Kőműves Kata
H1SKSV

Szent István Campus
2024

TARTALOMJEGYZÉK

1.	Bevezetés	5
2.	Célkitűzések	6
3.	Irodalmi áttekintés	7
3.1.	Szemes cirok	7
3.1.1.	A szemes cirok (<i>Sorghum bicolor</i> L. Moench) jellemzése	7
3.1.2.	Szemes cirok termesztésének helyzete világviszonylatban	7
3.1.3.	Szemes cirok termesztésének helyzete hazánkban	9
3.1.4.	A szemes cirok növényvédelme	9
3.1.5.	A szemes cirok gyomnövényei	10
3.1.6.	A szemes cirok kártevői	10
3.1.7.	A szemes cirok kórokozói	11
3.1.8.	A szemes cirok antioxidáns aktivitása	12
3.2.	A mikotoxin-termelő gombák általános jellemzése	12
3.2.1.	Az <i>Aspergillus</i> nemzetség jellemzése	13
3.2.2.	A szemes cirkon megjelenő <i>Aspergillus</i> fajok jellemzése	14
3.2.3.	Az <i>Aspergillus flavus</i> jellemzése	14
3.2.4.	Az <i>Aspergillus niger</i> jellemzése	15
3.2.5.	Az <i>Aspergillus parasiticus</i> jellemzése	16
3.2.6.	Az <i>Aspergillus oryzae</i> jellemzése	16
3.3.	A mikotoxinok	17
3.3.1.	A mikotoxinok jellemzése és előfordulása	17
3.3.2.	<i>Aspergillus</i> fajok által termelt mikotoxinok jellemzése	18
3.3.2.1.	Az aflatoxin jellemzése	18
3.3.2.2.	<i>Aspergillus</i> fajok aflatoxin termelésének kimutatása	19
3.3.2.3.	Az ochratoxin jellemzése	19
3.3.2.4.	Az <i>Aspergillus</i> fajok ochratoxin termelésének kimutatása	20
3.3.2.5.	Az <i>Aspergillus</i> fajok mikotoxin-termelésében szerepet játszó gének	21
3.3.3.	Mikotoxin szennyezettség szabályozásai	22
4.	Anyag és módszer	26
4.1.	A növényi minta eredete	26
4.2.	A szemtermések belső fertőzöttségének laboratóriumi körülmények közötti meghatározása	28
4.3.	Molekuláris genetikai vizsgálatok	29
4.3.1.	Faj szintű azonosításhoz a kísérletbe vont indítószekvenciák	29
4.3.2.	Polimeráz láncreakciók	29
4.3.3.	Az azonosított <i>Aspergillus</i> fajok mikroszkópi vizsgálata	30
4.4.	<i>Aspergillus</i> izolátumok mikotoxin-termelésben szerepet játszó génjeinek azonosítása	30
4.4.1.	PCR vizsgálatok mikotoxin-termelésre specifikus gének primerjeivel	30
4.4.2.	PCR termékek összemérése	31

5.	<i>Eredmények és értékelésük</i>	32
5.1.	Szemtermések belső fertőzöttségének vizsgálata	32
5.2.	A gomba nemzetség faj szintű azonosítása a vizsgálat során	33
5.2.1.	Az <i>Aspergillus</i> fajok izolátumain végzett molekuláris genetikai vizsgálatok eredményei	33
5.2.2.	Az azonosított <i>Aspergillus</i> fajok filogenetikai analízise	34
5.3.	Az azonosított <i>Aspergillus</i> spp. izolátumok mikroszkópi vizsgálatai	35
5.4.	Az <i>Aspergillus</i> izolátumok mikotoxin-termelését elősegítő gének azonosításának eredményei	37
6.	<i>Következtetések és javaslatok</i>	39
6.1.	A szemtermések belső fertőzöttségének vizsgálata	39
6.2.	Az izolált és azonosított mikotoxin-termelő gombafajok	39
6.3.	Az izolált <i>Aspergillus</i> fajok aflatoxin-termelésben szerepet játszó génjeinek vizsgálata	40
7.	<i>Összefoglalás</i>	41
8.	<i>Köszönetnyilvánítás</i>	42
9.	<i>Mellékletek</i>	43
9.1.	M1- ThermoScientific PCR KIT	43
9.2.	M2- Agaróz gél fotók – PCR reakciók	44
9.3.	M3- NCBI adatbázisba feltöltött szekvenciák és azok elérései	49
10.	<i>Hivatkozások</i>	51
11.	<i>Nyilatkozatok</i>	57

1. BEVEZETÉS

A szemes cirok (*Sorghum bicolor* L. Moench) egyre nagyobb térnyerése tapasztalható hazánkban, köszönhetően a kultúrnövény sokoldalúságának, mivel akár kedvezőtlen éghajlati viszonyok között is jó termőképességgel rendelkezik. Ennek köszönhetően a szemes cirok termesztése számos előnnyel jár, különösen a szárazságnak kitett területeken. A növény nagy ellenálló képessége miatt a szemes cirok fontos alternatívává válhat a kukorica helyett, különösen a változó klimatikus körülmények között. Az elmúlt évek aszályos időjárása és a mezőgazdaságot érintő kihívások egyre inkább előtérbe helyezték a szemes cirkot, mint potenciális megoldást a termésbiztonság növelésére.

Azonban a szemes cirok termesztése során komoly kihívást jelentenek a különböző mikotoxin-termelésre is képes kórokozók, köztük az *Aspergillus* nemzetségbe tartozó gombafajok. Az *Aspergillus* fajok különösen veszélyesek lehetnek, mivel több fajuk is különféle mikotoxinokat, köztük aflatoxin-termelésére képes, amely súlyos egészségügyi kockázatot jelenthet mind az emberi, mind az állati fogyasztásra szánt élelmiszerek és takarmányok tekintetében.

Magyarországon az *Aspergillus* nemzetségbe tartozó fajok jelenléte egyre gyakoribb a szemes cirok szemtermésében, különösen az éghajlatváltozás okozta extrém időjárási körülmények – mint például a szárazság és extrém magas hőmérséklet – miatt. Az aszályos években a növények stresszhelyzetbe kerülhetnek, ami elősegítheti az *Aspergillus* fajok megtelepedését. Az *Aspergillus flavus*, amely közülük itthon a leginkább elterjedt mikotoxin-termelő faj, komoly veszélyt jelent a szemes cirok termesztés során, és nagy figyelmet igényel a termelők és kutatók részéről egyaránt.

Összességében a szemes cirok egy ígéretes növény Magyarország mezőgazdaságában. Ugyanakkor a termesztésének sikeressége nagyban függhet attól, hogy mennyire tudjuk kontrollálni a növényeket támadó *Aspergillus* fajok terjedését és mikotoxin-termelését. A megfelelő mezőgazdasági gyakorlatok, valamint a folyamatos kutatások és monitorozás elengedhetetlenek ahhoz, hogy a szemes cirok biztonságos és gazdaságos alternatívája lehessen a hagyományos gabonaféléknek.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Diplomadolgozatomban az alábbi célok elérését tűztem ki:

- A szemes cirok szemterméseinek mikotoxin-termelő gombák által okozott belső fertőzöttségének vizsgálata.
- A belső fertőzöttséget okozó mikotoxin-termelő gombák nemzetség szintű dominanciájának meghatározása különös tekintettel az *Aspergillus* fajokra.
- Az izolált *Aspergillus* nemzetség tagjainak fajszerű azonosítása kalmodulin (*CaM*) génre specifikus primerek segítségével.
- Az izolált *Aspergillus* nemzetségbe tartozó gombafajok mikotoxin-termelésben szerepet játszó génjeinek azonosítása a génekre specifikus indítószekvenciákkal.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. Szemes cirok

3.1.1. A szemes cirok (*Sorghum bicolor* L. Moench) jellemzése

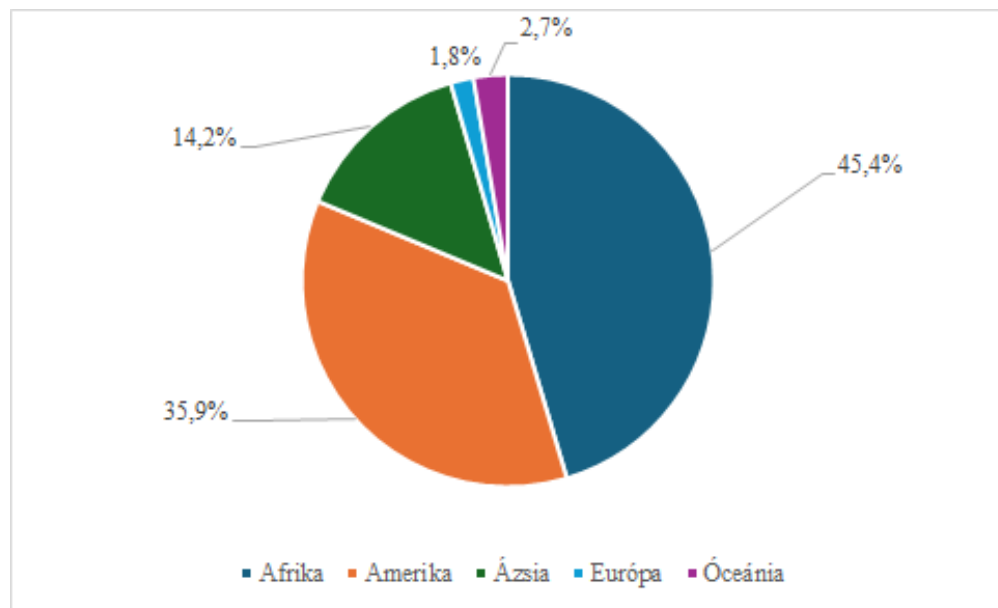
A cirok a pázsitfűfélék családjába (*Poaceae*), azon belül is a kölesformák (*Panicoideae*) alcsaládjába tartozó gabonanövény. A cirok Afrikából, azon belül is a Szahara déli zónájából származik. Hazánkban és világviszonylatban is az ötödik legnagyobb területen termesztett gazdaságilag fontos szántóföldi növény. Egyre nagyobb népszerűségnek örvend a fogyasztók körében, ugyanis széleskörű felhasználhatósága mellett, gluténmentessége, magas fehérje tartalma és antioxidáns vegyületekben gazdag beltartalma miatt termesztése és felhasználása egyre jobban elterjedt (Berenji & Dahlberg 2004; Sárvári 2011; Jevcsák & Sipos 2016).

A szemes cirok egy éves növény, amelyet úgynevezett C4-es típusú növényként ismerünk. Ennek a tulajdonságának köszönhetően kiváló a fotoszintetizáló képessége, ezáltal meleg, száraz éghajlati körülmények között magasabb terméshozam várható. A cirok vetése akkor optimális, ha a talaj eléri a 12-13 °C-t. Vetés mélysége 3-4 cm és 70-75 cm-es sortávolságra vetjük. Kiváló szárazságtűrő növény, mely savanyú talajok kivételével minden talaj típuson termeszthető. Kedvező körülmények között elérheti a 8-10 t/ha termésátlagot is (Rajki & Palágyi 2017; Sorghum ID 2018; Visarada & Aruna 2019).

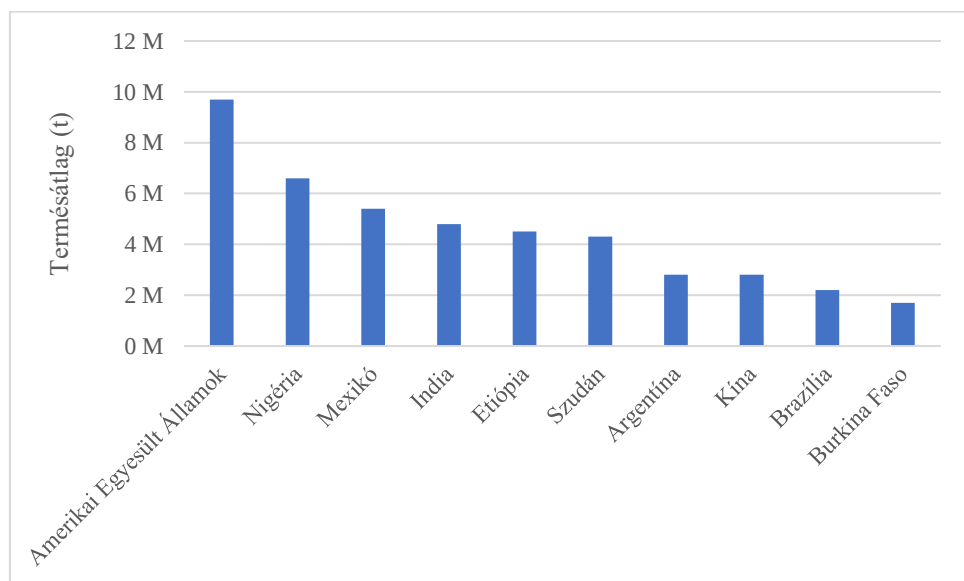
3.1.2. Szemes cirok termesztésének helyzete világviszonylatban

A cirok a világ ötödik legfontosabb gabonaféléje a rizs, a búza, a kukorica és az árpa után. Afrika, Ázsia és Latin-Amerika félszáraz trópusi régióiban élő több mint 750 millió ember számára ez a fő gabonaforrás. A világ jelenlegi termelése mintegy 58 millió tonna, ami 42,6 millió hektár területet jelent. Az Egyesült Államok a legnagyobb termelő, a világtermelés közel 17%-át adja, ahol a terméshozamok lényegesen magasabbak. A cirok termesztése világviszonylatban a következőképpen alakul (1.ábra). India, Nigéria, Kína, Mexikó, Szudán és Argentína követi az USA-t a ciroktermelés terén (2.ábra). Szenegálban, hasonlóan Afrika és Ázsia többi félszáraz területéhez, a cirok kiemelkedő szerepet játszik az élelmiszer- és takarmányellátásban. A cirokmagot elsősorban a helyi lakosság, különösen a földművesek fogyasztják, akik gyakran korlátozott hozzáféréssel rendelkeznek más tápláló energiaforrásokhoz. A cirokszemeket tésztákban, főtt formában és hagyományos italokként is fogyasztják ezen területeken. Szenegálban a cirokszemeket búzadaraként is fogyasztják,

mártással kísérve. Az iparosodott országokban a cirkot gabonaszemek vagy takarmány formájában állati takarmányként és bioetanol előállításához használják. A cirok iránti kereslet növekszik számos fejlődő országban, különösen Nyugat-Afrikában (például Nigériában, Ghánában és Burkina Faso-ban). Ennek oka részben a népesség növekedése, másrészt az ezekben az országokban folyó politikai törekvések, amelyek a cirok ipari felhasználásának, például sörfőzés fejlesztését célozzák az árpamaláta helyettesítése érdekében (Fall et al. 2016; [http1](#)).



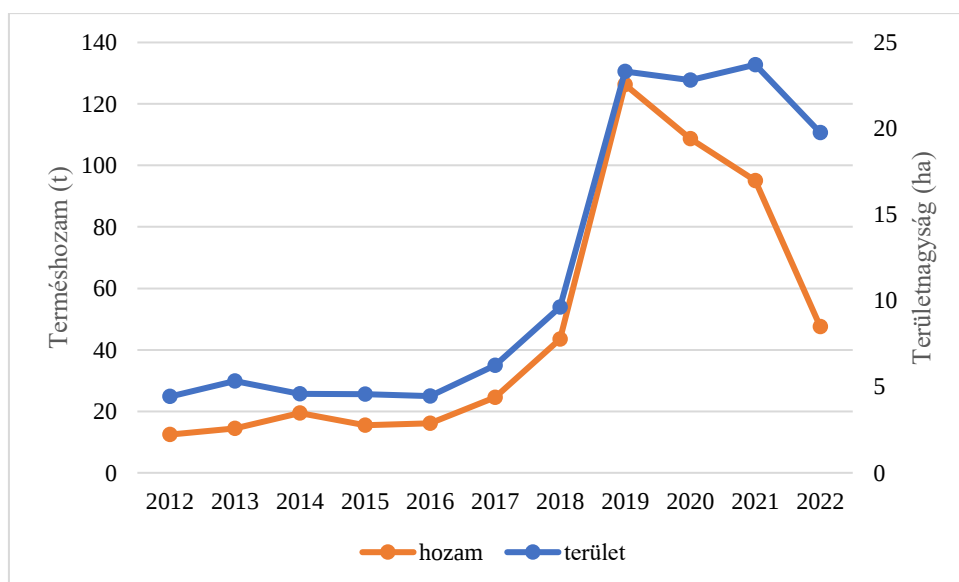
1. ábra: Cirok termesztés világviszonylatban (Forrás: FAOSTAT alapján, saját szerkesztés, 2024)



2. ábra: Vezető ciroktermelő országok és termésátlaguk (t)(Forrás: FAOSTAT alapján, saját szerkesztés, 2024)

3.1.3. Szemes cirok termesztésének helyzete hazánkban

A szemes cirok hazánkba az 1960-as években került be, majd ezután csökkenő tendenciát mutatott termesztési területe, ami talán a hibrid kukorica megjelenéséhez is köthető. Az elmúlt időszakban azonban egyre nagyobb területen jelent meg, mint kultúrnövény, ezáltal az ágazatban új lendület kezdett kibontakozni. A 2012 és 2015 közötti időszakban nem csupán a takarmányozás játszott meghatározó szerepet az ágazat fellendülésében, inkább a biogáztermelés hozta magával az emelkedést. Ennek oka a cirok magas cukortartalmában keresendő, ami lehetővé teszi a jelentős mennyiségű metán felszabadítását a növényből. Magyarországon körülbelül 28-30 ezer hektárra tehető a termőterülete (3.ábra) (Péterfy 2020; Halmos 2022; FAOSTAT 2024).



3. ábra: Területarányos cirokhozam Magyarországon (Forrás: FAOSTAT alapján, saját szerkesztés, 2024)

3.1.4. A szemes cirok növényvédelme

Ma már elképzelhetetlen a gazdálkodók számára, hogy a növénytermesztést szintetikus növényvédőszer használata nélkül oldják meg. Azonban a cél az, hogy csökkentsük a növényvédőszer felhasználást. Az ilyen függőség negatív következményekkel járhat az ökoszisztémákra nézve, mivel növeli a növényvédő szerekkel való terhelést és nemkívánatos egészségügyi hatásokat okozhat. Ugyanakkor a jövő növénytermelését veszélyeztetik olyan tényezők, mint a károsítók elleni rezisztencia kialakulása és a rendelkezésre álló hatóanyagok számának csökkenése. Az Európai Unió azonban a fenntartható gazdálkodás elveivel összhangban arra ösztönzi a növénytermesztőket, hogy alkalmazzák az integrált növényvédelem nyolc alapelvét. Ennek háttérében az áll, hogy olyan rendszerekre van

szükségünk, amelyek kevésbé függenek a szintetikus növényvédő szerektől, és így hozzájárulnak a fenntarthatóbb és környezetbarátabb mezőgazdaság kialakításához. A 2009/128/EK irányelv alapelvei az integrált növényvédelemben (Kiss et al. 2017):

1. Alapelv – megelőzés és visszaszorítás,
2. Alapelv – megfigyelés,
3. Alapelv – döntéshozatal,
4. Alapelv – nem kémiai módszerek,
5. Alapelv – peszticid kiválasztás,
6. Alapelv – csökkentett növényvédőszer használat,
7. Alapelv – anti-rezisztencia stratégiák,
8. Alapelv – értékelés.

3.1.5. A szemes cirok gyomnövényei

A cirokféléket a T3, T4, G1, G3-as életformacsoportú gyomnövények károsítják. A leggyakoribb fajok a vadrepce (*Sinapis arvensis*), a repcsényretek (*Raphanus raphanistrum*), a hélazab (*Avena fatua*), a parlagfű (*Ambrosia artemisiifolia*), a disznóparéj fajok (*Amaranthus spp.*), a fenyércirok (*Sorghum halepense*), az útszéli zsázsa (*Cardaria draba*), a mezei aszat (*Cirsium arvense*), valamint az apró szulák (*Convolvulus arvensis*). A sikeres védekezés, elsősorban függ a területválasztástól, az előveteménytől és annak gyomirtásától, az agrotechnikai kezelésektől és persze a kémiai gyomszabályozástól. A cirokban preemergensen, korai poszt, illetve posztemergensen tudunk védekezni (Jóvér & Radócz 2015; Arslan et al. 2016).

3.1.6. A szemes cirok kártevői

Fontos megemlíteni a cirok kártevőit is, különösen a levéltetveket, amik vírusvektor mivoltuk miatt nagyon jelentősek. Szívogatásuk során a növény diszpozíciós állapotba kerül, megteremtve ezzel számos kórokozó számára a fertőzés lehetőségét. A szívogatás tüneteinek túl, mézharmat és korompenész is megjelenhet. Fontos megemlíteni a kukoricamolylepke (*Ostrinia nubilalis*) által okozott kártételt is, amely hasonlóan a kukoricánál a szár károsítására specializálódik, így a védekezés stratégiája hasonló a kukoricában alkalmazotthoz. Bár kisebb mértékben, de magkárosítóként is felmerülnek a poloskák (*Heteroptera spp.*) és a vetési bagolylepke (*Agrotis segetum*). A talajban élő kártevők között említést érdemelnek a pattanóbogár (*Agriotes spp.*) lárvák és a cserebogár (*Melolontha spp.*) pajorok. Védekezés szempontjából természetes ellenségek védelmére nagy hangsúlyt kell fektetni, továbbá a terület-illetve fajtaválasztásra is. A termesztéstechnológia lépések mellett pedig az előrejelzésre

és utolsó sorban végső megoldásként az inszekticidek használatára tudunk támaszkodni. A cirok legfontosabb kártevői: fakó fű-levéltetű (*Metopolophium dirhodum*), zöld kukorica levéltetű (*Rhopalosiphum maidis*), zselnicemeggy-levéltetű (*Rhopalosiphum padii*), kis gabona-levéltetű (*Sitobion avenae*), kukoricamolylepke (*Ostrinia nubilalis*), Magevő kártevők közül a vetési bagolylepke (*Helicoverpa armigera*), poloskák (*Heteroptera spp.*), barkók (*Curculionidae spp.*) és a talajlakó kártevők (Sharma 1993; Balázs et al. 2003; Gou et al. 2011; Oksun et al. 2020; [http2](#)).

3.1.7. A szemes cirok kórokozói

Mint minden más növényt a cirkot is támadhatja vírus, baktérium és gomba egyaránt, melyek hatalmas termésveszteségeket tudnak okozni. **Gombabetegségek** közül az egyik legveszélyesebb az antraknózis melyet a *Colletotrichum sublineolum* nevű kórokozó terjeszt. A növény minden részét támadja az egész fenológiai stádiumban. Továbbá a cirok levélfoltossága is veszélyt jelenthet, amit az *Exserohilum turcicum* kórokozó okoz. Kedvező számára a hűvösebb, párásabb időjárás. A levélfoltosság tüneteit kezdetben apró foltok jellemzik, amelyek később hosszú, keskeny, közepén barnás, mélyvörös szegéllyel rendelkező sérülésekké alakulnak. Ezek a sérülések a sporuláció során tovább sötétednek, és a fertőzést követő két hét elteltével nekrotikus sérülésekké válnak, a betegség járványos méreteket ölthet. A cirok szemeket számos más gomba nemzetség kolonizálhatja. Ezek közül a legelterjedtebb a *Fusarium*, az *Alternaria*, a *Penicillium*, az *Aspergillus*, a *Culvularia* és a *Phoma* nemzetség fajtái. Ezen gombafajok mikotoxin-termelésre is képes kórokozók, mely befolyásolja a vetőmag életképességét és hatalmas termésveszteségeket okozhat. A *Macrophomina phaseolina*, más néven hamuszürke szárkorhadás, különösen hosszantartó szárazság idején okozhat jelentős problémákat. **Baktériumos** megbetegedések közül a legjelentősebb a *Burkholderia andropogonis*, aminek megtelepedésében a párás, meleg és csapadékos időjárás segít. Általában nem okoz nagy jelentőségű kárt. Továbbá **vírusbetegségek** is megjelenhetnek cirok termesztés során melyek közül a legjelentősebbek a MDMV (Maize dwarf mosaic vírus) és a MSV (Maize streak virus). Közti gazdájuk a fenyércirok. Az előfordulásukat és súlyosságukat befolyásolják az időjárási tényezők, a vektorok túlélési képessége, a termesztési módszerek és a gazdaspecifikusság következménye. A fertőzött növények növekedése elmarad. A korán fertőzött növény előbb-utóbb elpusztul, anélkül, hogy a bugák kifejlődnének. A későbbi szakaszokban fertőzött növények törpülnek, illetve kevés vagy egyáltalán nem képeznek szemterméseket (McClure et al. 2010; Sárvári 2011; Tesso et al. 2012; Egbuta et al. 2017; Spurlock et al. 2018; Anitha et al. 2020; [http2](#))

3.1.8. A szemes cirok antioxidáns aktivitása

Európában még újdonságnak számít az élelmiszerként való alkalmazás esetében, de Afrikában és Ázsiában a cirok régóta ismert és használt alapélelmiszer, melyet a rizs vagy a quinoához hasonlóan készítenek el. A cirokból készült italok alapja lehet sör vagy más alkoholos ital. Számos nemzetközi szakirodalom a szemes cirkot a jövő gabonájaként említi a kiemelkedő beltartalmi értéke és antioxidáns aktivitása révén (Nydia et al. 2013; Chhikara et al. 2019; Meena et al. 2022). A cirok kiváló tápanyagforrás, magas fehérje-, vas-, B6-vitamin-, niacin- és foszfortartalmának köszönhetően. Emellett remek energiaforrás, antioxidánsokban gazdag, gluténmentes, ezért a cöliákiában szenvedők számára is megfelelő gabona forrás, valamint jelentős a rost- és kálium tartalma. A cirokban megtalálható fenolos vegyületek szintje magasabb, mint a rizs, búza, árpa, kukorica, rozs és zab esetében. A fenolok szinte minden cirokfajtában megtalálhatók, de a főbb osztályok közé tartoznak a fenolsavak, a flavonoidok és a tanninok. A fenolsavak a növényekben található aromás másodlagos metabolitok. A cirokszem 135,5-479,40 mg/g fenolsavakat tartalmaz, amelyek hidroxibenzoésav-származékok és hidroxifahéjsav-származékok kategóriájába sorolhatók. A cirokból származó egyéb fenolos antioxidánsok többek között természetes tartósítószerként, antioxidáns kiegészítőként és terápiás szerekként is felhasználhatók. A flavonoidok a bioaktív vegyületek egy csoportja, amelyek számos egészségügyi előnnyel rendelkeznek. A tanninok a növényben elterjedt másodlagos anyagcseretermékek, amelyek a ragadozók és kórokozók elleni védekezés céljából termelődnek. A cirok magas antioxidáns aktivitása összefüggésbe hozható egészségügyi előnyökkel, mint például, csökkenti az oxidatív stresszt vagy, a szabadgyökök által indukált betegségeket például a rákos betegségek kialakulásának lehetőséget, csökkenti az érlelmeszesedés kockázatát, a gyulladásos bélbetegségeket, a szürkehályog és más betegségek kockázatát (Navnidhi et al. 2018; Visarada & Aruna 2019; Meena et al. 2022). A hazai termőhelyekről gyűjtött szemes cirok szemterméseiben legmagasabb arányban előforduló lipofil antioxidánsok a γ -tokoferol, α -tokoferol, zeaxantin és lutein (Szabó et al. 2024).

3.2. A mikotoxin-termelő gombák általános jellemzése

A mikroszkopikus gombák széles körben megtalálhatók a természetben, beleértve a takarmányokat is, továbbá elengedhetetlen szerepet játszanak a szerves anyagok lebontásában. Növekedésük és szaporodásuk során felhasználják a környezetükből származó szerves tápanyagokat, és olyan anyagokat szintetizálnak, amelyek a gombatest természetes

alkotóelemei, azaz a primer anyagcsere részei. A fejlődés és növekedés bizonyos szakaszaiban, vagy akár az előző folyamatokkal párhuzamosan, ún. másodlagos anyagcsere is lezajlik. Több 100 gombafajt ismerünk, amelyek termelhetnek mikotoxinokat. Számos csoportosítás létezik:

- a mikotoxinok bioszintézisének prekursorai alapján,
- a mikotoxin kémiai szerkezetéből adódó rokonság alapján,
- farmakológiai hatás alapján,
- vagy a penészgombák előfordulása alapján (Bennett & Klich 2003).

Egy másik csoportosítás alapján megkülönböztetünk szántóföldi és raktári penészgombákat. Ennek a csoportosításnak az alapja, a takarmánynövények nedvességtartalma, mely a betakarítással egyidőben jelentősen csökken. A toxint termelő gombák közül azokat, amelyek magasabb nedvességtartalmat igényelnek (20% felett) szaporodásukhoz, szántóföldi penészeknek nevezzük. Rendszerint a szántóföldön kárt okoznak a növényekben. A szántóföldi gombák szaporító szerkezetei könnyedén szállíthatók a levegővel, és állandó képleteknek tekinthetők, míg azokat, amelyek alacsonyabb víztartalom mellett is szaporodnak, raktári penészeknek nevezzük. A szántóföldi penészgombák minimális veszélyt jelentenek a raktározott terményekre, de talajban élő életformájuknak köszönhetően a spóráik a légmozgással mind a termesztett növényeket, mind a tárolt terményeket fertőzhetik. Az *Aspergillus* nemzetség a legalacsonyabb relatív nedvességtartalom mellett (14%) fertőz, míg a *Penicillium* fajok ennél valamivel magasabb páratartalom mellett (~16%). A két csoportba számos fontos toxintermelő gomba tartozik, azonban empirikus szempontból az alábbi fajok kiemelkedő fontosságúak (Mézes 2006; Péteri 2009; Khlangwiset & Wu 2010; Ismaiel & Papenbrock 2015; Kange et al. 2015; Perrone et al. 2020; Leslie et al. 2021, Chhaya et al. 2022; Mohammed et al. 2022):

- szántóföldi penészgombák: *Fusarium*, *Alternaria*, *Claviceps*, *Stachybotrys* fajok
- raktári penészgombák: *Penicillium* és az *Aspergillus* fajok.

3.2.1. Az *Aspergillus* nemzetség jellemzése

Az *Aspergillus* nemzetség gombái taxonómiai besorolás szerint az *Ascomycota* törzsbe (aszakuszos gombák) a *Pezizomycotina* altörzsbe, az *Eurotiomycetes* osztályba, az *Eurotiales* rendbe azon belül pedig az *Aspergillaceae* családba tartoznak (Mycobank 2024). Micheli először írta le a nemzetséget 1729-ben, amely olyan gombákat foglal magába, melyek hosszú szárral és spórafejjel rendelkeznek. Körülbelül 350 fajt sorolunk ebbe a nemzetségbe, és fő jellemzőjük a konídiumtartó megléte. Ezek a gombák számos élőhelyen megtalálhatók, és

rendkívül sokoldalúak a másodlagos anyagcseretermékek előállításában. Többük fontos humán és növényi kórokozó, mások pedig számos élelmiszeripari termék előállításában játszanak szerepet. Általában raktári kórokozóként tartjuk őket számon, de vannak fajok melyek már szántóföldön is képesek sanyargatni a növényeket, mint például a gyapotot, a kukoricát, a földimogyorót, a szőlőt, a hagymát és más fűszernövényeket. A nemzetség fajai, a metabolikus sokoldalúságuknak köszönhetően, jelentős biotechnológiai potenciállal rendelkeznek, és több fajukat felhasználják különféle élelmiszeripari és nem élelmiszeripari melléktermék előállítására. A növényi kórokozók aggodalomra adnak okot nemcsak azért, mert károsíthatnak számos agronómiai szempontból fontos élelmiszer alapanyagként termesztett növényt, hanem azért is, mert képesek különféle mikotoxinokat is termelni. Ezek a mikotoxinok a nemzetség meghatározott fajaihoz vagy alfajaihoz kapcsolódnak, és általában mérgezőek az állatokra és az emberre egyaránt. Mezőgazdasági szempontból az *Aspergillus* fajok által termelt fontos mikotoxinok a következők: aflatoxinok, ochratoxinok, patulin, fumonizinek, citrinin (Haller 1976; Amaike & Keller 2011; Baranyi 2016; Szigeti 2018).

3.2.2. A szemes cirkon megjelenő *Aspergillus* fajok jellemzése

A cirok szemtermésén számos *Aspergillus* faj jelenik meg. Felsorolás szinten a következő fajokat izolálták cirokról: *Aspergillus flavus*, *A. flavus* var. *colomunaris*, *A. fumigatus*, *A. glaucus*, *A. multicolor*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus*, *A. rubrobrunneus*, *A. sydowii*, *A. terreus*, *A. unguis*, *A. vesicolor*, *Eurotium amstelodami* és *E. chevalieri* (Tesso et al. 2011).

3.2.3. Az *Aspergillus flavus* jellemzése

Az *Aspergillus flavus* először Link írta le 1809-ben, és azóta ismeretes, amely csak ivartalan spórákat, konídiumokat és a telelő termőtesteket, a szkleróciumokat termel. Nemrégiben az *A. flavus* ivaros stádiumáról számoltak be, amit *Petromyces flavus* néven osztályoztak. Az *A. flavus* mellett közeli rokonának az *A. parasiticus*-nak az ivaros alakját is megtalálták, amely a *Petromyces parasiticus* tudományos nevet kapta. Az *A. flavus* széles körűen elterjedt szaprofita talajgombaként fordul elő világszerte, betakarítás előtt és után pedig számos mezőgazdasági terményen okoz betegséget, például gabonaféléken, olajos magvakon. A gomba nemcsak mezőgazdasági veszélyt jelent, hanem állati és emberi megbetegedéseket is okozhat. Aflatoxikózist és/vagy májrákot okozhat az aflatoxinnal szennyezett takarmány fogyasztása révén, vagy invazív szaporodással aszpergillózist is kiválthat, különösen

immunhiányos egyéneknél. Az aflatoxin és más másodlagos metabolitok, mint a ciklopiazonsav (CPA) és aflatrem termelése a poliketid-származékokból származik. Az aflatoxin először a 1962-es Turkey X betegség során került leírásra, ahol aflatoxinnal szennyezett takarmány baromfi elhullást okozott. Az *A. flavus* genomját nemrégiben szekvenálták, és becsült mérete 36,8 megabázispár (Mb), körülbelül 12 000 előre jelzett funkcionális gén található benne. Genom adatok kimutatták, hogy az *A. flavus* szoros rokonságban áll az *A. oryzae*-vel, ami gazdaságilag fontos, de aflatoxinokat nem termelő gombafaj. Az izolátumok ebben a fajban kizárólag B-típusú aflatoxinokat képesek előállítani. Az *A. flavus*, hasonlóan más *Aspergillus* fajokhoz, világszerte elterjedt, bár inkább a melegebb (trópusi, szubtrópusi) területeken gyakori. Optimális növekedési hőmérséklete 37 °C, de széles tartományban, 12 és 48 °C között is képes növekedni. Az *A. flavus* törzsek genetikailag és fenotípusosan is nagy diverzitást mutatnak. A konídiumok színe táptalajtól függően változik, a sárgászöldtől egészen a barnáig. Két morfológiailag megkülönböztethető szklerócium-méretbeli variánst azonosítottak az L-törzs és S-törzs között, az L-törzs nagyobb szkleróciumokat képez, mint a S-törzs (Geiser et al. 2000). Az S-törzs nagyobb mennyiségben állít elő aflatoxint laboratóriumi körülmények között, és kevesebb konídiumot termel, mint az L-törzs. Az S-törzs ugyanakkor ritkán fordul elő természetes környezetben (Amaike & Keller 2011; Baranyi 2016).

3.2.4. Az *Aspergillus niger* jellemzése

Az *Aspergillus niger* már több évtizede központi szerepet tölt be a kutatásban és az ipari felhasználásban. Az első gyakorlati jelentőségét 1919-ben nyerte el, amikor sikeresen alkalmazták a citromsav ipari előállításában. Az *A. niger* segítségével később glükonsavat és fumársavat is előállítottak, bár ezek gazdasági jelentősége kisebb volt. Az 1960-as évektől kezdve azonban az *A. niger* számos olyan enzim forrása lett, amelyek széles körben alkalmazhatók a gyümölcsfeldolgozásban, a sütésben, valamint a keményítő- és élelmiszeriparban technikai segédanyagokként. A géntechnológiát sikeresen használták fel a termelési folyamatok hatékonyabbá tételére, valamint az *A. niger* mint idegen fehérjék expressziós rendszerének kialakítására. Az *A. niger* széles hőmérsékleti tartományban képes növekedni, a 6-47 °C között, jelentős hőmérsékleti optimummal, amely 35-37 °C között helyezkedik el. Az *A. niger* rendkívül tág pH-tartományban fejlődik, a 1,4-től 9,8-ig terjedő értékeken belül. Ezek a kiváló alkalmazkodóképességek és a levegővel könnyen terjedő konídiumok bőséges termelése lehetővé teszi a fajnak, hogy szinte bárhol jelen legyen, gyakran előfordulva a meleg és nedves környezetekben. Az *A. niger*-t általában természetes

környezetben elterjedt, nem patogén gombának tekintik. Az emberek mindennapi életük során rendszeresen érintkeznek a spóráival anélkül, hogy bármilyen betegséget okoznának. Az *A. niger* törzsek számos másodlagos metabolitot hoznak létre, azonban csak az ochratoxin A minősül mikotoxinnak. A vizsgált törzsek csupán 3-10%-a mutatott pozitív eredményt kedvező körülmények között az ochratoxin A termelése tekintetében. Új és még nem vizsgált izolátumokat érdemes ellenőrizni az ochratoxin A-termelés szempontjából. Ezen korlátozások figyelembevételével azt a következtetést vonták le, hogy az *A. niger* biztonságos körülmények között tenyésztendő gombafaj (Schuster et al. 2002).

3.2.5. Az *Aspergillus parasiticus* jellemzése

Az *Aspergillus parasiticus* és az *A. flavus* egyaránt a *Flavi* szekció tagjai, genetikailag szorosan kapcsolódnak egymáshoz, de mégis megkülönböztethetők. A két faj fenotípusosan is könnyen megkülönböztethető. Az *A. parasiticus* B1, B2, G1 és G2 aflatoxinokat termel. *A. parasiticus* sötétzöld konídiumfejek és kifejezettebb konídium képzés különbözteti meg az *A. flavus*tól. A faj populációi jelentős morfológiai és aflatoxin-termelési változatossággal rendelkeznek. Bár a *Flavi* szekcióba tartozó fajok, beleértve az *A. parasiticus*-t, szkleróciumot termelnek, az olyan *Aspergillus* fajokat, mint az *A. flavus* és *A. parasiticus* sokáig aszexualisnak tekintették, mivel ezen fajok nem képesek sejtosztódásra. Ennek eredményeként az *A. parasiticus* és az *A. flavus*, mint *Flavi* szekció tagjai ivartalan alakokkal rendelkeznek (Horn et al. 2017).

3.2.6. Az *Aspergillus oryzae* jellemzése

Az *Aspergillus oryzae* egy olyan gomba, melyet széles körben alkalmaznak a hagyományos japán fermentációs iparágakban, beleértve a szójaszószt, a szakét, a babbort, a fűszerezést és az ecetgyártás területét. A fonalas gombák általában képesek szekréciós úton különféle és jelentős mennyiségű enzimeket termelni. Az *A. oryzae* különösen kiemelkedő potenciállal rendelkezik különféle enzimek termelésében. Emellett a géntechnológia fejlődése lehetővé tette az *A. oryzae* ipari enzimek előállításának alkalmazását a modern biotechnológiában. Az *A. oryzae* például az első gomba volt, amelyet heterogén enzim kereskedelmi termelésére alkalmaztak, ilyen például a mosóporokban használt lipáz 1988-ban. A jellemzője az *A. oryzae* hagyományos japán fermentációjának a szilárd állapotú termesztés (SSC) alkalmazása (rizsszem, szójabab és búzakorpa). Az ilyen fermentációs módot Kínában már 2000-3000 évvel ezelőtt alkalmazták. Az *A. oryzae* RIB40 (ATCC42149) genomjának

szekvenálása 2005-ben fejeződött be. A szekvenált törzs egy vad típusú törzs, amely leginkább hasonlít a szaké főzéshez használt törzsekhez, de még mindig képes a proteázok erőteljes termelésére, ami a szójaszósz erjesztésének egyik legfontosabb jellemzője. Az *A. oryzae*-t először H. Ahlburg izolálta kojiból 1876-ban, amikor meghívták a japán orvosi főiskolára. Eredeti nevét, *Eurotium oryzae*, később F. Cohn átnevezte *A. oryzae*-re, mivel úgy találta, hogy nem képes az ivaros szaporodásra. Annak ellenére, hogy az *A. oryzae* genetikailag nagyon közel áll az *A. flavus*hoz, amelyről ismert, hogy a legerősebb természetes rákkeltő anyagot, az aflatoxint termeli, az *A. oryzae* nem termel aflatoxint vagy más rákkeltő anyagcsereterméket. Az *A. oryzae* által termelt erjesztett élelmiszerek, beleértve az *A. sojae*-t, az *A. oryzae* *Flavi* szakaszba tartozó közeli rokonát, bizonyítottan aflatoxinmentesek. A két fajt, az *A. oryzae*-t és az *A. flavus*-t hagyományosan morfológiai, fiziológiai és tenyésztésen alapuló jellemzők alapján különböztették meg. A legújabb DNS-alapú technikák javították a megkülönböztetés lehetőségét. Zhang és munkatársai arról számoltak be, hogy az *A. oryzae* aflatoxin bioszintézis géncsoportjának homológjai még az *A. flavus* és az *A. parasiticus* aflatoxin expressziójának kedvező körülmények között sem fejeződtek ki (Zhang et al. 2005; Machida et al. 2005; Machida et al. 2008)

3.3. A mikotoxinok

3.3.1. A mikotoxinok jellemzése és előfordulása

A fonalas gombák másodlagos anyagcseretermékei, melyeket például az *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Claviceps* és *Stachybotrys* fajok termelnek. Extracellulárisan jutnak be ezek a kémiaiilag stabil vegyületek az élelmiszerek és takarmányok útján a humán és haszonállatok szervezetébe. Nagyon ellenálló vegyületek, az élelmiszer feldolgozás során is csak minimálisan károsodnak. Szervezetre gyakorolt káros hatásai a meddőség, szaporodás biológiai zavarok, különféle rákos megbetegedések, állatoknál tömeges elhullást is okozhatnak (Bennett & Klich 2003; Leslie et al. 2021). Általában nem sorolják ide a "kalaposgombák" toxinjait, a gombák által termelt antibiotikumokat és a növénykárosító toxinokat (fitotoxinok). A mikotoxikózisok szempontjából elsősorban a penészgombák jelentősek főleg az *Ascomycota* törzs tagjai, pl. *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Stachybotrys*, *Claviceps* fajok. Egyes járomspórás gombákban is észleltek mikotoxinok illetve fitotoxinok tekintett másodlagos metabolitokat, pl. *Rhizopus* fajokban rhizoxint és rhizonint, azonban ezeket a velük endoszimbiózisban élő *Burkholderia* fajok állítják elő. A toxintermelő gombákat nedvesséigényük alapján két csoportra osztjuk: a szántóföldi penészek, amelyek magasabb (20% fölötti) nedvességtartalmat igényelnek, mint például a *Fusarium* és *Claviceps*

fajok, valamint a raktári penészek, amelyek alacsonyabb nedvességtartalom mellett is szaporodnak, mint az *Aspergillus* és *Penicillium* fajok. Az *Aspergillus flavus* mindkét csoportban fontos, mivel a tárolt termények aflatoxin szennyezését okozhatja, és már a szántóföldön is fertőzhet. A mikotoxinok keletkezése két szakaszra oszlik: a betakarítás előtti (preharvest) és a betakarítás utáni (postharvest) fázisra, melyek különböző környezeti tényezők hatására alakulnak ki (Amadi & Adeniy 2009; Leslie & Logrieco 2014; Ismaiel & Papenbrock 2015).

Az aflatoxinok, a citrinin, a patulin, a penicilsav, a tenuazonsav, az ochratoxin A, a citokalazinok, a deoxinivalenol, a fumonizinek, a fuzarin C, a fuzársav és a zearalenon a legelterjedtebb típusok, melyek leginkább a gabonaféléket szennyezik. Ezeket főként *Aspergillus*, *Penicillium* és *Fusarium* gombafajok termelik. Ezek a toxinok negatívan befolyásolhatják a vetőmag minőségét, a csírázást, az életképességet, a csíranövények fejlődését, valamint a gyökér és a csírakezdemény növekedését. Mivel ezek a toxinokat termelő gombák gyakran endofiták, melyek élő növényi szöveteket fertőznek és kolonizálnak, előfordulhat, hogy a toxinok felhalmozódása növényi betegségeket okoz a növényi szövetekben (Varga et al. 2014; Ismaiel & Papenbrock 2015; Szukács & Geösel 2019).

3.3.2. *Aspergillus* fajok által termelt mikotoxinok jellemzése

3.3.2.1. Az aflatoxin jellemzése

Az aflatoxinok, melyek a poliketid reakcióútból származnak, az 1960-as években kerültek felfedezésre Nagy-Britanniában. Ekkor tapasztaltak először rejtélyes megbetegedéseket Angliában, ahol 1959-ben egy ismeretlen kóroktól szenvedő pulykák tömeges elhullása történt, ami több mint százezer állat vesztét okozta. A földimogyoródara mérgező hatásának feltárásához folyadék-kromatográfiás vizsgálatot alkalmaztak, amely során az aflatoxin nevű toxint azonosították, amit az *A. flavus* gomba termelt. Az aflatoxinok által okozott megbetegedéseket aflatoxikózisnak nevezik. Akut esetekben, mint például az Indiában 1974-ben és Kenyában 1981-ben és 2004–2006-ban bekövetkezett esetekben, toxikus hepatitiszt okozhatnak. Hosszabb távon a folyamatos aflatoxin expozíció májcirrózist és májrákot idézhet elő, ami különösen gyakori Mozambikban, Dél-Afrikában és Kínában. Az aflatoxinokat nem csak az *A. flavus*, hanem más *Aspergillus* fajok is képesek előállítani, de gazdaságilag jelentős toxintermelőnek csak az *A. flavus*, *A. nomius* és *A. parasiticus* fajokat tekintik. Az aflatoxinok leginkább földimogyoróban, de más olajos magvakban, fűszerekben és kukoricában is megtalálhatók. Bár hazánkban gyakran izolálják az *A. flavus*-t mezőgazdasági

terményekről, általánosan elterjedt nézet, hogy mérsékelt égövi/hazai éghajlati viszonyok között az aflatoxinok felszaporodásának kicsi az esélye, mivel az *A. flavus* magasabb hőmérsékleten termel aflatoxinokat. Az aflatoxinok különböző formái, például az aflatoxin B1, B2, G1, G2 és M1, számos környezeti és élelmiszerforrásból származhatnak. A trópusi országokban rendkívül elterjedtek. Bár hazánkban a terményekben való felszaporodásuk kicsi az esélye, a globális felmelegedés hatására ez a probléma várhatóan növekedni fog (Marroquín-Cardona et al. 2014; Varga et al. 2014; EFSA 2020).

3.3.2.2. *Aspergillus* fajok aflatoxin termelésének kimutatása

Az aflatoxinok erőteljes hepatokarcinogének és mutagének, amelyeket számos *Aspergillus* faj másodlagos metabolitaként termel. Ezek, mint az *A. flavus* és az *A. parasiticus*, kiemelkedő szennyeződést okoznak az élelmiszer-alapanyagokban, ami súlyos egészségügyi kockázatokat jelent az emberre és az állatokra nézve, valamint gazdasági problémákat okozhat a nemzetközi kereskedelemben és a gabonatermelők számára. Az M1, az aflatoxin B1 metabolikusan termostabil származéka, felhalmozódhat az aflatoxinnal szennyezett takarmánnyal etetett tehenek tejében, továbbá megtalálható lehet a sajtban és más tejtermékekben is. Ez jelentős fenyegetést jelent az EU gazdaságára, különösen a régiókra, ahol a tejtermelés fontos iparág. Azonban nem minden *A. flavus* törzs termel aflatoxint. Valójában sok izolátum mutációk miatt nem képes mikotoxin-termelésére. Azonban az azonosítás hagyományos mikrobiológiai módszerei időigényesek, míg az immunológiai módszerek hajlamosak az aspecifitásra és hamis pozitív eredményekre. A polimeráz-lánreakció (PCR) alapú diagnosztikai módszerek alkalmazása azonban ígéretes lehetőséget jelent az aflatoxin bioszintézis génjeinek kimutatására vagy expressziójának követésére. Több kutatócsoport már tesztelte a PCR-alapú módszerek hatékonyságát, amelyek közül néhány lehetővé teszi az *Aspergillus* fajok megkülönböztetését és az aflatoxin-termelő és nem termelő törzsek elkülönítését. Ezek a módszerek gyorsak és specifikusak, így versenyre kelhetnek a jelenlegi módszerekkel. Az RT-PCR alapú szűrési módszerek különösen előnyösek lehetnek, mivel a génexpresszióra fókuszálnak, és kevésbé hajlamosak a hamis pozitív eredményekre (Degola et al. 2007).

3.3.2.3. Az ochratoxin jellemzése

Az ochratoxinok egy rokon pentaketid-metabolitok csoportja, melyek fenilalaninhoz kötött dihidroizokumarinból származnak. Az ochratoxin A-t (OTA) 1965-ban fedezték fel. Az OTA a legelterjedtebb kongenerát, főként az *A. ochraceus* gombák termelik, bár más

Aspergillus és *Penicillium* fajok is ismertek, hogy előállítják a természetben előforduló ochratoxin A, B és C-t. Az ochratoxinok gyakran előfordulnak élelmiszerekben a világ különböző részein, mind meleg, mind hűvös éghajlaton, és gyakori szennyezői a gabonaféléknek, kávénak, kakaónak, bornak, sörnek és állati eredetű élelmiszereknek, különösen a sertéshúsnak. Az OTA erős nefrotoxin, és állatokra vonatkozó bizonyítékok alapján a 2B csoportba sorolták, mint lehetséges humán rákkeltő anyagok. Szerepe van számos nefropátiában, beleértve az endémiás sertésnefropátiát és a balkáni endémiás nefropátiát. Kísérleti modellben az OTA májkárosító, teratogén, immuntoxikus és karcinogén hatást mutatott. Későbbi kutatások kimutatták, hogy számos penészgombafaj, mint az *A. carbonarius*, az *A. niger* és a *Penicillium verrucosum* is képes ochratoxint termelni. A közelmúltban az *A. westerdijkiae* és az *A. steynii*, az *Aspergillus Circumdati* szekció két új fajtát az *A. ochraceus*-tól elkülönítették, és erősebb OTA-termelőknél bizonyultak. A *P. nordicum* és a *P. verrucosum* szintén ismert OTA-termelők (Marroquín-Cardona et al. 2014.; Ismaiel & Papenbrock 2015).

3.3.2.4. Az *Aspergillus* fajok ochratoxin termelésének kimutatása

Az *Aspergillus* fajok, amelyek a *Nigri* szekcióba tartoznak, világszerte elterjedtek. Sok közülük képes károsítani a tárolt terményt, azonban néhányat felhasználnak a fermentációs iparban is. Azonban jelentőségük radikálisan megváltozott azáltal, hogy az ochratoxin A szennyezettségért felelős gombákként azonosították őket a szőlő- és borkészítésben. Például az *A. tubingensis*, az *A. niger* és az *A. carbonarius* régóta ismert, mint ochratoxint termelő fajok. Ezeknek a fajoknak a pontos azonosítása kulcsfontosságú lehet a toxikológiai kockázatok megítélésében, mivel termelésük képessége eltérő lehet. Azonban az OTA bioszintézis lépéseiben részt vevő géneket még nem azonosították, ezért az ezek kimutatására tervezett primerek sem állnak rendelkezésre. A kalmodulin gén azonban igen hasznosnak bizonyult a *Nigri* szekcióhoz tartozó fajok megkülönböztetésében, mivel rendelkezik néhány fajspecifikus, diagnosztikai célokra alkalmas jellemzővel. Például Susca és kollégái 2007-ben kimutatták, hogy a kalmodulin alapú PCR módszer nagyfokú specificitással rendelkezik az *Aspergillus* fajok fajszintű azonosítására. Ez a módszer lehetővé teszi ezeknek a fajoknak az azonosítását morfológiai vizsgálat nélkül. Ezenkívül ez a módszer alkalmas olyan vizsgálatokhoz, amelyek nagy mennyiségű gomba izolátumot érintenek, mivel gyors DNS-kivonást és egyszerű PCR-amplifikációt tesz lehetővé. Például a NIG1/NIG2 és TUB1/TUB2 fajspecifikus primerek lehetővé teszik az *A. tubingensis* és *A. niger* törzsek azonosítását azonos PCR körülmények között, még akkor is, ha morfológiailag nem megkülönböztethetőek (Susca et al. 2007).

3.3.2.5. Az *Aspergillus* fajok mikotoxin-termelésében szerepet játszó gének

Degola és munkatársai 2007-ben kukoricaszemekből izolált *A. flavus* aflatoxin-génklaszterének öt génjét célozták meg specifikus primerekkel, hogy kiemeljék expressziójukat az aflatoxin-termelését indukáló körülmények között termesztett micéliumokban. Az öt génből két szabályzó (*aflR* és *aflS*) és három szerkezeti gént (*aflD*, *aflO*, *aflQ*) célozták meg. Kimutatták, hogy jó korreláció van az aflatoxin gének génexpressziója, amelyet ebben az esetben multiplex RT-PCR-rel elemeztek, és az aflatoxin-termelés között, ez alól kivételt képzett egy törzs, mely látszólagosan az összes releváns gént átírta, de nem termelt aflatoxint a közegben. A vizsgálat jelentősége abban állt, hogy ez volt az első példa a multiplex PCR és az RT-PCR megközelítési kombinációjának alkalmazása az *A. flavus* populáció szűrésére az aflatoxigén és nem aflatoxigén törzsek jelenlétére (Degola et al. 2007).

Gallo és munkatársai (2012) a kutatásuk során az aflatoxin-termeléssel összefüggésben álló géneket vizsgálták, és ehhez az *aflR* és *aflS* szabályozó géneket, valamint az *aflD*, *aflM*, *aflO*, *aflP* és *aflQ* szerkezeti géneket célzó primerpárokat használták. Különböző csoportokban elemezték e gének jelenlétét és azok kapcsolatát az aflatoxin-termeléssel. Azt találták, hogy csak azok a törzsek nem voltak képesek aflatoxin-termelésére, amelyeknél a vizsgált gének közül három vagy több hiányzott. Ezzel szemben az aflatoxint-termelő izolátumoknál minden gén jelen volt. Ezért a kutatók arra a következtetésre jutottak, hogy az aflatoxin bioszintetikus gének hiánya szorosan összefügg azzal, hogy a törzsek nem termelnek aflatoxint. Emellett az *aflO*, *aflP* és *aflQ* géneket gyakran megtalálták a nem aflatoxint-termelő izolátumokban is (Gallo et al. 2012).

Scherm és munkatársainak kutatási célja az volt, hogy vizsgálja az RT-PCR módszer alkalmazását az *A. flavus* és az *A. parasiticus* aflatoxint-termelő és nem termelő törzseinek megkülönböztetésére. Aflatoxin B1 bioszintetikus útvonalának kilenc szerkezeti génjét (*aflD*, *aflG*, *aflH*, *aflI*, *aflK*, *aflM*, *aflO*, *aflP* és *aflQ*) és két szabályozó génjét, az *aflS* és *aflR*-t tartalmazó specifikus primereket alkalmazták a 13 törzs teljes RNS-ének elemzésére. A transzkripciót a β -tubulin gén kifejeződésével igazolták. Az aflatoxin bioszintetikus gének többségének, beleértve az *aflR* és az *aflS*-t, a kifejeződése változott a törzsek között attól függően, hogy termeltek-e aflatoxint, valamint a növekedési körülményektől. Azonban azt tapasztalták, hogy három gén, az *aflD*, az *aflO* és az *aflP* expressziós profilja következetesen korrelált a törzs aflatoxin-termelő vagy nem termelő képességével (Scherm et al. 2005).

Yang és munkatársai tanulmányukban először mutatták be az *A. flavus* proteomjának átfogó térképvázlatát. Ez az első olyan ismert vizsgálat, amely ilyen proteomikai megközelítést

alkalmazott az *Aspergillus* genomikai annotációjának fejlesztésére. Az eredményeiket arra használták fel, hogy új betekintést nyerjenek az aflatoxinszintézis és az *A. flavus* patogenitásának mechanizmusába, így potenciálisan új stratégiákat dolgozhattak ki az aflatoxin-szennyezettség ellenőrzésére. Proteogenomikai elemzésük során 732 új fehérjekódoló gént sikerült véglegesen azonosítani az *A. flavus*-ban. Érdekes módon ezek közül néhány viszonylag kis méretű volt, ami magyarázatot adhat arra, hogy miért hagyták figyelmen kívül őket a korábbi *in silico* elemzések. Ezek az új fehérjék nagyjából 50%-a konzerválódott 66 *Aspergillus* faj között. Megállapították, hogy ezek a konzervált fehérjék részt vesznek metabolikus, szaporodási és fejlődési folyamatokban. Továbbá, úgy tűnik, hogy ezek a fehérjék kulcsfontosságúak az *Aspergillus* növekedésében és túlélésében, mivel az ilyen anyagcsere-hálózatok kritikusak az *Aspergillus* fajok számára. Proteogenomikai elemzésük során a mintákat nyolc különböző stresszkezelésből származtatták, és számos új gén különbözőképpen fejeződött ki ezekre a körülményekre adott válaszként. Úgy vélték, hogy az *A. flavus* sejtekben stresszkörülmények között azonosított új fehérjék kapcsolatban lehetnek az *A. flavus* túlélésével, növekedésével, patogenitásával és stresszre adott viselkedésével a gazdasajtban. Emellett az aflatoxin szintézisében és exportjában részt vevő új fehérjéket is azonosították. Például a szénanyagcserében részt vevő új fehérjék szabályozzák az acetyl-CoA áramlását, ami az aflatoxinok bioszintézisének kezdeti szubsztrátja (Yang et al. 2021).

3.3.3. Mikotoxin szennyezettség szabályozásai

A mikotoxinok olyan másodlagos anyagcseretermékek, amelyeket különböző nemzetségű fonalas gombák termelnek. Ezek gyakran szennyeződnek mezőgazdasági termékekben a termesztés, betakarítás vagy tárolás során. A legelterjedtebb mikotoxin-termelők közé tartoznak az *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium* és *Penicillium* gombafajok. A mikotoxinok szennyezése gyakrabban fordul elő fejlődő országokban, ahol kedvezőbb a gombanövekedésre és toxintermelésre alkalmas környezet.

Az állati eredetű élelmiszerek is lehetnek szennyezettek mikotoxinok által, leggyakrabban mikor az állatok szennyezett takarmányt fogyasztanak vagy az állati termékek nem megfelelő tárolási körülményei miatt. A melegebb éghajlatú országokban, ahol rosszak a tárolási körülmények és az élelmiszerek minőségének ellenőrzése, valamint ahol nincsenek megfelelő szabályozások a mikotoxinokra vonatkozóan, gyakrabban fordulnak elő ilyen típusú szennyezések. A mikotoxinoknak való kitettség különböző egészségügyi problémákat okozhat, attól függően, hogy az expozíció mennyisége és időtartama milyen, valamint az egyén

egészségi állapota és a mikotoxin típusa. Akut esetekben gyors és egyértelmű tünetek jelentkezhetnek, míg krónikus expozíció esetén hosszú távon felhalmozódhatnak a toxinok, ami krónikus betegségekhez vezethet, mint például a rák vagy az immunrendszer gyengülése. Az élelmiszerek és takarmányok mikotoxin szennyezettségének kimutatásához specifikus és megbízható analitikai módszereket kell alkalmazni. Fontos a minták reprezentatív kiválasztása és az elemzési módszerek rendszeres frissítése annak érdekében, hogy hatékonyan lehessen megelőzni és kezelni a mikotoxinok által okozott élelmiszerbiztonsági problémákat (Al-Jaal et al. 2019).

Zain (2011) szerint az élelmiszerek és takarmányok mikotoxinokkal való szennyezettsége globálisan komoly problémát jelent. A legfontosabb mezőgazdasági szempontból jelentős mikotoxinok közé tartoznak az aflatoxinok, az ochratoxinok, a trichotecének, a zearalenon, a fumonizinek, a tremorgenikus toxinok és az anyarozs-alkaloidok. Bizonyos penészgombafajok többféle mikotoxint is termelhetnek, és egy szennyezett alapanyagon gyakran több mikotoxin is megtalálható. A mikotoxinok által okozott betegségeket mikotoxikózisnak nevezzük. A humán szervezetbe a mikotoxinok 70%-a táplálkozás során kerül be, ugyanakkor dermális, légzőszervi és parenterális úton is be tud jutni a szervezetbe. Fő oka a bejutásnak, hogy a mérgező anyagok részlegesen, vagy egyáltalán nem bomlanak le az előállítási vagy feldolgozási folyamatok során. A magas hőmérséklettel szemben is kiváló ellenállóságot mutatnak, valamint a gyomor sósav tartalmának is ellenállnak. A mikotoxinoknak különböző akut és krónikus hatásai vannak az emberekre és az állatokra, fajtól és érzékenységtől függően. Bár a kérődzők általában ellenállóbbak a mikotoxinok káros hatásaival szemben, a gazdasági hatások mégis jelentősek lehetnek, mint például az emberi és állati veszteségek, az egészségügyi és állatorvosi költségek növekedése, az állattenyésztés csökkenése, valamint a szennyezett élelmiszerek és takarmányok ártalmatlanítása. Bár folyamatosak az erőfeszítések a mikotoxinok ellenőrzésére vonatkozó iránymutatások meghatározására, a gyakorlati intézkedések nem mindig elégségesek (Kovács 2010; Zain 2011; Kovács 2018).

A nemzeti mikotoxin határértékek meghatározásában figyelembe kell venni a toxikológiai ismereteket, a nemzetközi ajánlásokat továbbá a határértékek ellenőrzésére alkalmas mintavételi és analitikai módszereket, illetve a határértékek egészségügyi és gazdasági hatását. Az élelmiszerellátás veszélyeztetésének elkerülése érdekében a határértékek nem lehetnek szigorúak. A legrészletesebb szabályozást az aflatoxin B1-re vonatkozóan dolgozták ki, melynek a takarmányokban a határértékeit a 2002/32/EK irányelvei és módosításai határozzák meg az Európai Unióban. A 2006/576/EK rendelet a DON, zearalenon, ochratoxin

és fumoizinek maximális elfogadható koncentrációját szabályozza az Európai Bizottság. Magyarország teljes mértékben átvette az uniós határértékeket a Magyar Takarmánykódex kötelező alkalmazásáról szóló 44/2003 FVM rendelet 2. melléklete szerint. A jogszabályok kialakítása során figyelembe kell venni az egészségügyi, a gazdasági, a társadalmi és a kereskedelmi kockázatokat, illetve szempontokat. Gazdasági aspektusból az egyik legjelentősebb a szabályozás, ugyanis szigorú határérték betartási kötelezettséggel, komoly költséggel jár, mindemelett gátolhatja az exportnak szánt árucikk kijutását (EK 2023/915; Szabó 2014; Szabóné 2018).

A 2023/915/EC irányelv határozza meg az egyes toxinokra vonatkozó ajánlott maximális határértékeket. Ezek az értékek eltérőek az emberi fogyasztásra szánt termékek és a csecsemők számára elérhető termékek esetében, ahol a csecsemőknek szánt termékeknel mindig sokkal alacsonyabb határértékek érvényesek ahogy az 1. táblázatban is látható. Az aflatoxinra és az ochratoxin-A-ra vonatkozó határértékek a legszigorúbbak. Aflatoxin esetén külön határértékeket állapítanak meg a következő termékekre: az emberi fogyasztás vagy élelmiszer-összetevőként történő felhasználás előtt válogatott vagy fizikai kezelésen átesett földimogyoróra (8 µg/kg), diófélékre (5 µg/kg), szárított gyümölcsökre (5 µg/kg), kukoricára (5 µg/kg), valamint valamennyi gabonafélére és azokból készült termékekre (2 µg/kg). Közvetlen fogyasztás esetén a határérték nem haladhatja meg a 2 µg/kg-ot. Bizonyos fűszerek esetében a megengedett határérték 5 µg/kg. Anyatej-helyettesítő és anyatej-kiegészítő tápszerekben, illetve csecsemők számára készült speciális gyógyászati célú diétás termékekben az aflatoxin M₁ mennyisége nem lehet több mint 0,025 µg/kg. Az ochratoxin-A maximális mennyisége 2 µg/kg lehet azokban a szőlőlében, mustban, borban és minden szőlő- vagy boralapú italban, amelyeket közvetlen emberi fogyasztásra szánnak. A feldolgozatlan gabonafélékben ez a határérték 5 µg/kg. Az instant kávé kivételével minden típusú kávéban a határérték 3 µg/kg, míg az oldható kávé esetén 5 µg/kg. Szárított szőlőben az ochratoxin-A megengedett maximális mennyisége 8 µg/kg. A közvetlen emberi fogyasztásra szánt kukoricaételekben és kenyérben a fumonizin mennyisége legfeljebb 1000 µg/kg, a deoxinivalenol pedig 500 µg/kg lehet. Feldolgozatlan kukoricában a fumonizin határértéke 4000 µg/kg, míg a deoxinivalenol 1750 µg/kg lehet. Közvetlen fogyasztásra szánt gabonafélék és száraz tészta esetében a deoxinivalenol határértéke 750 µg/kg. A zearalenon kenyérben a legalacsonyabb (50 µg/kg), míg feldolgozatlan és közvetlen fogyasztásra szánt termékekben elérheti a 350 µg/kg-ot is. A patulin mennyisége szilárd almaételekben legfeljebb 25 µg/kg, míg gyümölcslevekben és szeszes italokban 50 µg/kg lehet (EK 2023/915; Petrányi et al. 2016).

Az EK 2024/1038-as rendelet az EK 2023/915 rendeletnek módosított változata, mely az élelmiszerekben előforduló T-2 és HT-2 toxin felső határértékeit határozza meg. A T-2 és HT-2 toxin felső határértéke feldolgozatlan gabonamagvakban 50 µg/kg, feldolgozatlan szemes kukoricában és feldolgozatlan durumbúzában pedig 100 µg/kg. Végző fogyasztók számára a gabonafélékben 20 µg/kg, valamint bÉbiÉtelek, csecsemők és kisgyermekek számára készült feldolgozottgabona-alapú élelmiszerekben ez az Érték nem haladhatja meg a 10 µg/kg-ot, ahogyan az 1.táblázat is szemlélteti (EK 2024/1038).

1. táblázat: Emberi fogyasztásra szánt élelmiszerek mikotoxin szennyezettségére vonatkozó határértékek (forrás:2023/915 EC; 2024/1038 EC)

	Határérték (µg/kg)	
	Emberi fogyasztásra szánt termékek	Csecsemőknek szánt termékek
Aflatoxin	2-12	0,10
Aflatoxin M1 (nyers tej)	0,050	0,025
Ochratoxin-A	2-80	0,50
Deoxinivalenol	500-1750	200
Zearalenon	50-400	20
Fumonizin B1+B2	800-4000	200
Patulin	25-50	10
T-2 és HT-2	20-1250	10

4. ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1. A növényi minta eredete

Az cirok szemtermések mintagyűjtése 2021-ben és 2022-ben történt. 2021-ben 12 különböző termőhelyről gyűjtöttünk, amelyek lefedték Magyarország 6 régióját. A szemtermések két különböző genotípusba tartozó szemes cirokról származtak, amint az 2. táblázatban látható. 2022-ben a szemtermések egyetlen termőhelyről származtak, melyet a 2021-es minták elemzése alapján választottunk ki. A második év mintavételezésére a dél-alföldi régiót választottuk, ahol a mikotoxin-termelő gombák előfordulása a legelterjedtebb volt, ahogy azt az 2. táblázatban is láthatjuk. 2022-ben 6 különböző genotípust vizsgáltunk, amelyek között szerepelt a 2021-es év két genotípusa is.

2. táblázat A mintagyűjtések helyszínei, a szemes cirok genotípusai és a minták kódjai 2021-ben és 2022-ben

Helyiség	Koordináták	Év	Régió	Genotípus	Kód
Adács	47.69173 N, 19.97778 E	2021	Észak-Magyarországi Régió	G1	SL1
Adács	47.69173 N, 19.97778 E	2021	Észak-Magyarországi Régió	G2	SN1
Gyékényes	46.24063 N, 16.99019 E	2021	Dél-Dunántúli Régió	G1	SL2
Gyékényes	46.24063 N, 16.99019 E	2021	Dél-Dunántúli Régió	G2	SN2
Hedrehely	46.19643 N, 17.65159 E	2021	Dél-Dunántúli Régió	G1	SL3
Hedrehely	46.19643 N, 17.65159 E	2021	Dél-Dunántúli Régió	G2	SN3
Hódmezővásárhely	46.41830 N, 20.32955 E	2021	Dél-Alföldi Régió	G1	SL4
Hódmezővásárhely	46.41830 N, 20.32955 E	2021	Dél-Alföldi Régió	G2	SN4
Kapoly	46.72814 N, 17.97106 E	2021	Dél-Dunántúli Régió	G1	SL5
Kapoly	46.72814 N, 17.97106 E	2021	Dél-Dunántúli Régió	G2	SN5
Kissomlyó	47.14468 N, 17.10275 E	2021	Nyugat-Dunántúli Régió	G1	SL6
Kissomlyó	47.14468 N, 17.10275 E	2021	Nyugat-Dunántúli Régió	G2	SN6

Mezőberény	46.82367 N, 21.03191 E	2021	Dél-Alföldi Régió	G1	SL7
Mezőberény	46.82367 N, 21.03191 E	2021	Dél-Alföldi Régió	G2	SN7
Mezőhegyes	46.31181 N, 20.81546 E	2021	Dél-Alföldi Régió	G1	SL8
Mezőhegyes	46.31181 N, 20.81546 E	2021	Dél-Alföldi Régió	G2	SN8
Nagyréde	47.76477 N, 19.84886 E	2021	Észak- Magyarországi Régió	G1	SL9
Nagyréde	47.76477 N, 19.84886 E	2021	Észak- Magyarországi Régió	G2	SN9
Sárkeresztúr	47.00134 N, 18.54796 E	2021	Közép- Dunántúli Régió	G1	SL10
Sárkeresztúr	47.00134 N, 18.54796 E	2021	Közép- Dunántúli Régió	G2	SN10
Törökszentmiklós	47.17781 N, 20.40930 E	2021	Észak-Alföldi Régió	G1	SL11
Törökszentmiklós	47.17781 N, 20.40930 E	2021	Észak-Alföldi Régió	G2	SN11
Tüskevár	47.11805 N, 17.30990 E	2021	Nyugat- Dunántúli Régió	G1	SL12
Tüskevár	47.11805 N, 17.30990 E	2021	Nyugat- Dunántúli Régió	G2	SN12
Apátfalva	46.17847 N, 20.57826 E	2022	Dél-Alföldi Régió	G1	S1
Apátfalva	46.17847 N, 20.57826 E	2022	Dél-Alföldi Régió	G2	SL13
Apátfalva	46.17847 N, 20.57826 E	2022	Dél-Alföldi Régió	G3	S3
Apátfalva	46.17847 N, 20.57826 E	2022	Dél-Alföldi Régió	G4	S4
Apátfalva	46.17847 N, 20.57826 E	2022	Dél-Alföldi Régió	G5	SN13
Apátfalva	46.17847 N, 20.57826 E	2022	Dél-Alföldi Régió	G6	S6

A minták kisparcellás kísérletből származtak, melyeken kémiai növényvédelmi kezelést nem végeztek. A minták nedvességtartalma 14-16% között volt. A mintákat betakarítás előtt 1-2 héttel gyűjtöttük be, és minden mintavételezési parcelláról 5 különböző ponton vettünk mintát. A mintagyűjtési pontok között legalább 3 méteres távolság volt (2021-ben: 24 x 5 minta;

2022-ben: 6 x 5 minta). A szemterméseket kézzel hántoltuk, majd papírdobozokban tároltuk 5 °C-on a felhasználásig.

4.2. A szemtermések belső fertőzöttségének laboratóriumi körülmények közötti meghatározása

A begyűjtött szemterméseket felületi fertőtlenítés céljából 5 percen keresztül kereskedelmi forgalomban kapható 10%-os hígítású hipó (NaOCl) oldatban áztattuk, majd desztillált vízzel (dH₂O) alaposan lemostuk őket, és lamináris fülkében szárítottuk. A fertőtlenített szemterméseket ezután Nash & Snyder-féle szelektív táptalajra helyeztük. Ez a speciális táptalaj kifejezetten alkalmas *Fusarium* fajok izolálására és fenntartására, mivel a benne található pentaklór-nitrobenzol (PCNB) fungicid megakadályozza más mikroorganizmusok növekedését. Ugyanakkor, egyes források szerint nemcsak *Fusarium* fajok képesek növekedni ezen a táptalajon, hanem más mikotoxin-termelő gombafajok is (Leslie és Summerell 2006). A táptalaj összetevőit laboratóriumi mérlegen kimértük, majd az elegyet autoklávbán, túlnyomás alatt sterilizáltuk (121 °C, 20 perc). Amikor a táptalaj kézmelegre hűlt, hozzáadtuk a szükséges antibiotikumokat, és steril fülkében steril Petri-csészékbe öntöttük.

A Nash & Snyder-féle táptalaj (PPA) összetétele 1 liter desztillált vízhez a következő volt (Leslie és Summerell 2006):

- 15 g pepton
- 20 g agar (nem steril)
- 1 g KH₂PO₄
- 0,5 g MgSO₄
- 50 ppm PCNB
- 100 ppm kloramfenikol

A szemterméseket 10 technikai és 10 biológiai ismétléssel vizsgáltuk. A megszilárdult táptalajra, steril csipesz segítségével, oltófülkében helyeztük el a felületileg fertőtlenített szemterméseket. Ezeket 25 °C-on termosztátban inkubáltuk, majd a 7. napon ellenőriztük a kinőtt gombatelepek számát. A gombatelepek nemzetségi szintű azonosítása érdekében kloramfenikolt tartalmazó burgonya-dextróz táptalajra (Potato Dextrose Agar, PDA) oltottuk át őket, amelynek összetétele literenként:

- 39 g PDA por (20 g/l dextróz, 4 g/l burgonyakivonat, 15 g/l agar)
- 100 ppm kloramfenikol

A gombatelepeket PDA táptalajon inkubáltuk 25 °C-on, sötét termosztátban, 7 napig, hogy elősegítsük a sporulációt. A nemzetségi szintű azonosítást makro- és

mikromorfológiai vizsgálatokkal végeztük, a makromorfológiai azonosításhoz a telepek jellegzetes formáját és pigmentáltságát vettük alapul. A mikromorfológiai vizsgálatokhoz mikroszkópi preparátumokat készítettünk a micéliumszövedékből, amelyeket Olympus BX50 típusú fénymikroszkóppal elemeztünk.

4.3. Molekuláris genetikai vizsgálatok

4.3.1. Faj szintű azonosításhoz a kísérletbe vont indítószekvenciák

A molekuláris genetikai azonosítások során 2 indítószekvencia párral dolgoztunk. Az *Aspergillus* nemzetségbe tartozó gombák esetében a kalmodulin génre (*CaM*) speciális indítószekvencia párokat (cmd5/cmd6 és CL1/CL2A) alkalmaztunk. A szekvenciák a 3. táblázatban találhatóak.

3. táblázat A kísérletben használt indítószekvenciák tulajdonságai

Primer neve	Primer szekvencia	Nemzetség	PCR termék várható mérete (bázispár)	Irodalmi hivatkozás
CL1	5'-GA(GA)T(AT)CAAGGAGGCCTTC-3'	<i>Aspergillus</i> spp.	688 bp	O'Donnell et al. 2000
CL2A	5'-TTTTTGCATCATGAGTTGGAC-3'	<i>Aspergillus</i> spp.	688 bp	O'Donnell et al. 2000
cmd5	5'-CCGAGTACAAGGAGGCCTTC-3'	<i>Aspergillus</i> spp.	580 bp	Hong et al. 2006
cmd6	5'-CCGATAGAGGTCATAACGTGG-3'	<i>Aspergillus</i> spp.	580 bp	Hong et al. 2006

4.3.2. Polimeráz láncreakciók

Az *Aspergillus* izolátumok esetében standard polimeráz láncreakciót (PCR) végeztünk a CL1/CL2A és cmd5/cmd6 kalmodulin génekre specifikus primerpárokkal az M1-es melléklet szerint. A CL1/CL2A primerpárokat a Pro FlexTM thermocyclerrel (Applied BiosystemsTM Singapore) használtuk az alábbi feltételek mellett: 1 ciklus kezdeti denaturálás 94 °C-on 5 percig, majd 30 denaturálási ciklus 94 °C-on 30 másodpercig, 55 °C-on 1 percig való anelláció, 72 °C-on 2 percig történő lánchosszabbítás, és végül 1 ciklus végső meghosszabbítás 72 °C-on 5 percig (Melléklet - M2). A cmd5/cmd6 primerpárokat hasonló feltételek mellett alkalmaztuk, 1 ciklus kezdeti denaturálás 95 °C-on 5 percig, 35 denaturálási ciklus 95 °C-on 1 percig, 55 °C-on 30 másodpercig való anelláció, 72 °C-on 40 másodpercig történő lánchosszabbítás, és végül

1 ciklus végső meghosszabbítás 72 °C-on 5 percig. A CaM PCR-termékeket a DNS-szekvenáláshoz templátként a Macrogen Europe (Macrogen Europe BV, Amsterdam) használta. A PCR termékek előzetes tisztítása után végeztük el a Sanger-dedoxi szekvenálást. A szekvenciákat az NCBI (US National Center for Biotechnology Information) adatbázissal hasonlítottuk össze, amely elérhető a <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> címen (Melléklet - M3).

A kísérlet során az utolsó két zseb a PCR termékeket tartalmazta, amelyek közül az egyik a pozitív, a másik pedig a negatív kontrol volt. A pozitív kontrol mintái a MATE, NVI, Integrált Növényvédelmi Tanszék gyűjteményéből származó DNS mintákból származtak. A negatív kontrol esetében a PCR termékekbe Mili-Q víz került, amelyben nem volt DNS jelen. A felszaporított termékeket 1%-os etídium bromidot (EtBr) tartalmazó agaróz gélben választottuk szét. A gélen megjelenő termékeket az Image Lab (BioRad) programmal értékeltük ki, és a 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) marker alapján ellenőriztük a képződött termékek specifikusságát.

4.3.3. Az azonosított *Aspergillus* fajok mikroszkópi vizsgálata

Az azonosított egy-egy gombafajból micélium mintákat készítettünk mikroszkópiás preparátumok formájában, majd ezeket az Olympus BX50 típusú fénymikroszkóppal vizsgáltuk. A vizsgálatok során fotókat készítettünk az Olympus E420 típusú tükörreflexes gép segítségével.

4.4. *Aspergillus* izolátumok mikotoxin-termelésben szerepet játszó génjeinek azonosítása

4.4.1. PCR vizsgálatok mikotoxin-termelésre specifikus gének primerjeivel

A PCR vizsgálatok során 7 gén jelenlétét vizsgáltuk, amelyek kapcsolatba hozhatók a mikotoxin-termeléssel. Ezeket a Degola et al. (2007) és a Gallo et al. (2012) által leírt eljárás alapján végeztük. Összesen 21 izolátumot vizsgáltunk, közülük 19 *A. flavus* és 2 *A. oryzae* izolátum volt. Az *aflR*, *aflS*, *aflD*, *aflM*, *aflP*, *aflO* és *aflQ* géneket, amelyek fontos szerepet játszanak az aflatoxin-termelésében, a 4. táblázatban található indítószekvenciák segítségével vizsgáltuk. Az *aflD*, *aflO*, *aflM*, *aflP* és *aflQ* gének strukturális gének, melyek az aflatoxin bioszintézisében részt vesznek és a bioszintézis útvonal enzimeit kódolják, míg az *aflR* és *aflS* gén szabályozó gének, amelyek fontosak a strukturális gének expressziójának szabályozásában.

4. táblázat Az aflatoxin-termelőkéesség kimutatására alkalmazott indítószekvenciák jellemzői a kísérlet során

Primer neve	Primer szekvencia	Gén specifikusság	PCR termék várható mérete (bázis pár)	Irodalmi hivatkozás
AflR	5' -AAGCTCCGGGATAGCTGTA-3'	<i>aflR</i>	1079 bp	Gallo et al. 2012
	5' -AGGCCACTAAACCCGAGTA-3'			
AflS	5' -TGAATCCGTACCCTTTGAGG-3'	<i>aflS (aflJ)</i>	684 bp	Degola et al. 2007
	5' -GGAATGGGATGGAGATGAGA-3'			
AflD	5' -CACTTAGCCATCACGGTCA-3'	<i>aflD (nor-1)</i>	852 bp	Degola et al. 2007
	5' - GAGTTGAGATCCATCCGTG-3'			
AflM	5' -AAGTTAATGGCGGAGACG-3'	<i>aflM (ver-1)</i>	470 bp	Degola et al. 2007
	5' - TCTACCTGCTCATCGGTGA-3'			
AflO	5' -TCCAGAACAGACGATGTGG-3'	<i>aflO (omtB)</i>	790 bp	Degola et al. 2007
	5' - CGTTGGCTAGAGTTTGAGG-3'			
AflP	5' -AGCCCCGAAGACCATAAAC-3'	<i>aflP (omtA)</i>	870 bp	Degola et al. 2007
	5' -AGCCCCGAAGACCATAAAC-3'			
	5' -CCGAATGTCATGCTCCATC-3'			
AflQ	5' - TCGTCCTTCCATCCTCTTG-3'	<i>aflQ (ordA)</i>	757 bp	Degola et al. 2007
	5' -ATGTGAGTAGCATCGGCATTC-3'			

4.4.2. PCR termékek összemérése

-5 µl DNS

-5 µl primer F

-5 µl primer R

-10 µl víz

-25 µl DreamTaq MasterMix (ThermoFisher Scientific)

5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELEÉSÜK

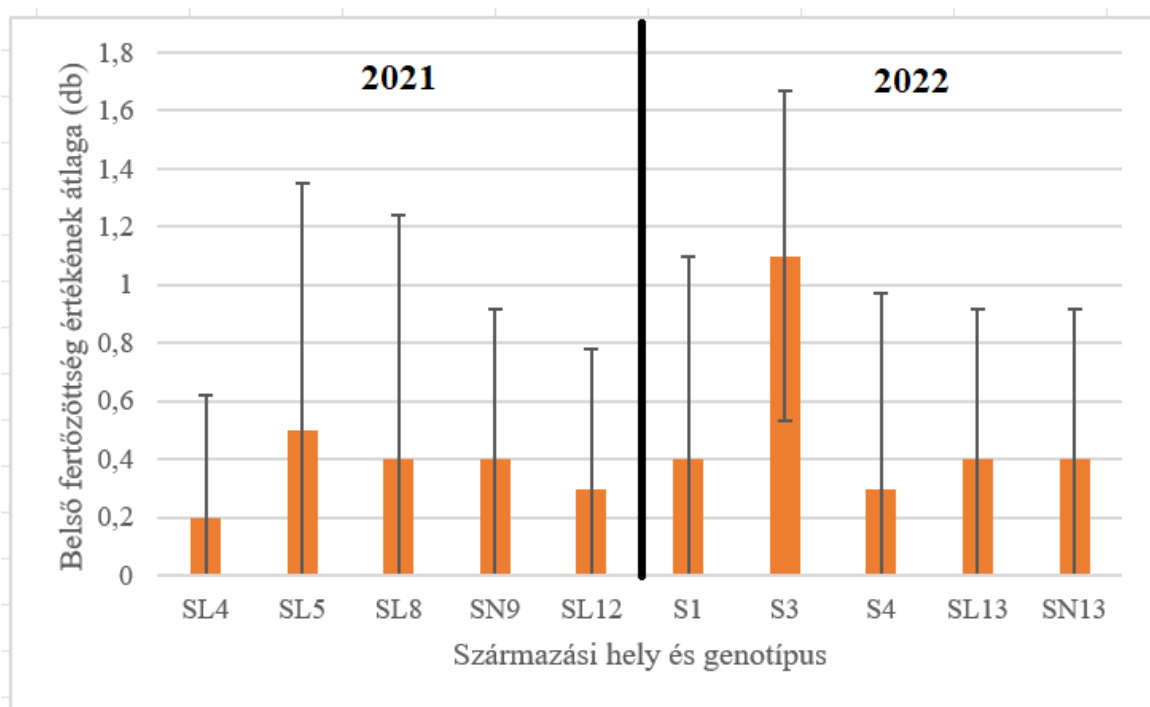
5.1. Szemtermések belső fertőzöttségének vizsgálata

A szemes cirok szemtermésének belső fertőzöttségének értékelésénél az *Aspergillus* nemzetséget vizsgáltuk. Bár detektáltunk *Alternaria*, *Penicillium* és *Fusarium* nemzetségbe tartozó gombák által okozott belső fertőzöttséget is, kutatásaink során ezeket a nemzetségeket nem vizsgáltuk részletesen.

Az 1-es genotípusú szemes cirok szemterméseit 2021-ben gyűjtöttük, amelyek átlagos belső fertőzöttségeit a 4-es ábra szemlélteti. Az SL1, SL2, SL3, SL6, SL7, SL9, SL10 és az SL11-es genotípusoknál nem mutattunk ki belső fertőzöttséget ezért ezeket a 4. ábrán nem tüntettük fel. A belső fertőzöttség értékek számottevő különbséget mutatnak a származási hely függvényében. A legmagasabb belső fertőzöttséget a 2021-es évben gyűjtött minták közül az SL5 genotípus esetében tapasztaltuk, ahol körülbelül 0,5 szemtermés volt fertőzött, míg a legalacsonyabb ugyanebben az évben 0,2 szemtermés volt.

A 2-es genotípus esetében, melyek szintén a 2021-es év gyűjtéséből származnak, a belső fertőzöttségi értékek a származási hely alapján szintén jelentős eltérést mutattak. Egy darab genotípus esetében mutattunk ki belső fertőzöttséget az SN9-es minta esetében, ahol az érték 0,4 szemtermés fertőzöttségét mutatta. Az SN1, SN2, SN3, SN4, SN5, SN6, SN7, SN8, SN10, SN11 és az SN12-es minták esetében a belső fertőzöttség vizsgálata során 0%-os fertőzöttséget tapasztaltunk, ezért ezeket szintén nem tüntettük fel a 4. ábrán.

A 2022-es termesztési évből származó szemtermések belső fertőzöttségi értékei is a 4. ábrán láthatóak. Az S3-as minta mutatta a legmagasabb belső fertőzöttségi értéket, ahol átlagosan 10 szemtermésből 1,1 volt fertőzött a nemzetség valamely tagjával. A legalacsonyabb belső fertőzöttségi értéket az S4 mintánál észleltük, ahol átlagosan 0,3 szemtermés volt fertőzött *Aspergillus* fajok által. A származási hely ezen esetben is jelentős eltéréseket mutatott. Az ábra is jól mutatja, hogy a 2022-es évben, amit rendkívül aszály sújtotta évnek detektálunk, magasabb fertőzöttségi arányt szemléltet, mint a 2021-es átlagosnak mondható év.



4. ábra: Szemtermések belső fertőzöttségének átlaga (db) a vizsgált nemzetség alapján az 1-es (SL4, SL5, SL8, SL12, SL13), a 2-es (SN9, SN13) és a további (S1, S3, S4) vizsgált genotípusok esetében 2021-ben és 2022-ben a különböző termőhelyek függvényében szórásértékekkel (SD).

5.2. A gomba nemzetség faj szintű azonosítása a vizsgálat során

5.2.1. Az *Aspergillus* fajok izolátumain végzett molekuláris genetikai vizsgálatok eredményei

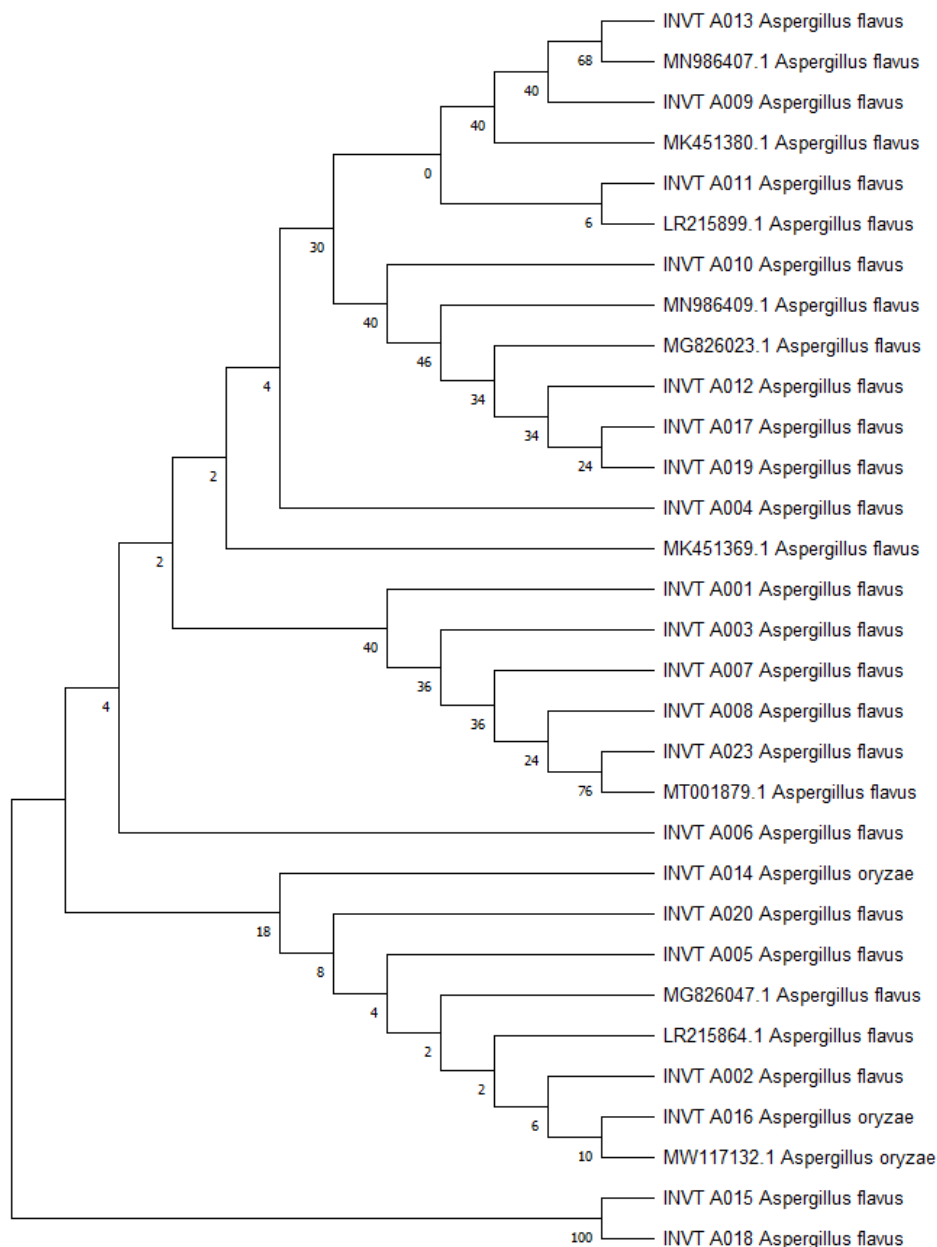
Az *Aspergillus* nemzetség tagjainak faj szintű azonosítása során 23 tiszta tenyészetet állítottunk elő. A kapott eredmények alapján 23 PCR termék szekvenálását végeztük el, majd az NCBI BLAST-tal ellenőriztük a szekvenciákat, és feltöltöttük azokat az NCBI adatbázisába is (Melléklet - M3 – 15. táblázat, Melléklet – M2). Az 5. táblázatban láthatók az azonosított *Aspergillus* fajok dominanciaviszonyai. A molekuláris genetikai vizsgálatok során 19 *A. flavus* és 2 *A. oryzae* fajt azonosítottunk, amelyek két különböző mintából származtak.

5. táblázat: A szemes cirok szemtermések belső fertőzöttségének értékelése során azonosított *Aspergillus* fajok dominanciaviszonyai (megoszlás)

Faj	Azonosított izolátumok mennyisége (db)	Azonosított izolátumok aránya (%)
<i>Aspergillus flavus</i>	19	90%
<i>Aspergillus oryzae</i>	2	10%

5.2.2. Az azonosított *Aspergillus* fajok filogenetikai analízise

Az azonosított *Aspergillus* fajokból kiválasztott kalmodulin génszekvenciákat összehasonlítottuk az NCBI adatbázisában található ismert *Aspergillus* fajok szekvenciáival. A tesztizolátumok CaM génszekvenciái alapján elkészített maximális valószínűségű (Maximum-likelihood, ML) filogenetikai fa az azonos fajhoz tartozó izolátumokat külön csoportokba rendezte (5.ábra). A filogenetikai fa kettő kládot tartalmaz. Az egyik ág (felső rész) dominánsan az *Aspergillus flavus* faj különböző izolátumait tartalmazza, míg a másik ág (alsó rész) mind *A. flavus*, mind *A. oryzae* izolátumokat is tartalmaz. Az izolátumok közül az INVT_A013, INVT_A009, INVT_A011 és több más izolátum egy csoportot alkotnak, amelyekhez más publikált szekvenciák is társulnak, mint az MN986407.1 és az MK451380.1. Ez a csoport viszonylag homogén. Az INVT_A010 és az INVT_A012 izolátumok külön ágon helyezkednek el, ami arra utal, hogy ezek kissé eltérnek a többi *A. flavus* izolátumtól. A fa alsó részén található izolátumok között szerepelnek az INVT_A014 és az INVT_A016, amelyek mind az *Aspergillus oryzae* fajhoz tartoznak. Az *A. oryzae* izolátumok közül az INVT_A016 és az MW117132.1 külön csoportot alkotnak, melyeket az ágak közötti nagyobb genetikai távolság különít el egymástól és a többi izolátumtól.



5. ábra: Maximum-likelihood dendrogram a *Aspergillus* spp. CaM szekvenciáihoz. A címkéken a fajok nevei szerepelnek, majd a törzs neve és/vagy száma, valamint a használt szekvenciának megfelelő GeneBank hozzáférési szám. Az ágak alatt látható azon replikált fák százalékos aránya (>70%), amelyekben a társított taxonok a bootstrap tesztben csoportosultak (1000 ismétlés).

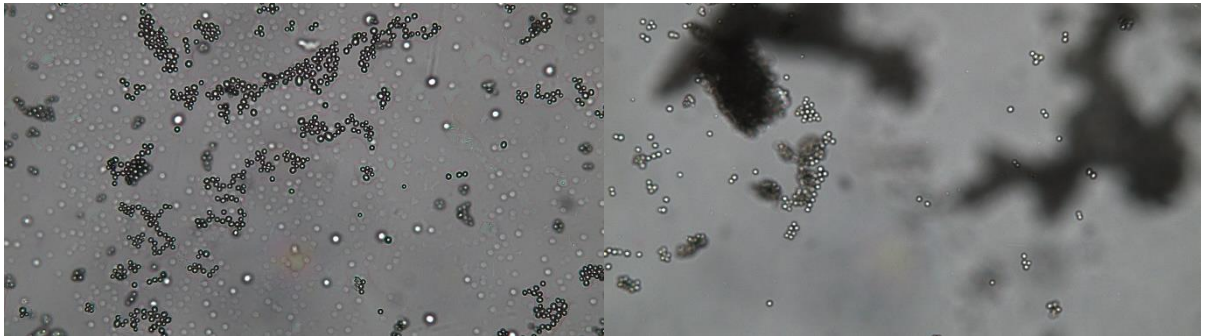
5.3. Az azonosított *Aspergillus* spp. izolátumok mikroszkópi vizsgálatai

A molekuláris genetikai vizsgálataink során meghatározott fajokat elemeztük morfológiai szempontból is. A vizsgálatok során mikroszkóppal elemeztük az előre meghatározott tiszta tenyészetekből készült preparátumokat, melyek morfológiai jellemzők alapján lettek kiválasztva. Ezek közül azokat a tenyészeteket szelektáltuk, amelyek a legjellemzőbb mikroszkópi képet mutatták az adott nemzetségre.

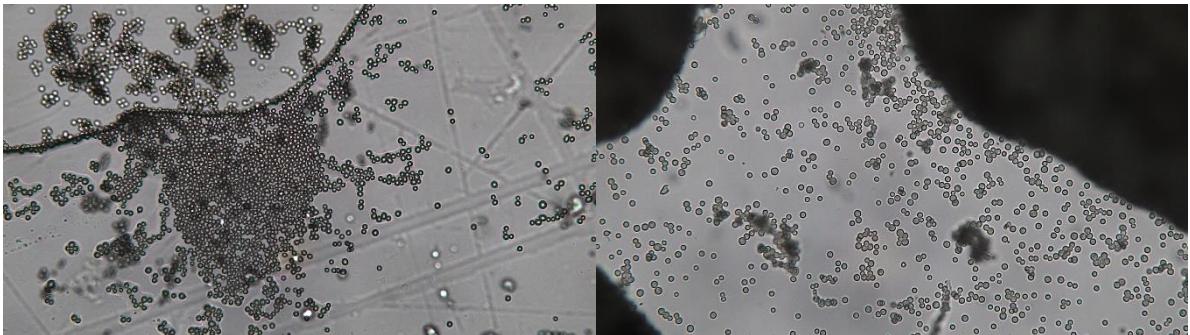
A makromorfológiai vizsgálata során, az azonosított *Aspergillus* fajok zöld színű telepeit észleltük, ahogyan az a 6. ábrán is látható. Mikroszkópos vizsgálataink során megfigyeltük, hogy a hosszú, egyenes konídiumtartók végén a konídiumok fejet képeznek, melyeket az 7-es és 8-as ábra szemlélteti. A kerek konídiumok láncokban rendeződnek, és gömb, bunkó vagy palack alakú, szélesedő végű konídiumtartókon helyezkednek el (9.ábra). Az *Aspergillus* fajok esetében a konídiumok és konídiumtartók morfológiája alapján nem lehet egyértelműen megkülönböztetni a fajokat a nemzetségen belül, továbbá a telepek pigmentáltsága is rendkívül hasonló a különböző fajok között.



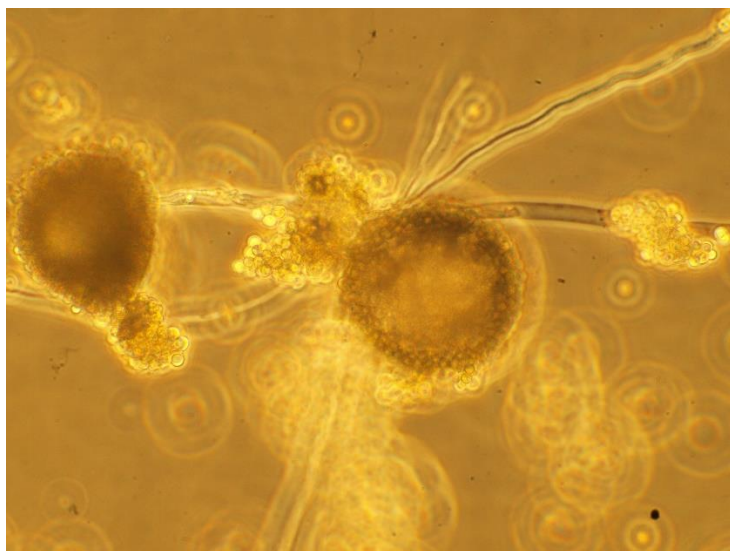
6. ábra: *Aspergillus* tenyészte PDA táptalajon (Fotó: Kőműves 2024)



7. ábra: Az *A. flavus* konídiumai (Fotó: Kőműves 2024)



8. ábra: Az *A. oryzae* konídiumai (Fotó: Kőműves 2024)



9. ábra: *Aspergillus* spp. konídiumtartó mikroszkópi képe (Fotó: Kőműves 2024)

5.4. Az *Aspergillus* izolátumok mikotoxin-termelését elősegítő gének azonosításának eredményei

A gélelektroforézis során vizsgáltuk 21 azonosított *Aspergillus* faj DNS-ét az aflatoxin-termeléssel összefüggésbe hozható gének, nevezetesen az *aflD*, *aflM*, *aflO*, *aflP*, *aflQ*, *aflR* és *aflS* indítószekvenciáival. Az *Aspergillus* izolátumok között jelentős eltéréseket figyeltünk meg a mikotoxin-termelésért felelős gének vizsgálata során. Az INVT_A007, INVT_A009, INVT_A019 és az INVT_A020-as minták esetében minden gén jelenlétét kimutattuk, tehát mindegyik mikotoxin-termelést elősegítő génre pozitív eredményt kaptunk.

A gélelektroforézis során az *aflD* gén jelenlétét egy 852 bp hosszúságú ampikon igazolta, amely 11 *Aspergillus flavus* és 2 *A. oryzae* izolátumban jelent meg (Melléklet – M2 – 10. és 11. ábra). Az *aflM* gén 470 bp hosszú célszekvenciáját 15 *A. flavus* és 2 *A. oryzae* DNS-ében azonosítottuk (Melléklet – M2 - 12. és 13. ábra) Az *aflO* gén jelenlétét 790 bp hosszú PCR-termék igazolta, amelyet 19 *A. flavus* és 1 *A. oryzae* esetében detektáltunk (Melléklet - M2 – 14. és 15. ábra). Az *aflP* gén jelenlétét 870 bp-nál mutattuk ki 13 *A. flavus* esetében (Melléklet – M2 – 16. és 17. ábra). Az *aflQ* gént, amely az aflatoxin-termeléssel van összefüggésben, 10 *A. flavus* DNS-ében tapasztaltuk (Melléklet – M2 - 18. és 19. ábra). Az *aflR* gén jelenlétét 1079 bp-nál detektáltuk, és ez 15 *A. flavus* és 2 *A. oryzae* mintában fordult elő (Melléklet – M2 - 20. és 21. ábra). Az *aflS* gén jelenléte 12 *A. flavus* és 2 *A. oryzae* esetében volt kimutatható, 684 bázispárnál (Melléklet – M2 - 22. és 23. ábra).

6. táblázat: A mikotoxin-termelésért felelős gének jelenléte *Aspergillus* izolátumokban. A táblázatban a pozitív eredményeket „+” jellel és zöld színnel jelöltük, ahol a primer sikeresen megsokszorozta a célszekvenciát. A „-” jelölés pedig azokat az eseteket mutatja, ahol a primer nem amplifikálta a célszekvenciát.

Ssz.	Tenyészet és DNS kód	Származási hely és genotípus kód	Faj	<i>AflD</i>	<i>AflM</i>	<i>AflO</i>	<i>AflP</i>	<i>AflQ</i>	<i>AflR</i>	<i>AflS</i>
1	INVT_A001	SL13	<i>Aspergillus flavus</i>	-	-	+	+	+	-	-
2	INVT_A002	SL13	<i>Aspergillus flavus</i>	+	+	+	+	-	+	+
3	INVT_A003	SL8	<i>Aspergillus flavus</i>	+	+	+	+	-	+	+
4	INVT_A004	SL13	<i>Aspergillus flavus</i>	-	-	+	-	-	-	-
5	INVT_A005	SN13	<i>Aspergillus flavus</i>	-	-	+	+	+	-	-
6	INVT_A006	SL13	<i>Aspergillus flavus</i>	-	-	+	-	-	-	-
7	INVT_A007	SL13	<i>Aspergillus flavus</i>	+	+	+	+	+	+	+
8	INVT_A008	S1	<i>Aspergillus flavus</i>	+	+	+	+	+	+	-
9	INVT_A009	S3	<i>Aspergillus flavus</i>	+	+	+	+	+	+	+
10	INVT_A010	S4	<i>Aspergillus flavus</i>	+	+	+	-	+	+	+
11	INVT_A011	SN13	<i>Aspergillus flavus</i>	+	+	+	-	-	+	+
12	INVT_A012	SL8	<i>Aspergillus flavus</i>	-	+	+	+	+	+	+
13	INVT_A013	SN1	<i>Aspergillus flavus</i>	+	+	+	+	-	+	+
14	INVT_A014	SL13	<i>Aspergillus oryzae</i>	+	+	-	-	-	+	+
15	INVT_A015	SL13	<i>Aspergillus flavus</i>	-	+	+	+	-	+	+
16	INVT_A016	SL4	<i>Aspergillus oryzae</i>	+	+	+	-	-	+	+
17	INVT_A017	SN9	<i>Aspergillus flavus</i>	-	+	+	-	-	+	-
18	INVT_A018	SL5	<i>Aspergillus flavus</i>	+	+	+	-	-	+	+
19	INVT_A019	SN13	<i>Aspergillus flavus</i>	+	+	+	+	+	+	+
20	INVT_A020	SN13	<i>Aspergillus flavus</i>	+	+	+	+	+	+	+
21	INVT_A023	SL12	<i>Aspergillus flavus</i>	-	+	+	+	+	+	-

6. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

6.1. A szemtermések belső fertőzöttségének vizsgálata

Bár a cirok alapú élelmiszerek egyre népszerűbbek, Magyarországon még mindig kevés kutatás áll rendelkezésre a szemes cirok szemterméséből izolált mikotoxin-termelő gombákról és azok toxinogén tulajdonságairól. A szemes cirokkal végzett vizsgálataink alapján megállapítottuk, hogy a minták jelentős részében mikotoxin-termelő gombák okozta belső fertőzöttséget találtunk. Az izolált gombák tiszta tenyészeinek vizsgálata során *Aspergillus* fajokat találtunk és vizsgáltunk a további kutatásaink során, ugyanakkor *Fusarium* fajok, *Penicillium* fajok és *Alternaria* fajok is előfordultak, bár kutatásaink nem terjedtek ki ezen nemzetségek részletes vizsgálatára, így az eredményben nem szerepelnek. Kange és munkatársai (2015) eredményei is megerősítik, hogy ezek a három mikotoxin-termelő nemzetség – *Aspergillus*, *Penicillium* és *Fusarium* – megjelenhet a cirok szemtermésekben, és belső fertőzöttséget okozhatnak, továbbá hazai kutatások is bizonyítják, hogy ezen nemzetségek megjelenhetnek hazai termesztési körülmények között (Szabó & Körösi 2024; Szabó et al. 2024). A belső szemfertőzöttséget befolyásolhatják egyes környezeti paraméterek is, mint például a termesztési technológia, biotikus tényezők és az elővetemény. A 2022-es termesztési év extrém aszályos időjárási viszonyai szintén hozzájárulhattak a szemtermések belső fertőzöttségi értékeinek változásához, mivel az *Aspergillus* fajok számára különösképp kedvező a csapadékmentes, tartósan magas hőmérsékleti időjárás (Amaike & Keller 2011).

6.2. Az izolált és azonosított mikotoxin-termelő gombafajok

Az *Aspergillus* fajok izolálása során 21 tiszta tenyészetet hoztunk létre, amelyek közül a molekuláris genetikai vizsgálatok alapján 19 esetben *A. flavus*-t és 2 esetben *A. oryzae*-t azonosítottunk. Mindkét faj a *Flavi* szekcióhoz tartozik, amely különösen fontos a mezőgazdaság, biotechnológia, valamint az emberi és állategészségügy szempontjából (Frisvad et al. 2018). Az *A. flavus* egy gyakran előforduló faj mezőgazdasági növényeken, amelyet világszerte számos helyről izolálnak, és aflatoxin-termelő képessége miatt jelentős veszélyt jelent az élelmiszer- és takarmánybiztonságra (Palencia et al. 2010; Riba et al. 2010). Ezzel szemben az *A. oryzae* faj nem rendelkezik aflatoxinogén tulajdonságokkal, így jelenléte biztonságosnak tekinthető, és a fermentációs iparban is széles körben alkalmazzák különböző erjesztési eljárásokhoz (Chang & Ehrlich 2010). Magyarországon is számos esetben azonosították az *A. flavus* fajt kukorica szemtermésből (Tóth et al. 2012; Dobolyi et al. 2013; Baranyi et al. 2015; Sebők et al. 2016). Egy 2012-es EFSA tudományos közlemény

figyelmeztetett az *Aspergillus* fajok növekvő előfordulására egyes gabonafélék szemterméseiben az extrém aszályos időjárás következtében (Battilani et al. 2012). Az ott felvázolt forgatókönyvek mára valósággá váltak, hiszen kutatásaink eredményei is azt mutatják, hogy az *Aspergillus* fajok térnyerése fokozódik, ami aflatoxin-szennyezettségük révén jelentős kockázatot jelent az élelmiszer- és takarmányláncra nézve.

6.3. Az izolált *Aspergillus* fajok aflatoxin-termelésben szerepet játszó génjeinek vizsgálata

Degola és munkatársai (2007), valamint Gallo és munkatársai (2012) kísérletei során különböző gének aflatoxin-termeléssel való összefüggését vizsgálták. Kutatásaink során az előzőekben említett módszerek alapján elemeztük az aflatoxin-termelés szempontjából legfontosabb gének jelenlétét a szemes cirokról izolált *Aspergillus* fajok esetében. Gallo és munkatársai 2012-es kísérletében az *aflQ* gént főként a nem aflatoxinogén izolátumokban találták meg nagy számban. Saját kísérleteink során az *aflQ* gént 10 alkalommal sikerült amplifikálni, ami arra utal, hogy ez a 10 *Aspergillus* faj valószínűleg a Gallo és munkatársai által 2012-ben leírt nem aflatoxinogén csoportba tartozik. Mivel azonban egyetlen gén jelenléte vagy hiánya önmagában nem határozza meg egyértelműen az aflatoxin-termelőképeséget, fontos a többi vizsgált gén eredményeinek alapos értékelése is.

Az *aflR* és *aflS* gének jelenlétét többen is szoros korrelációba hozták az aflatoxin-termelő képességgel (Degola et al. 2007; Gallo et al. 2012). Ezért a saját mintáinkban ezen gének jelenléte valószínűsíti az aflatoxin-termelés képességét. Kísérleteink során az *aflS* gént 14 mintában, míg az *aflR* gént 17 mintában sikerült amplifikálni. Degola és munkatársai 2007-es kísérletében ezen gének jelenléte nagy biztonsággal jelezte az aflatoxin-termelő képességet, így feltételezhető, hogy az általunk izolált *Aspergillus* fajok is képesek aflatoxin-termelésére. Fontos azonban megjegyezni, hogy ezeknek a géneknek az azonosítása az egyes mintákban nem jelenti egyértelműen az aflatoxin-termelő képességet, csak valószínűsíti azt, mivel Gallo és munkatársai (2012) csak a gének együttes jelenléte esetén detektáltak aflatoxin-termelést 2012-es kísérletükben. Kísérleteink során a gének együttes jelenlétét az INVT_A002, INVT_A003, INVT_A007, INVT_A009, INVT_A010, INVT_A011, INVT_A012, INVT_A013, INVT_A014, INVT_A015, INVT_A016, INVT_A018, INVT_A019, és az INVT_A020 mintákban tapasztaltuk.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A szemes cirok (*Sorghum bicolor* L. Moench) fontos takarmánynövény, amely egyre nagyobb népszerűségnek örvend Magyarországon. Azonban a cirok szemtermése érzékeny lehet toxintermelő gombák, különösen az *Aspergillus* nemzetség tagjai általi fertőzésre, amelyek súlyos mikotoxin-szennyeződést okozhatnak. A mikotoxinok, például az aflatoxinok-termelése élelmiszer-biztonsági és egészségügyi kockázatokat jelent, ezért elengedhetetlen a toxintermelő fajok és a mikotoxin-termelésért felelős gének azonosítása.

Kutatásaink során a cirok szemterméséből izolált *Aspergillus* fajok molekuláris genetikai vizsgálata során a mikotoxin-termelő gombák dominancia viszonyait, valamint fajszintű azonosítását végeztünk. Az *Aspergillus* fajok fajszintű meghatározása PCR alapú módszerekkel történt, melyek során fajspecifikus primereket használtunk a DNS amplifikációjához. A molekuláris genetikai azonosítások során 2 indítószekvencia párral dolgoztunk. Az *Aspergillus* nemzetségbe tartozó gombák esetében a kalmodulin génre (CaM) speciális indítószekvencia párokat (cmd5/cmd6 és CL1/CL2A) alkalmaztunk. A PCR-termékeket a Macrogen Europe segítségével tisztítottuk és Sanger-szekvenálást alkalmaztunk. A kapott szekvenciákat az NCBI adatbázissal hasonlítottuk össze. A vizsgálat során pozitív és negatív kontrollokat is használtunk, amelyeket agaróz gélben választottunk szét és értékeltünk. A PCR-vizsgálatok célja a mikotoxin-termeléséhez kapcsolódó gének jelenlétének kimutatása volt, különös tekintettel az aflatoxin-termelésében részt vevő strukturális és szabályozó génekre. A 21 izolátum között 19 *A. flavus* és 2 *A. oryzae* volt, amelyek mindegyikén az aflR, aflS, aflD, aflM, aflP, aflO és aflQ géneket vizsgáltuk. Végezetül a PCR-termékeket 1%-os agaróz gélben futtattuk, majd az eredményül kapott géleket UV fény alatt vizsgáltuk, és a Biorad rendszerrel, az ImageLab szoftver segítségével elemeztük.

A kutatás eredményei rávilágítanak arra, hogy a cirok szemtermésének *Aspergillus* fajok általi fertőzése jelentős élelmiszerbiztonsági kockázatot jelenthet, különös tekintettel az aflatoxinok szennyezésére. Az *Aspergillus flavus* és *A. oryzae* izolátumok jelenléte, valamint a toxintermelést elősegítő gének kimutatása hangsúlyozza a rendszeres monitoring és megelőző intézkedések fontosságát a cirok termelésében.

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném kifejezni hálámat Dr. Körösi Katalin Orsolyának, témavezetőmnek, a dolgozat megírásában nyújtott segítségéért.

Köszönöm Dr. Szabó Barbara Katalinnak, aki szakmai és baráti támogatásával végig mellettem állt, segítve, hogy ez a dolgozat megszülethessen, és lehetőséget adott egy rendkívül izgalmas és jelentős téma megismerésére.

Őszinte köszönetet szeretnék mondani barátaimnak, Bakó Fanninak és Horváth Boglárkának, akik támogatásával együtt értünk el életünk egyik fontos mérföldkövéhez.

Végül, de nem utolsósorban hálás vagyok családomnak és páromnak a folyamatos támogatásukért, amely nélkül nem jutottam volna el idáig.

9. MELLÉKLETEK

9.1. M1- ThermoScientific PCR KIT

ThermoScientific PCR KIT:

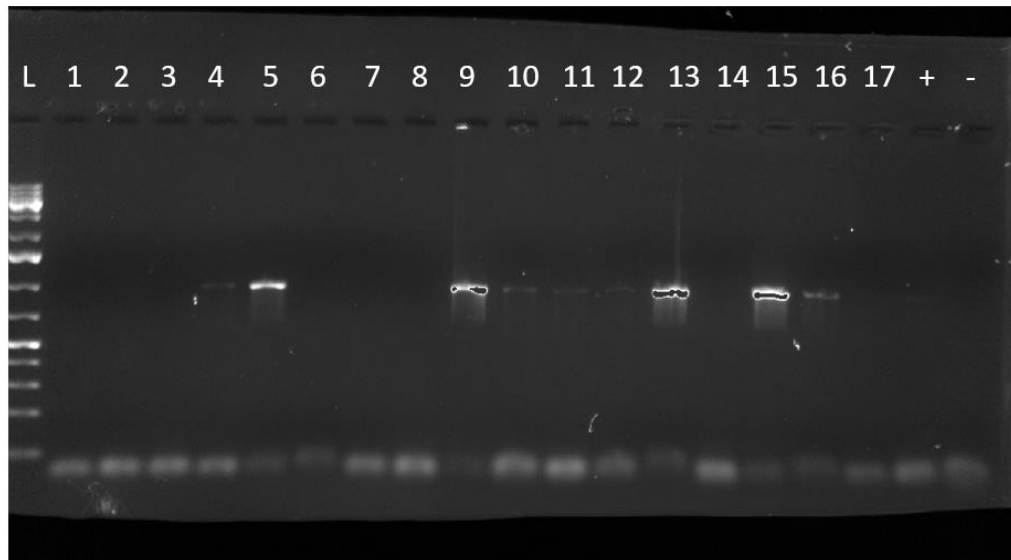
- DreamTaq Master Mix (2x)

ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep Kit:

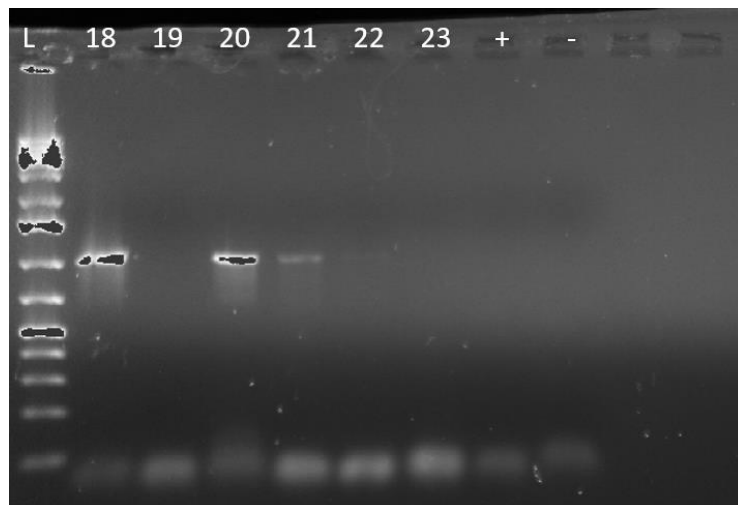
DNS kivonás:

1. A gomba micéliumait (100 mg) helyezünk a ZR BashingBeas Lysis Tube-ba és 750 µl Lysis Solutiont adunk hozzá.
2. Vortexeljük maximális erősségen 5 percig.
3. Centrifugába helyezzük és 1 percen keresztül 10.000 fordulatszámon centrifugáljuk.
4. A csövekből 400 µl felülúszót pipetázunk át a Zymo-Spin IV Spin Filter csőbe, alá gyűjtő csövet helyezünk.
5. Centrifugába helyezzük és 1 percen keresztül 7.000 fordulatszámon centrifugáljuk.
6. 1200 µl Fungal/Bacterial DNA Binding Buffert helyezünk az előbb használt gyűjtőcsőbe.
7. 800 µl oldatot pipetázunk át a gyűjtőcsővel egyberakott Zymo-Spin ICC Column filteres csövekbe.
8. Centrifugába helyezzük és 1 percen keresztül 10.000 fordulatszámon centrifugáljuk.
9. Ami a gyűjtőcsövekben összegyűlt kidobjuk és a 7. és 8. lépést megismételjük.
10. A Zymo-Spin ICC Column filteres csövekbe 200 µl DNA Pre-Wash Buffert helyezünk.
11. Centrifugába helyezzük és 1 percen keresztül 10.000 fordulatszámon centrifugáljuk.
12. A gyűjtőcsőbe került folyadékot ismét kiöntjük.
13. A Zymo-Spin ICC Column filteres csövekbe 500 µl Fungal/Bacterial DNA Washing Buffer-t helyezünk, majd ismét centrifugáljuk 1 percen keresztül 10.000 fordulatszámon.
14. A Zymo-Spin ICC Column csövet eppendorfbá áttesszük, pipetázunk rá 50 µl DNA Elution Puffert, centrifugáljuk. A DNS-kivonatunk elkészült, hogy a mintában lévő anyag ne bomoljon le, mélyhűtőben tároljuk.

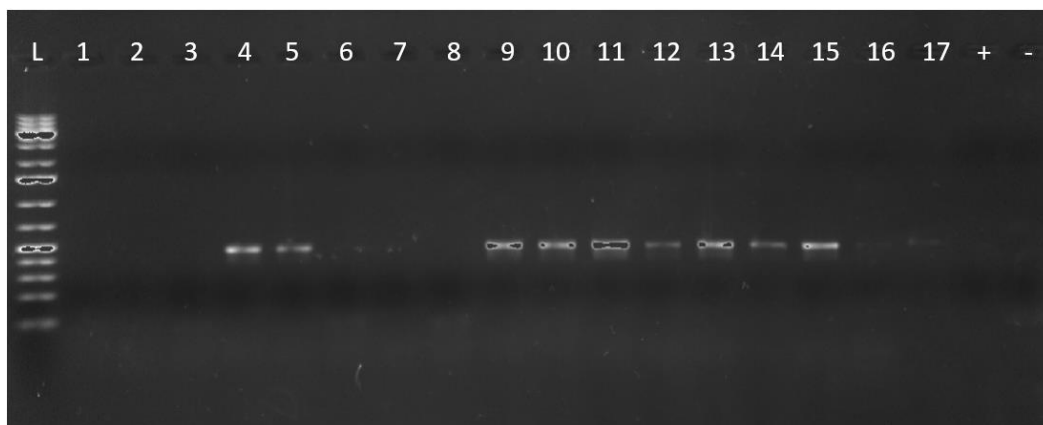
9.2. M2- Agaróz gél fotók – PCR reakciók



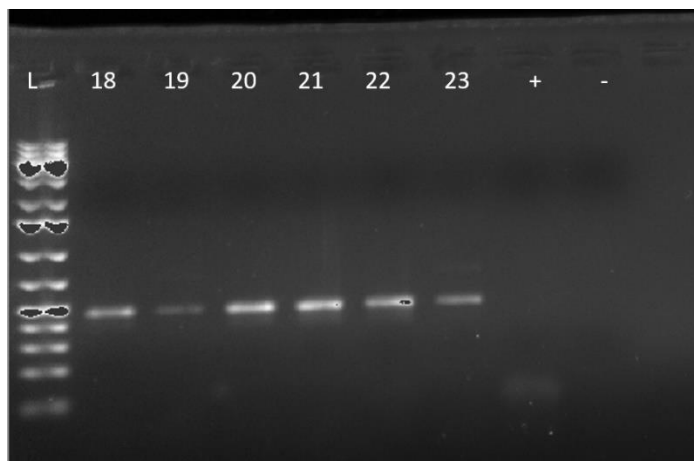
10. ábra: Az AfID génre specifikus primer párokkal kapott PCR termékek 1%-os agaróz gélben, 45 perces futtatási idővel, 10X TBE bufferrel, micéliumos izolátumokból kinyert DNS-sel az 1-17-es mintában, pozitív és negatív kontrollal. 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) indikációval (L). A várható amplifikációs termék 852 bp.



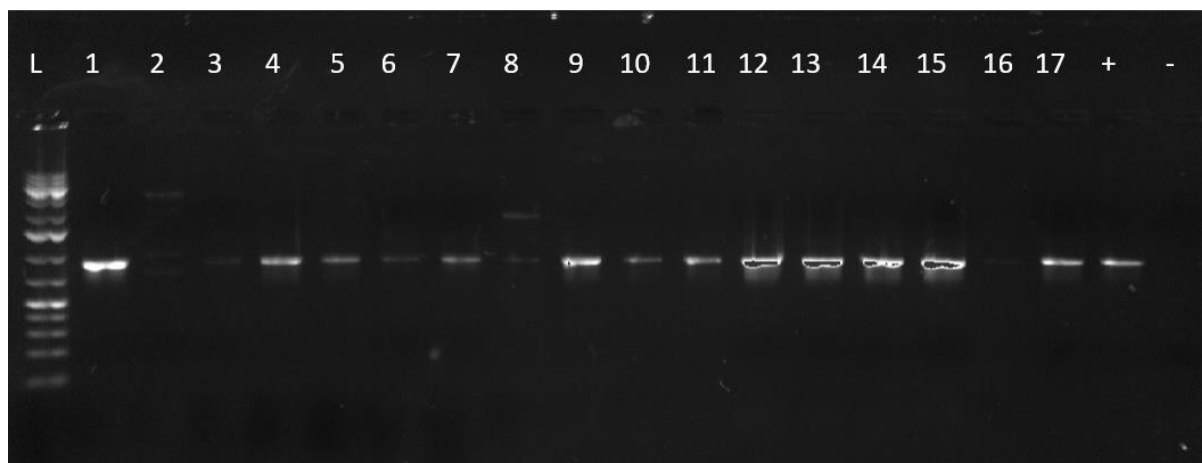
11. ábra: Az AfID génre specifikus primer párokkal kapott PCR termékek 1%-os agaróz gélben, 45 perces futtatási idővel, 10X TBE bufferrel, micéliumos izolátumokból kinyert DNS-sel az 1-17-es mintában, pozitív és negatív kontrollal. 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) indikációval (L). A várható amplifikációs termék 852 bp.



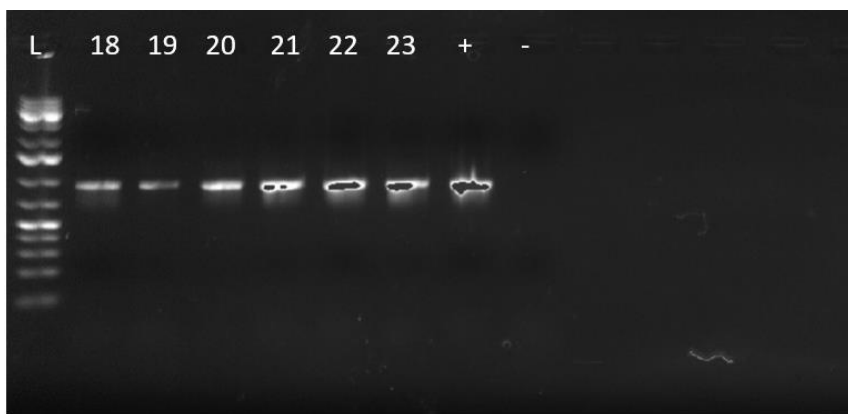
12. ábra: Az AfIM génre specifikus primer párokkal kapott PCR termékek 1%-os agaróz gélben, 45 perces futtatási idővel, 10X TBE bufferrel, micéliumos izolátumokból kinyert DNS-sel az 1-17-es mintában, pozitív és negatív kontrollal. 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) indikációval 134 (L). A várható amplifikációs termék 470 bp.



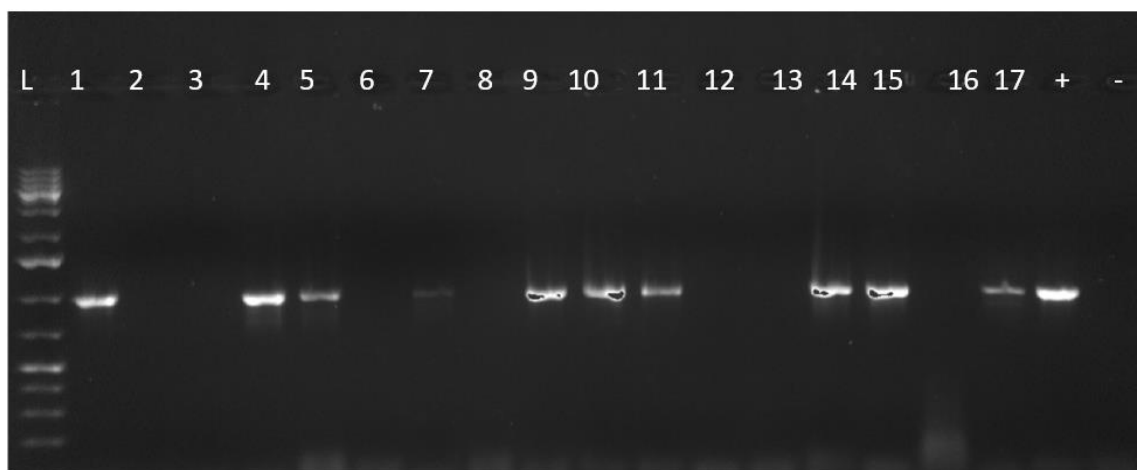
13. ábra: Az AfIM génre specifikus primer párokkal kapott PCR termékek 1%-os agaróz gélben, 45 perces futtatási idővel, 10X TBE bufferrel, micéliumos izolátumokból kinyert DNS-sel az 1-17-es mintában, pozitív és negatív kontrollal. 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) indikációval 134 (L). A várható amplifikációs termék 470 bp.



14. ábra: Az AfIO génre specifikus primer párokkal kapott PCR termékek 1%-os agaróz gélben, 45 perces futtatási idővel, 10X TBE bufferrel, micéliumos izolátumokból kinyert DNS-sel az 1-17-es mintában, pozitív és negatív kontrollal. 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) indikációval (L). A várható amplifikációs termék 790 bp.



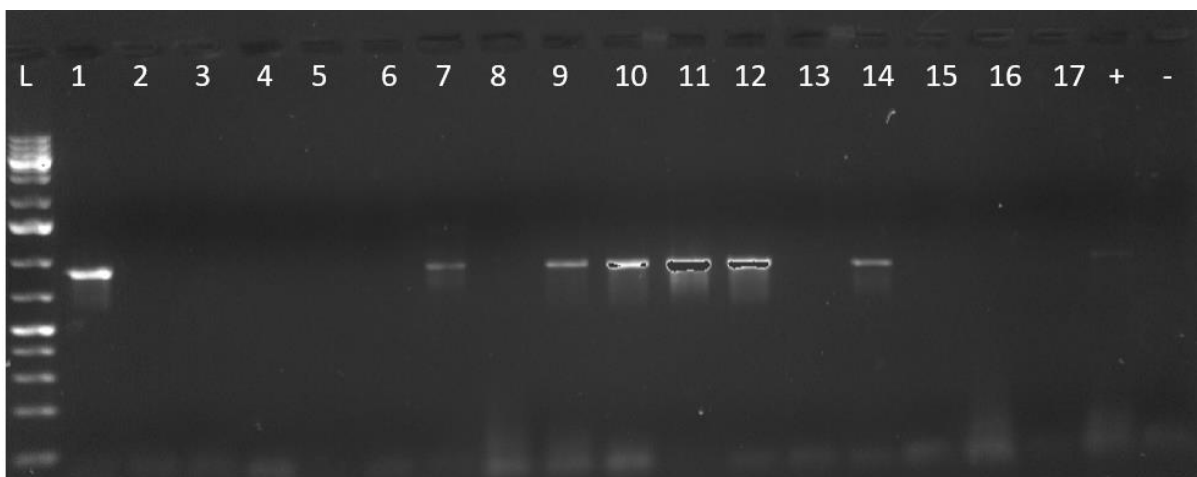
15. ábra: Az AflO génre specifikus primer párokkal kapott PCR termékek 1%-os agaróz gélben, 45 perces futtatási idővel, 10X TBE bufferrel, micéliumos izolátumokból kinyert DNS-sel az 1-17-es mintában, pozitív és negatív kontrollal. 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) indikációval (L). A várható amplifikációs termék 790 bp. A pozitív kontroll esetében nem amplifikálódott a célszekvencia.



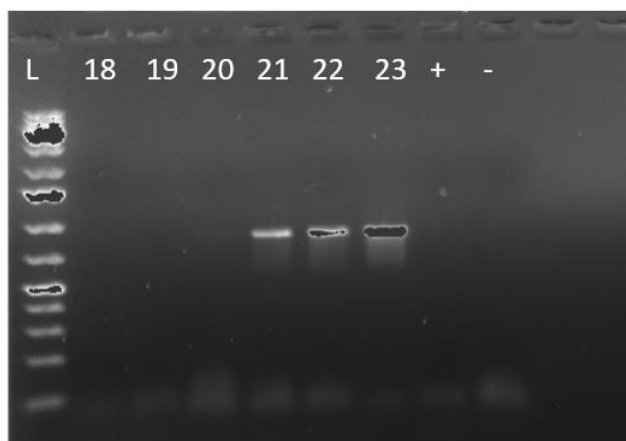
16. ábra: Az AflP génre specifikus primer párokkal kapott PCR termékek 1%-os agaróz gélben, 45 perces futtatási idővel, 10X TBE bufferrel, micéliumos izolátumokból kinyert DNS-sel az 1-17-es mintában, pozitív és negatív kontrollal. 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) indikációval (L). A várható amplifikációs termék 870 bp.



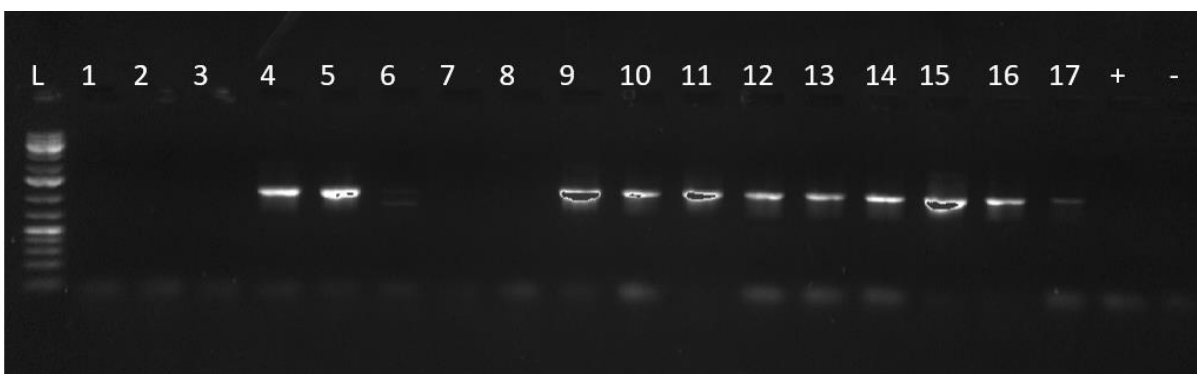
17. ábra: Az AflP génre specifikus primer párokkal kapott PCR termékek 1%-os agaróz gélben, 45 perces futtatási idővel, 10X TBE bufferrel, micéliumos izolátumokból kinyert DNS-sel az 1-17-es mintában, pozitív és negatív kontrollal. 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) indikációval (L). A várható amplifikációs termék 870 bp.



18. ábra: Az AflQ génre specifikus primer párokkal kapott PCR termékek 1%-os agaróz gélben, 45 perces futtatási idővel, 10X TBE bufferrel, micéliumos izolátumokból kinyert DNS-sel az 18-23-as mintában, pozitív és negatív kontrollal. 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) indikációval (L). A várható amplifikációs termék 757 bp. A pozitív kontroll esetében nem amplifikálódott a célszekvencia.



19. ábra: Az AflQ génre specifikus primer párokkal kapott PCR termékek 1%-os agaróz gélben, 45 perces futtatási idővel, 10X TBE bufferrel, micéliumos izolátumokból kinyert DNS-sel az 18-23-as mintában, pozitív és negatív kontrollal. 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) indikációval (L). A várható amplifikációs termék 757 bp. A pozitív kontroll esetében nem amplifikálódott a célszekvencia.



20. ábra : Az AflR génre specifikus primer párokkal kapott PCR termékek 1%-os agaróz gélben, 45 perces futtatási idővel, 10X TBE bufferrel, micéliumos izolátumokból kinyert DNS-sel az 1-17-es mintában, pozitív és negatív kontrollal. 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) indikációval (L). A várható amplifikációs termék 1079 bp. A pozitív kontroll esetében nem amplifikálódott a célszekvencia



21. ábra : Az AflR génre specifikus primer párokkal kapott PCR termékek 1%-os agaróz gélben, 45 perces futtatási idővel, 10X TBE bufferrel, micéliumos izolátumokból kinyert DNS-sel az 1-17-es mintában, pozitív és negatív kontrollal. 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) indikációval (L). A várható amplifikációs termék 1079 bp. A pozitív kontroll esetében nem amplifikálódott a célszekvencia.



22. ábra: Az AflS génre specifikus primer párokkal kapott PCR termékek 1%-os agaróz gélben, 45 perces futtatási idővel, 10X TBE bufferrel, micéliumos izolátumokból kinyert DNS-sel az 1-17-es mintában, pozitív és negatív kontrollal. 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) indikációval (L). A várható amplifikációs termék 684 bp. A pozitív kontroll esetében nem amplifikálódott a célszekvencia.



23. ábra: Az AflS génre specifikus primer párokkal kapott PCR termékek 1%-os agaróz gélben, 45 perces futtatási idővel, 10X TBE bufferrel, micéliumos izolátumokból kinyert DNS-sel az 1-17-es mintában, pozitív és negatív kontrollal. 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) indikációval (L). A várható amplifikációs termék 684 bp. A pozitív kontroll esetében nem amplifikálódott a célszekvencia.

9.3. M3- NCBI adatbázisba feltöltött szekvenciák és azok elérései

7. táblázat: A szemes cirok szemtermésekről izolált és azonosított *Aspergillus* fajok. A táblázat tartalmazza az agaróz gélben futtatott PCR termék számát (N°), az izolátum és DNS kódját (ID), a szemtermések származási helyét, amelyekről az adott gomba izolálásra került (származási hely), a származási hely és genotípus kódját, az azonosított fajt és az NCBI adatbázisához kapcsolódó elérési számot.

N°	ID	Származási hely	Származási hely és genotípus kódja	Faj	Referencia génbanki szám	NCBI elérési szám
127	INVT_A001	Apátfalva	SL13	<i>A. flavus</i>	MK451369	OR424708
126	INVT_A002	Apátfalva	SL13	<i>A. flavus</i>	LR215864	OR424709
125	INVT_A003	Mezőhegyes	SL8	<i>A. flavus</i>	MK451369	OR424710
124	INVT_A004	Apátfalva	SL13	<i>A. flavus</i>	LR215899	OR424711
118	INVT_A005	Apátfalva	SN13	<i>A. flavus</i>	LR215864	OR424712
117	INVT_A006	Apátfalva	SL13	<i>A. flavus</i>	LR215899	OR424713
116	INVT_A007	Apátfalva	SL13	<i>A. flavus</i>	MK451369	OR424714
112	INVT_A008	Apátfalva	S1	<i>A. flavus</i>	MT001879	OR424715
111	INVT_A009	Apátfalva	S3	<i>A. flavus</i>	MK451380	OR424716
109	INVT_A010	Apátfalva	S4	<i>A. flavus</i>	MN986409	OR424717
105	INVT_A011	Apátfalva	SN13	<i>A. flavus</i>	MN986409	OR424718
100	INVT_A012	Mezőhegyes	SL8	<i>A. flavus</i>	MG826023	OR424719
99	INVT_A013	Adács	SN1	<i>A. flavus</i>	MN986407	OR424720
96	INVT_A014	Apátfalva	SL13	<i>A. oryzae</i>	MW117132	OR424721
94	INVT_A015	Apátfalva	SL13	<i>A. flavus</i>	MK451369	OR424722
93	INVT_A016	Hódmezővásárhely	SL4	<i>A. oryzae</i>	MW117132	OR424723

90	INVT_A017	Nagyréde	SN9	<i>A. flavus</i>	MG826023	OR424724
84	INVT_A018	Kapoly	SL5	<i>A. flavus</i>	MG826047	OR424725
83	INVT_A019	Apátfalva	SN13	<i>A. flavus</i>	MG826023	OR424726
82	INVT_A020	Apátfalva	SN13	<i>A. flavus</i>	LR215864	OR424727
67	INVT_A023	Tüskevár	SL12	<i>A. flavus</i>	MT001879	OR424728

10. HIVATKOZÁSOK

1. http1: Gabonakutató. <https://www.gabonakutato.hu/hu/kukorica-es-cirokfelek-nemesitese> (2023)
2. http2: Cabi. <https://www.cabi.org/plantwiseplus/resources/> (2023)
3. Mycobank. <https://www.mycobank.org/Simple%20names%20search> (2024)
4. FAOSTAT. <https://www.fao.org/faostat/en/#home> (2024. április).
5. Al-Jaal, B., Salama, S., Al-Qasmi, N., & Jaganjac, M. (2019). Mycotoxin contamination of food and feed in the Gulf Cooperation Council countries and its detection. *Toxicon*, 171, 43-50.
6. Amadi, J. E., & Adeniyi, D. O. (2009). Mycotoxin production by fungi isolated from stored grains. *African Journal of Biotechnology*, 8(7).
7. Amaike, S., & Keller, N. (2011). *Aspergillus flavus*. *Annual Review of Phytopathology*, 49(1): 107-133.
8. Anitha, K., Das, I., Holajjer, P., Sivaraj, N., Ravinder Reddy, C., & Balijepalli, S. B. (2020). Sorghum Diseases: Diagnosis and Management. old.: 568-608.
9. Arslan, M. P., Hafiz, H. A., & Bhagirath, S. C. (2016. 04. 30). Weed management in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] using crop competition: A review. *Crop protection*, old.: 74-75.
10. *Aspergillus P. Micheli ex Haller, Historia stirpium indigenarum Helvetiae inchoata* 3: 113 (1768)
11. Balázs, K., Basky, Z., Bogya, S., Haltrich, A., Jenser, G., Kozák, F., . . . Szalay-Marzsó, L. (2003). *A szántóföldi és kertészeti növények kártevői*. Budapest: Mezőgazda Kiadó.
12. Baranyi, N., Despot, D. J., Palágyi, A., Kiss, N., Kocsubé, S., Szekeres, A., Kecskeméti, A., Bencsik, O., Vagvölgyi, C., Segvic Klaric, M., Varga, J. (2015): Identification of *Aspergillus* species in Central Europe able to produce G-type aflatoxins. *Acta Biologica Hungarica*, 66 339-347. p.
13. Baranyi N. (2016): Mezőgazdasági és klinikai szempontból jelentős aflatoxin-termelő *Aspergillus* izolátumok jellemzése és genetikai variabilitásának vizsgálata, doktori értekezés, Szegedi Tudományegyetem, Szeged 116 p.
14. Battilani, P., Rossi, V., Giorni, P., Pietri, A., Gualla, A., Van der Fels-Klerx, H. J., Booji, A., Moretti, A., Logrieco, A., Miglietta, F., Toscano, P., Miraglia, M., De Santis, B., Brera, C. (2012): Modelling, predicting and mapping the emergence of aflatoxins in cereals in the EU due to climate change. EFSA Supporting Publications, 9 (1) 223E.
15. Bennett, J. W., Klich, M. (2003): Mycotoxins, *Clinical Microbiology Reviews*, 16 497-516. p.
16. Berenji, J., & Dahlberg, J. (2004). Perspectives of Sorghum in Europe. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 332-338.p.
17. Chang, P.K., Ehrlich, K.C. (2010): What does genetic diversity of *Aspergillus flavus* tell us about *Aspergillus oryzae*?. *International Journal of Food Microbiology*, 138 (3) 189-199. p.
18. Chhaya, R. S., O'Brien, J., Cummins, E. (2022): Feed to fork risk assessment of mycotoxins under climate change influences-recent developments. *Trends in Food Science & Technology*, 126 126-141. p

19. Chhikara, N., Abdulahi, B., Munezero, C., Kaur, R., Singh, G. and Panghal, A. (2019): Exploring the nutritional and phytochemical potential of sorghum in food processing for food security, *Nutrition & Food Science*, 49 (2) 318-332. p.
20. Degola F, Berni E, Dall'Asta C., Spotti E., Marchelli R., Ferrero I és Restivo F. M. (2007): A multiplex RT-PCR approach to detect aflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus*, *Journal of Applied Microbiology*, 103(2): 409-417.
21. Dobolyi, C. S., Sebők, F., Varga, J., Kocsubé, S., Szigeti, G., Baranyi, N., Szécsi, Á., Tóth, B., Varga, M., Kriszt, B., Szoboszlai, S., Krifaton, C., Kukolya, J. (2013): Occurrence of aflatoxin producing *Aspergillus flavus* isolates in maize kernel in Hungary. *Acta Alimentaria*, 42 (3) 451-459. p
22. Dr. Rajki, E., & Dr. Palágyi, A. (2017. 03. 03.). Szemescirok termesztési technológia. Szeged.
23. Dr.Sárvári, M. (2011). Egyéb, alternatív gabonynövények termesztése.
24. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), Schrenk, D., Bignami, M., Bodin, L., Chipman, J. K., del Mazo, J., ... & Wallace, H. (2020). Risk assessment of aflatoxins in food. *EFSA journal*, 18(3), e06040.
25. Egbuta, M. A., Mwanza, M., & Babalola, O. O. (2017). Health risks associated with exposure to filamentous fungi. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(7): 719.
26. 2023/915 EK rendelet (2023.április 25.) az élelmiszerekben előforduló egyes szennyező anyagok felső határértékeinek meghatározásáról
27. 2024/1038 EK rendelete (2024. április 9.) az (EU) 2023/915 rendeletnek az élelmiszerekben előforduló T-2 és HT-2 toxin felső határértékei tekintetében történő módosításról
28. Fall, R., Cisse, M., Sarr, F., Kane, A., Diatta, C., & Diouf, M. (2016). Production and use Sorghum: a literature review. *J Nutr Health Food Sci*, 4(1), 1-4.
29. Frisvad, J., Hubka, V., Ezekiel, C., Hong, S.-B., Nováková, A., Chen, A., Arzanlou, M., Larsen, T., Sklenář, F., Mahakarnchanakul, W. (2018): Taxonomy of *Aspergillus* section Flavi and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. *Studies in Mycology*, 93 (1) 1–63. p
30. Gallo A., Stea G., Battilani P. F., Logrieco A. és Perrone G. (2012): Molecular characterization of an *Aspergillus flavus* population isolated from maize during the first outbreak of aflatoxin contamination in Italy, *Phytopathologia Mediterranea*, 51(1): 198-206.p.
31. Guo, C., Cui, W., Feng, X., Zhao, J., & Lu, G. (2011). Sorghum insect problems and Managementf. *Journal of integrative plant biology*, 53(3), 178-192.p.
32. Halmos B., Á. (2022. 04. 01). Gluténmentes cirokcipó vagy ciroktakarmány - ez a jövő? *Kistermelők lapja*, old.: 199.
33. Hong, S.B., Cho, H.S., Shin, H.D., Frisvad, J.C., Samson, R.A. (2006): Novel *Neosartorya* species isolated from soil in Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56 (2) 477-486. p.
34. Horn, B., Ramirez-Prado, J., & Carbone, I. (2017). The sexual state of *Aspergillus parasiticus*. *Mycologia*, 275-280.p.

35. Ismaiel, A., & Papenbrock, J. (2015). Mycotoxins: Producing Fungi and Mechanisms of Phytotoxicity. *Agriculture*, 492.
36. Ismaiel, A. A., & Papenbrock, J. (2015). Mycotoxins: producing fungi and mechanisms of phytotoxicity. *Agriculture*, 5(3), 492-537.p.
37. Jevcsák, S., & Sipos, P. (2016. 3. 26). A cirok és a köles – mint alternatív gabonafélék – táplálkozás-élettani hatásai. *Agrártudományi Közlemények*, (69), 91-95.p.
38. Jóvér, J., & Radócz, L. (2015). Evaluation of postemergent weed control in the case of forage sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Magyar Gyomkutatás és Technológia*, 43-44.p.
39. Kange, A.M., Cheruiyot, E.K., Ogendo, J.O., Arama, P.F. (2015): Effect of sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) grain conditions on occurrence of mycotoxin-producing fungi. *Agriculture & Food Security*, 4 1-8.p.
40. Kiss, J., Zanker, A., & Eke, I. (2017). Az integrált növényvédelem nyolc alapelve. *Növényvédelem*, 429-432.p.
41. Khlangwiset P. és Wu F. (2010): Costs and efficacy of public health interventions to reduce aflatoxin-induced human disease, *Food Additives & Contaminants: Part A*, 27(7): 998-1014.
42. Kovács M. (2010): Aktualitások a mikotoxin kutatásban, Szent István Egyetem, Egyetemi jegyzet, Gödöllő, 156p.
43. Kovács, M. (2018). Mikotoxinok hatása az életminőségünkre. *Acta Agraria Kaposváriensis*, 22(2), 33-45.p.
44. Leslie, J.F., Summerell, B.A. (2006): *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing, Oxford, UK. 388. p.
45. Leslie, J. F., & Logrieco, A. (Eds.). (2014). *Mycotoxin reduction in grain chains*. John Wiley & Sons.
46. Leslie, J.F., Moretti, A., Mesterházy, Á., Ameye, M., Audenaert, K., Singh, P.K., RichardForget, F., Chulze, S.N., Del Ponte, E.M., Chala, A., Battilani, P., Logrieco, A. (2021): Key Global Actions for Mycotoxin Management in Wheat and Other Small Grains. *Toxins*, 13 (10) 725. p.
47. Machida, M., Yamada, O., & Gomi, K. (2008). Genomics of *Aspergillus oryzae*: learning from the history of Koji mold and exploration of its future. *DNA research*, 15(4), 173-183.p.
48. Machida, M., Asai, K., Sano, M., Tanaka, T., Kumagai, T., Terai, G., Kusumoto, K., Arima, T., Akita, O., Kashiwagi, Y., Abe, K., Gomi, K., Horiuchi, H., Kitamoto, K., Kobayashi, T., Takeuchi, M., Denning, D. W., Galagan, J. E., Nierman, W. C., Yu, J., Archer, D. B., Bennett, J. W., Bhatnagar, D., Cleveland, T. E., Fedorova, N. D., Gotoh, O., Horikawa, H., Hosoyama, A., Ichinomiya, M., Igarashi, R., Iwashita, K., Juvvadi, P. R., Kato, M., Kato, Y., Kin, T., Kokubun, A., Maeda, H., Maeyama, N., Maruyama, J., Nagasaki, H., Nakajima, T., Oda, K., Okada, K., Paulsen, I., Sakamoto, K., Sawano, T., Takahashi, M., Takase, K., Terabayashi, Y., Wortman, J. R., Yamada, O., Yamagata, Y., Anazawa, H., Hata, Y., Koide, Y., Komori, T., Koyama, Y.,

- Minetoki, T., Suharnan, S., Tanaka, A., Isono, K., Kuhara, S., Ogasawara, N. and Kikuchi, H. 2005, Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*, *Nature*, 438, 1157–1161.p.
49. Marroquín-Cardona, A. G., Johnson, N. M., Phillips, T. D., & Hayes, A. W. (2014). Mycotoxins in a changing global environment—a review. *Food and Chemical Toxicology*, 69, 220-230.p.
 50. McClure, A., Ebelhar, S., Lee, C., Nafziger, E., & Wyciskalla, T. (2010). Sorghum checkoff. In *United Sorghum Checkoff Program's Mid-South Production Handbook* (old.: 46-50). Kansas.
 51. Meena, K., Visarada, K., & Meena, D. (2022). Sorghum bicolor (L.) Moench a multifarious crop -fodder to therapeutic potential and biotechnological applications: A future food for the millennium. *Future foods*, 1-14.p.
 52. Mézes M. (2006): Penészgombák és mikotoxinok a takarmányokban és az ellenük való védekezés lehetőségei Agrárágazat, Szent István Egyetem, Egyetemi jegyzet, Gödöllő
 53. Mohammed, A., Bekeko, Z., Yusufe, M., Sulyok, M., & Krska, R. (2022). Fungal species and multi-mycotoxin associated with post-harvest Sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) Grain in Eastern Ethiopia. *Toxins*, 14(7), 473.p.
 54. Navnidhi, C., Burale, A., Claudia, M., Ravinder, K., Gurpreet, S., & Anil, P. (2018). 08 16). Exploring the nutritional and phytochemical potential of sorghum in food processing for food security. *Nutrition & Food Science*. India.
 55. Nydia E., Patricia I., Ledesma-Osuna, A., Benjamin, Rosario M., & Serna-Saldívar, S. (2013). Effect of defatting and decortication on distribution of fatty acids, phenolic and antioxidant compounds in sorghum (*Sorghumbicolor*) bran fractions. *International Journal of Food Science and Technology*.
 56. O'Donnell, K. (2000): Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca*-*Fusarium solani* species complex. *Mycologia*, 92 (5) 919-938.p.
 57. Okosun, O., Allen, K., Glover, J., & Reddy, G. (2020). Biology, Ecology, and Management of Key Sorghum Insect Pests. *Journal of Integrated Pest Management*, 12(1), 4.
 58. Palencia, E.R., Hinto, D.M., Bacon, C.W. (2010): The black *Aspergillus* species of maize and peanuts and their potential for mycotoxin production, *Toxins*, 2 (4) 399-416. p.
 59. Perrone, G., Ferrara, M., Medina, A., Pascale, M., Magan, N. (2020): Toxigenic Fungi and Mycotoxins in a Climate Change Scenario: Ecology, Genomics, Distribution, Prediction and Prevention of the Risk. *Microorganisms*, 8 (10) 1496. p.
 60. Petrányi, A., Boros, N., & Bodnár, I. (2016). Élelmiszerek mikotoxin szennyezettségének értékelése. *International Journal of Engineering and Management Sciences*, 1(2), 90-96.p.
 61. Péterfy, C. (2020. 01-03.). Takarmánycirok-nemesítés a Gabonakutatónál . *Magyar Mezőgazdaság*, 676.p.
 62. Péteri, A. Z. (2009). Mikroszkópikus gombák mikotoxin-bontó képességének vizsgálata. *Doktori értekezés*, 116 p. Szeged: Szegedi Tudomány Egyetem.
 63. Riba, A., Bouras, N., Mokrane, S., Mathieu, F., Lebrihi, A., Sabaou, N. (2010): *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxins in Algerian wheat and derived products. *Food and Chemical Toxicology*, 48 (10) 2772-2777.p.
 64. Sárvári, M. (2011). Egyéb, alternatív gabonanövények termesztése. 64-65.p.
 65. Schuster, E., Dunn-Coleman, N., Frisvad, J., & M. van Dijck, P. (2002). On the safety of *Aspergillus niger* – a review. *Appl Microbiol Biotechnol*, 59:426–435.p.

66. Sebők, F., Dobolyi, C., Zágoni, D., Risa, A., Krifaton, C., Hartman, M., Cserhádi, M., Szoboszlai, S., Kriszt, B. (2016): Aflatoxigenic *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* strains in Hungarian maize fields. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 63 (4) 491-502. p.
67. Sharma, H. (1993. 02. 12). Host-plant resistance to insects in sorghum and its role in integrated pest management . *CROP PROTECTION*, 11-19.p.
68. Scherm, B., Palomba, M., Serra, D., Marcello, A., & Migheli, Q. (2005). Detection of transcripts of the aflatoxin genes aflD, aflO, and aflP by reverse transcription–polymerase chain reaction allows differentiation of aflatoxin-producing and non-producing isolates of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *International journal of food microbiology*, 98(2), 201-210.p.
69. SORGHUM ID (2018): <https://sorghum-id.com/content/uploads/2018/09/synthese-sorgho-grain-hu-bd.pdf> (Letöltés dátuma: 2023.10.24.)
70. Spurlock, T., Faske, T., & Kelley, J. (2018). Diseases of Grain Sorghum. 37-45.p.
71. Susca, A., Stea, G., Mulè, G., & Perrone, G. (2007). PCR identification of *Aspergillus niger* and *Aspergillus tubingensis* based on calmodulin gene. *Food Additives and Contaminants*, 24 (10) 1154-1160. p.
72. Szabó, M. (2014). *Takarmányok mikotoxin szennyezettségének vizsgálata Magyarországon, különös tekintettel azok Aflatoxin-B1, Zearalenon, T-2 toxin, valamint a Deoxinivalenol tartalmára 2013 évben* (Doctoral dissertation).
73. Szabóné, T. H. (2018). *Fusarium mikotoxin szennyezettség alakulása Magyarországon különös tekintettel a klímaváltozásra* (Doctoral dissertation, Szent István Egyetem (2000-2020)).
74. Szabó, B. K., & Körösi, K. (2024). Storage mycotoxin producing fungi in Hungarian sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) samples—molecular approach of *Fusarium* spp. *Journal of Plant Pathology*, 1-7.p.
75. Szabó, B.K., Atanasova, V., Ducos, C., Kismányoky, A., Pinson-Gadais, L., Ponts, N., Savignac, J., Körösi, K., & Richard-Forget, F. (2024). Characterisation of sorghum cultivated in Hungary: potential health risk resulting from the occurrence of toxigenic fungi and effect of endogenous lipophilic antioxidants on mycotoxin production. *World Mycotoxin Journal*, 17(2), 131-148.p.
76. Szigeti, G. (2018). Az *Aspergillus* nemzetség átfogó filogenetikai analízise; potenciális mikotoxin-termelő és opportunistá patogén fekete *Aspergillus* törzsek jellemzése. 90 p. Szeged: Szegedi Tudományegyetem.
77. Szukács, S., & Geösel, G. (2019). Mikotoxinok fenyegetése a gombatermesztésben. *Kertgazdasag-Horticulture*, 51(4).
78. Tesso, T., Perumal, R., Little, C., Adeyanju, A., Radwan, G., Prom, L., & Magil, C. (2012). Sorghum Pathology and Biotechnology - A Fungal Disease Perspective: Part II. Anthracnose, Stalk Rot, and Downy Mildew. *The European Journal of Plant Science and Biotechnology*, 31-41.p.

79. Tesso, T., Prom, L., Little, C., Perumal, R., Odvody, G., & Magill, C. (2011). Sorghum Pathology and Biotechnology - A Fungal Disease Perspective: Part I. Grain Mold, Head Smut, and Ergot. *The European Journal of Plant Science and Biotechnology*, 11-26.p.
80. Tóth, B., Török, O., Kótai, É., Varga, M., Toldiné Tóth, É., Pálfi, X., Háfra, E., Varga, J., Mesterházy, Á. (2012): Role of Aspergilli and Penicillia in mycotoxin contamination of maize in Hungary. *Acta Agronomica Hungarica*, 60 (2) 143-149. p
81. Varga J., Szigeti Gy., Baranyi N., Szekeres A. és Kocsubé S. (2014): Mikotoxinok, mikotoxinogén gombák, micetizmusok, Szegedi Tudományegyetem, Egyetemi jegyzet, Szeged, 99p.
82. Visarada, K. B. R. S., & Aruna, C. (2019). Sorghum: A bundle of opportunities in the 21st century. In *Breeding Sorghum for diverse end uses*. Woodhead Publishing.1-14.p.
83. Yang, M., Zhu, Z., Zhuang, Z., Bai, Y., Wang, S., & Ge, F. (2021). Proteogenomic characterization of the pathogenic fungus *Aspergillus flavus* reveals novel genes involved in aflatoxin production. *Molecular & Cellular Proteomics*, 20.
84. Zain, M. E. (2011). Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi chemical society*, 15(2), 129-144.p.
85. Zhang, Y. -Q., Wilkinson, H., Keller, N. P. and Tsitsigiannis, D. 2005, Secondary metabolite gene clusters, In: An, Z. (ed.), *Handbook of Industrial Microbiology*. Marcel Dekker: New York, 355–386.p.

11. NYILATKOZATOK

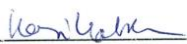
NYILATKOZAT

KÖRÖVES KATA (név) (hallgató Neptun azonosítója: 115K5V)
konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a diplomadolgozatot áttekintettem, a hallgatót az
irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól
tájékoztattam.

A diplomadolgozatot a záróvizsgán történő védeésre javaslom / nem javaslom¹.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem²

Kelt: 2024 év 10 hó 21 nap


belső konzulens

¹ A megfelelő aláhúzendő.

² A megfelelő aláhúzendő.

NYILATKOZAT

a diplomadolgozat nyilvános hozzáféréséről és eredetiségéről

A hallgató neve: Kőműves Kata
A Hallgató Neptun kódja: H1SKSV
A dolgozat címe: Szemes cirok (*Sorghum bicolor* L. Moench) szemterméséből izolált *Aspergillus* fajok faj szintű azonosítása, és a bennük előforduló mikotoxin-termelést elősegítő gének detektálása
A megjelenés éve: 2024
A konzulens intézetének neve: Növényvédelmi Intézet
A konzulens tanszékének a neve: Integrált Növényvédelmi Tanszék

Kijelentem, hogy az általam benyújtott diplomadolgozat egyéni, eredeti jellegű, saját szellemi alkotásom. Azon részeket, melyeket más szerzők munkájából vettem át, egyértelműen megjelöltem, és az irodalomjegyzékben szerepeltettem.

Ha a fenti nyilatkozattal valótlan állítottam, tudomásul veszem, hogy a záróvizsga-bizottság a záróvizsgából kizár és a záróvizsgát csak új dolgozat készítése után tehetek.

A leadott dolgozat, mely PDF dokumentum, szerkesztését nem, megtekintését és nyomtatását engedélyezem.

Tudomásul veszem, hogy az általam készített dolgozatra, mint szellemi alkotás felhasználására, hasznosítására a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem mindenkor szellemi tulajdon-kezelési szabályzatában megfogalmazottak érvényesek.

Tudomásul veszem, hogy dolgozatom elektronikus változata feltöltésre kerül a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem MATER Hallgatói Dolgozatok repozitóriumba. Tudomásul veszem, hogy a megvédett és

- nem titkosított dolgozat a védést követően
- titkosításra engedélyezett dolgozat a benyújtásától számított 5 év eltelte után

nyilvánosan elérhető és kereshető lesz az Egyetem MATER Hallgatói Dolgozatok repozitóriumban.

Kelt: 2024 év 10 hó 21 nap

Kőműves Kata
Hallgató aláírása