

Fekete Aspergillus fajok szerepe az élelmiszerbiztonságban és humán egészségügyben (mint mikotoxin termelők, allergének és patogének) hazánkban (azonosító: 84077)

Zárójelentés

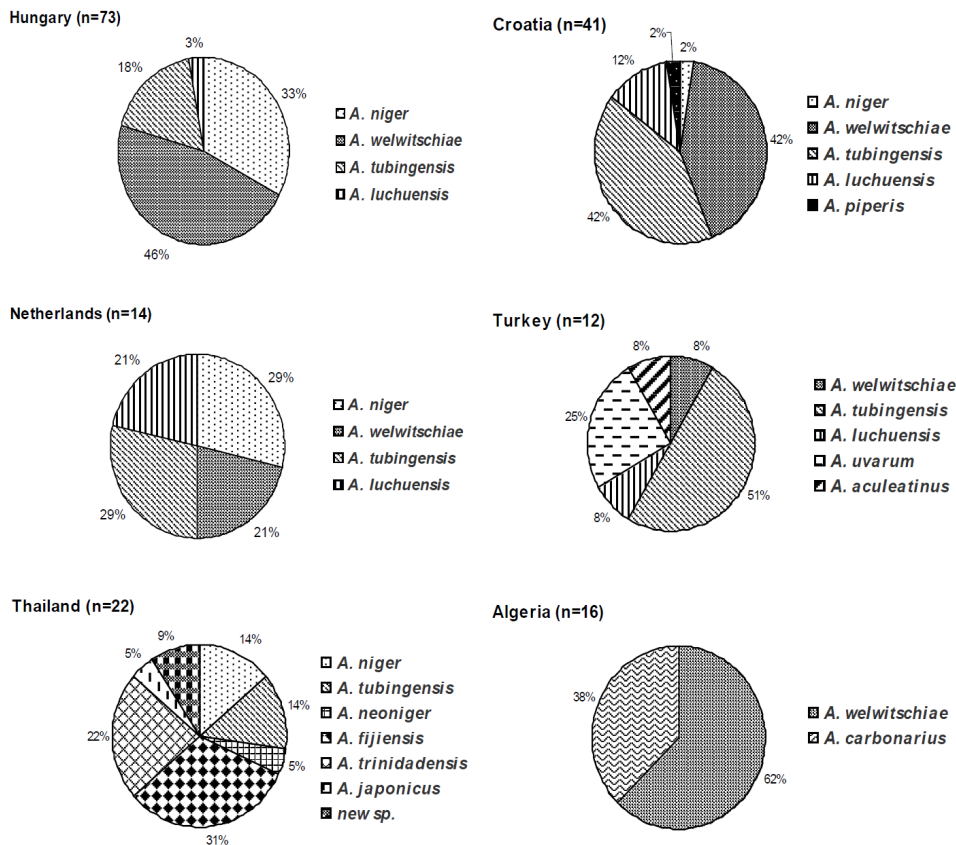
Munkánk során a fekete Aspergillus fajok előfordulását és fajeloszlását vizsgáltuk különböző mezőgazdasági termékeken és beltéri levegőben. A törzsek izolálását DRBC agar lemezekon végeztük. Tiszta tenyészeteket hoztunk létre, majd DNS kivonást végeztünk EpiCentre DNS kivonó kit segítségével. A fajokat részleges kalmodulin szekvenciáik alapján azonosítottuk.

A fekete Aspergillus fajok gyakran okozhatják a hagyma rothadással járó megbetegedését. Eddig 37 fekete Aspergillus törzset izoláltunk hagymáról, melyek mindegyike *A. welwitschiae*-nak bizonyult, mely potenciálisan fumonizinek termelésére képes.

Vizsgáltuk továbbá füge és datolya minták mikrobiótáját. Egy füge kivételével minden mintáról izoláltunk fekete Aspergillus-okat. A datolyáról izolált 35 törzs mindegyike, de a fügéről izolált törzsek nagy része (17 izolátum) is a toxintermelésre nem képes *A. tubingensis* fajba tartozott. A fügéről izolált törzsek közül 6 *A. niger*-nek bizonyult, melyek termelhetnek fumonizineket. A fekete Aspergillus-ok mellett több mintáról is izoláltunk aflatoxinok termelésére képes *A. flavus* törzseket.

Kukoricáról is izoláltunk fekete Aspergillus-okat, az 51 törzs közül 40 *A. niger*-nek, 1 *A. welwitschiae*-nek, és 10 *A. tubingensis*-nek bizonyult. Izoláltunk fekete Aspergillus-okat chili paprikáról, dióról és más terményekről is.

Egy szegedi kollégium beltéri levegőjéből izolált penészgombák közül 23 törzs tartozott a fekete Aspergillus-ok közé, melyekből 9 *A. niger*, 9 *A. welwitschiae* és 5 *A. tubingensis* fajba tartozott. További vizsgálataink során 6 különböző országban vizsgáltuk a fekete Aspergillus fajok előfordulását beltéri levegőben (1. ábra). Korábbi vizsgálatainkkal összehangban, az *A. niger* mellett számos más fajt azonosítottunk. Az európai országokban hasonló fajeloszlást észleltünk, míg a legnagyobb fajszintű variabilitást a thaiföldi minták esetében detektáltuk (Varga et al. 2014).



1. ábra. Fekete Aspergillus fajok eloszlása beltéri levegőben különböző országokban (Varga et al. 2014)

Párosodási típus gének vizsgálata

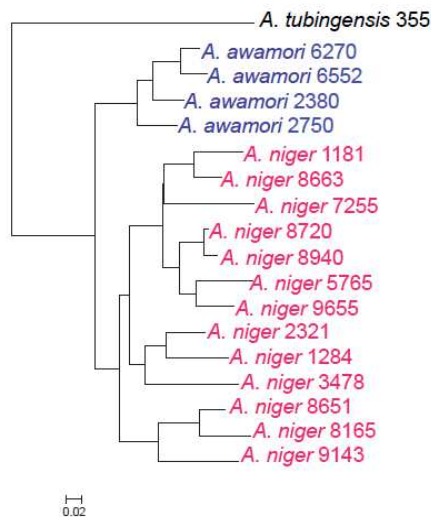
Az Aspergillus fajok nagy részénél, köztük a fekete Aspergillus-oknál csak aszexuális szaporodás ismert, vegetatív szaporító képletek, konídiumok segítségével. A gomba genomában a MAT gének felelősek a párosodás irányításáért. Az Aspergillus niger teljes genom szekvenálása után azonosították a MAT 1-1 párosodási típus gént. Egyedül a MAT gének jelenléte még nem elegendő a szexuális szaporodáshoz, de fontos előfeltétele annak. Elvégeztük 16 *A. niger*, 71 *A. welwitschiae* és 40 *A. tubingensis* törzs párosodási típus géneinek vizsgálatát, PCR (Polymerase Chain Reaction) technika segítségével, melyek különböző mezőgazdasági termékekről és beltéri levegőből származtak. Minden izolátum esetén sikerült igazolnunk a MAT1-1 vagy a MAT 1-2 gén jelenlétét. Az *A. niger* és *A. tubingensis* fajok esetén 1:1 MAT1-1:MAT1-2 arányt, míg az *A. welwitschiae* faj esetén 6:1 arányt tapasztaltunk (publikálás alatt).

Genetikai variabilitás vizsgálata

Az *A. niger* és *A. welwitschiae* fajokba tartozó izolátumok β -tubulin, kalmodulin és transzlációs elongációs faktor α szekvenciák alapján jól elkülöníthetőek, de mindeztidig nem találtak egyéb markert, melyekkel ezek a fajok megkülönböztethetőek lennének. Munkánk során UP-PCR (Universally Primed - PCR) és mitokondriális DNS-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) technikák segítségével hasonlítottuk össze ezen fajok izolátumait, mivel ezek a módszerek már korábban alkalmasnak bizonyultak közeli rokon fajok elkülönítésére és genetikai variabilitásának vizsgálatára.

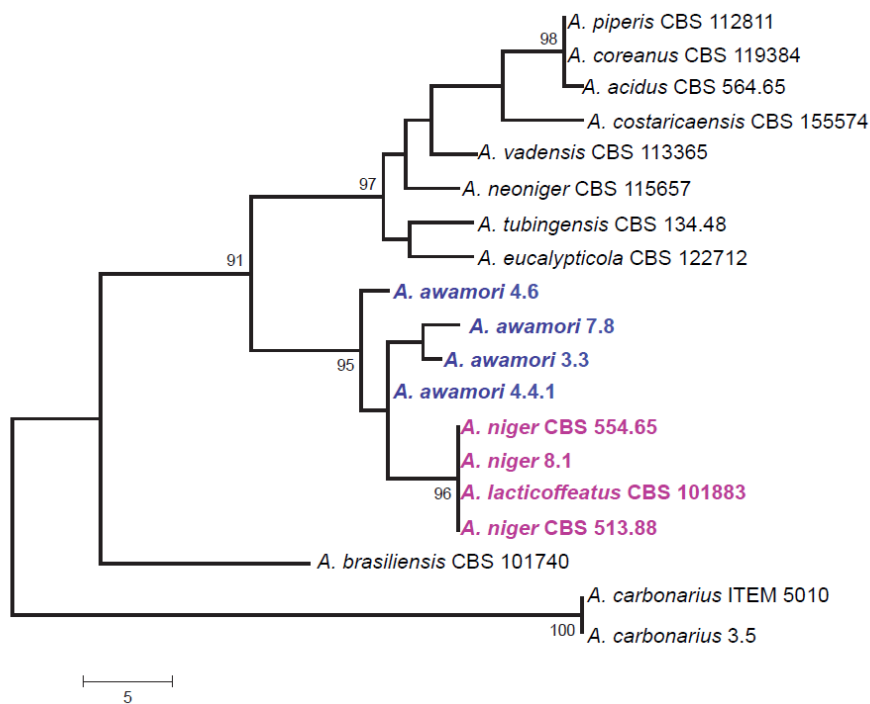
Az UP-PCR analízis során 8 primert használtunk fel. A gélektorforetikus képen tapasztalt sávmintázatokból összesen 88 fragmentet vettünk figyelembe a mátrix elkészítésénél. A filogenetikai analízist a PHYLIP programcsomag 3.67 verziójának programjaival végeztük. A filogenetikai fát Neighbor joining módszerrel készítettük, melyen az *A. niger* és *A. welwitschiae* izolátumok két jól elkülönülő kládot alkottak (2. ábra).

A mitokondriális DNS-RFLP analízist korábban az *A. niger* fajkomplexen belül a különböző haplotípusok meghatározására használták. Az *A. niger* és *A. welwitschiae* törzsek összehasonlítása során kiderült, hogy az 1c típusú mitokondriális DNS-t hordozó törzsek az *A. welwitschiae* fajnak felelnek meg.

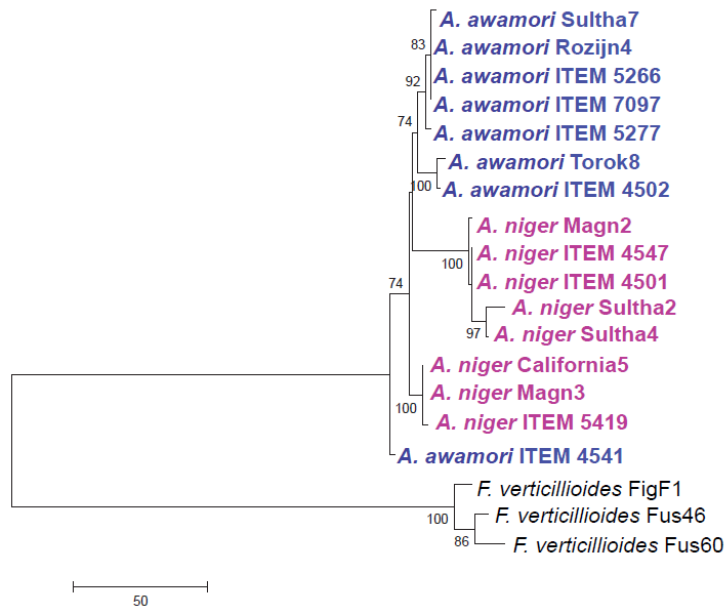


2. ábra. *A. awamori* (mai nevén *A. welwitschiae*) és *A. niger* izolátumok elkülönítése UP-PCR analízis alapján

A mikotoxinok bioszintézisében szerepet játszó gének szekvenciái alapján is próbáltuk ezt a két fajt elkülöníteni. Ennek érdekében az ochratoxin bioszintézisben szerepet játszó klórperoxidáz (3. ábra) illetve a fumonizin bioszintézisben kulcsfontosságú FUM8 géneket szekvenáltuk meg (4. ábra, Varga et al. 2011).



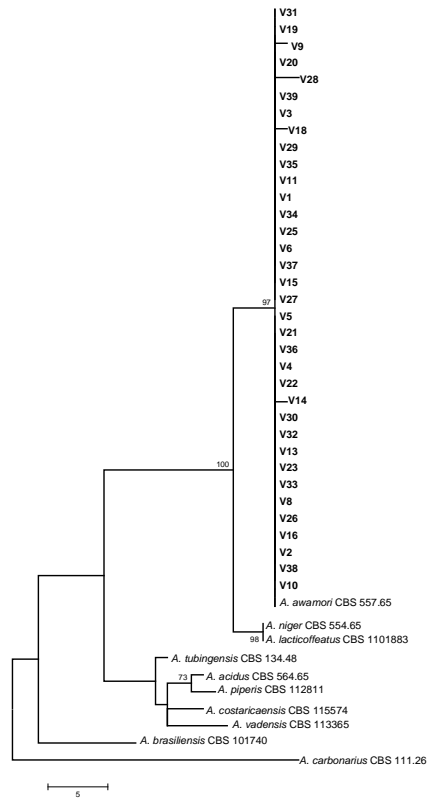
3. ábra. Fekete *Aspergillus* izolátumok klórperoxidáz génszekvenciáin alapuló törzsfá



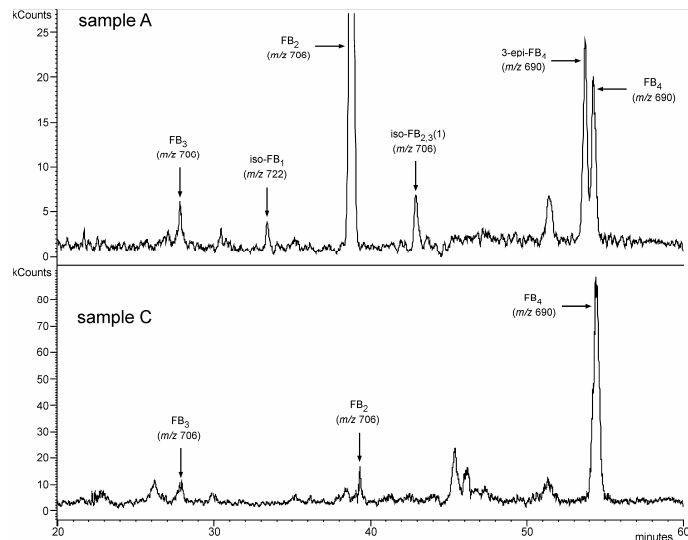
4. ábra. Fekete Aspergillus izolátumok FUM8 génszekvenciáin alapuló törzsfá

Hagyma mintákról származó fekete Aspergillus izolátumok vizsgálata

A hagyma fekete rothadással járó megbetegedéséért korábban az *A. niger*-t tették felelőssé, azonban kutatásaink során 6 Magyarországon vásárolt hagyma mintákról izolált 35 törzs mindegyike *A. welwitschiae*-nek (korábban *A. awamori*) bizonyult kalmomodulin gén szekvenciáik alapján (5. ábra). Megvizsgáltuk az egyes izolátumok ochratoxin A (OTA) és fumonizin termelő képességét. A vizsgált törzsek 15%-a termelt OTA-t (0.02-0.4 mg/kg), 17%-a pedig fumonizineket (0.01-10 mg/kg). A hagyma minták fumonizin tartalmának vizsgálata során két mintában sikerült fumonizinek jelenlétét kimutatni, 0.32 és 0.33 mg/kg koncentrációkban (6. ábra). Ezután újabb hagymamintákat gyűjtöttünk be különböző területekről (India, USA, Anglia, Lengyelország, Románia, Magyarország). Elvégeztük azok fajsztíntű azonosítását egy a kalmomodulin génre tervezett fajspecifikus primerpár segítségével. Eredményeink alapján megerősítést nyert, hogy a hagyma fekete rothadásos megbetegedéséért az *A. welwitschiae* faj tehető felelőssé, nem csak Magyarországon, hanem világszerte is. Ez felveti egy esetleges habitat preferencia lehetőségét. Hagyma mintákból kivonatot készítettünk, majd lyuktesztet végeztünk, melynek eredménye egyértelműen bizonyította, hogy a hagyma gátolja az *A. niger* faj növekedését, míg az *A. welwitschiae* izolátumokét nem. A kapott eredmények alapján először sikerült nem DNS szintű különbséget találni a két nagyon közeli rokon faj, az *A. niger* és *A. welwitschiae* között.



5. ábra. A hagymáról izolált törzsek kalmodulin alapú törzsfája



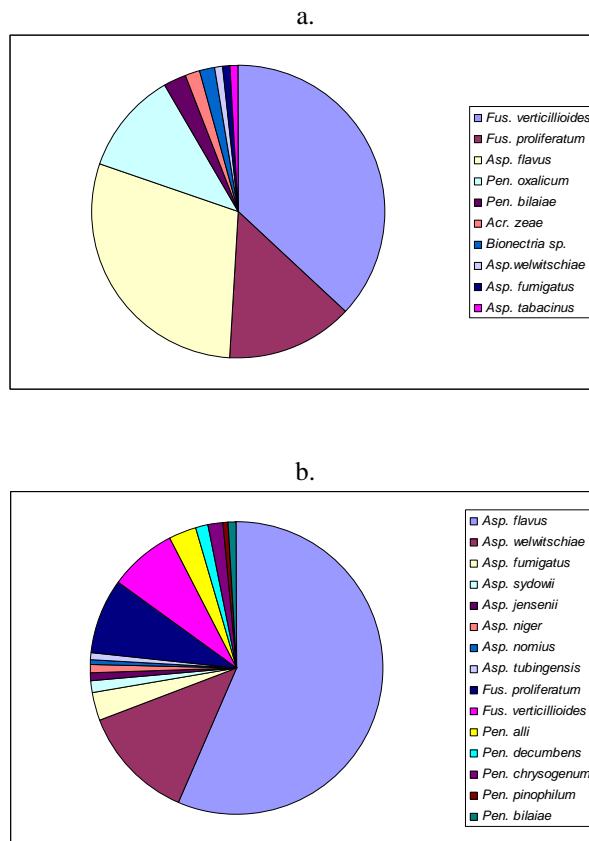
6. ábra. Két hagymaminta fumonizin tartalma HPLC-MS analízis alapján.

Kukorica gombafertőzöttségének és mikotoxin szennyezettségének vizsgálata

Vizsgáltuk 20-20 szántóföldi és raktári, szerb és magyar kukoricaminta mikotoxin szennyezettségét, ezen kívül morfológiai és molekuláris biológiai módszerekkel azonosítottuk a kukoricákról izolált gombákat. A vizsgálatokból megállapítható, hogy a raktári és szántóföldi kukoricaminták mindegyike tartalmazott

penészgombákat, melyek a felületi fertőtlenítés ellenére is szaporodásnak indultak a táptalajra kitett kukoricaszemeken. A telepek morfológiai elkülönítése és tiszta tenyészetek létrehozása után, DNS izolálással és szekvencia analízissel csaknem 300 patogén gombatörzset azonosítottunk. A leggyakoribbak az *Aspergillus*, *Fusarium* és *Penicillium* nemzetségek tagjai voltak, melyek között találtunk mikotoxintermelőket is. Megállapítottuk, hogy a raktárból származó kukoricamintákban az *Aspergillus flavus*, míg közvetlenül a szántóföldekről gyűjtött mintákban a *Fusarium verticilloides*, a *Fusarium proliferatum* és az *Aspergillus flavus* fajok domináltak (7. ábra). A fekete *Aspergillus* fajok közül az *A. welwitschiae*-t mindkét mintacsoportban detektáltuk, míg az *A. niger* csak a raktári mintákban fordult elő.

A mikotoxin tartalom mérése során a raktári mintákban csak fumonizin B1 és B2 jelenléte volt kimutatható, aflatoxin B1, ochratoxin A és DON nem volt detektálható. A szántóföldi mintáknál is a fumonizinek domináltak, sőt két mintánál a szennyezés meghaladta az EU határértéket, továbbá aflatoxint is találtunk. Az ochratoxin A és a DON itt sem volt detektálható. A kukoricát károsító penészgombák és raktári penészek komoly egészségügyi kockázatot jelentenek a mikotoxintermelés miatt. Oda kell figyelniük a szántóföldi terményekre és a takarmányraktározás körülményeire, ugyanis a nem megfelelő raktározási körülmények kedvezhetnek a mikotoxintermelő gombafajok elszaporodásának. Gátat kell vetniük az egészségügyi kockázati tényezők kialakulásának, mert a szennyezett takarmány fogyasztása veszélyforrást jelent nemcsak az állatoknak, hanem közvetve az embereknek is, a mikotoxinnal fertőzött állati hús vagy a tej elfogyasztásával. A forró, csapadékos időjárás fokozza a gombák növekedési ütemét és elősegíti a másodlagos anyagcseretermékek képződését. A globális időjárás változás miatt hazánkban egyre több olyan gombafaj jelenik meg, amely károsítja a takarmányozásra és emberi fogyasztásra szánt gabonát, ezért fontos lenne a termények folyamatos monitorozása hazánkban.



7. ábra. Gombafajok előfordulása aratás után (a), és raktári mintákban (b) szekvencia alapú meghatározások alapján kukoricán 2012-ben

Iráni és magyar fülfertőzésekből izolált fekete *Aspergillus*-ok fajsztívu azonosítása és antifungális szerekkel szembeni érzékenységu

A külső hallójárat gombás eredetü gyulladását (otitis externa mycotica) legtöbbször a *Candida* és *Aspergillus* nemzetségekbe tartozó gombák okozzák. Az eddigi irodalmi adatok szerint az *Aspergillus* fajok közül az *A. niger* felelős a legtöbb megbetegedésért. A fekete *Aspergillus*-ok csoportjában már több fajról bebizonyosodott, hogy kiválthatnak oportunistá mikózisokat. A különböző fajok eltérő mértékben lehetnek érzékenyek gombaellenes szerekre, így a megfelelő terápia kiválasztásában segíthet a fertőzést okozó faj pontos ismerete. Munkánk során 7 iráni és 14 magyarországi fülfertőzésből származó izolátumot vizsgáltunk, melyeket kivétel nélkül *A. niger*-ként azonosítottak a hagyományos, morfológián alapuló módszerrel. A kalmodulin gén egy szakaszának bázissorrendjei alapján elvégeztük az izolátumok fajsztívu besorolását. Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy az *A. niger*-en kívül más fekete *Aspergillus* fajok (*A. welwitschiae* és *A. tubingensis*) is okozhatnak fülfertőzéseket (8. ábra). Az iráni izolátumok közül 4 *A. niger*, 2 *A. tubingensis*, 1 pedig *A. welwitschiae* fajnak bizonyult. A Magyarországon izolált minták közül 11 az *A. welwitschiae* és 3 az *A. tubingensis* fajhoz tartozott, *A. niger*-t egy esetben sem detektáltunk. Továbbá teszteltük néhány izolátum érzékenységét három, a klinikumban széles körben használt gombaellenes szerrel (itraconazol, ketokonazol, terbinafin) szemben, Checkerboard titrálást alkalmazva. A minimális gátló koncentráció (MIC) értékek alapján nem mutatkozott nagy különbség az eltérő fajok érzékenységében, de elmondhatjuk, hogy a terbinafin (MIC₁₀₀: 0.25-1 µg/ml) és itraconazol (MIC₁₀₀: 0.5-1 µg/ml) szerek hatásosabbnak bizonyultak, mint a ketokonazol (MIC₁₀₀: 8-16 µg/ml) (8. ábra).

Fig. 1 One of the 7,490 maximum parsimony trees of type strains and the isolates came from otomycosis cases of *Aspergillus* section *Nigri* based on calmodulin sequence data (tree length, 124; consistency index, 0.962264; retention index, 0.986577; and composite index, 0.970665). Bootstrap values >70% are indicated on the branches

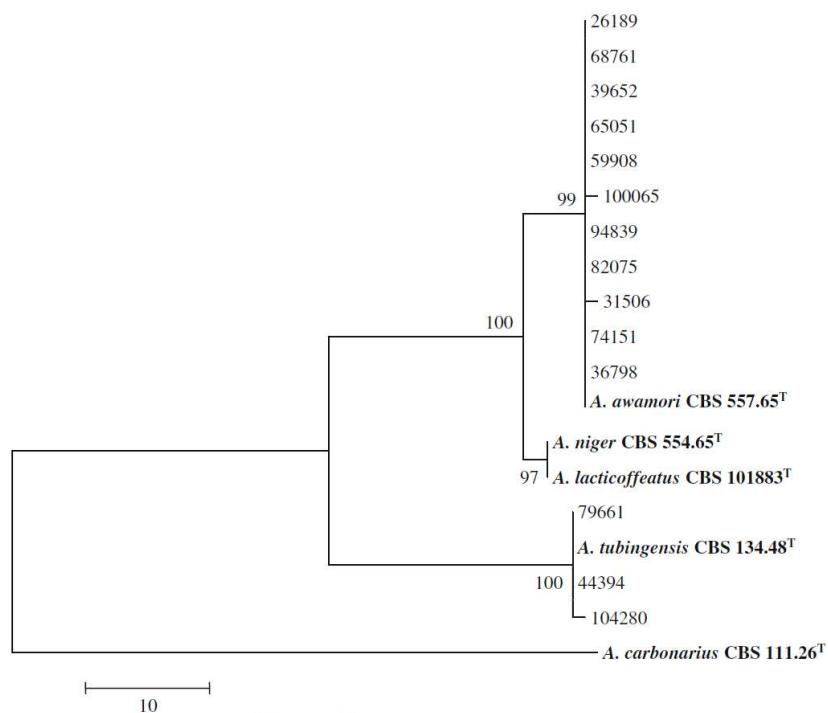


Table 2 MIC₁₀₀ values of the black *Aspergillus* isolates recovered from otomycosis cases in Southern Hungary

Drugs Strains	Itraconazole (µg ml ⁻¹)	Ketoconazole (µg ml ⁻¹)	Terbinafine (µg ml ⁻¹)	Amphotericin B (µg ml ⁻¹)
<i>A. awamori</i> 26189	0.5	8	0.5	0.5
<i>A. awamori</i> 36798	0.5	8	0.25	1
<i>A. awamori</i> 59908	0.5	8	0.25	0.5
<i>A. awamori</i> 82075	0.5	8	0.5	1
<i>A. tubingensis</i> 44394	0.5	8	1	0.5
<i>A. tubingensis</i> 79661	0.5	16	1	0.5

8. ábra. A hazai fekete *Aspergillus* izolátumok fajeloszlása és antifungális szerekkel szembeni érzékenysége fülfertőzésekből (Szigeti et al. 2012)

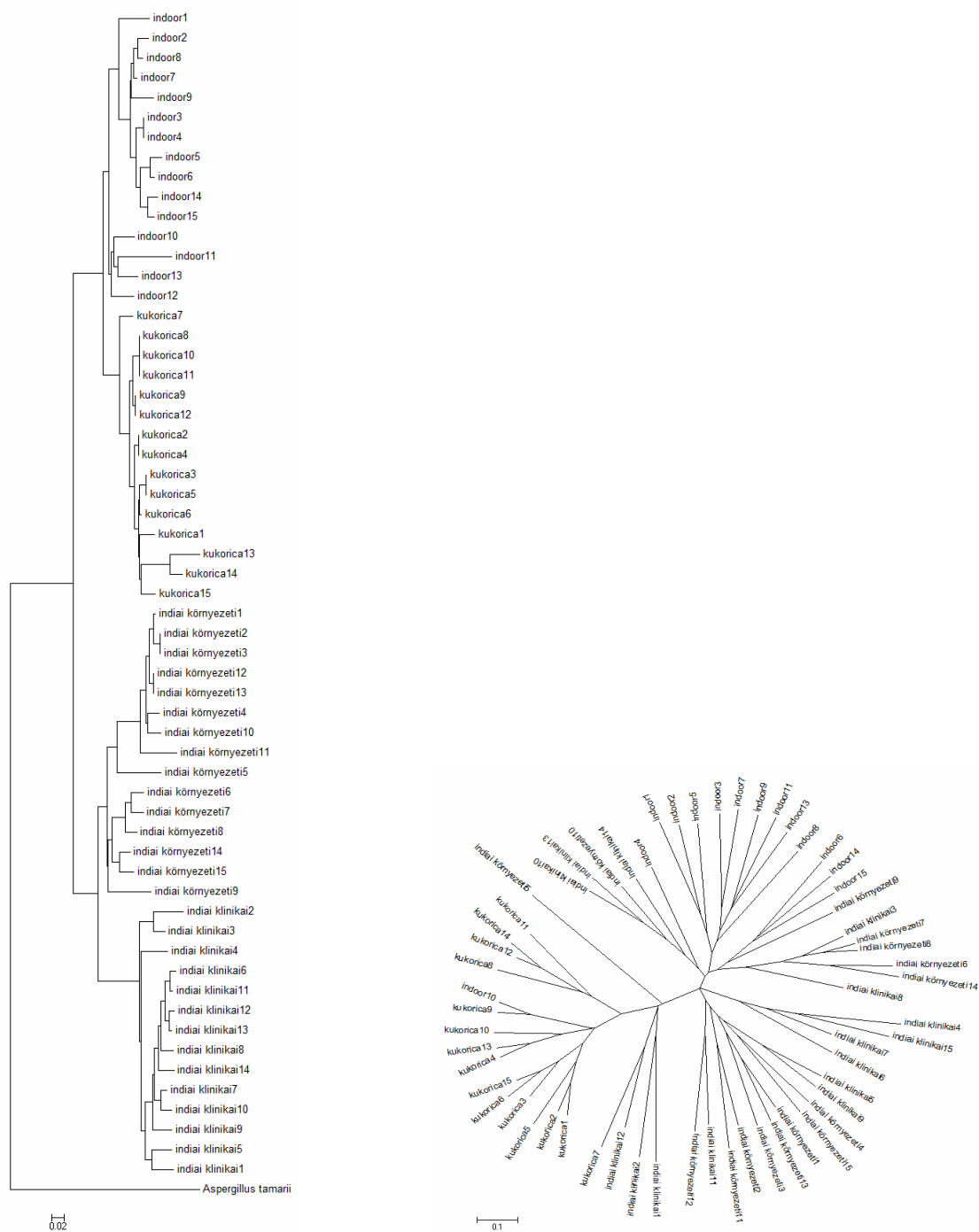
Aspergillus fajok előfordulása humán szemfertőzésekben (keratitisz)

Az Aspergillus fajok a leggyakoribb előidézői a gombák által okozott keratitisznek szubtrópusi illetve trópusi területeken. A fertőzés fő kockázati tényezője a növényi részek által okozott trauma a mezőgazdasági munka során. Ezért egy évek óta fennálló kölcsönös együttműködésnek köszönhetően számos Aspergillus izolátumot kaptunk egy indiai szemklinikáról (Aravind Eye Hospital, Coimbatore, Tamil Nadu, India). A szemklinikán kizárólag morfológiai alapon történő fajmeghatározást végeznek, de pusztán morfológiai karakterek alapján csak néhány faj esetén lehetséges a pontos meghatározás. Molekuláris módszerekkel a fajok azonosítása biztosabb. Nagyon fontos a klinikai Aspergillus izolátumok fajszintű meghatározása, mert a különböző fajok eltérő mértékben lehetnek érzékenyek gombaellenes szerekre. A faj ismerete segíthet a megfelelő gombaellenes terápia kiválasztásában. Az Aspergillus fajok elkülönítésére különböző módszerek léteznek, a β -tubulin vagy kalmomodulin gének szekvenciái megfelelően bizonyultak a fajszintű elkülönítéshez. Az Aspergillus fajok közül főként az *A. flavus*, *A. terreus*, *A. fumigatus* és *A. niger* okoz keratitiszt. Munkánk során 2012-ben 52 Dél-Indiából származó keratitiszes esetekből izolált törzset vizsgáltunk. A fajazonosítás eredményeként a legtöbb azonosított izolátum, 46 (88,5%) az *A. flavus* fajba, 4 (7,7%) az *A. tamarii* fajba, míg 1-1 izolátum (1,9-1,9%) az *A. terreus* és *A. pseudotamarii* fajba tartozik. Utóbbi aflatoxinogén fajt elsőként azonosítottuk emberi fertőzésből. Az Aspergillus flavus izolátumok aflatoxin termelő képességét YES tápoldaton vizsgáltuk, az izolátumok 50%-a termelt aflatoxinokat. A mért értékek aflatoxin B₂ esetében 34,4 és 352 ng/ml közé tehetők, míg aflatoxin B₁ esetében ezen értékek 50,2 ng/ml és 75,3 μ g/ml közé esnek. Az Aspergillus pseudotamarii izolátum aflatoxin termelő képességének vizsgálatát három különböző tápközegben végeztük el. Mivel klinikai izolátum, ezért a YES tápoldat mellett megpróbáltunk az emberi szervezethez hasonló körülményeket teremteni. Így RPMI és BHI tápközegben is elvégeztük a tenyésztést, 35°C-os inkubációs hőmérsékleten. Ennek eredményeként megállapítottuk, hogy az izolátum csak YES tápoldatban termelt aflatoxin B₁-et és B₂-t, összhangban az irodalmi adatokkal. Az extraktumokat előzetesen vékonyrétegen futtattuk, majd az eredményeket HPLC analízissel ellenőriztük. Az izolátum 2,6 ng/ml aflatoxin B₂-t, és mintegy 1 μ g/ml aflatoxin B₁-et termelt.

A gombaellenes szerekkel szembeni érzékenység vizsgálat eredményeként megállapítható, hogy az izolátumok a terbinafinnal szemben a legérzékenyebbek, míg kisebb mértékben érzékenyek a mikonazollal, klotrimazollal és az ekonazollal szemben. Vorikonazollal szembeni érzékenységet a minták 47%-ánál tapasztaltunk, míg flucitozinnal szemben a vizsgált izolátumok 100%-a érzéketlennek bizonyult. 35 Aspergillus flavus izolátum genetikai variabilitás vizsgálatát végeztük el UP-PCR technikával. Az analízis során 6 primert használtunk fel. 2014-ben az Indiában morfológiai alapon meghatározott 5 *A. terreus*, 5 *A. fumigatus*, 5 *A. tamarii* és 25 *A. flavus* és egy azonosítatlan Aspergillus izolátumot vizsgáltunk. A molekuláris fajazonosítást követően az alábbi fajeloszlást kaptuk: 4 *A. terreus*, 1 *A. melleus*, 5 *A. fumigatus*, 6 *A. tamarii*, 24 *A. flavus*, 1 *A. quadrilineatus*. Az *A. flavus* izolátumok 45%-a volt képes aflatoxin előállítására YES tápoldatban.

60 különböző élőhelyekről származó *A. flavus* izolátum genetikai variabilitásának összehasonlító vizsgálatát is megkezdtük. Klinikai szemfertőzésekben származó izolátumok (India), különböző növényi részekről származó környezeti izolátumok (India), kukoricáról származó környezeti izolátumok (Szerbia, Óbecse), illetve beltéri levegőből származó izolátumok (Horvátország, Magyarország) vizsgálata van folyamatban. Az izolátumok fajszintű azonosítását a kalmomodulin gén egy szakaszának szekvencia analízise révén végeztük el. Vizsgáltuk az izolátumok genetikai variabilitását UP-PCR technikával, microsatellite analízist végeztünk, továbbá meghatároztuk az izolátumok párosodási típusát (mating-type). Az aflatoxin termelő képességet vékonyréteg kromatográfiával vizsgáltuk. A különböző élőhelyekről származó izolátumok genetikai variabilitásának vizsgálatát egyrészt UP-PCR, másrészt microsatellite analízissel végeztük el. A UP-PCR analízist követően már a gélfotók kiértékelése során is jól elkülönültek a különböző populációk. Létrehoztuk a fragmentek jelenlétén illetve hiányán alapuló bináris mátrixot, majd a filogenetikai rekonstrukciót Neighbor-Joining analízis segítségével végeztük el. A microsatellite analízis alapján készített törzsfá hasonló eloszlást mutatott (14. ábra).

Az izolátumok párosodási típus génjeinek (MAT) vizsgálata során megállapítottuk, hogy az izolátumok 77%-a csak a MAT1-1 idiomorfot hordozta, 18%-uk csak a MAT1-2 idiomorfot, míg 5%-ukban mindkét idiomorfot előfordult. A MAT gének eloszlása a populációk között eltérést mutatott. Csak a MAT1-1 idiomorfot hordozta az indiai klinikai izolátumok 100%-a, indiai környezeti izolátumok 60%-a, a kukoricáról származó izolátumok 93%-a, valamint a beltéri levegőből származó izolátumok 53%-a. A látszólag mindkét idiomorfot hordozó izolátumokkal további vizsgálatokat tervezünk elvégezni.



14. ábra. *A. flavus* izolátumok törzsfája UP-PCR (balra) és microsatellite analízis alapján (jobbra)

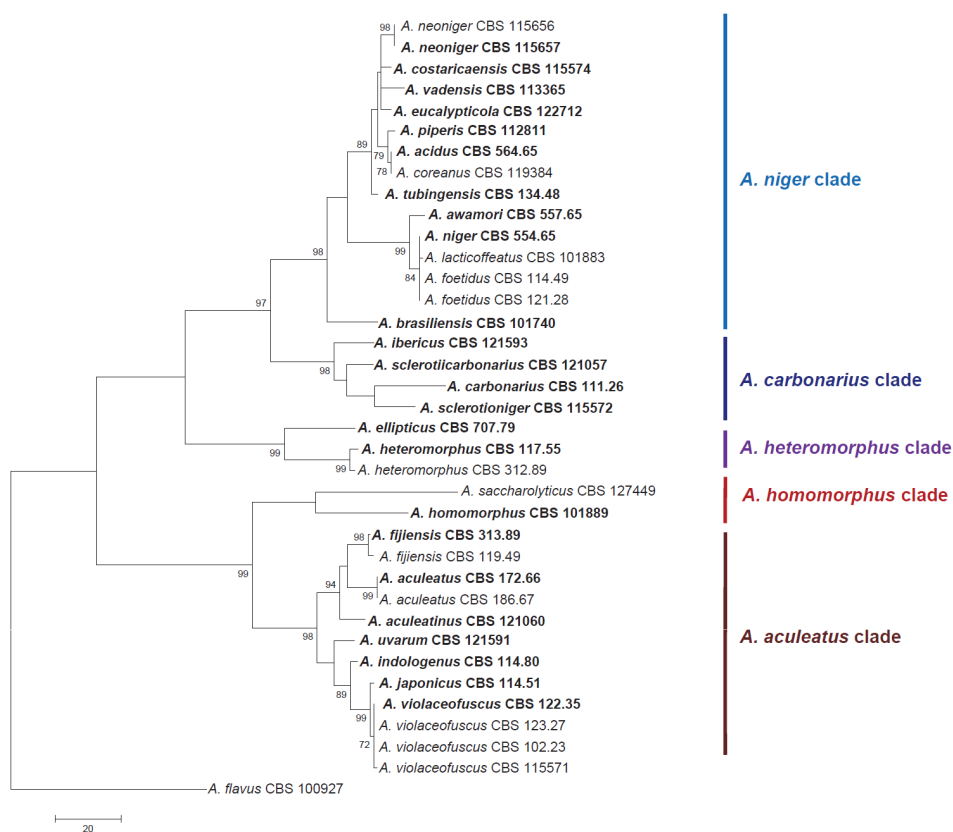
Aspergillus fajok nevezéktana, és új *Aspergillus* fajok azonosítása

Részvettem a gombák (köztük az *Aspergillus* fajok) nevezéktanával foglalkozó összejöveteleken Hollandiában (1 fungus = 1 name, 1 fungus= which name: Amszterdam, Utrecht, 2011, 2012).



Mint az "International Commission on Penicillium and Aspergillus" ISHAM csoport vezetőségi tagja vettem részt ezeken az üléseken, és előadásokat is tartottam. Ezeken a megbeszéléseken az Aspergillus fajok tekintetében az a konszenzus született, hogy az Aspergillus nevet használjuk erre a csoportra (így az Emericella, Eurotium, Neosartorya és számos egyéb nevek illegitímek; Hawksworth et al. 2011, Samson et al. 2014).

A project keretében számos új fajt azonosítottunk és írtunk le, illetve tisztáztuk taxonómiai helyzetét. A Nigri szekcióban 6 új fajt azonosítottunk polifázikus vizsgálatuk alapján (3 génszakasz szekvencia analízise, morfológiai és fiziológiai vizsgálatok, a termelt másodlagos anyagcseretermékek azonosítása; Aspergillus eucalypticola, A. neoniger, A. fijiensis, A. indologenus: Varga et al. 2011; A. floridensis, A. trinidadensis: Jurjevic et al. 2012, 9. ábra).



9. ábra. A fekete Aspergillus fajok (*Aspergillus* section Nigri) filogenetikai törzsfája kalmodulin génszekvenciák alapján (Varga et al. 2011)

Az *Aspergillus* nemzetség átfogó filogenetikai jellemzése

Az *Aspergillus* nemzetséget jelenleg 8 alnemzetségbe és 24 szekcióba sorolják, azonban a napjainkig elvégzett kutatások nem szolgálnak megfelelő mennyiségű információval sem az alnemzetségek, sem az egyes szekciók közötti filogenetikai kapcsolatok feltérképezéséhez. Célul tűztük ki a teljes nemzetséget felölelő 6 lókuszos (*Ac11*, *MCM7*, *RPB1*, *RPB2*, *Cct8*, *Tsr1*) filogenetikai vizsgálat elvégzését, hogy felfedjük ennek a gazdasági szempontból igen fontos gombacsoportnak evolúciós kapcsolatait. 92 fajt választottunk ki, amelyek jól reprezentálják a nemzetséget. Külcsoportnak a *Penicillium chrysogenum* fajt választottuk. A filogenetikai

analízist Maximum Likelihood módszerrel végeztük. A kapott törzsfák megbízhatósági elemzésére ML bootstrap analízist alkalmaztunk 1000 ismétlésben. Első megközelítésben minden lókuszt számoltattunk egy törzsfát, majd mivel az egyes lókusztok alapján számolt törzsfák között lényeges topológiai eltérés nem mutatkozott, egy kombinált adatsort hoztunk létre, majd ebből számoltattunk egy újabb törzsfát, mely mind a hat vizsgált lókuszt információtartalmát hordozza. A vizsgálat során elsősorban a Nigri szekcióra fókuszáltunk. Ezt a szekciót korábbi kutatások alapján a Circumdati alnemzetséghez sorolják a Circumdati és Cremei szekciókkal együtt. Az általunk végzett filogenetikai vizsgálat eredményeképpen kapott törzsfá alapján azonban elmondhatjuk, hogy sem a Nigri, sem a Cremei szekciók nem tartoznak bele a Circumdati alnemzetségbe, hanem valószínűleg új alnemzetségeket reprezentálnak (10. ábra).

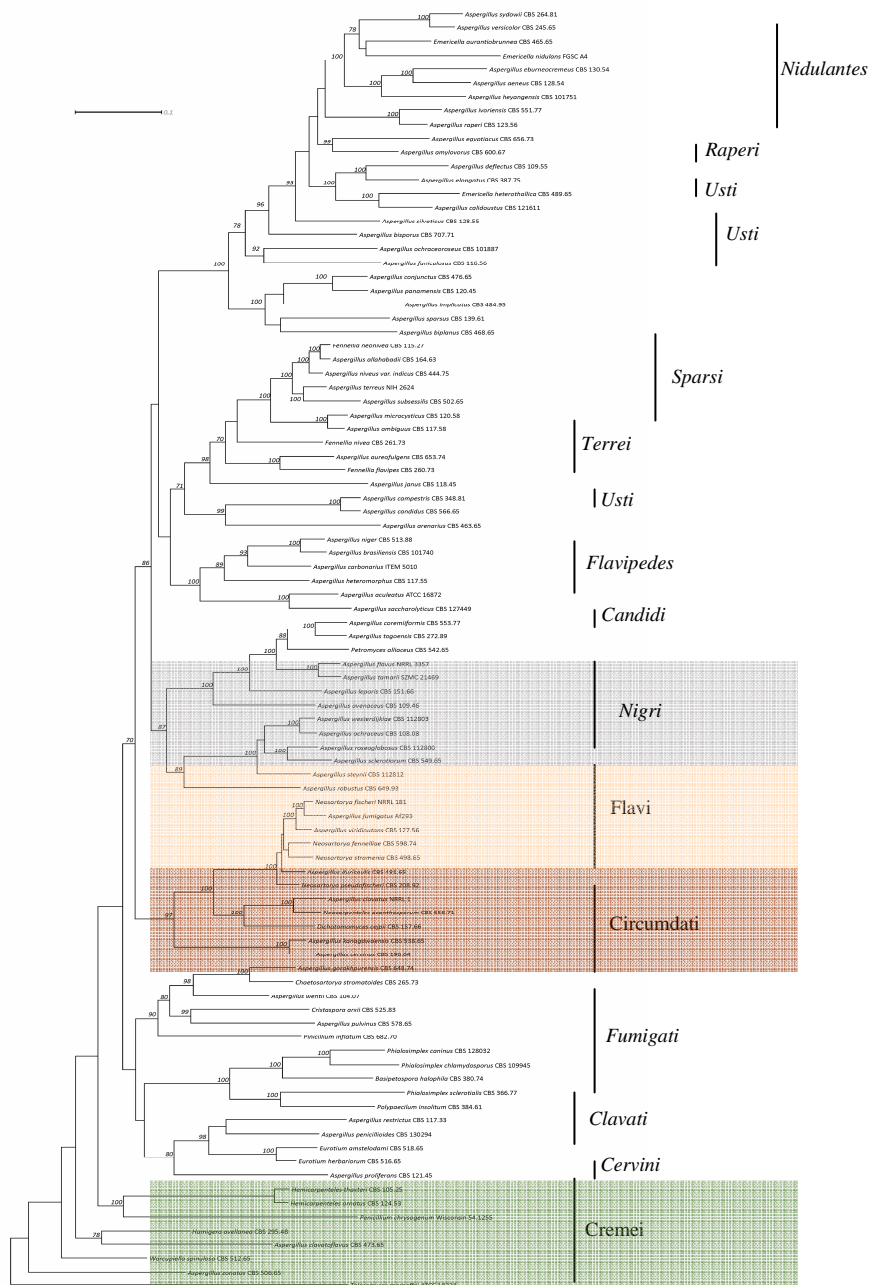
Az Aspergillus fajok azonosítására alkalmas génrégiók vizsgálata

A gombák esetében a DNS alapú fajszintű meghatározás elsődleges „barcode” szekvenciájául a rRNS génklusztter ITS szakaszt választották (Schoch és mtsai., 2012), habár több korábbi tanulmány is rávilágított arra, hogy ez a régió nem alkalmas minden gomba (Kiss 2012), köztük számos Aspergillus faj fajszintű elkülönítésére (Geiser és mtsai., 2007). Az ITS régió elsősorban fajkomplexek elkülönítésére alkalmas (Balajee és mtsai., 2007, Samson és Varga 2009) a pontos fajszintű azonosításhoz általában más lókusztok felhasználása is szükséges. Korábbi kutatásaink alkalmával megállapítottuk, hogy a kalmodulin és a β -tubulin gének egy szakaszának felhasználásával számos esetben lehetséges a pontos fajazonosítás. Saját és génbanki szekvenciák felhasználásával megvizsgáltuk, hogy az említett három szakasz mekkora feloldóképességgel bír a teljes Aspergillus nemzetségben belül.

A vizsgált génszakaszokat elsődlegesen a MAFFT v7.149b szoftver (Kato és Standley, 2013) segítségével illesztettük, majd az illesztések felhasználásával Neigbor joining (Saitou és Nei, 1987) analízist végeztünk a MEGA v6 (Tamura és mtsai., 2013) programcsomag használatával. A kapott filogenetikai fát segédfaként alkalmazva újabb illesztést végeztünk a PRANK v140110 (Löytynoja és Goldman, 2005) szoftver segítségével. A végső filogenetikai fát Maximum Likelihood analízis segítségével állítottuk elő, a raxmlGUI v1.3 (Silvestro és Michalak 2011) programcsomag használatával, a GTR+ Γ modellt alkalmazva. Az analízis során a részleges kalmodulin és β -tubulin szekvenciákat exonokra és intronokra particionáltuk, míg az ITS adatsort ITS1, ITS2 és 5,8 rRNS partíciókra osztottuk. A filogenetikai analízist 500 ismétlésben hajtottuk végre.

A vizsgált génszakaszok közül az ITS régió rendelkezett a legkisebb feloldóképességgel (1. Táblázat). A kapott filogenetikai fán a nemzetségben belüli szekciók túlnyomó többsége jól elkülönült, bár a támogatottsági értékek nem minden esetben bizonyultak magasnak. A vizsgált szekvenciák közül 54 esetben nem volt lehetséges a pontos fajszintű azonosítás. A fekete Aspergillus-ok két külön kládra bomlottak, melyeket az "uniseriate" és "biseriate" fajok alkották. Az analízis során számos faj filogenetikai pozíciója bizonytalanak mutatkozott (11-13. ábra).

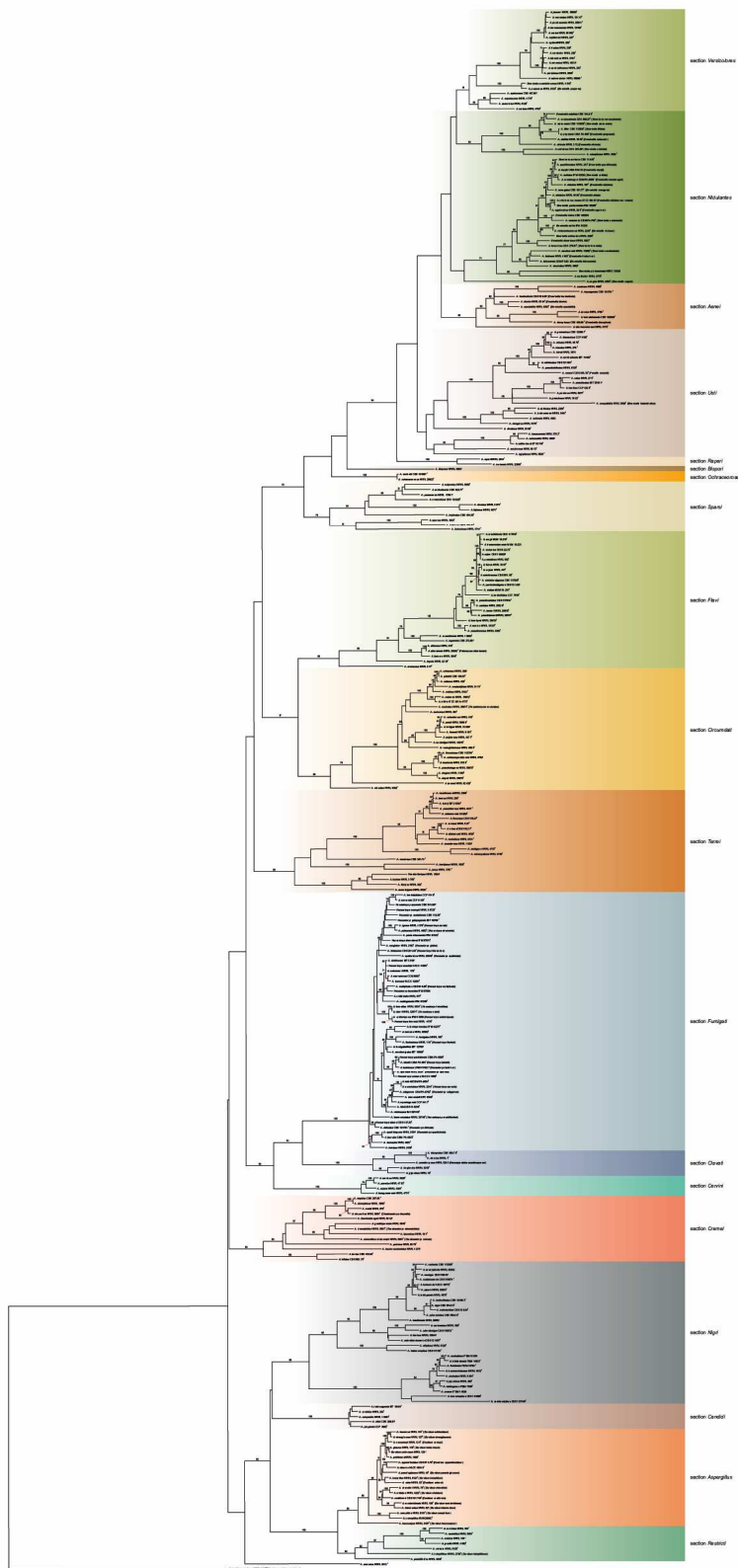
A β -tubulin szekvenciák analízise során azt tapasztaltuk, hogy az egyes szekciók nem különültek el teljes mértékben. Számos esetben a kalmodulin szekvenciák jobb elkülönítést eredményeztek (1. táblázat, 11-13. ábra). Az analízisbe bevont β -tubulin génszakaszok segítségével a vizsgált fajok túlnyomó többségét azonban el lehetett különíteni. Az általunk vizsgált génszakaszok közül a részleges kalmodulin szekvenciák bizonyultak a legalkalmasabbnak a pontos fajszintű azonosításban. A felhasználásukkal elkészített törzsfán minden szekció magas támogatottsággal különült el (11. ábra). A 308 vizsgált faj közül 6 esetben nem nyílt lehetőségünk a pontos fajszintű azonosításra. Eredményeink alapján a részleges kalmodulin génszakaszok megfelelnek a „barcoding” szekvenciákkal szemben támasztott követelményeknek és alkalmazásukkal lehetőség nyílik az Aspergillus nemzetség tagjainak pontos, fajszintű meghatározására.



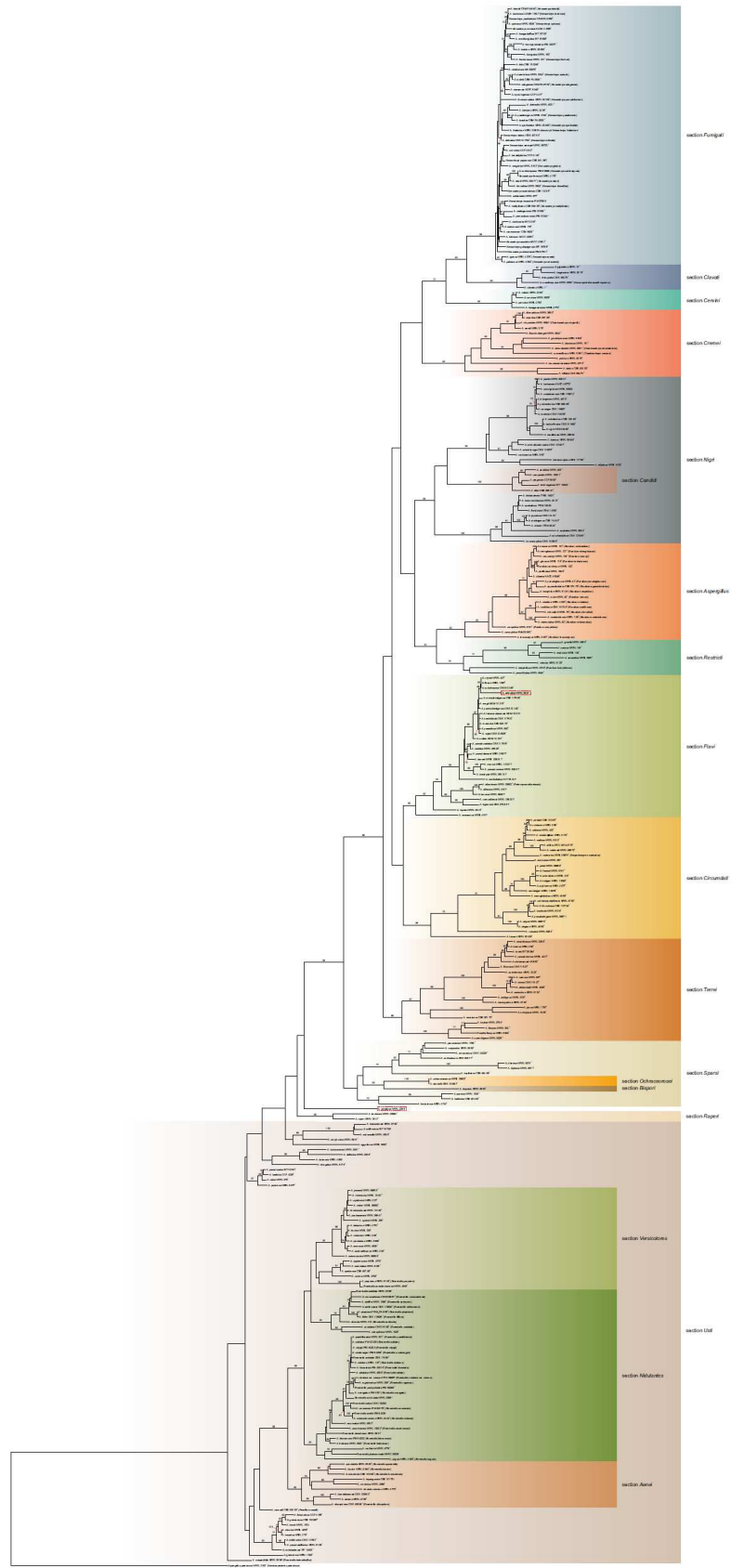
10. ábra. Az *Aspergillus* nemzetség 6 génszekvencián alapuló felosztása

1. Táblázat. A barcoding analízis során felhasznált génszakaszok összehasonlító táblázata

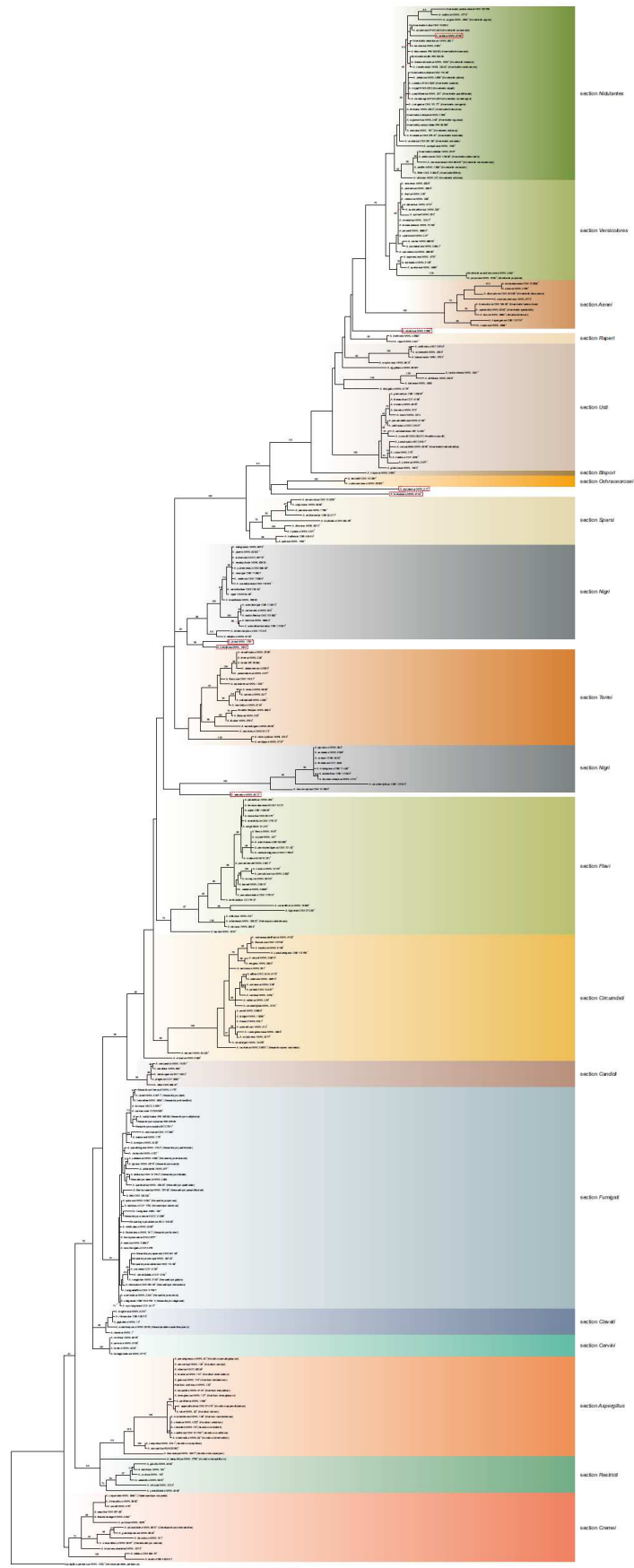
	Kalmodulin adatsor	β -tubulin adatsor	ITS adatsor
Szekvenciák száma	308	308	296
Az illesztés hossza (gap-ekkel együtt)	2983	2654	1553
Parszimoniái szempontból informatív helyek száma	937	731	331
Azonos szekvenciák száma	6	18	54



11. ábra. Az Aspergillus nemzetség kalmodulin szekvenciákon alapuló törzsfája



12. ábra. Az *Aspergillus* nemzetség β -tubulin (*benA*) szekvenciákon alapuló törzsfája



13. ábra. Az *Aspergillus* nemzetség ITS szekvenciákon alapuló törzsfája

Egyéb kutatások (melyek kapcsolódnak az OTKA pályázat témájához)

A globális klímaváltozás egyik legfontosabb hatása a mikotoxinok szempontjából a melegkedvelő aflatoxin termelő fajok megjelenése lehet a mérsékelt égövi országokban, ami az itt termesztett mezőgazdasági termékek fokozott mikotoxin-szennyeződését vonhatja maga után, különös tekintettel az aflatoxinokra. A jelenséggel az utóbbi években Európa számos országában, így a hazánkkal határos Szerbiában, Szlovéniában, Horvátországban, Romániában és Ukrajnában is szembesülnünk kellett. Fenti észlelések hatására vizsgáltuk hazai mezőgazdasági termékek mikrobiotáját. Vizsgáltunk az ország különböző régióiból származó kukorica mintákat, chilit, diót, fűszereket, valamint különböző dohányárúkat is. Potenciális aflatoxin termelő *Aspergillus flavus* izolátumokat számos esetben detektáltunk a mintákban. Nagyszámú *Aspergillus flavus* izolátumot azonosítottunk az ország különböző régióiból származó búzaszemeken is. A legfertőzöttebbnek az Alakor (egyszemű búza, *Triticum monococcum*) bizonyult. Az Alakor ősi diploid búzafajta, mely igen ellenálló gombabetegségekkel szemben. A búzamintákban nem tudtunk aflatoxinokat kimutatni. Az izolátumok aflatoxin termelő képességének vizsgálatát vékonyréteg kromatográfiával és HPLC-vel végeztünk el, ennek eredményeként az izolátumok sem termelnek aflatoxint. Az egyéb mezőgazdasági termékek (chili, dió, kukorica) aflatoxin termelés vizsgálatának eredményeként nagyszámú izolátumot kaptunk, melyek igen jelentős mennyiségben képesek aflatoxinokat termelni. Továbbá különböző hazai és határmenti mezőgazdasági területekről származó gabonaminták, valamint egyéb külföldi környezeti minták vizsgálatát és további *Aspergillus* izolátumok gyűjtését is elvégeztük. A vizsgálatba bevont minták a következők voltak: Szegedről származó tönkölybúza (*Triticum spelta*) szemek, Vajdaságból származó kukoricaszemek, valamint Indiából származó környezeti minták (különböző növényi részek és talajminták). A molekuláris fajazonosítást követően megállapítottuk, hogy a Szegedről származó tönkölybúzáról 5 izolátum közül 2-2 izolátum az *A. flavus* és *A. piperis* fajba, míg 1 izolátum az *A. welwitschiae* fajba volt sorolható. Vajdasági kukoricaszemekről 25 izolátumot gyűjtöttünk, ezek közül mind az *A. flavus* fajba tarozott. Az Indiából származó környezeti izolátumok (mintaszám: 44) fajsztintú azonosítását követően megállapítottuk, hogy az *Aspergillus* nemzetség mellett néhány *Penicillium* nemzetségbe tartozó törzseket is azonosítottunk. Az izolátumok főként az *Aspergillus* nemzetség *Flavi* és *Nigri* szekciójába voltak sorolhatóak, de néhány esetben az *Aspergillus* nemzetség *Circumdati*, valamint *Terrei* szekciójába tartozó izolátumot is sikeresen azonosítottunk.

További kutatásokat tervezünk végezni az *Aspergillus* fajok előfordulásával, mikotoxin termelő képességével illetve genetikai variabilitásával kapcsolatban a közeljövőben.

A project kivitelezése során 83 publikáció született (lsd. közlemények listáját), és további cikkek írása folyamatban van.