



INTÉZMÉNYI TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI KONFERENCIA

2022. november 23.

**ŐSZI BÚZÁN [*TRITICUM AESTIVUM* (L.)] MEGJELENŐ
ASPERGILLUS FAJOK ÉS AZOK MIKOTOXIN
TERMELÉSÉHEZ KÖTHETŐ GÉNJEINEK
AZONOSÍTÁSA ÉS VIZSGÁLATA**

**Appearing *Aspergillus* species on winter wheat [*Triticum aestivum* (L.)]
grains and the detection of their mycotoxin-producing genes**

Készítette: Vlaskality Sára Dóra
YDPFK0
Növényorvos mesterképzés
Nappali tagozat
Szent István Campus

Témavezető: Dr. Körösi Katalin Orsolya, egyetemi docens,
MATE, Növényvédelmi Intézet, Integrált Növényvédelmi Tanszék

Témavezető: Szabó Barbara Katalin, PhD hallgató, MATE,
Növényvédelmi Intézet, Integrált Növényvédelmi Tanszék

Lehetséges OTDK szekció: Agrártudományi szekció

**Gödöllő
2022**

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	3
2. Célkitűzéseim.....	4
3. Irodalmi áttekintés	5
3.1. Az őszi búza (<i>Triticum aestivum</i>) jellemzése	5
3.1.1. Az őszi búza (<i>Triticum aestivum</i>) betegségei.....	5
3.2. Mikotoxin termelésre képes szántóföldi és raktári penészgombák általános jellemzői 6	
3.2.1. Mikotoxin szennyezettség és a vele járó kihívások	7
3.3. Aspergillus nemzetség jellemzése, előforduló fajok	9
3.3.1. Aspergillus fajok aflatoxin termelésének kimutatása.....	10
3.4. Aspergillus fajok ochratoxin termelésének kimutatása	10
3.4.1. Aspergillus fajok esetében leírt gének, amelyek összefüggésben állhatnak a mikotoxin termeléssel	11
3.4.2. Aflatoxinok jellemzése	12
3.4.3. Ochratoxinok jellemzése	13
3.5. Fusarium nemzetség jellemzése, előforduló fajok	14
3.5.1. Fusarium fajok által termelt mikotoxinok jellemzése	15
4. Anyag és módszer	17
4.1. Szemek felületi fertőtlenítése	17
4.2. A szemtermések belső fertőzöttségének vizsgálata Fuzárium szelektív táptalajon... 17	
4.3. Tiszta tenyészetek készítése burgonya dextróz táptalajra	17
4.4. Mikroszkópi vizsgálatok.....	18
4.5. Molekuláris genetikai vizsgálatok	19
5. Eredmények és értékelésük.....	22
5.1. Szemtermések belső fertőzöttségének vizsgálata	22
5.2. Mikroszkópi vizsgálat.....	24
5.3. Molekuláris genetikai vizsgálatok eredményei	26
6. Következtetések és javaslatok.....	31
7. Összefoglalás	34
8. Köszönetnyilvánítás	35
9. Irodalomjegyzék	36

1. Bevezetés

A FAO becslései szerint 2050-re 70%-kal több élelmiszerre lesz szükségünk világszerte, mint napjainkban. Eközben az éghajlatváltozás olyan irányba tart, amely további kihívások elé állítja a mezőgazdasági ágazat képviselőit. Ilyen kihívás lehet a mikotoxin-termelő penészgomba fajok térnyerése is. Ezért válik szükségessé az ilyen penészgombák, mint például az *Aspergillus* nemzetségbe tartozó fajok minél mélyrehatóbb megismerése és mikotoxin-termelő képességük molekuláris biológiai módszerekkel történő feltérképezése.

A mikotoxin szennyezettség, akár a szántóföldön, akár a tárolás során jelenik meg, kiemelkedő élelmiszer és takarmánybiztonsági kockázattal jár. A mikotoxinok jelen lehetnek növényi eredetű élelmiszereinkben, csökkentve azok beltartalmi értékét. Mindemellett használlataink is felvehetik őket a takarmány fogyasztása során. Ennek következtében akumulálódhat azok húzában, zsírjában, egyes ehető belsőségeiben, nem beszélve arról, hogy akár kiválasztódhat tejjel és tojással is, így jelentve ismételt veszélyforrást az emberre. Szélsőséges esetekben megbetegedéshez, majd elhulláshoz vezethet a súlyos toxikózis, így jelentve ezzel gazdasági veszteséget számunkra. Egy *Aspergillus* fertőzés következtében kialakuló mikotoxin szennyezés teljes gabonátételeket tehet felhasználásra alkalmatlanná, sőt mi több, a magas toxintartalommal rendelkező gabonátételeket meg kell semmisíteni.

Jól látható tehát, hogy egy esetleges *Aspergillus* fertőzés milyen egészségügyi és anyagi kockázatokat vonhat maga után. Nem beszélve a minőség romlás következtében kieső megtermelt termés mennyiségéről, amely a Föld növekvő népessége miatt és a következő évekre prognosztizált gabona hiány miatt tovább növeli a téma jelentőségét.

Magyarországon a búza [*Triticum aestivum* (L.)] az egyik legjelentősebb termesztett növényünk a humán élelmezésben és a használlatok takarmányozásában betöltött szerepének köszönhetően.

2. Célkitűzéseim

- Mikotoxin-termelő gombák okozta belső fertőzöttség vizsgálata őszi búza szemtermésben.
- Az izolált *Aspergillus spp.* szekvencia specifikus fajmeghatározása (Susca *et al.*, 2007).
- *Aspergillus spp.* mikotoxin-termelést elősegítő génjeinek molekuláris genetikai vizsgálata (Degola *et al.*, 2007; Gallo *et al.*, 2012).

3. Irodalmi áttekintés

3.1. Az őszi búza (*Triticum aestivum*) jellemzése

A termesztett búza (*Triticum* fajok) az *Poaceae* családba, azon belül *Poales* rendbe tartozó, egyik legszélesebb körben termesztett haszonnövényünk. A búza az emberi szervezet működéséhez szükséges energia és ételmi rost bevitelének fontos forrásául szolgál (Shewry és Hey, 2015), emellett a *Triticum aestivum* magas antioxidáns tartalommal és gyulladáscsökkentő hatással is rendelkezik (Grace *et al.*, 2022), létfontosságú a globális élelmezésbiztonság szempontjából.

A búzát földrajzi régiók széles körében termesztik, a tengerszinttől, a 4570 méteres tengerszint feletti magasságig. Földrajzi szélesség szerint pedig az északi szélesség 30° és 60°, valamint a déli szélesség 27° és 40° fokok között jellemző az őszi búza termesztése (Yuan és Sun, 2021). Az őszi búza (*Triticum aestivum*), amely fontos alaptermék, képes alkalmazkodni a különböző környezeti feltételekhez, amely képességet elsősorban a fejlettségi időpont szabályozását befolyásoló összetett genetikai háttérének tulajdonítják (Zhang *et al.*, 2022).

A KSH adatai szerint Magyarországon az őszi búza betakarított összterülete 891 ezer ha volt, valamint termésátlaga elérte az 5970 kg/ha-t a 2021-es évben (KSH, 2021).

3.1.1. Az őszi búza (*Triticum aestivum*) betegségei

Az őszi búzát világviszonylatban tekintve számos növénypatogén vírus képes megtámadni, ezek közül hazánkban azonban mindössze a búza törpülés vírusnak (Wheat dwarf virus – WDV), valamint a búza csíkos mozaik vírusnak (Wheat streak mosaic virus – WSMV) van jelentősége. Esetenként őszi búza kultúrában is problémát okozhatnak még az árpa vírusos betegségei, mint az árpa csíkos mozaik vírus (Barley stripe mosaic virus – BSMV) és az árpa sárga törpülés vírus (Barley yellow dwarf virus – BYDV) (Áy *et al.*, 2007).

A kórokozó gombák komoly fenyegetést jelentenek a globális élelmezésbiztonságra. A növényi betegségek körülbelül 85%-át gombák vagy gombaszerű szervezetek okozzák. A búza patogén gombás fertőzése a növénytermesztés egyik legkritikusabb eleme lehet (Nair *et al.*, 2019). Legfontosabb betegségei közé tartozik a gabonalisztharmat, a fuzariózis, a szártőbetegség, valamint az üszög és az egyes rozsdabetegségek. A csírákorban jelentkező betegségek közül nagy szerepe van az üszöggombáknak (*Tilletia laevis*, *Ustilago tritici* f.sp. *tritici*), a *Fusarium*, az *Alternaria* és *Rhizoctonia* fajoknak. A jellemző gombás megbetegedések közül kiemelkedő jelentőséggel bír a lisztharmat (*Blumeria graminis* f.sp. *tritici*), az egyes gabonarozsdák

(*Puccinia graminis f.sp. tritici*, *P. recondita*, *P. striiformis*) és a fuzáriózis (*Gibberella zeae*/*Fusarium graminearum*, *F. culmorum*, *F. poae*, *Gibberella moniliformis* / *F. verticillioides* stb.) okozta károk (Kovács et al., 1978). A búza fuzáriumos fertőzése egy széles körben elterjedt és pusztító betegség. A fuzáriumos betegség kedvező éghajlati viszonyok között komoly termésmennyiségi és minőségi veszteségeket okozhatnak. Ebből kifolyólag a megfertőzött szemtermések esetenként sem vetőmagként, sem élelmiszerforrásként, sem takarmányként nem állják meg a helyüket. A legnagyobb gondot azonban a szemtermések penészgombák másodlagos anyagcseretermékeikkel, a mikotoxinokkal való szennyezettsége jelenti (Paillard et al., 2004). A leggyakrabban előforduló mikotoxinok az őszi búza termesztése során a zearalenon (ZEA) és a B típusú trichotecének, mint például a deoxinivalenol (DON) (Sinegugu et al., 2021).

3.2. Mikotoxin termelésre képes szántóföldi és raktári penészgombák általános jellemzői

A penészgombákat fertőzésük körülményeit tekintve két nagy csoportba sorolhatjuk. Az úgynevezett szántóföldi penészgombák jellemzően nagyobb nedvességtartalmat igényelnek (20-30%). Velük leggyakrabban a termőföldön találkozhatunk, a növénytermesztés során. A raktári penészgombák inkább tárolás során okoznak problémát, ebből kifolyólag inkább az alacsony nedvességtartalmat részesítik előnyben (Mézes, 2006).

A szántóföldi penészgombák a magas nedvesség tartalmú gabona mellett kedvelik a nagy vízáktívitású közeget is. A toxintermelés mennyisége esetükben is számtalan dolog függvénye lehet, előidézhetheti a helytelen növényápolás és növényvédelem, egyes agrotechnikai hibák, a növényváltás hiánya stb. A szántóföldi penészgombák csoportjából többek között a *Fusarium* fajok által termelt a trichotecén és zearalenon toxinok jelentik a legnagyobb egészségügyi kockázatot (Kovács, 2010).

A raktári penészgombák jelenléte főleg a tárolás során elkövetett technológiai hibákra vezethető vissza. Kártételük jellemzően a gabona beltartalmi értékének csökkenésében nyilvánul meg, már önmagában ezzel is komoly gazdasági károkat okozva, nem beszélve az esetleges mikotoxin termelésről. Legfontosabb képviselőjük az *Aspergillus* és a *Penicillium* és a *Fusarium* nemzetségekhez tartozó fajok. Ezen nemzetségek számos a humán egészségre is potenciális veszélyt jelentő mikotoxint termelhetnek, mint például az aflatoxin, a patulin vagy éppen az ochratoxin-A. (Kovács, 2010).

3.2.1. Mikotoxin szennyezettség és a vele járó kihívások

Egy gabonatétel mikotoxinnal való szennyezettsége esetében az adott toxin a teljes élelmiszerláncban előfordulhat. Számolnunk kell vele a feldolgozatlan növényi termékekben, így később a növényi eredetű élelmiszerekben és takarmányokban, végül pedig a állati szervezetekben, az állatok húsaiban és más állati eredetű élelmiszerekben, mint például a tojásban és a tejben (Al-Jaal *et al.*, 2019). Sőt egyes mikotoxinok képesek kiválasztódni az anyatejjel is.

A mérgező mikotoxinok útja a termőföldről egészen a feldolgozottélelmiszerig nyomon követhető. A talajban, vagy a talajfelszínen jelenlévő gomba még a termőterületen megfertőzheti a növényt és beindulhat a mikotoxin termelés is, ami aztán a betárolást követően tovább folytatódhat, sőt fokozódhat, ami végül a szennyezett gabonából előállított élelmiszer toxin tartalmában mutatkozik meg. Tovább súlyosbítja a helyzetet, hogy előfordulhatnak olyan esetek, amikor egyazon mintából, minimális mennyiségben ugyan, de több toxin is kimutatható. A gyakorlatban a szennyezettség mértékét néha igen nehéz megbecsülni, hiszen a mikotoxinok gyakran nem egyenletesen oszlanak el a vizsgált mintákban, hanem inkább gócszerűen. Ebből kifolyólag az erre irányuló vizsgálatok alkalmával többszöri mintavételezés szükséges. Azaz a vizsgált tételből többszöri ismétléssel, kisebb mintákat vesznek véletlenszerűen, majd ezeket egy teljes tételmintává összesítik. Végül extrakcióval, másnéven kioldással vonják ki a mikotoxinokat és az így kapott oldat toxin tartalmát vizsgálják analitikai eszközökkel (Berthiller *et al.*, 2018; Al-Jaal *et al.*, 2019). Egyre gyakrabban előforduló jelenség, hogy egy adott tételben több fajta mikotoxint detektálnak, melyek akár erősíthetik is egymás hatását. Az állattenyésztésben szennyezett takarmány etetése esetén tehát sok esetben kevert hatás figyelhető meg a toxikózis során, ami nehezíti az ezt kiváltó mikotoxinok gyors beazonosítását, ebből kifolyólag nehezíti az ellenük való mihamarabbi védekezés lehetőségét az állatállományban (Al-Jaal *et al.*, 2019).

A fentiekben már sokszor említett szennyezettség okozta gazdasági károkon kívül, az egészségügyi kockázat is komoly kihívást jelent napjainkban. A humán egészségre gyakorolt kockázatból kifolyólag elengedhetetlen feladat a mikotoxin termelő penészgombák ellen irányuló védekezés. A mikotoxinok körülbelül 70%-a táplálkozás során változatlan formában kerül be a humán szervezetbe (Zain, 2011; Kovács, 2010). Ennek legfőbb oka, hogy az ilyen mérgező anyagok csak részlegesen vagy egyáltalán nem is bomlanak le a takarmány előállítás, vagy egyes feldolgozási műveletek során (Mokhtarian *et al.* 2020) A hőkezelési folyamatok is ártalmatlannak bizonyulnak ellenük, hiszen nem érzékenyek a magas hőmérsékletre. Valamint

ellenállnak a gyomor magas sósav tartalmának is. Tehát elmondhatjuk, hogy a mikotoxinok, ezen tulajdonságaik révén jól ellenállnak a gyakorlatban legtöbbször használt védekezési módszerek jelentős részének. Mindezek tetejében pedig gyakran kimondottan agresszív sejtméregként viselkednek. Képesek korlátozni a szervezet védekező mechanizmusait, illetve akadályozni az immunrendszer optimális működését. (Degola *et al.*, 2007).

A szántóföldi penészgombák által termelt mikotoxinok ellen az előzőkből kifolyólag a megelőzés bizonyul a legjobb védekezésnek. A penészgombák elszaporodását kell tehát megakadályozni. Erre jó megoldás lehet a megfelelő agrotechnikai módszerek alkalmazása, mint például a tarlómaradványok aláforgatása, az árvakelés és a gyomok kezelése. Nagyon fontos továbbá a vetésforgó betartása, illetve a rezisztens fajták termesztése. A toxintermelő gombákkal szennyezett területen fontos lehet a vetőmag penészgombák elleni csávázása. Később a növényállományban bekövetkezett fertőzés kémiai kezelése során nagy hangsúlyt kell fektetni az időzítésre. A vegyszeres kezelést kalászhányás végén, virágzás kezdetén kell elvégezni. Összességében törekedni kell arra, hogy a növény a lehető legkevesebb stresszhatásnak legyen kitéve a szántóföldön. (Kovács, 2010).

A raktári penészgombák befolyásolják a betárolt szemtermések csírázó képességét, minőségi és mennyiségi romlásához vezethetnek (Alemayehu *et al.*, 2020). A raktári penészgombák mikotoxinjaik megjelenésének elkerülése érdekében, a penészgombák elszaporodását kell megakadályozni vagy minimálisra csökkenteni. Mindkét alapvető penészgomba típus ellen fontos megelőzésnek bizonyul a betakarítás körülményeinek megfelelő megválasztása, gondolva itt a megfelelő nedvességtartalomra és érettségi szintre. Ezt követően kihagyhatatlan lépés a betárolás előtti válogatás, mely során kisselektáljuk a sérült szemeket, illetve az idegen növényi részeket (Khlangwiset & Wu, 2010; Kovács, 2010).

A fentiekben elhangzottak alapján tehát elmondható, hogy komplex szabályozásra van szükség, a mikotoxinok okozta élelmiszerbiztonsági problémák csökkentése érdekében. Ehhez elhanyagolhatatlan a penészgombák szaporodásának megelőzése. Fontos a feldolgozás lépéseinek nyomon követése, illetve azok ellenőrzése. Mindezek tetejében pedig nagy segítséget jelenthet az élelmiszeriparban és a takarmány előállításban használatos megengedett határértékek megállapítása és betartása is (Khlangwiset & Wu, 2010; Kovács, 2010).

3.3. *Aspergillus* nemzetség jellemzése, előforduló fajok

Az *Aspergillus* nemzetségbe tartozó növény kórokozó fajok szaprofita szervezetként képesek fennmaradni a talajban, illetve a lehullott növényi maradványokban. Ivartalan úton konídiumokat képeznek, melyek konídiumtartókon helyezkednek el. A számukra kedvezőtlen időszakot pedig szklerócium kitartóképlet formájában vészelik át (Amaiike & Keller, 2011).

Az *Aspergillus* nemzetségbe tartozó növényi kórokozók nemcsak azért adhatnak okot aggodalomra, mert több agronómiailag fontos élelmisznövényt is képes megfertőzni, hanem azért is, mert számos fajuk mikotoxint termelhet (Palencia *et al.*, 2010). Az *Aspergillus* csoportba tartozó *Aspergillus flavi* a növényeinken általánosan előforduló faj, amely az *A. parasiticus* mellett közegészségügyi szempontból a legfontosabb aflatoxin-termelők közé sorolható (Riba *et al.*, 2010; Horn, 2007). Jelenléte során számolni kell az élelmiszer-romlással és akár a toxintermeléssel is. Egyes kutatások alapján, a cirok szemtermésből izolált *Aspergillus flavi* izolátumainak 25% -a volt aflatoxint, míg 22,5% -a ciklopiazonsavat termelő. Mindezek ellenére fontos megjegyezni, hogy az *A. flavus* mikotoxin-termelése nagymértékben változó, és számos tényezőtől függ, például a kórokozó genotípustól, a földrajzi eredettől, az éghajlati viszonyoktól és az agronómiai gyakorlattól (Del Palacio *et al.*, 2020).

Az *Aspergillus flavus* fontos kórokozója a különféle termesztett növényeknek, mint a kukorica, a gyapot és a földimogyoró, ezzel komoly termés kiesést okoz az egész világon (Varga *et al.*, 2009; Dobolyi *et al.*, 2011). Hazánkban az aflatoxin-termelő fajok közül az *A. flavus*-t gyakran izolálják különböző mezőgazdasági terményekről, mint kukorica, búza vagy szőlő (Varga *et al.*, 2014). A gabonák közül a búza mellett, fontossága miatt kiemелendő még a kukorica szennyezettsége. Az európai korlátozások szerint a kukorica felhasználása és élelmiszer-összetevőként való alkalmazása esetén maximum 10 µg/kg összes aflatoxint vagy 5 µg/kg aflatoxin B1-et tartalmazhat (Benito *et al.*, 2021). A búza és búzalisztra vonatkozó határértéket 2 µg/kg AFB1 tartalomban állapították meg (Nazareth *et al.*, 2016). A cirkot gyakran szennyezhetik zearalenon, fumonizinek, aflatoxinok és ochratoxin-A mikotoxinok. Ma már úgy vélik, hogy az élelmiszerek ochratoxin-A szennyeződése elsősorban az *Aspergillus carbonarius*-nak és néhány *A. niger* aggregátumfajnak, elsősorban az *A. niger* és az *A. tubingensis*-nek köszönhető. Az *A. niger* és más *A. niger* aggregátumfajok dominánsak voltak Argentínából, Thaiföldről, Brazíliából és Tunéziából származó cirokban. Az *A. carbonarius* pedig az indiai cirokmintákban mutatott magasabb eloszlást (Lahouar *et al.*, 2017).

Az *Aspergillus tubingensis* a fekete *Aspergillus* penészek egyik legjellemzőbb faja, természetesen az *A. niger* mellett. Az *A. tubingensis* gyakran felelős egyes gyümölcsök és zöldségek betakarítás utáni bomlásáért (Xu *et al.* 2020).

3.3.1. *Aspergillus* fajok aflatoxin termelésének kimutatása

Az *Aspergillus* nemzetség tagjai nem minden esetben termelnek mikotoxinokat. Majdnem minden *A. parasiticus* törzs termel aflatoxint, csupán 3-6% nem minősül aflatoxigénnek, míg az *A. flavus* populációk toxigenitása jelentősen változik a törzs, a szubsztrát és a földrajzi eredet függvényében. Sőt *A. flavus* esetében is gyakran megfigyelt jelenség, hogy egy vagy több, a bioszintetikus géncsoporthoz tartozó gén mutálódik. Annak eldöntésére, hogy a kísérleti körülmények között megfigyelt *Aspergillus* faj termel-e aflatoxint, számos laboratóriumi megoldást dolgoztak már ki (Degola *et al.*, 2007). Az aflatoxin bioszintetikus útvonala körülbelül 25 gént foglal magában, amelyek egy 70 kb-os DNS-régióban csoportosulnak. Az *A. flavus*, az *A. parasiticus* és más *Aspergillus Flavi* szekcióba tartozó fajok közel azonos szekvenciákkal és génrenddel rendelkeznek a klaszterben. (Gallo *et al.*, 2012). A közelmúltban több kutatócsoport tesztelte polimeráz láncreakción (PCR) alapuló diagnosztikai módszerek alkalmazásának lehetőségét az aflatoxin bioszintetikus gének jelenlétének vagy expressziójának kimutatására (Degola *et al.*, 2007). Ez előbbire genomiális PCR, míg utóbbira real-time PCR eljárás alkalmazható. Criseo és munkatársai 2001-ben multiplex PCR protokollt dolgoztak ki az *A. flavus* csoporton belüli aflatoxin-termelő és nem termelő törzsek megkülönböztetésére. Mayer 2003-as kutatása során valós idejű PCR-t használt az *A. flavus* aflatoxin bioszintetikus génjének expressziójának nyomon követésére búzában. Az aflatoxin bioszintézis gének PCR kimutatásán alapuló vizsgálatok azonban nem hibátlanok, abból fakadóan, hogy nem képes kimutatni az esetleges mutációt a primerek célzott génszekvencia régióján kívül. Ennek következtében gyakran előfordulhatnak téves pozitív eredmények. Az RT-PCR-en alapuló szűrési módszerek adott esetben sokkal pontosabbak lehetnek, mivel a génexpresszió kimutatását célozzák (Degola *et al.*, 2007).

3.4. *Aspergillus* fajok ochratoxin termelésének kimutatása

A Nigri szekcióba tartozó *Aspergillus* fajok világszerte elterjedtek. Sok faj közülük képes károsítani a betárolt terményt, azonban több más fajt közülük felhasználnak a fermentációs iparban. Jelentősége azonban teljesen megváltozott a közelmúltban, mer a szőlő és a bor ochratoxin A szennyezettségért leginkább felelős gombákként azonosították őket. Az *A.*

tubingensis-ről, az *A. niger*-ről és az *A. carbonarius*-ról is régóta ismert, hogy ochratoxint termel. Ezen fajok meghatározása a Nigri fajcsoporton belül kulcsfontosságú lehet a toxikológiai kockázat megbecslése szempontjából. Mivel az ochratoxin szennyezettség becslésénél fontos szempont, hogy mely faj okozza a szennyezést, mivel azok ochratoxin termelő képessége jelentősen eltérhet. Ezért hasznos információval szolgálhatnának a mikotoxin termelésért feleős gének azonosítására használható primerek, azonban az OTA bioszintézis lépéseiben részt vevő géneket még nem azonosították, így kimutatásukra tervezett primert sem terveztek még. A kalmodulin gén azonban igen hasznosnak bizonyult a Nigri szekcióhoz tartozó fajok megkülönböztetésében, mivel rendelkezik néhány fajspecifikus, diagnosztikai célokra alkalmas jellemzővel. Susca és kutatótársai 2007-ben kimutatták, hogy a kalmodulin alapú PCR módszer nagyfokú specificitással rendelkezik az *Aspergillus* fajszerű azonosítására a fekete *Aspergillus*okon belül. A PCR-módszerrel ezek a fajok morfológiai vizsgálat nélkül is azonosíthatók, az elemzés és az ebből következő téves azonosítás kockázata nélkül. Ezenkívül ez a módszer a gyors DNS-kivonás és az egyszerű PCR-amplifikáció miatt alkalmas olyan vizsgálatokhoz, amelyek nagyszámú gombaipari izolátumot érintenek. Mivel az *Aspergillus tubingensis*, mint ochratoxin termelő faj morfológiailag nem megkülönböztethető *A. niger* csoporton belül. A Nig1/2 és Tub1/2 fajspecifikus primerek lehetővé tették azonban az *A. tubingensis* és *A. niger* törzsek egyidejű azonosítását, azonos PCR körülmények között (Susca *et al.*, 2007).

3.4.1. *Aspergillus* fajok esetében leírt gének, amelyek összefüggésben állhatnak a mikotoxin termeléssel

Degola és munkatársai az öt pár primert alkalmazták az AflD, AflR, AflS, AflO és AflQ gének specifikus amplifikálására. A kapott eredmények azt az általánosan elfogadott paradigmát támasztotta alá, mely szerint az aflR expressziója szükséges a toxin nagymértékű termeléséhez. Az aflR és az aflS gének szabályozó szerepe a szerkezeti gének expressziójának szabályozásában már korábban is bizonyított volt. A várakozásoknak megfelelően a megfigyelt strukturális génexpresszió követi az aflR és az aflS transzkripciót. Az aflD, az aflO és az aflQ, pedig az aflatoxin bioszintézis útvonal enzimeit kódolják, azonban vizsgálatuk során nem tapasztalták laboratóriumi használatuk előnyeit az aflatoxin klaszter más génjeivel összehasonlítva (Degola *et al.*, 2007). Teljesen más eredményekről számoltak be azonban Scherm és munkatársai, akik azt tapasztalták, hogy az aflD, az aflO és az aflP mutatta a legjobb teljesítményt az aflatoxintermelés és a génexpresszió korrelációja tekintetében (Scherm *et al.*, 2005).

Gallo és munkatársai szintén a két szabályozó gént, az aflR-t és az aflS-t, valamint a szerkezeti géneket, az aflD-t, az aflM-et, az aflO-t, az aflP-t és az aflQ-t célzó primerpárokat használták kísérletük során. Majd különböző csoportokban figyelték meg az említett gének jelenlétének és a csoportok aflatoxin termelésének összefüggéseit. Megállapították, hogy csupán az olyan törzsek nem voltak képesek aflatoxin előállítására, amelyből a megfigyelt génekből három vagy több jelenléte hiányzott. Ezzel szemben az aflatoxin-termelő izolátumok mindegyike mutatta a teljes génkészletet. Tehát az aflatoxin bioszintetikus gének amplifikációjának hiánya következetesen összefüggésbe hozható volt a törzsek nem aflatoxigén jellegével. Valamint esetükben az aflO, aflP és aflQ a nem aflatoxigén izolátumok nagy számának amplifikált génjei voltak (Gallo *et al.*, 2012).

Chang és társai nem aflatoxigén *A. flavus* izolátumok egy részének vagy a teljes géncsoportjának delécióját vizsgálta és jellemzése során alátámasztotta azt a hipotézist, miszerint az aflatoxintermelő képesség elvesztése a kapcsolódó gének deléciójával vagy mutációjával hozható összefüggésbe (Chang *et al.*, 2005). Más kutatók pedig arról számoltak be, hogy az aflatoxin génklaszter génvesztés, rekombináció, DNS-inverziók, részleges deléciók, transzlokációk és egyéb genomiális átrendeződések valószínűsége összefügg a klaszternek a kromoszóma telomerikus régiójához való közelségével (Carbone *et al.*, 2007)

Yang és munkatársai feltételezték, hogy az *A. flavus* sejtekben stressz körülmények között azonosított új fehérjék összefüggésben lehetnek az *A. flavus* túlélésével, növekedésével, patogenitásával és stressz-reakció viselkedésével a fertőzött gazdasejtben. Ezenkívül néhány, az aflatoxin szintézisében és exportjában is részt vevő új fehérjét határoztak meg kísérletük során. Ilyen például a szén-anyagcserében részt vevő fehérjék, amelyek szabályoznák az acetyl-CoA fluxusát, ami az aflatoxinok bioszintézisének kezdeti szubsztrátja. A vakuolummal kapcsolatban álló fehérjék a vakuolum homeosztázis szabályozásával befolyásolhatják az aflatoxinok bioszintézisét és ebből következő exportját. Kutatásuk során bizonyítékot találtak arra vonatkozóan, hogy a PTM az *A. flavus* enzimek aktivitásának szabályozásával az aflatoxin bioszintézisében szerepet játszó mechanizmus lehet (Degola *et al.*, 2007; Gallo *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2021).

3.4.2. Aflatoxinok jellemzése

Az aflatoxinokat számos szakirodalom a legerősebb természetes karcinogének közé sorolja (Rushing és Selim, 2019; Schwartz-Zimmermann *et al.*, 2019; Udomkun *et al.*, 2017). A négy legtöbbet kutatott és humán vonatkozásban is legfontosabb csoportja az aflatoxin B1 és B2,

valamint az aflatoxin G1 és G2, melyeket az *Aspergillus* nemzetségbe tartozó gombafajok termelnek. Legalább 20 az *Aspergillus* nemzetségbe sorolható gombafajról bizonyítottan tudjuk, hogy képesek aflatoxin termelésre. (Baranyi, 2016). Azonban jellemzően az *Aspergillus flavus*, illetve az *A. parasiticus* okozzák a legjelentősebb gazdasági és egészségügyi kockázatot (Carvajal-Campos *et al.*, 2017; Schwartz-Zimmermann *et al.*, 2019). Az aflatoxin termelésre képes penészgombák jellemzően előnyben részesítik a magas páratartalom és hőmérsékleti viszonyokat. Ennek értelmében az ilyen éghajlati adottságok, melyek főleg a szubtrópusi és trópusi éghajlatra jellemzők, kedveznek az aflatoxin termelődésének. (Peraica *et al.*, 1999; Pretari *et al.*, 2019). Ez az általánosság az elmúlt években tapasztalható éghajlatváltozás következtében azonban megdőlni látszik. A mérsékelt éghajlati övbe tartozó területeken is egyre gyakrabban okoz problémát az aflatoxin szennyezettség kialakulása, mely alól Magyarország sem kivétel. (Dobolyi *et al.*, 2011; Baranyi 2016). Nem ritka jelenség az sem, hogy a *Fusarium* és *Aspergillus* nemzetség okozta gombafertőzés egyszerre jelenjen meg egyazon szemtermésen, hiszen közel azonos hőoptimummal rendelkeznek. Ráadásul ez esetben könnyen előfordulhat szinergizmus is, mely során a két mikotoxin jelenléte serkenti egymás hatását (Kubena *et al.*, 1997).

Gyakran találkozhatunk aflatoxin szennyezettséggel számos fontos élelmisznövényben, úgy, mint földimogyoróban, diófélékben, egyéb olajos magvakban, kukoricában, illetve gyümölcsökben (Udomkun *et al.*, 2017). Ezek közül is jellemzően az olajos magvak, a pisztácia és a földimogyoró rendelkeznek a legmagasabb aflatoxin koncentrációval. Az aflatoxinok növényi eredetű élelmiszereink mellett, a szennyezett takarmány fogyasztása során használlataink szervezetéig is eljuthatnak. Az aflatoxin B1 és B2 az állati szervezetben bomlásnak indulnak, ennek során jönnek létre az aflatoxin M1 és M2 metabolitok, melyekkel kizárólag az állati eredetű élelmiszereinkben találkozhatunk (Udomkun *et al.*, 2017)

3.4.3. Ochratoxinok jellemzése

Az ochratoxin egy erős vesekárosodást előidéző anyag, amely előfordulhat olyan élelmiszerekben és takarmányokban, mint a hüvelyesek, gabonafélék, szárított gyümölcsök, kávé, sör, bor és húsok (Susca *et al.*, 2007). Különösen a trópusi és szubtrópusi területek alkalmasabbak az *Aspergillus* fajok számára az ochratoxin előállítására, míg a *Penicillium* fajok inkább viszonylag alacsony hőmérsékleten szintetizálják. Kémiai szerkezetük alapján az ochratoxinok elsősorban három típusba sorolhatók: ochratoxin A (OTA), ochratoxin B (OTB) és ochratoxin C (OTC). Közülük az OTA-t tartják a legnagyobb mennyiségben előforduló és

legmérgezőbbnek (Wang *et al.*, 2022) Az IARC 1993-ban potenciális humán rákkeltő anyagként (2B csoport) határozta meg az Ochratoxin-A-t, hepatotoxikus, teratogén, immuntoxikus és nefrotoxikus hatással (IARC., 1993). Az ochratoxin A egy mérsékelten stabil molekula, amely túlélheti az általános élelmiszer-feldolgozást, és nehezen eltávolítható, ha az élelmiszereket szennyezi (Chen *et al.*, 2022). Az Európai Unióban az OTA megengedett maximális szintjét 3 µg/kg-ban határozták meg a gabonafélékben és gabonakészítményekben, 2 µg/kg-ban a borban és a szőlőlében, valamint 0,5 µg/kg-ban a csecsemőknek és gyermekeknek szánt bébiételekben (Európai Bizottság, 2006).

3.5. *Fusarium* nemzetség jellemzése, előforduló fajok

A *Fusarium* nemzetség tagjai betegségeket okozhatnak számos gazdaságilag fontos növényben, illetve mikotoxin termelésük révén további megbetegedésekhez vezethetnek az ember és a haszonállatok szervezetében egyaránt. A mikotoxinok mellett a *Fusarium spp.* másodlagos metabolitok széles skálájával rendelkeznek, amelyek a növényi betegségekhez, valamint az emberek és háziállatok rákos megbetegedéséhez és más növekedési rendellenességekhez vezethetnek. A *Fusarium spp.* általa kiváltott betegségek típusai meglehetősen változatosak. Megjelenhet akár gyökér- vagy szárrothadás, rák, hervadás, gyümölcs- vagy magrothadás, valamint levélbetegségek formájában is. Az 1980-as évek óta a felismert *Fusarium* fajok száma fokozatosan nőtt, így mára már ezek száma több, mint 80. (Leslie és Summerell, 2008; Ilgen *et al.*, 2008).

A *F. verticillioides* jellemzően kukoricán és cirkon okoz rothadást, de sok más növényt is megfertőzhet. A *F. oxysporum* tagjai több mint száz, mezőgazdaságilag fontos növényfajban képesek hervadásos betegségeket okozni. Az egyes *F. oxysporum* izolátumok azonban gyakran gazdaspecifikus fajok közé sorolhatók. Az azonos fajba tartozó gazdanövényt fertőző izolátumokat ugyanabba a forma specialisba sorolják (pl. *F. oxysporum f. sp. cepae*) (Baayen *et al.*, 2000).

Fusarium oxysporum, *F. poae*, *F. graminearum*, *F. sporotrichioides* és a *F. culmorum* pedig számos gabonanövény, köztük az őszi búza fuzáriumos megbetegedését okozzák. Szinte minden növényi részt képes megfertőzni, mennyiségi és minőségi kárt okozva azzal. Jellemzően polifág, nekrotrófok, talajlakó szervezetek és gyengültségi kórokozók. Sok esetben fertőznek sebeken keresztül vagy jelennek meg másodlagos kártételként. Képesek fennmaradni a növényi maradványokon, a talajban vagy a vetőmagban klamidospórával vagy micéliummal. Terjedése pedig konídiummal, ritkábban micéliummal vagy szintén klamidospórával történhet

(Goncharov *et al.*, 2022; Fischl *et al.*, 1995). Az ellenük való védekezés során kulcsfontosságú a megfelelő agrotechnikai eszközök alkalmazása. Ide tartozik a vetésváltás, az egészséges vetőmag, a tarlómaradványok beforgatás alkalmazása, valamint az optimális tárolási körülmények betartása stb. (Fischl *et al.*, 1995)

3.5.1. Fusarium fajok által termelt mikotoxinok jellemzése

3.5.1.1. Zearalenon

A zearalenon (ZEA) a *Fusarium* nemzetség egyes gombái által szintetizált másodlagos metabolit. Gyakran számolhatunk zearalenon szennyeződéssel *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium crookwellense* és *Fusarium emitectum* gombák fertőzése esetén (Gadzała-Kopciuch *et al.*, 2011).

Az emberi szervezet közvetlenül a szennyezett élelmiszerek révén, vagy közvetve a mikotoxinok kitett állatokból származó termékeken keresztül kerülhet kapcsolatba a zearalenonnal. Mivel a gyártási folyamat során nem távolítható el, a ZEA a teljes emberi élelmiszerláncot érinti, számos élelmiszeripari terméken keresztül, beleértve a gabonaféléket, húst, tejet, bort, sört, szárított gyümölcsöket és fűszereket (Kriszt *et al.*, 2012). A szervezetbe jutást követően pedig képes felhalmozódni a különböző szövetekben (Brera *et al.*, 2014). A zearalenon (ZEA), egy nem szteroid ösztrogén hatású mikotoxin (Bennett & Klich, 2003; Yang *et al.*, 2007). A ZEA és metabolitjai, az α -ZOL és a β -ZOLA-nak való kitettség indukálhatja a progeszteron, ösztradiol, tesztoszteron és kortizol termelését a szervezetben. Ebből kifolyólag nemcsak a ZEA, hanem annak metabolitjai is endokrin rendszert károsító anyagként viselkedhetnek és változásokat okozhatnak a reprodukciós rendszerben (Wang *et al.*, 2014).

3.5.1.2. Trichotecének

Számos gombafaj, köztük a *Stachybotrys*, *Trichoderma*, *Myrothecium*, *Trichotecium*, *Cephalosporium*, *Cylindrocarpon*, *Phomopsis*, *Verticimonosporium*, de főleg a *Fusarium* nemzetségbe tartozó fajok termelnek trichotecéneket (TCN). Körülbelül 170 toxin tartozik a TCN-ek közé, melyek mindegyike alacsony a molekulatömeggel és hasonló a kémiai alapszerkezettel rendelkezik (Mahato *et al.*, 2022). A TCN-ek azonban szerkezetük alapján négy kategóriába sorolhatók, nevezetesen az A, B, C és a D típusba. Az A típusú TCN-ek közé sorolhatjuk a T-2-t, HT-2-t, trichodermint, diacetoxiszcirpenolt (DAS), neoszolaniolt (NEO) és a harzianum A-t. A B típusba tartoznak a dezoxinivalenolok (DON), nivalenolok (NIV),

fusarenon X-k és trichotecinek. A C típusba csupán a krotocin sorolható. Végül pedig a satratoxin G és H, a verrucarín A és a roridin A a D típus tagjai (Huang *et al.*, 2019).

A gabonafélék, például a búza, az árpa, a tritikálé, a zab és a kukorica a TCN-ek elsődleges forrásai az emberi élelmiszerekben és az állati takarmányban, mivel gyakran fertőződnek meg *Fusarium* fajokkal (He *et al.*, 2010). A TCN-mérgezés elnyomja az immunválaszt humán és a haszonállatok szervezetében, annak segítségével, hogy gátolja számos sejtfunkció megfelelő működését. Gátolja a fehérjesszintézist, a mitokondriumok működését, a sejtosztódást, a sejtmembrán működését és elősegíti az apoptózist (Rocha *et al.*, 2005). TCN-ek közül a DON-toxin széles körben elterjedt, és a terményekben igen gyakran megfigyelhető jelenléte (Polak-Śliwińska & Paszczyk, 2021). Az EU szabályozásai alapján a DON megengedett határértéke 1250 µg/kg a feldolgozatlan gabonafélékben, 1750 µg/kg a feldolgozatlan zab és durum búza esetében, 750 µg/kg a közvetlen emberi fogyasztásra szánt feldolgozott élelmiszerekben, 500 µg/kg a gabonapelyhekben, valamint 200 µg/kg határértéket szabtak meg a gabonaalapú bébiételekre (Európai Bizottság, 2006).

3.5.1.3. Fumonizinek

A fumonizinek a kukorica, a kukoricaalapú élelmiszerek és az állati takarmányok széles körben elterjedt természetes szennyezői (Voss *et al.*, 2007; Bolger *et al.*, 2001). Alapvetően 4 fő csoportba sorolhatók, úgy mint FA (A1, A2 és A3), FB (B1, B2 és B3), FC (C1, C3 és C4) és FP (P1, P2 és P3) (Ouyang *et al.*, 2022). Közülük a FB1, FB2 és FB3 csoportok fordulnak elő leggyakrabban élelmiszereinkben, amelyek sokszor együttesen vannak jelen (Chen *et al.*, 2021). A fumonizinek potenciális kockázata az állati és emberi egészségre szinte kizárólag a *F. verticillioides* vagy a *F. proliferatum* által szennyezett kukoricával hozhatók összefüggésbe. Toxikus hatással bírnak, azaz májtoxicitást, rákos megbetegedéseket, a lóféléknél leukoencephalomaláciát, a sertéseknél pedig tüdőödémát okozhatnak (Kellerman *et al.*, 1990; Gelderblom *et al.*, 1991). Toxikológiai szempontból a legjelentősebb és a legnagyobb mennyiségben előforduló fumonizinek a FB1 csoportba tartoznak (Bartók *et al.*, 2010; Falavigna *et al.*, 2013). Az FB1-et tartalmazó élelmiszerek emberi fogyasztása nyelőcsőrákhoz, máj- és vese károsodáshoz vezethet vagy idiopátiás kongesztív kardiopátiát (ICC) okozhat. Valamint terhesség alatt fennálló FB1 kitettség során gyakran rendellenes magzati fejlődés tapasztalható (Waes *et al.*, 2005; Missmer *et al.*, 2006). Az FB1 elsősorban a kukoricát és a kukoricakészítményeket szennyezi. Ezenkívül azonban a rizst és más gabonaféléket, például zabot, rozst, árpát, búzát is szennyezheti, de alacsonyabb mennyiségben (Hanvi *et al.*, 2019).

4. Anyag és módszer

4.1. Szemek felületi fertőtlenítése

A kísérletem során első lépésként őszi búza szemterméseiben vizsgáltam az egyes mikotoxin-termelő gombák okozta belső fertőzöttség mértékét. A szemtermések Kiszomborról származtak. Először a szemterméseket felületileg fertőtlenítettem 10%-os NaOCl-vel (hypo). 2-3 percig állni hagytam a magokat az oldatban. Ezt követően pedig szűrőpapírt rögzítettem a főzőpohár szájára és 4-5 percen keresztül folyó víz alatt öblítettem le őket.

4.2. A szemtermések belső fertőzöttségének vizsgálata Fuzárium szelektív táptalajon

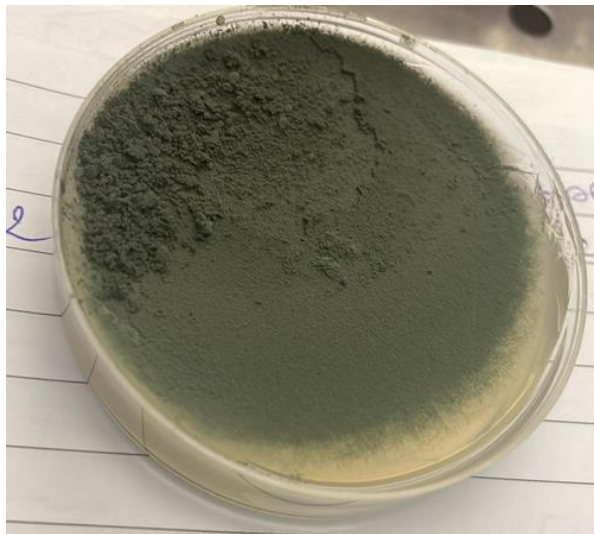
Nash & Snyder – féle fuzárium szelektív táptalajt készítettem a szemek belső fertőzöttségének értékeléséhez (Leslie és Summerell, 2008). Az elkészítéséhez 1 l desztillált vizet, 15 g peptont, majd 1 g KH_2PO_4 -t és 0,5 g MgSO_4 -t, végül pedig 20 g agart használtam. Először a száraz hozzávalókat mértem ki egy lombikba, majd csak ezután öntöttem fel a fent megadott mennyiségű desztillált vízzel. Ezt követően autokláv segítségével 20 percen keresztül, 120 °C-on sterilizáltam. A sterilizálás után a, lehűlt táptalajhoz a steril box alatt, pipetta segítségével további 50 ppm (5 ml) PCNB-t és 100 ppm (10 ml) kloramfenikolt adtam hozzá. Ezt követően nagyméretű (9 cm átmérőjű), steril petricsészékbe öntöttem ki a lombik tartalmát.

A magokat borszeszegővel és alkohollal fertőtlenített csipesz segítségével oltófülkében a táptalajra helyeztem. Egy mintavételi hely esetében 10 petricsészébe, petricsészénként 10 magot, vagyis összesen 100 darab szemtermést helyeztem le. Az őszi búza szemterméseinek vizsgálata során összesen 7 minta fertőzöttségét figyeltem meg Nash & Snyder féle fuzárium szelektív táptalajon.

4.3. Tiszta tenyészetek készítése burgonya dextróz táptalajra

3 nap, majd egy hét elteltével felmértem a kinőtt gombatelepeket és az így, Nash & Snyder – féle fuzárium szelektív táptalajon kinőtt gombatelepeket PDA (burgonya dextróz) táptalajra oltottam. A burgonya-dextróz táptalaj elkészítéséhez 39 g Merck gyártójú PDA táptalaj keveréket és 1 l desztillált vizet használtam. A burgonya-dextróz táptalaj keverék 1:1:10 arányban tartalmaz dextrózt, agart és burgonya kivonatot. Az így kimért oldatot szintén autokláv segítségével sterilizáltam 20 percen keresztül, 120 °C-on. A steril fülke alatt további 100 ppm (10 ml) kloramfenikolt adagoltam a táptalajhoz, majd a kis méretű (5 cm átmérő)

petricsészékbe öntöttem ki a lombik tartalmát. Ezt követően steril oltókacsok segítségével a frissen elkészült táptalajra izoláltam a magok felszínén megjelenő gombatelepeket.



1. ábra: Aspergillus nemzetségbe tartozó gomba tiszta tenyésztete PDA táptalajon
(Fotó: Vlaskality, 2022)

4.4. Mikroszkópi vizsgálatok

Az előzőkhez hasonlóan ismételten 3 nap elteltével 7 napra, napi 12 óra sötétség, 12 óra UV megvilágítás mellett inkubáltam a tenyészeteket a konidiumok fejlődésének indukálása céljából, ezt követően megvizsgáltam a petricsészék tartalmát. Morfológiai bélyegek alapján meghatároztam, hogy Fusarium, Aspergillus vagy Alternaria nemzetséghez tartozó telepek fejlődtek-e az egyes csészékben. Ezek után minden telepből mikroszkópi preparátumot készítettem. Majd egy Olympus BX51 típusú fénymikroszkóp és egy ahhoz tartozó Olympus E420 kamera segítségével megvizsgáltam és dokumentáltam az így elkészített mintákat.



2. ábra: Olympus BX51 típusú fénymikroszkóp és az ahhoz tartozó Olympus E420 kamera
(Fotó: Vlaskality, 2022)

4.5. Molekuláris genetikai vizsgálatok

A tartós preparátumokból 5 darab, a morfológiai meghatározás során *Aspergillus*-nak detektált micéliumaiból DNS-t izoláltam, Zymo Research Fungal/Bacterial DNA MiniPrep kit segítségével az 1. mellékletben leírtak szerint. A DNS mintákat Nanodroppal mértem be, hogy megvizsgáljam a pontos DNS (ng/ul) tartalmát az egyes mintáknak. Majd egységesen 10 ng/ul koncentrációra hígítottam ki mint az izolált DNS mintákat, mint a használni kívánt primereket.

Ezt követően 2 gombafaj, illetve 8, a mikotoxin termeléssel összefüggésbe hozható gén jelenlétét vizsgáltam PCR eljárással. Ennek értelmében a kísérlet során összesen 4 darab primerpárt alkalmaztam fajmeghatározás céljából. Ezek *Aspergillus niger*, valamint *Aspergillus tubingensis* fajokra specifikus primerpárok voltak. Mindemellett összesen 16 darab mikotoxin termeléssel összefüggésben levő génre specifikus primerpárt használtam. Ezek Tub1 (β tubulin), AflR, AflS, AflD, AflM, AflP, AflO, AflQ génekre specifikus primerek voltak, mely gének aflatoxin termelésben való jelentőségéről már az irodalmi áttekintésben szót ejtettem. kísérlet során alkalmazott primer szekvenciákat az 1. táblázatban tüntettem fel.

Végül a PCR-terméket 1%-os agaróz gélben futtattam meg. A gél elkészítéséhez 200 ml hígított TBE puffert, 2 g agarózt és 0,5 μ l etidium-bromidot használtam. Az így kapott géleket UV fény alatt, Biorad rendszerrel, ImageLab program segítségével értékeltem ki.

Primer megnevezése	Faj vagy gén specifikusság	Primer szekvencia	Az applifikált szekvenciák várható hosszúsága (bp)	Felhasznált irodalom
Nig1	Aspergillus niger	Forward 5'- GATTTTCGACAGCATTTCAGAA-3'	245	Susca et al. 2007
		Reverse 5'- AAAGTCAATCACAATCCAGCCC- 3'		
Tub	Asp. tubingensis	Forward 5'- TCGACAGCTATTTCCCCCTT-3'	505	Susca et al. 2007
		Reverse 5'- TAGCATGTCATATCACGGGCAT- 3'		
Tub1	β -tubulin	Forward 5'- GCTTTCTGGCAAACCATCTC – 3'	1198	Gallo et al. 2012
		Reverse 5' – GGTCGTTTCATGTTGCTCTCA – 3'		
AflR	aflR	Forward 5' - AAGCTCCGGGATAGCTGTA-3'	1079	Gallo et al. 2012
		Reverse 5' - AGGCCACTAAACCCGAGTA-3'		
AflS	aflS (aflJ)	Forward 5' - TGAATCCGTACCCTTTGAGG-3'	684	Degola et al. 2007
		Reverse 5'- GGAATGGGATGGAGATGAGA-3'		
AflD	aflD(nor-1)	Forward 5'- CACTTAGCCATCACGGTCA-3'	852	Degola et al. 2007
		Reverse 5'- GAGTTGAGATCCATCCGTG-3'		
AflM	aflM(ver-1)	Forward 5'- AAGTTAATGGCGGAGACG-3'	470	Degola et al. 2007
		Reverse 5'- TCTACCTGCTCATCGGTGA-3'		
AflO	aflO(omtB)	Forward 5' - TCCAGAACAGACGATGTGG-3'	790	Degola et al. 2007

		Reverse 5'- CGTTGGCTAGAGTTTGAGG-3'		
AflP	aflP(omtA)	Forward 5'- AGCCCCGAAGACCATAAAC-3'	870	Degola et al. 2007
		Reverse 5'- CCGAATGTCATGCTCCATC-3'		
AflQ	aflQ(ordA)	Forward 5'- TCGTCCTTCCATCCTCTTG-3'	757	Degola et al. 2007
		Reverse 5'- ATGTGAGTAGCATCGGCATTC-3'		

1. táblázat: A kísérlet során használt primerek szekvenciái, bázishosszúsága és a szekvenciasorrend eredetének irodalmi forrása

5. Eredmények és értékelésük

5.1. Szemtermések belső fertőzöttségének vizsgálata

A búzaszemek Nash & Snyder féle táptalajon történő belső fertőzöttségének vizsgálata során a búza1 mintában a 10 szemtermésből átlagában 3,5 szemtermésben tapasztaltam belső fertőzöttséget (3. ábra).

A fent említett mintákból származó gombaszövedékek PDA táptalajra történő átoltása segítségével tisztatenyészeteket hoztam létre. Morfológiai bélyegek alapján meghatároztam, hogy a kezdetben átlagosan 3,5, darab belső fertőzöttséget mutató szemtermésből PDA táptalajon 1,1 darab *Alternaria*, szintén 1,1 darab *Aspergillus* és összesen 1,5 darab *Fusarium* tenyészet fejlődött.

A búza2 kóddal ellátott búzaszemek Nash & Snyder táptalajon történő belső fertőzöttségének vizsgálata során 10 petricsészből átlagosan 2,8, szemtermés felszínén jelent meg gombaszövedék.

A burgonya-dextróz táptalajon történő morfológiai meghatározás során átlagosan csupán 0,3 darab *Alternaria* és 0,9 darab *Fusarium* tenyésztett indult növekedésnek. A fennmaradó fuzárium szelektív táptalajon növekedett micélium szövedékekből származó izolátumok nem indultak növekedésnek. *Aspergillus*ra utaló morfológiai bélyegeket nem tapasztaltam.

A búza3 mintából származó búzaszemek Nash & Snyder táptalajon történő vizsgálata során közel azonosan a búza1 csoport búzaszemeihez, tízből átlagosan 3,6 szemtermés mutatott belső fertőzöttségeket, ami összesen 36 elváltozott magot jelent.

A tiszta tenyészeteken 10 szem átlagában csupán 0,5 darab *Alternaria*, 0,4 darab *Aspergillus* és 0,8 darab *Fusarium* tenyészet fejlődött a morfológiai jegyek segítségével történő meghatározás alapján. A fennmaradó fuzárium szelektív táptalajon növekedett micélium szövedékekből származó izolátumok ebben az esetben sem indultak növekedésnek.

A búza4 minta fuzárium szelektív táptalajon történő belső fertőzöttségének felmérése során az első csoporthoz hasonlóan tíz petricsésze átlagában 3,5 belső fertőzöttséggel rendelkező szemet találtam.

A PDA táptalajon elvégzett morfológiai bélyegek alapján történő meghatározás során 2 darab *Alternaria*, 0,3 darab *Aspergillus* és 1 darab *Fusarium* tenyészetet azonosítottam.

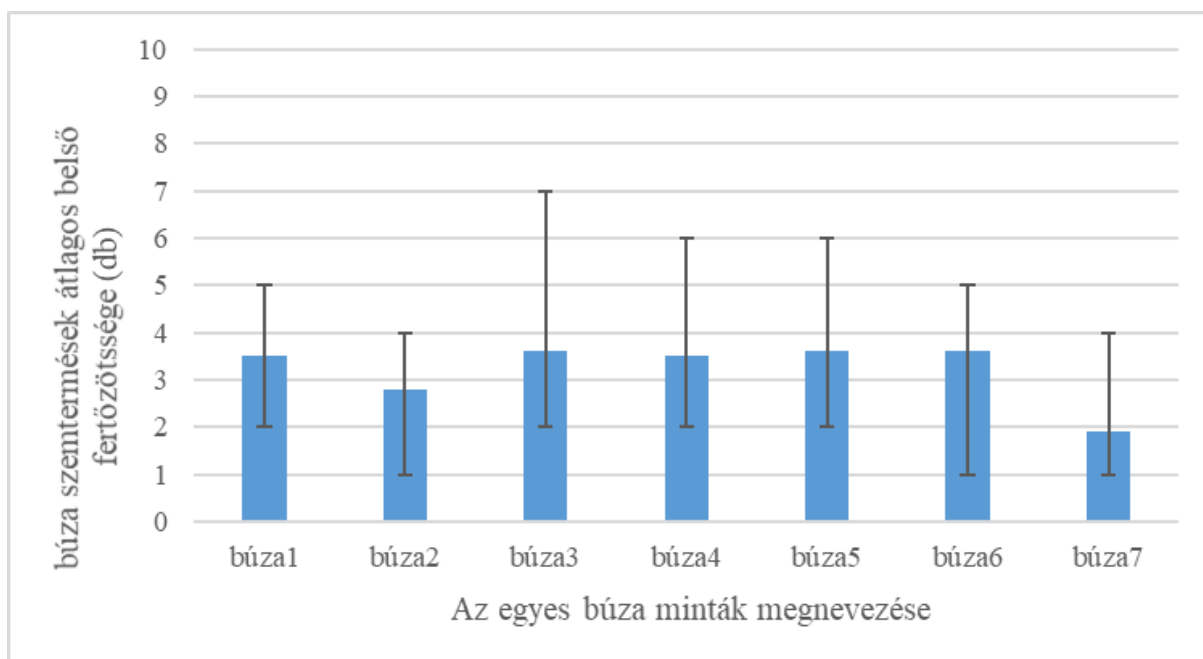
A búza5 számozású őszi búza minták belső fertőzöttségének felmérése során a 10 ismétlés során lehelyezett 10-10 szemekből átlagosan szintén 3,6 szemtermés felszínén jelent meg gombaszövedék.

A burgonya-dextróz táptalajra történő átoltást követően ez esetben is elvégeztem a nemzetségek meghatározását a morfológiai jegyek segítségével. Ennek következtében 1,9 darab Alternaria, 0,3 darab Aspergillus, illetve 1,4 darab Fusarium telepet azonosítottam be.

A búza6 kóddal ellátott Őszi búza minták fusarium szelektív táptalajon történő belső fertőzöttségének vizsgálata során 10 szemből átlagosan az előzőekhez hasonlóan ez esetben is 3,6 szemtermés felszínén jelentkezett gombaszövedék.

Ezt követően elvégeztem a morfológiai jegyek alapján történő besorolást, mely során összesen 2,1 Alternaria, mindössze 0,1 Aspergillus és 1 Fusarium tiszta tenyészetet határoztam meg.

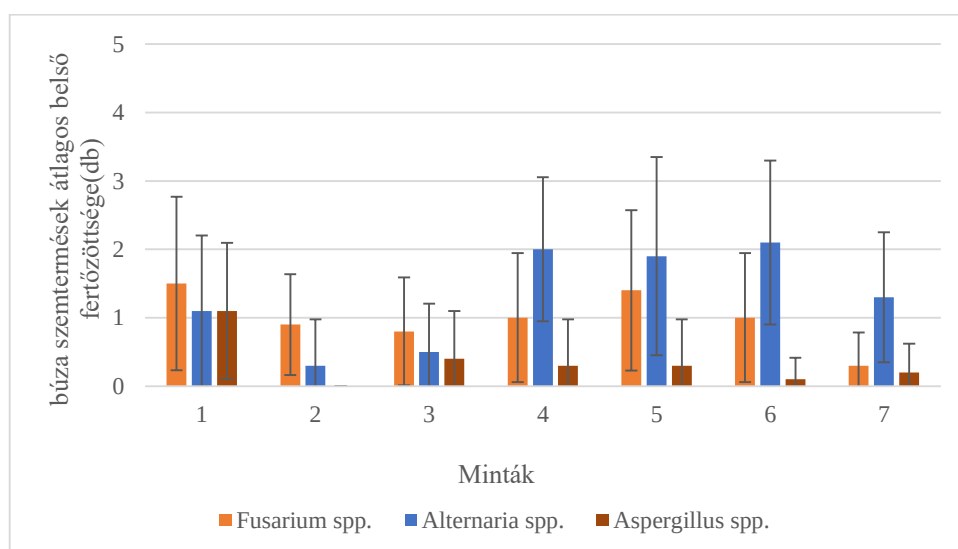
Az utolsó általam vizsgált őszi búza mintavételi csoport a búza7 jelöléssel volt ellátva. A szemtermések belső fertőzöttségének vizsgálata során átlagosan mindössze 1,9 darab fertőzött szemet számoltam.



3. ábra: Őszi búza szemtermések átlagos belső fertőzöttségének értékei (az ábrán a szórás van feltüntetve)

A burgonya-dextróz táptalajon ez esetben is elvégeztem a morfológiai meghatározást. Átlagosan 1,3 Alternaria, 0,2 Aspergillus és 0,3 Fusarium nemzetségbe tartozó tenyészetet állapítottam meg.

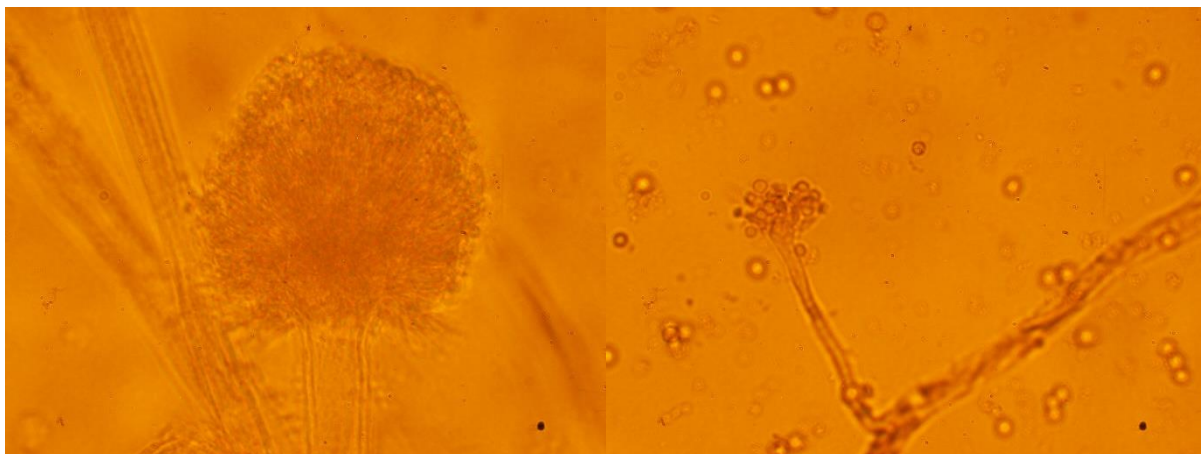
A 4. ábra jól szemlélteti, hogy az őszi búza 7 csoportjának vizsgálata során az egyes nemzetségek milyen eloszlásban okoztak belső fertőzöttséget a szemtermésekben. 10 szemre nézve az első mintában átlagosan 1,5, a másodikban 0,9, a harmadikban 0,8, a negyedik csoportban 1, az ötödikben 1,4, a hatodikban szintén 1 és végül a hetedik mintavételi csoportban átlagosan 0,3 szemtermésen okoztak fertőzést a *Fusarium* nemzetség tagjai. Szintén 10 szem átlagában az első mintában 1,1, a másodikban 0,3, a harmadik csoportban 0,5, a negyedikben 2, az ötödikben 1,9, a hatodik mintában 2,1 és végül a hetedik vizsgált csoportban mindössze 1,3 fertőzött szemtermést okozott az *Alternaria* nemzetség jelenléte. Végül pedig az első mintavételi csoportban átlagosan 10 szemből 1,1, a másodikban 0, a harmadik mintában 0,4, a negyedikben és ötödik csoportban 0,3, a hatodikban 0,1 és a hetedikben a 10 táptalajra helyezett szemből átlagosan 0,2 darab mag fertőzéséért volt felelős az *Aspergillus* nemzetség.



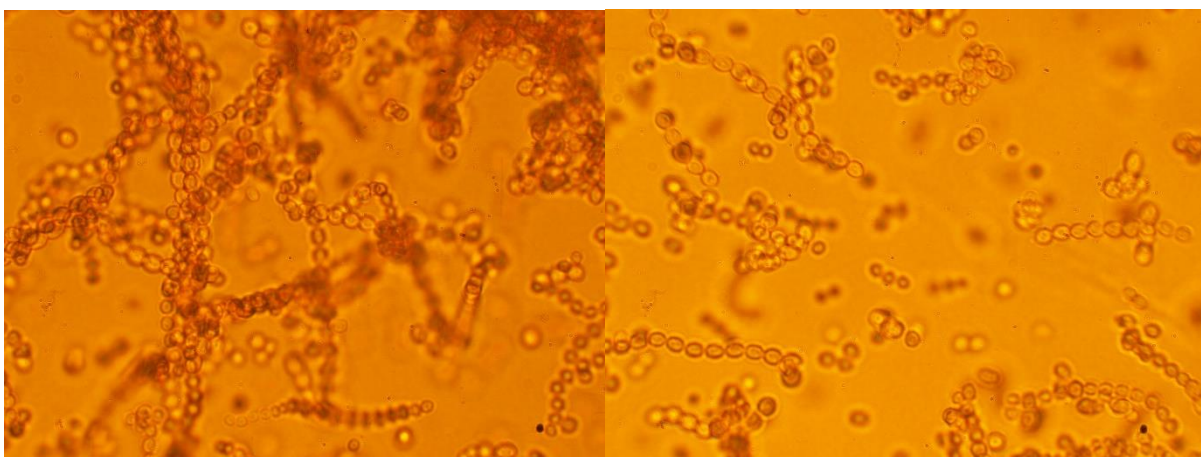
4. ábra: Őszi búza szemtermések nemzetségekre lebontott belső fertőzöttségének átlagos értékei, szórással kiegészítve

5.2. Mikroszkópi vizsgálat

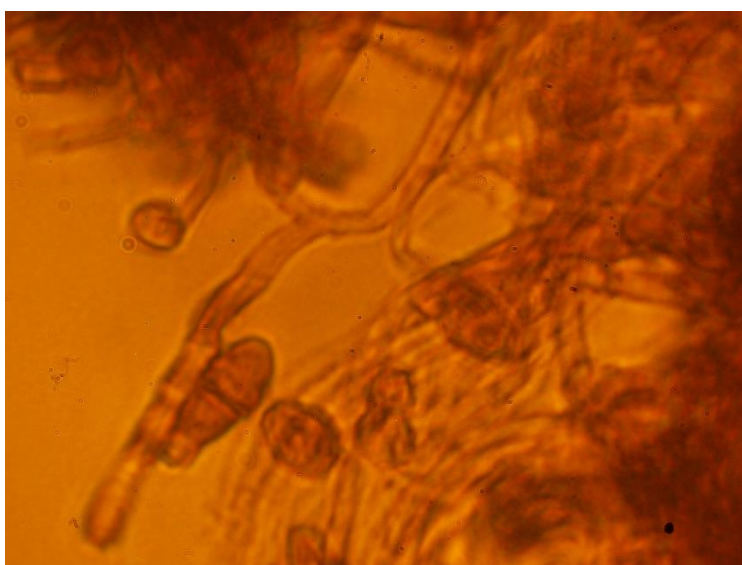
A vizsgálatok során a morfológiai bélyegek alapján már meghatározott tiszta tenyészetekből készült preparátumokat vizsgáltam meg mikroszkóp segítségével. Ennek alkalmával az adott nemzetségekre legjellemzőbb mikroszkópi képeket mutató tenyészeteket válogattam ki, majd ezekkel dolgoztam tovább a DNS kivonás során.



3. ábra: őszi búza szemtermésből izolált *Aspergillus* spp. mikroszkópi képe
(Fotó: Vlaskality, 2022)



4. ábra: őszi búza szemtermésből izolált *Aspergillus* spp. mikroszkópi képe
(Fotó: Vlaskality, 2022)



5. ábra: őszi búza szemtermésből izolált *Alternaria* spp. mikroszkópi képe
(Fotó: Vlaskality, 2022)

5.3. Molekuláris genetikai vizsgálatok eredményei

A gélelektroforézis során minden esetben a 16 darab PCR termékekkel dolgoztam. Az utolsó két PCR terméket tartalmazó zseb volt a negatív kontrollt, azaz ezek nem tartalmaztak DNS-t. Valamint minden alkalommal csupán a negatív kontrollokat megelőző 5 PCR termék tartalmazta őszi búza felszínéről származó gomba szövedék DNS-ét.

Az 1-16-ig számozott minták esetében az *Aspergillus niger* fajra specifikus primert használtam. 1-től 14-ig, minden fül a tiszta tenyészetekből kivont *Aspergillus* DNS-eket tartalmazza, ebből azonban csupán az utolsó 5 darab, tehát a 10, 11, 12, 13 és 14-es számmal ellátott minták tartalmazzák őszi búza felületéről izolált gombából származó DNS-t. A 14-es számmal ellátott, őszi búza felületéről izolált, majd kitenyésztett *Aspergillus* gombából származó DNS esetében az *Aspergillus niger* fajspecifikus primer amplifikálta a célszekvenciát, így a gélelektroforézis kiértékelése során a 14-es mintánál jól kivehető bandet láthatunk, nagyjából a 245 bázispár hosszúságot jelentő távolságban. Tehát az utolsó, 14-es sorszámmal megjelölt búza minta esetében a teszt pozitív eredményt adott. A maradék 4 őszi búzából származott PCR termék a gélelektroforézist követően negatív eredményt produkált (2. melléklet).

A 17-től 32-ig terjedő számozás esetében a mastermixhez *Aspergillus tubingensis*-re specifikus primert adtam. Ebben az esetben is az utolsó 2 fül tartalmazta a negatív kontrollt, és az ezt megelőző 5 az őszi búza felületén megjelenő gombákból izolált DNS-t. Ezen gélkép kiértékelése során az utolsó előtti, azaz ez esetben a 29-es számmal ellátott fülben volt jól kivehető pozitív eredmény, megközelítőleg az 1406 bázispár hosszúságnál, azaz a negyedik búzaminta az *Aspergillus tubingensis* faj képviselője volt (3. melléklet).

Az első két esetben tehát csupán fajspecifikus primerekkel végeztem vizsgálatokat, ezt követően pedig mikotoxin termeléssel összefüggésbe hozható gének jelenlétét vizsgáltam az azokra specifikus primerpárok segítségével.

A Tub1 és AflR génre specifikus primerek esetében egyetlen alkalommal sem tapasztaltam, hogy a primer amplifikálta volna a célszekvenciát.

Ezzel ellentétben a 65-80-ig számozott minták vizsgálata alkalmával az AflS génspecifikus primer felszorzozta a kívánt DNS szakaszt a 76. minta esetében, az 1399 bázispár hosszúságot jelölő sávban (4. melléklet).

A 81 és 96 közti minták esetében AflD génspecifikus primert adtam a mastermixhez. Az így létrejött PCR termékek gélben történő megfuttatását követően azonban sehol nem tapasztaltam pozitív eredményt, az őszi búzából származó minták vizsgálata során.

97-től 112-ig sorszámozott mintákban az AflM mikotoxin termelésben feltehetően szerepet játszó gén jelenlétét figyeltem meg, az arra specifikus primerpárok segítségével, azonban egy esetben sem detektáltam, hogy a primer amplifikálta volna a kívánt célszekvenciát.

Az AflO gén esetleges jelenlétét a 113-128 számozással ellátott PCR termékekben vizsgáltam meg. Ennek során a gélképen több minta megfigyelése során is jól kivehető világító eredményt detektáltam, amely arra enged következtetni, hogy a specifikus primer többszörözött a célzott DNS szakaszt. Tehát összesen két, az őszi búzát fertőző *Aspergillus*okból kivont DNS tartalmazta a vizsgált gént, melyeket a 122-es és a 124-es mintákban azonosítottam, az 1034 bázispár hosszúság nagyságában (5. melléklet).

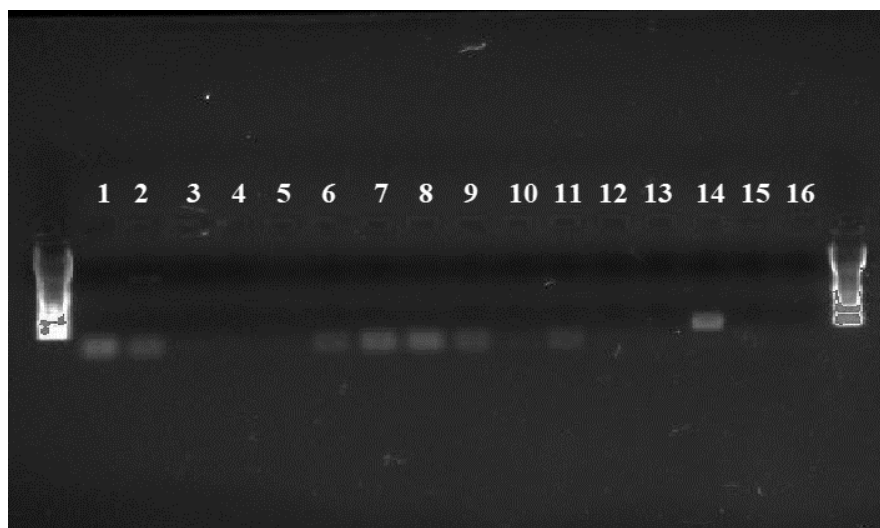
Ezt követően az AflP mikotoxin termelésben szerepet játszó gén jelenlétét vizsgáltam meg az őszi búza belső fertőzöttségét okozó *Aspergillus* gombákból kivont DNS mintáiban. AflP génre specifikus primert adtam a mastermixhez, majd az ebből származó PCR termékben gélelektroforézis segítségével ellenőriztem a kapott eredményt. A gélképen 129-144 számmal jelöltem meg a fület. A 138-as fülben a primer megsokszorozta a kívánt célgént, melynek eredményeképpen erős foszforeszkáló sáv látható a gélképen, körülbelül 870 bázispár hosszúságnál (6. melléklet).

Az utolsó általam megfigyelt gén az AflQ volt, mely jelenlétét a 145-160 sorszámú mintákban vizsgáltam meg. Ez esetben azonban a gélelektroforézissel történő ellenőrzés során egy esetben sem tapasztaltam pozitív eredményre utaló mintázatot a kapott gélképen.

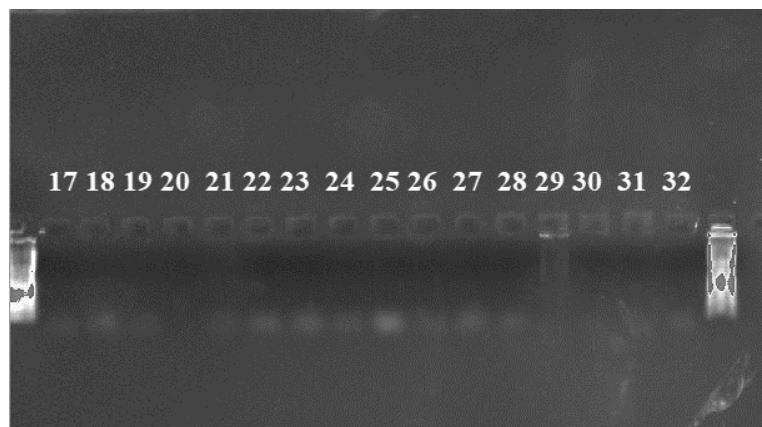
Összegezve tehát, az 5 őszi búzát fertőző *Aspergillus* gombából izolált DNS fajszerű azonosítása alkalmával, az ötödik izolátum *Aspergillus niger*nek, míg a negyedik *Aspergillus tubingensis*nek bizonyult. A génspecifikus primerekkel történő megfigyelések következtében pedig az első mintából az AflP és az AflO gének jelenlétét sikerült kimutatnom. A második PCR termék ellenőrzése alkalmával egyik specifikus primer sem amplifikálta a célszekvenciát. A harmadik minta génspecifikus primerekkel történő kísérletét követően 2 gén kifejeződését is detektáltam a DNS-ben. Ezek az AflO és az AflS mikotoxin termelésben bizonyítottan szerepet játszó gének voltak. A negyedik és az ötödik őszi búzát fertőző gombaszövedékből származó DNS mintákból egyik gén jelenlétét sem sikerült kimutatnom. A kapott eredményeket a lent található táblázat szemlélteti.

Primer	1.minta	2.minta	3.minta	4.minta	5.minta
Asp. niger	-	-	-	-	+
Asp. tubingensis	-	-	-	+	-
TUB1	-	-	-	-	-
AflR	-	-	-	-	-
AflS	-	-	+	-	-
AflD	-	-	-	-	-
AflM	-	-	-	-	-
AflO	+	-	+	-	-
AflP	+	-	-	-	-
AflQ	-	-	-	-	-

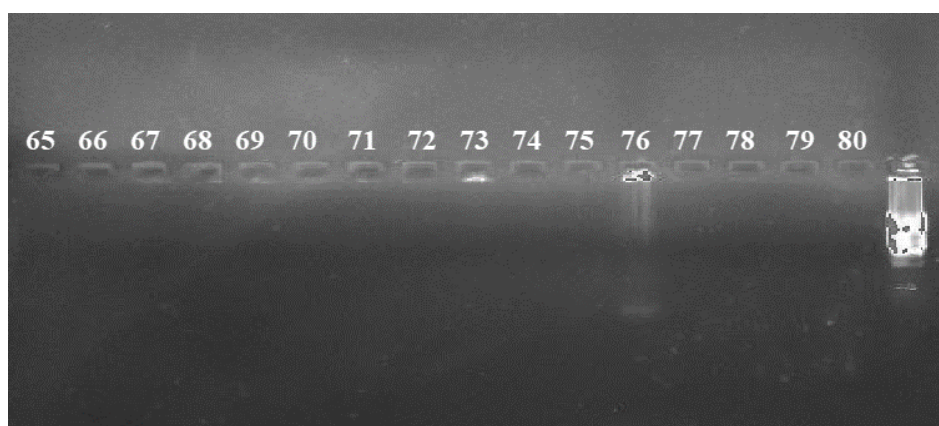
2. táblázat: Specifikus primerek amplifikált célszekvenciái („+”-al jelöltem a pozitív eredményt, vagyis azt, ahol a primer felsokszorozta a célszevenciát; „-”, -al jelöltem a negatív eredményeket, vagyis azt, ahol a primer nem amplifikálta a célszekvenciát)



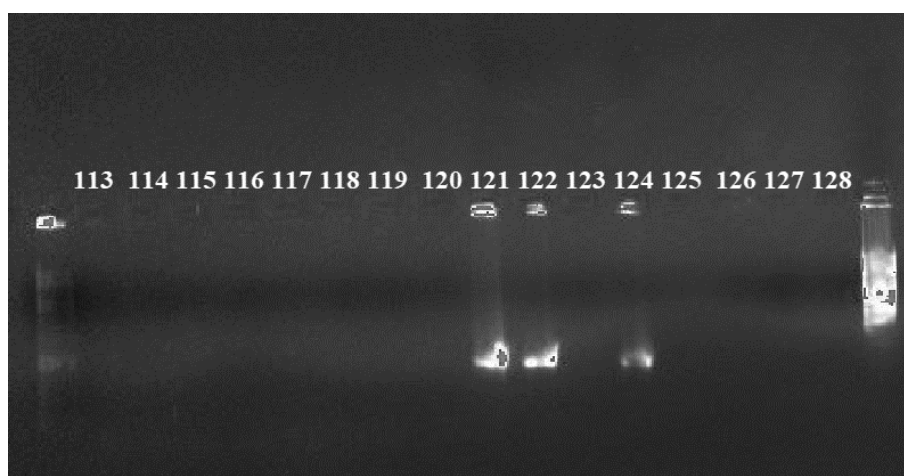
6. ábra: Gélelektroforézis eredményéről UV megvilágítás mellett készített gélképek az 1-16 minták esetében
(Fotó: Vlaskality, 2022)



7. ábra: Gélelektroforézis eredményéről UV megvilágítás mellett készített gélképek az 17-32 minták esetében
(Fotó: Vlaskality, 2022)



8. ábra: Gélelektroforézis eredményéről UV megvilágítás mellett készített gélképek az 65-80 minták esetében
(Fotó: Vlaskality, 2022)



9. ábra: Gélelektroforézis eredményéről UV megvilágítás mellett készített gélképek az 113-128 minták esetében
(Fotó: Vlaskality, 2022)



10. ábra: Gélelektroforézis eredményéről UV megvilágítás mellett készített gélképek az 129-144 minták esetében
(Fotó: Vlaskality, 2022)

6. Következtetések és javaslatok

Az őszi búza szemtermések belső fertőzöttségének vizsgálata során az *Aspergillus* nemzetség jelenléte volt a legalacsonyabb. Ez nem azt jelenti, hogy az *Aspergillus* fajok jelentléte elhanyagolható lenne, de mindenképpen rámutat arra, hogy az *Aspergillus*ok mellett a belsőfertőzöttség alapján abundánsabb, más gomba nemzetségek vizsgálata is fontos lehet. Akár a jelen kutatáshoz hasonló, mikotoxin termeléssel összefüggésbe hozható gének kimutatása is indokolt vola.

A morfológiai és mikroszkópi meghatározást követően a véletlenszerűen kiválasztott 5 darab *Aspergillus* tisztatenyészet közül 2-ről sikerült megállapítani a fajspecifikus primerpárokkal történő vizsgálat során, hogy a mikotoxin termelés szempontjából legveszélyesebbnek tartott *Aspergillus niger*, illetve *Aspergillus tubingensis* fajokhoz tartoznak. A fennmaradó három törzs esetében, további gyakori *Aspergillus* fajok, pl.: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus* fajokra specifikus primerekkel történő PCR vizsgálatok elvégzése lehet indokolt. Ezáltal meg tudnánk határozni molekuláris genetikai módszerekkel, hogy a vizsgált tisztatenyészetek nagy valószínűséggel mely fajokhoz tartoznak. Ennél is pontosabb eredményt kaphatnánk a gomba törzsekből izolált DNS szekvenálásával, ahogy Vesth és mtsai tették 2018-as kutatásukban, amiben 6db *A.niger* genomot és 23db más, a *Nigri* szekcióba tartozó genom szekvenálását végezték el a fajon belüli és a fajfeletti szinten előforduló genetikai variációk vizsgálata céljából, ám ehhez drága bioinformatikai háttér szükséges.

A Degola és munkatársai, valamint a Gallo és munkatársai által végzett kísérletekben különböző gének aflatoxin termeléssel való összefüggését vizsgálták. Kísérletemben a kutatásaik alapján, aflatoxin termelés szempontjából, nagy jelentőségű gének jelenlétét kutattam. Degola kísérlete során az aflP, aflD, aflO gének jelenléte mutatta a legnagyobb mértékű korrelációt az aflatoxin termelőképeséggel (Degola *et al.*, 2007).

Gallo és kutatótársai által végzett kísérletben az AflQ gént a nem aflatoxigén izolátumok esetében tudták nagy számban amplifikálni (Gallo *et al.*, 2012).

Mivel az AflQ gén az általam vizsgálat minták egyikében sem szerepelt, ez arra enged következtetni, hogy az 5 darab *Aspergillus* faj feltehetően inkább a Gallo és mtsai 2012-es kuttásában aflatoxigénnek tartott csoportba tartozik. Mivel azonban egyetlen gén jelenléte vagy hiánya nem határozza meg egyértelműen a mikotoxin-termelő képességet, így fontos a többi vizsgált gén eredményeinek értékelése is.

Az AflR és AflS gének esetében bizonyították legtöbbször a gének jelenléte és az aflatoxin termelőképeség szoros korrelációját. Így a saját mintáim esetében ezen gének jelenléte

valószínűsíteni az aflatoxin termelőképeséget. Azonban saját mintáim közül mindössze egy esetben, a 3-as számú minta esetében tudtam azonosítani az AflS gént. Itt azonban egy másik gént is megtaláltam, az AflO-t ami Degola és mtsai 2007-es kísérletében nagy biztonsággal jelezte az aflatoxin termelő képességet. Ezért a hármas minta esetében valószínűnek tartom, hogy egy aflatoxintermelésre képes *Aspergillus* fajjal van dolgunk.

Ugyanezt gondolom, az egyes számú mintáról is, ahol szintén kimutatható volt az AflO gén jelenléte és az AflP jelenléte is, amit szintén Deogola és mtsai 2007-ben hoztak összefüggésbe az aflatoxintermelő képességgel.

A 4-es és 5-ös számú minták esetében az az érdekes helyzet áll fenn, hogy bár egyetlen aflatoxin termeléssel kapcsolatba hozható gént sem sikerült kimutatni a mintákból, a fajspecifikus primerekkel végzett vizsgálat alapján nagyvalószínűséggel az *Aspergillus tubingensis*, illetve az *Aspergillus niger* fajhoz tartozó törzseket izoláltam. A vizsgált gének negatív eredménye alapján nem, a feltételezett fajszintű besorolás alapján viszont valószínűsíthető a két törzs toxintermelő képessége. Az *A. niger* ochratoxin A termelő képességét, már 1994-ben bizonyították (Abarca *et al.* 1994). Az *A. tubingensis* esetében egymásnak ellentmondó eredmények láttak napvilágot. Perrone és társai 2006-ban, 20db *A. tubingensis* törzsből 5-nél tapasztalt kismértékű OTA termelést, és az *A. niger* esetében szintén OTA termelőképeséget állapítottak meg. Pár évvel később 2012-ben azonban Storari és társai a korábban megjelenő eredményeket felülbírálván cáfolták az *A. tubingensis* OTA termelő képességét.

A 2-es minta az egyetlen, amely sem a vizsgált gének, sem a fajspecifikus primerek esetében nem produkált pozitív, aflatoxint termelőképeségre utaló eredményt. Azonban könnyen lehet, hogy egy másik gyakori *Aspergillus* faj, például az *A. flavus* fajspecifikus primerével elvégzett vizsgálat esetén pozitív eredményt adna. Mindenesetre ennek a törzsnek az esetében az elvégzett vizsgálatok alapján semmilyen eredmény nem utal a toxintermelő képességre. Összegezve az 5 vizsgált búzáról származó *Aspergillus* mintából 4 esetben detektáltam olyan eredményt, amely toxin-termelőképeséget feltételez. Ami azt jelenti, hogy az 5 minta tekintetében a minták 80%-a potenciálisan aflatoxintermelő gombákból áll. Feltételezhető, hogy ez az arány többé-kevésbé igaz lehet a búzaszemekről izolált többi *Aspergillus* tekintetében is. Bár ennek bizonyítására a kísérlet további ismétlésekkel történő elvégzése lenne szükséges.

Mindezeknél túl fontos kiemelni, hogy az említett gének azonosítása az egyes mintákban nem jelent egyértelmű aflatoxin termelőképeséget, csupán valószínűsíti ezt a képességet, mivel Gallo és mtsai is csak a vizsgált gének együttes jelenléte esetén detektáltak aflatoxin-termelést 2012-es kísérletük során.

A toxintermelő képesség pontos meghatározásának módja lehetne még, a már említett Gallo és társai által 2012-ben közölt cikkben leírt módon, a vizsgált gomba törzsekkel történő toxintermeltetés, megfelelő környezeti paraméterek mellett, majd pedig a kapott minták analitikai úton történő vizsgálata és az aflatoxin jelenlétének kimutatása.

Kísérletemet további szemtermések belső fertőzöttségének mérésével és PCR vizsgálatával tervezem kibővíteni. Valamint a jövőre nézve érdemes lenne még qRT-PCR segítségével felmérni, hogy a már amplifikált gének kifejeződése milyen mértékű.

7. Összefoglalás

Magyarországon a búza az egyik legjelentősebb termesztett növényünk a humán élelmezésben és a haszonállatok takarmányozásában betöltött szerepének köszönhetően. Az *Aspergillus* nemzetségbe tartozó számos faj által okozott fertőzés következtében kialakuló mikotoxin-szennyezettség teljes gabonátételeket tehet felhasználásra alkalmatlanná. A mikotoxin-termelő gombákkal való fertőzöttség számos egészségügyi és anyagi kockázatokat vonhat maga után. Nem beszélve a minőségromlás következtében kieső megtermelt termény mennyiségéről, amely a Föld növekvő népessége és a következő évekre prognosztizált gabona hiány miatt tovább növeli a téma jelentőségét.

Ezért szükséges az egyes penészgombák, mint például az *Aspergillus* nemzetségbe tartozó fajok minél mélyrehatóbb megismerése és mikotoxin-termelő képességük molekuláris biológiai módszerekkel történő feltérképezése. Kutatásom során az őszi búza szemtermését fertőző mikotoxin-termelő gombák dominancia viszonyait, valamint a szemekből izolált *Aspergillus* fajok faj szintű azonosítását, és a mikotoxin termelést elősegítő génjeinek azonosítását végeztem el az azokra specifikus primerekkel. Összesen 4 darab primerpárt alkalmaztam fajmeghatározás céljából. Ezek *Aspergillus niger*, illetve *Aspergillus tubingensis* fajokra specifikus primerpárok voltak. Mindemellett összesen 16 darab mikotoxin termeléssel összefüggésbe hozható génre specifikus primerpárt alkalmaztam. Utóbbiak a Tub1, AflR, AflS, AflD, AflM, AflP, AflO, AflQ génekre specifikus primerek voltak. Végül a PCR-terméket 1%-os agaróz gélben futtattam meg. Az így kapott géleket UV fény alatt, Biorad rendszerrel, ImageLab program segítségével értékeltem ki.

A kutatásom során két az őszi búza szemtermésen belső fertőzöttséget okozó fajt, valamint számos, a mikotoxin termeléssel összeköthető gént azonosítottam az *Aspergillus*okból izolált DNS-ek PCR vizsgálatával. Az a tudás, hogy az egyes *Aspergillus* fajokról meghatározhatjuk, hogy melyek génkészletében vannak jelen nagy bizonyossággal ezek a mikotoxin termelést elősegítő gének, a későbbiekben hozzájárulhat a betakarított termények biztonságosabb kezeléséhez.

8. Köszönetnyilvánítás

Ez úton szeretném köszönetemet kifejezni konzulenseimnek, Dr. Körösi Katalin Orsolyának és Szabó Barbara Katalinnak a kísérletekben és a dolgozat megírásában nyújtott segítségért!

Szeretném köszönetemet és tiszteletemet kifejezni Dr. Kiss József, illetve Dr. Túróczi György József tanár uraknak, hogy az Integrált Növényvédelmi Tanszék laboratóriumában volt lehetőségem beállítani a kísérletemet!

Valamint szeretnék köszönetet mondani Vajnai Zoltán, Molnár Klaudia és Döbröntey Réka Erika hallgató társaimnak a hasznos tanácsokért!

Nem utolsó sorban pedig szeretném hálámat kifejezni családomnak, az állandó támogatásért!

9. Irodalomjegyzék

1. Abarca M. L., Bragulat M. R., Castellá G. és Cabañes F. J. (1994): Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*, *Applied and Environmental Microbiology*, 60(7): 2650-2652.
2. Alemayehu S., Abay F., Ayimut K. M., Assefa D., Chala A., Mahroof R. és Subramanyam B. (2020): Evaluating different hermetic storage technologies to arrest mold growth, prevent mycotoxin accumulation and preserve germination quality of stored chickpea in Ethiopia, *Journal of Stored Products Research*, 85: 101526.
3. Al-Jaal B., Salama S., Al-Qasbi N., Jaganjac M. (2019): Mycotoxin contamination of food and feed in the Gulf Cooperation Council countries and its detection, *Toxicon*, 171: 43-50.
4. Amaike S. és Keller N. P. (2011): *Aspergillus flavus*, *Annual Review of Phytopathology*, 49(1): 107-133.
5. Áy Z., Kerényi Z., Papp M., Silhavy D és Pauk J. (2007): Vírusok kimutatása búzában PCR technikával, *Agrár- és Vidékfejlesztési Szemle*, 2(2): 101-109.
6. Baayen R. P., O'Donnell K., Bonants P. J. M., Cigelnik E. és Kroon L. P. N. M. (2000): Gene genealogies and AFLP analyses in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and nonmonophyletic formae speciales causing wilt and rot disease. *Phytopathology*, 90: 891–900.
7. Balogh K., Balláné Erdélyi M., Mézes M. (2013): *Takarmánytoxikológia*, Szent István Egyetemi Kiadó Nonprofit Kft., Gödöllő, 130 p.
8. Baranyi N. (2016): Mezőgazdasági és klinikai szempontból jelentős aflatoxin-termelő *Aspergillus* izolátumok jellemzése és genetikai variabilitásának vizsgálata, doktori értekezés, Szegedi Tudományegyetem, Szeged 116 p.
9. Bartók T., Tolgyesi L. és Szekeres A. (2010): Detection and characterization of twenty-eight isomers of fumonisin B1 (FB1) mycotoxin in a solid rice culture infected with *Fusarium verticillioides* by reversed-phase high-performance liquid chromatography/ electron spray ionization time-of-flight and ion trap mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 24: 35–42.
10. Benito N., Magnoli K., Carranza C. S., Aluffi M. E., Magnoli C. E. és Barberis C. L. (2021): Influence of a glyphosate-based herbicide on growth parameters and aflatoxin B1 production by *Aspergillus section Flavi* on maize grains, *Revista Argentina de Microbiología*, 53(2): 162-170.
11. Bennett J. W., Klich M. (2003): Mycotoxins, *Clinical Microbiology Reviews*, 16: 497-516.
12. Berthiller F., Cramer B., Iha M. H., Krska R., Lattanzio V. M. T., MacDonald S., Malone R. J., Maragos C., Solfrizzo M., StranskaZachariasova M., Stroka J., Tittlemier S. A. (2018): Developments in mycotoxin analysis: an update for 2016-2017, *World Mycotoxin Journal*, 11(1): 5-32.

13. Bhat R., Reddy K. R. N. (2017): Challenges and issues concerning mycotoxins contamination in oil seeds and their edible oils: Updates from last decade, *Food Chemistry*, 215: 425-437.
14. Bolger M., Coker R. D. és DiNovi M. (2001): Fumonisin. In: *Safety Evaluation of Certain Mycotoxins in Foods*, FAO Food and Nutrition Paper 74 World Health Organization, Geneva, 103–279.
15. Brera C., Debegnach F., De Santis B., Di Ianni S., Gregori E., Neuhold S. és Valitutti F (2014): Exposure assessment to mycotoxins in gluten-free diet for celiac patients, *Food and Chemical Toxicology*, 69: 13-17.
16. Carbone I., Ramirez-Prado J. H., Jakobek J. L. és Horn B. W. (2007): Gene duplication, modularity and adaptation in the evolution of the aflatoxin gene cluster, *BMC Evolutionary Biology*, 7: 111.
17. Carvajal-Campos A., Manizan A. L., Tadrist S., Akaki D. K., Koffi-Nevry R., Moore G. G., Fapohunda S. O., Bailly S., Montet D. és Oswald I.P. (2017): *Aspergillus korhogoensis*, a novel aflatoxin producing species from the Côte d’Ivoire, *Toxins*, 9:353.
18. Chang P. K., Horn B. W. és Dorner J. W. (2005): . Sequence breakpoints in the aflatoxin biosynthesis gene cluster and flanking regions in nonaflatoxigenic *Aspergillus flavus* isolate, *Fungal Genetics and Biology*, 42: 914–923.
19. Chen J., Chen Y., hu Q. és Wan J. (2022): Ochratoxin A contamination and related high-yield toxin strains in Guizhou dried red chilies, *Food Control*, 145: 109438.
20. Chen J., Wen J., Tang J., Shi J., Mu G., Yan R., Cai J. és Long M. (2021): Research Progress on Fumonisin B1 Contamination and Toxicity: A Review, *Molecules*, 26(17), 5238.
21. Crieso G., Bagnara A. és Bisignano G. (2001): Differentiation of aflatoxin-producing and non-producing strains of *Aspergillus flavus* group, *Letters in Applied Microbiology*, 33: 291–295.
22. 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.
23. Del Palacio A., Pan D. (2020): Occurrence and toxigenic potential of *Aspergillus* section *Flavi* on wheat and sorghum silages in Uruguay, *Mycology*, 11(2): 147-157.
24. Desmond O. J., Manners J. M., Stephens A. E., Maclean D. J. és Schenk P. M. (2008): The *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol elicits hydrogen peroxide production, programmed cell death and defence responses in wheat, *Molecular Plant Pathology*, 9(4): 435-445.
25. Dobolyi Cs., Sebők F., Varga J., Kocsubé S., Sziget Gy., Baranyi N., Szécsi Á., Lustyik Gy., Micsinai A., Tóth B., Kriszt B., Kukolya J. (2011): Aflatoxin-termelő *Aspergillus flavus* törzsek előfordulása hazai kukorica szemtermésben, *Növényvédelem*, 47: 125-133.
26. Európai Bizottság (2006): 1881/2006/EK rendelet az élelmiszerekben előforduló egyes szennyező anyagok felső határértékeinek meghatározásáról, *Official Journal of the European Union*, 364: 324-365.

27. Falavigna C., Lazzaro I., Galaverna G., Battilani B. és Dall'Asta . (2013): . Fatty acid esters of fumonisins: first evidence of their presence in maize, *Food Additives & Contaminants: Part A*, 30: 1606–1613.
28. Fischl G., Horváth J., Kadlicskó S., Kiss E., Pintér Cs. és Bíró K. (1995): *A szántóföldi növények betegségei*, Mezőgazda, Budapest, 328 p.
29. Gadzała-Kopciuch R., Cendrowski K., Cesarz A., Kiełbasa P. és Buszewski B. (2011): Determination of zearalenone and its metabolites in endometrial cancer by coupled separation techniques, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401(7): 2069-2078.
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.
31. Gelderblom, W. C. A., Kriek N. P. J., Marasas W. F. O. és Thiel P. G. (1991): Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite fumonisin B1 in rats, *Carcinogenesis*, 12: 1247–1251.
32. Goncharov A. A., Gorbatova A. S., Sidorova A. A., Tiunov A. V. és Bocharov G. A. (2022): Mathematical modelling of the interaction of winter wheat (*Triticum aestivum*) and *Fusarium* species (*Fusarium* spp.), *Ecological Modelling*, 465: 109856.
33. Grace A.-G., Usman M. A., Ochayi M. O., Adams M. D., Umar H. D., Obalum C. D., Akunna G. G., Meraiyebu A. B. és Onwuchekwa C. (2022): Elucidating the anti-oxidant and anti-inflammatory potentials of *Triticum aestivum* against ulcerative colitis: An in vivo and in silico study, *Phytomedicine Plus*, 2(4): 100350.
34. He J., Zhou T., Young J. C., Boland G. J. és Scott P. M. (2010): Chemical and biological transformations for detoxification of trichothecene mycotoxins in human and animal food chains: a review, *Trends in Food Science & Technology*, 21(2): 67-76.
35. Horn B. W. (2007): Biodiversity of *Aspergillus* section *Flavi* in the United States: A review, *Food Additives and Contaminants*, 24: 1088-1101.
36. Fischl G., Horváth J., Kadlicskó S., Kiss E. és Pintér Cs. (1995): *A szántóföldi növények betegségei*, Mezőgazda Kiadó, Budapest, 317p.
37. Hanvi D. M., Lawson-Evi P., De Boevre M., Goto C. E., De Saeger S. és Eklu-Gadegbeku K. (2019): Natural occurrence of mycotoxins in maize and sorghum in Togo, *Mycotoxin Research*, 35, 321–327.
38. Huang D., Cui L., Dai M., Wang X., Wu Q., Hussain H. I. és Yuan Z. (2019): Mitochondrion: A new molecular target and potential treatment strategies against trichothecenes, *Trends in Food Science & Technology*, 88: 33-45.
39. IARC (1993): Ochratoxin A, *IARCS Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 56: 489–452.

40. Ilgen P., Maier F. és Schafer W. (2008): Trichothecenes and lipases are host-induced and secreted virulence factors of *Fusarium graminearum*, *Cereal Research Communications*, 36:421–28.
41. Kellerman T. S., Marasas W. F., Thiel P. G., Gelderblom W. C., Cawood M. és Coetzer J. A. (1990): Leukoencephalomalacia in two horses induced by oral dosing of fumonisin B1, *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 57: 269–275.
42. 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.
43. Kovács M. (2010): Aktualitások a mikotoxin kutatásban, Szent István Egyetem, Egyetemi jegyzet, Gödöllő, 156p.
44. Kovács V., Szentgyörgyi L., Vályi I., Szappanos I., Kádár A., Petrő E., Sándor F., Nagy B. és Nechay O. (1978): Növényvédelmi technológiák 1979-1980, Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, 446p.
45. Kriszt R., Krifaton Cs., Szoboszlay S., Cserháti M., Kriszt B., Kukolya J., Czéh Á., Fehér-Tóth Sz., Török L., Szőke Zs., Kovács K. J., Barna T. és Ferenczi Sz. (2012): A New Zearalenone Biodegradation Strategy Using Non-Pathogenic *Rhodococcus pyridinivorans* K408 Strain, *Plos One*, 7(9), e43608.
46. Kubena L., Harvey R., Buckley S., Edrington T., Rottinghaus G. (1997): Individual and Combined Effects of Moniliformin Present in *Fusarium fujikuroi* Culture Material and Aflatoxin in Broiler Chicks, *Poultry Science*, 76(2): 265-270.
47. Lahouar A., Marin S., Crespo-Sempere A., Saïd S., Sanchis V. (2017): Influence of temperature, water activity and incubation time on fungal growth and production of ochratoxin A and zearalenone by toxigenic *Aspergillus tubingensis* and *Fusarium incarnatum* isolates in sorghum seeds, *International Journal of Food Microbiology*, 242(2): 53-60
48. Leslie J. F. és Summerell B. A. (2008): *The Fusarium Laboratory Manual*, Blackwell Publishing Professional, Iowa - USA, 387p.
49. Mahato D. K., Pandhi S., Kamle M., Gupta A., Sharma B., Panda B. K., Srivastava S., Kumar M., Selvakumar R., Pandey A. K., Suthar P., Arora S., Kumar A., Gamlath S., Bharti A. és Kumar P. (2022): Trichothecenes in food and feed: Occurrence, impact on human health and their detection and management strategies, *Toxicon*, 208: 62-75.
50. Mayer Z., Bagnara A., Farber P. és Geisen R. (2003): Monitoring the production of aflatoxin B1 in wheat by measuring the concentration of nor-1 mRNA, *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 1154–1158.
51. Mézes M. (2006): Penészgombák és mikotoxinok a takarmányokban és az ellenük való védekezés lehetőségei Agrárágazat, Szent István Egyetem, Egyetemi jegyzet, Gödöllő

52. Missmer S. A., Saurez L., Felkner M., Wang E., Merrill A., Rothman K. és Hendricks K. A. (2006): Exposure to Fumonisin and the Occurrence of Neural Tube Defects along the Texas–Mexico Border, *Environmental Health Perspectives*, 14, 237–241.
53. Mokhtarian M., Tavakolipour H., Bagheri F., Oliveira C. A. F., Corassin C. H. és Khaneghah A. M. (2020): Aflatoxin B1 in the Iranian pistachio nut and decontamination methods: A systematic review, *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 12(4): 15-25.
54. Nair M. M., Krishna T. S. és Manickavelu A. (2019): Bioinformatics insights into microRNA mediated gene regulation in *Triticum aestivum* during multiple fungal diseases, *Plant Gene*, 21: 100219.
55. Nazareth T. M., Bordin K., Manyes L., Meca G., Manes J. és Luciano F. B. (2016): Gaseous allyl isothiocyanate to inhibit the production of aflatoxins, beauvericin and enniatins by *Aspergillus parasiticus* and *Fusarium poae* in wheat flour, *Food Control*, 62: 317-321.
56. Ouyang H., Zhu H., Li J., Chen L., Zhang R., Fu Q., Li X. és Cao C. (2022): Fumonisin B1 promotes germ cells apoptosis associated with oxidative stress-related Nrf2 signaling in mice testes, *Chemico-Biological Interactions*, 363: 110009.
57. Paillard S., Schnurbusch T., Tiwari R., Messmer M., Winzeler M., Keller B., és Schachermayr G. (2004): QTL analysis of resistance to *Fusarium* head blight in Swiss winter wheat (*Triticum aestivum* L.), *Theoretical and Applied Genetics*, 109(2): 323-332.
58. Palencia E. R., Hinto D. M. és Bacon C. W. (2010): The black *Aspergillus* species of maize and peanuts and their potential for mycotoxin production, *Toxins*, 2: 399-416.
59. Peraica M., Radić B., Lucić A., Pavlović M. (1999): Toxic effects of mycotoxins in humans, *Bull World Health Organ*, 77(9): 754–766.
60. Perrone G., Mulé G., Susca A., Battilani P., Pietri A. és Logrieco A. (2006): Ochratoxin A Production and Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis of *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus tubingensis*, and *Aspergillus niger* Strains Isolated from Grapes in Italy, *Applied and Environmental Microbiology*, 72(1): 680-685.
61. Polak-Śliwińska M. és Paszczyk B. (2021): Trichothecenes in Food and Feed, Relevance to Human and Animal Health and Methods of Detection: A Systematic Review, *Molecules*, 26(2): 454.
62. Pretari A., Hoffmann V., Tian L. (2019): Post-harvest practices for aflatoxin control: Evidence from Kenya, *Stored Products*, 82: 31-39.
63. Riba A., Bouras N., Mokrane S., Mathieu F., Lebrihi A. és Sabaou N. (2010): *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxins in Algerian wheat and derived products, *Food and Chemical Toxicology*, 48(10): 2772-2777.
64. Rocha O., Ansari K. és Doohan F. N. (2005): Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: A review, *Food Additives and Contaminants*, 22(4): 369-378.

65. Rushing B. R., Selim M. I. (2019): Aflatoxin B1: A review on metabolism, toxicity, occurrence in food, occupational exposure, and detoxification methods, *Food and Chemical Toxicology*, 124: 81-100.
66. Salazar-López N. J., González-Aguilar G., Rouzaud-Sáenz O. és Robles-Sánchez M. (2018): Technologies applied to sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench): changes in phenolic compounds and antioxidant capacity, *Food Science and Technology*, 38(3).
67. Scherm B., Paloma M., Serra D., Marcello A. és 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: 201–210.
68. Schwartz-Zimmermann H. E., Jurisic N., Kunz-Vekiru E., Moll W. D., Schweiger W., Fowler J., Berthiller F. (2019): Determination of aflatoxin biomarkers in excreta and ileal content of chickens, *Poultry Science*, 98(11): 5551-5561.
69. Shewry P.R., Hey S.J. (2015) The contribution of wheat to human diet and health. *Food Energy Secur* 4(3):178–202.
70. Sinegugu P. N. S., Nokwazi C. M. és Kwasi S. Y. (2021): Epiphytic yeasts as potential antagonists against *Fusarium* head blight of wheat (*Triticum aestivum* L.) caused by *Fusarium graminearum* sensu stricto, *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*,
71. Storari M., Bigler L., Gessler C. és Broggini G. A. L. (2012): Assessment of the ochratoxin A production ability of *Aspergillus tubingensis*, *Food Additives & Contaminants: Part A*, 29(9): 1450-1454.
72. Susca A., Stea G., Mulé G. és Perrone G. (2007): PCR identification of *Aspergillus niger* and *Aspergillus tubingensis* based on calmodulin gene, *Food Additives and Contaminants*, 24 (10): 1154-1160.
73. Udomkun P., Wiredu A. N., Nagle M., Müller J., Vanlauwe B., Bandyopadhyay R. (2017): Innovative technologies to manage aflatoxins in foods and feeds and the profitability of application – A review, *Food Control*, 76: 127-138.
74. Varga J., Frisvad J.C., Samson R.A. (2009): A reappraisal of fungi producing aflatoxins, *World Mycotoxin Journal*, 2: 263-277.
75. Varga J., Szigeti Gy., Baranyi N., Szekeres A. és Kocsubé S. (2014): Mikotoxinok, mikotoxinogén gombák, micetizmusok, Szegedi Tudományegyetem, Egyetemi jegyzet, Szeged, 99p.
76. Vesth T. C. (2018): Investigation of inter-and intraspecies variation through genome sequencing of *Aspergillus* section Nigri, *Nature Genetics*, 50(12): 1688-1695.
77. Voss K. A., Smith G. W. és Haschek W. M. (2007): Fumonisin: toxicokinetics, mechanism of action and toxicity, *Animal Feed Science and Technology*, 137: 299–325.

78. Waes J. G.-V., Starr L., Maddox J., Aleman F., Voss K. A., Wilberding J. és Riley R. T. (2005): R.T. Maternal fumonisin exposure and risk for neural tube defects: Mechanisms in an In Vivo mouse model, *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*, 73: 487–497.
79. Wang L., Hua X., Shi J., Jing N., Ji T., Lv B., Liu L. és Chen Y. (2022): Ochratoxin A: Occurrence and recent advances in detoxification, *Toxicon*, 210: 11-18.
80. Wang Y., Zheng W., Bian X., Yuan Y., Gu J., Liu X., Liu Z. és Bian J. (2014): Zearalenone induces apoptosis and cytoprotective autophagy in primary Leydig cells, *Toxicology Letters*, 226(2): 182-191.
81. Xu C, Xu K, Yuan X-L., Ren G.-W., Wang X.-Q., Li W., Deng N., Wang X.-F. és Zhang P. (2020): Characterization of diketopiperazine heterodimers as potential chemical markers for discrimination of two dominant black aspergilli, *Aspergillus niger* and *Aspergillus tubingensis*, *hytochemistry*, 176: 112399.
82. Yang J. Y., Zhong X., Tanyi J. L., Shen J., Xu C., Gao P., Zheng T. M., DeMichelle A. M. és Zhang L. (2007): Toxic effects of zearalenone and its derivatives α -zearalenol on male reproductive system in mice, *Reproductive Toxicology*, 24: 381-387.
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: 100013
84. Yuan B.-Z., Sun J. (2021): Research trends and status of wheat (*Triticum aestivum* L.) based on the Essential Science Indicators during 2010–2020: a bibliometric analysis, *Cereal Research Communications*, 68: 12p.
85. Zain M. E. (2011): Impact of mycotoxins on humans and animals, *Journal of Saudi Chemical Society*, 15(2): 129-144.
86. Zhang D., Zhang X., Xu W., Hu T., Ma J., Zhang Y., Hou J., Hao C., Zhang X. és Li T. (2022): TaGW2L, a GW2-like RING finger E3 ligase, positively regulates heading date in common wheat (*Triticum aestivum* L.), *The Crop Journal*, 10(4): 972-979.

Internetes források:

KSH 2021: <https://www.ksh.hu/mezogazdasag> - 2021.12.20

https://portal.nebih.gov.hu/documents/10182/21384/aflatoxinok_az_elelmiszerlancban.pdf/9f16f504-6646-4208-aef9-ce3ec5ec1583 (2022 július)

1. melléklet

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 eppendorfba áttesszük, pipetázunk rá 50 µl DNA Elution Puffert, centrifugáljuk. A DNS-kivonatunk elkészült, hogy a mintában lévő anyag ne bomoljon le, mélyhűtőben tároljuk.