

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

KUKORICA GENOTÍPUSOK ELLENÁLLÓSÁGÁNAK VIZSGÁLATA TOXIKUS FUSARIUM ÉS ASPERGILLUS GOMBA FAJOKKAL SZEMBEN ÉS EZEK TAKARMÁNY- ÉS ÉLELMISZERBIZTONSÁGRA GYAKOROLT HATÁSA

SZABÓ BALÁZS

TÉMAVEZETŐK:

DR. TÓTH BEÁTA, KUTATÁSI IGAZGATÓ
PROF. DR. MESTERHÁZY ÁKOS, AZ MTA RENDES TAGJA

GABONAKUTATÓ NONPROFIT KÖZHASZNÚ KFT.



SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

2022

Bevezetés

A magyar mezőgazdaság legnagyobb mennyiségben termesztett és exportált cikke a kukorica. A globálisan növekvő kereslet, így a termelők igénye is az, hogy a kukorica hektáronkénti termésmennyisége a lehető legnagyobb legyen, kiegészítve a megfelelő biotikus és abiotikus stresszekkel szembeni toleranciával. Az elmúlt 150 évben körülbelül hatszorosára nőtt a kukorica hektáronkénti termésátlaga. Ez elsősorban a nagy termőképességű hibridek elterjedésének köszönhető, de emellett jelentős szerepe volt az agrotechnikai fejlesztéseknek is, melyek a potenciális termőképesség megvalósulását segítik elő. A globális klímaváltozás komoly kihívást jelent a hibridek termesztési technológiájának terén is, hiszen folyamatosan nő a hőségnapok száma, valamint egyre több a szélsőséges időjárási körülmény is. A korábban legegészségesebb szántóföldi növényünként jellemzett hibrid növény, a globális felmelegedés következtében egyre nagyobb kitettséggel rendelkezik a toxikus *Fusarium* és *Aspergillus* gomba fajok fertőzésével szemben. A *Fusarium* fajok által előidézett csőpenész számos járványt okozott az elmúlt évtizedekben, de az utóbbi évek megváltozott klimatikus viszonyai segítették az *Aspergillus flavus* szántóföldi kártételét is. Ezen fajok jelentős terméseszkkenést képesek előidézni kukoricában, mely a jelenlegi 460 milliárd forintos össztermelés 1%-át alapul véve is közel 5 milliárd forint kiesést jelent, mely összeg egy járványos évben, kiegészítve a mikotoxinok által okozott kárral, már akár a tízszeresére is nőhet. Annak érdekében, hogy megfelelő hatásfokkal tudjunk védekezni a csőpenészt okozó mikotoxinogén gombákkal szemben, egyrészt kiváló ellenállósággal rendelkező kukorica hibrideket kell nemesítenünk, másrészt a már forgalomban lévőket szelektálhatjuk egy megfelelő tesztrendszer alkalmazásával, de emellett nem elhanyagolható a megfelelő agrotechnikai módszerek alkalmazása sem. Kutatócsoportunk a Gabonakutató Nonprofit Közhasznú Kft. kötelékében már közel 50 éve végez nemesítést segítő tevékenységet. Célunk az, hogy a rezisztencia genetikai alapjait jobban

megismerve segítsük a nemesítő kollégákat a megfelelő szelekciós döntések meghozatalában.

Célkitűzések

A kutatásaink célkitűzéseként az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

1. A kukorica csőpenész ellenállóságra történő nemesítése során alkalmazott mesterséges inokulációs módszer alkalmazásával kapott adatok milyen összefüggést mutatnak a természetes fertőződés mértékével?
2. Milyen mértékű különbség van a különböző gomba fajok izolátumai által előidézett csőpenész borítottság, valamint mikotoxin koncentráció tekintetében?
3. Mekkora a különbség a *Fusarium* és *Aspergillus* fajok izolátumainak patogenitása között?
4. Milyen hatása van a környezeti tényezőknek a fertőzöttség mértékére és a mikotoxin koncentrációra, ugyanazon genotípusok esetében?
5. Milyen kapcsolat van a különböző gomba fajokkal szembeni rezisztencia genetikai háttere között?
6. Mi jellemzi a toxin felhalmozódással szembeni rezisztenciát és milyen a csőpenész rezisztenciához fűződő kapcsolata?
7. A kapott kutatási eredmények hogyan realizálhatók a gyakorlati nemesítés során?

Alkalmazott anyagok és módszerek

Mikrobiológiai eljárások

- ❖ A mesterséges fertőzéshez használt izolátumok szekvencia alapú fajmeghatározása, tenyésztése természetes burgonya táptalajon, 25°C-on, Memmert IPP110 inkubátorban
- ❖ A mesterséges fertőzéshez szükséges natúr fogvájók előkezelése, Czapek-Dox tápoldattal történő autoklávozása, majd az izolátumok fogvájókra oltása. Inkubálás 25°C-on, 21 napon keresztül Memmert IPP110 inkubátorban

Szántóföldi vizsgálatok

- ❖ A szántóföldi kísérletek tervezése, a szükséges agrotechnikai folyamatok elvégzése, időjárási adatok monitorozása
- ❖ Virágzás felvételezése az optimális inokulációs időpont meghatározása érdekében
- ❖ Kukoricacsövek mesterséges inokulációja az 50%-os nővirágzás utáni 6. napon Young fogvájós módszerének módosított verziójával. A kukoricacsövek középső részén steril, kézi lyukfúróval előkészített lyukba helyeztük a gombával átszőtt fogvájókat.
- ❖ Értékelés a fogvájó környékén látható mesterséges fertőződés kiterjedésének százalékos értéke alapján. A cső egyéb részein látható természetes *Fusarium* és *Aspergillus* fertőződés mértékének meghatározása
- ❖ A kísérleti adatok feldolgozása, diagramok szerkesztése, többtényezős variancia analízisek elkészítése, a korrelációs koefficiensek meghatározása és a lineáris regresszióanalízis elvégzése Microsoft Excel használatával

- ❖ Statisztikai értékelés Weber (1967) és Sváb (1981) biometria tanulmányai alapján

Analitikai módszerek

- ❖ Kukorica minták (5 átlagos fertőzöttségű cső) darálása Omas terménydaráló 7 mm-es rostájának alkalmazásával, majd Perten Laboratory Mill 3310 malommal.
- ❖ Kukorica minták DON toxin koncentrációjának meghatározása Agilent 1260-as HPLC-DAD műszerrel
- ❖ Kukorica minták Fumonizin B1, B2 és Aflatoxin B1 toxinok koncentrációjának meghatározása Agilent 1100 HPLC rendszerrel kapcsolt elektroporlasztásos ionforrással (ESI) felszerelt Varian 500MS ioncsapdás tömegspektrométerrel pozitív ionizációs üzemmódban

Eredmények

Vizsgálataink során mesterséges fertőzési módszerrel vizsgáltuk a kukorica hibridek mikotoxin termelő gomba fajokkal szembeni ellenállóságát. Mindkét kísérlet sorozatban fajonként több izolátummal dolgoztunk. Szignifikáns különbségeket fedtünk fel a kukorica hibridek ellenállóságának tekintetében. A 2012-2013. évi kísérletekben a kísérleti átlagokat tekintve hétszeres, a második sorozatban (2017-2018) ötszörös ellenállóságbeli különbségeket fedtünk fel. A toxin vizsgálatok eredményei hasonló képet mutattak. Ezek alapján megállapítható:

- A természetes fertőződést reprezentáló kontroll sorok és a mesterségesen inokulált sorok fertőződésének mértéke között gomba fajtól függően akár negyvenszeres különbségek is voltak. A természetes fertőződés alacsony szintjének hátránya, hogy a hibridek közötti ellenállóságbeli különbségek nem annyira kifejezettek, így a felállított rezisztencia sorrend téves szelekciós döntések meghozatalát okozhatja.
- Magyarország klimatikus viszonyai között eredményeink alapján a *F. graminearum* a legpatogénebb faj a kukorica esetében. A *F. verticillioides* ennél nagyságrendileg is alacsonyabb fertőzőtségi szintet tudott előidézni. A *F. culmorum* patogenitása az általunk vizsgált időszakban magasabb volt a *F. verticillioides*-nél. A vizsgált fajok közül az *A. flavus* volt a leggyengébb fertőzőképességű, általában a *F. verticillioides* fertőzőtségi átlagának felét tapasztaltuk. A 2012-2013. évi kísérletek estében a minták fumonizin szennyezettsége jelentősen meghaladta a mért DON koncentrációkat, tekintettel a magasabb átlaghőmérsékletű, szárazabb nyarakra. A 2017-2018. évi kísérletekben a DON koncentrációja közel ötszöröse volt a fumonizin analógok mennyiségének, míg az aflatoxin mennyisége nagyjából század része.

- Ugyanazon gomba faj izolátumai között akár tizennyolcszoros különbségek is lehetnek patogenitásuk terén. Mind a négy faj, mindkét izolátuma esetében szignifikáns különbségek voltak az általuk kiváltott fertőződés tekintetében. A Hibrid X Izolátum kölcsönhatás magas fokon szignifikáns volt, ezért az izolátumok esetében nincs éveken átnyúló, stabil szintű agresszivitás. Ezért a szűrési vizsgálatok alkalmával legalább kétfoldos, de leginkább 3 izolátum alkalmazása célszerű. Az azonos fajba tartozó izolátumok esetében akár háromszoros különbségek is lehetnek a toxintermelő képesség vonatkozásában.
- A szerbiai helyszín átlaghőmérsékletei éves szinten valamennyivel alacsonyabbak voltak a magyarországihoz képest, de a csapadékos napok száma és a lehullott csapadék mennyisége pedig több volt. A fertőzőtségi adatokat tekintve a szerbiai helyszínen a *F. graminearum* fertőződés közel másfélszeres átlaggal rendelkezett, míg a *F. culmorum* is némileg patogénebb volt, mint Kiszomboron. A 2012-es adatok alapján az egyik *F. verticillioides* izolátum jelentősebb járványhelyzetet tudott modellezni Szerbiában, de ennek ellenére a faj Kiszombor szárazabb klimatikus viszonyai között eredményesebben tudott fertőzni. Az *A. flavus* patogenitása nem mutatott szignifikáns eltéréseket a két kísérleti helyszínen. A Helyszín főhatás magasfokú szignifikáns különbségeket mutatott. A fumonizin koncentrációk alapján a kiszombori kísérlet toxin szennyezettsége közel húszszorososa volt a bácskertesinek. A DON tartalom a szerb mintákban volt nagyobb, melynek mértéke összesen százszoros volt a *F. graminearum*-mal fertőzött csövek esetén, míg tízszeres a *F. culmorum*-mal fertőzött csövek esetében. A mikotoxinok koncentrációi között a két kísérleti helyszínen szintén magas fokon szignifikáns ($p=0,001$) különbségeket tudunk kimutatni.

- A 2012-2013. évi kísérletekben magas fokú szignifikáns összefüggést mutattak a *F. graminearum* és *F. culmorum* fertőzöttségi adatok, mely arra enged következtetni, hogy a két fajjal szembeni rezisztencia genetikai háttere közel azonos lehet. A *F. verticillioides* fertőződés gyengébb, ám de ennek ellenére szignifikáns kapcsolatot mutatott az előbbi két faj által kiváltott fertőződéssel, de ez csak a 2012-2013-as kísérletekben volt igaz. Az *A. flavus* rezisztencia látszólag csak a *F. verticillioides* fajjal szembeni rezisztencia genetikai hátterével hozható összefüggésbe.
- A vizsgálatok eredményei alapján a *F. graminearum* fertőződés és DON kontamináció mértéke között ($r=0,9655$) szoros összefüggést kaptunk. A *F. culmorum* esetében szintén szoros összefüggést kaptunk a toxin adatokkal ($r=0,81$). A *F. verticillioides* esetében, a kísérlet egészét tekintve nem találtunk szignifikáns összefüggést a csőpenész borítottság és a toxintartalom között. A természetes fertőződés mértékéből és általánosan a csőpenész borítottságából nem lehet a toxin felhalmozódással szembeni rezisztencia mértékére nézve következtetést levonni.
- A hibridek közötti akár 10-szeres ellenállóságbeli különbségek monitorozásával és a rezisztensebb hibridek termesztésével minimálisra lehet csökkenteni az élelmiszer-és takarmánybiztonsági veszélyt. A fajonként több izolátummal történő rezisztencia szűrési tesztek elvégzése és az ehhez kapcsoló toxin vizsgálatok kivitelezése hasznos információkat nyújt, mely eredmények alapján a nemesítési szelekciós munkát segíthetjük.

Summary

In our studies, we tested the resistance of maize hybrids to mycotoxin producing fungal species by an artificial inoculation method. In both experiments we have worked with two isolates per species. We found significant differences in the resistance of maize hybrids. In the experiment between 2012-2013 sevenfold differences were found in terms of experimental means and fivefold in the second field trial (2017-2018). The toxin results were similar. Based on our results the following statements can be determined:

1. The difference between natural infection and the ear rot coverage of artificially inoculated rows can be up to forty times, depending on the species of fungus.
2. In Hungary *F. graminearum* is the most pathogenic species in maize. The pathogenicity of *F. verticillioides* and *F. culmorum* was much lower. *A. flavus* was the least infectious species. In the first series of experiment, the fumonisin contamination of the samples significantly exceeded the measured DON concentrations, while in the second, it was the other way around.
3. Isolates of a fungal species may have eighteenfold differences in their pathogenicity and threefold differences in their toxin producing ability.
4. In Serbia, *F. graminearum* infection had a higher mean value, but *F. culmorum* was also more pathogenic than in Kiszombor. *F. verticillioides* was able to infect maize more effectively under the drier climatic conditions of Kiszombor. The pathogenicity of *A. flavus* did not show significant differences at the two experimental sites. Differences between the two experimental sites were also represented in the concentrations of mycotoxins.
5. The genetic background of resistance to *F. graminearum* and *F. culmorum* is nearly identical. Resistance to *F. verticillioides* is less strickly associated with the former two species. *A. flavus* resistance can only be associated with *F. verticillioides* resistance.

6. There is a strong correlation between *F. graminearum* and *F. culmorum* infection severity and the degree of toxin contamination. For *F. verticillioides* and *A. flavus*, no correlation was found between these two factors.

7. Food and feed safety risks can be minimized by monitoring the up to 10-fold differences in resistance levels of hybrids and by performing resistance tests with multiple isolates per species.

A FOKOZATSZERZÉS ALAPJÁT KÉPZŐ PUBLIKÁCIÓK:

Referált folyóiratokban megjelent publikációk:

Szabó, B., Tóth, B., Tóth Toldiné, É., Varga, M., Kovács, N., Varga, J., Kocsubé, S., Palágyi, A., Bagi, F., Budakov, D., Stojšin, V., Lazić, S., Bodroža-Solarov, M., Čolović, R., Bekavac, G., Purar, B., Jocković, D., Mesterházy, A. (2018). A new concept to secure food safety standards against *Fusarium* species and *Aspergillus flavus* and their toxins in maize. *Toxins*, 10(9):372, 1-25.
<https://doi.org/10.3390/toxins10090372>

IF: 3,895

Mesterházy, A., Szieberth, D., Tóth Toldiné, É., Nagy, Z., **Szabó, B.**, Herczig, B., Bors, I., Tóth, B. (2022). Updating the methodology of identifying maize hybrids resistant to ear rot pathogens and their toxins—artificial inoculation tests for kernel resistance to *Fusarium graminearum*, *F. verticillioides*, and *Aspergillus flavus*. *Journal of Fungi*, 8(3), 293, 1-31.
<https://doi.org/10.3390/jof8030293>

IF: 5,816

Mesterházy, A., Szieberth, D., **Szabó, B.**, Berényi, A., Tóth, B. Mycotoxin contamination of maize (*Zea mays L.*) samples in Hungary, 2012–2017. (2022). *Cereal Research Communications* 2022, 1-9.
<https://doi.org/10.1007/s42976-022-00258-1>

IF: 0,830

Összesített IF: 10,541

Egyéb publikációk:

Mesterházy, Á., Toldiné, T. É., **Szabó, B.**, Tóth, B., Varga, M., Lehoczki-Krsjak, S., Kovács, N., Bagi, F., Varga, J. Kukorica hibridek ellenállósága toxintermelő gombákkal szemben, 2012-2013. (2014). In Növénynevelés a megújuló mezőgazdaságban: XX. Növénynevelési Tudományos Nap 2014, 1, 304–308.

Szabó, B., Toldiné, T. É., Tóth, B., Varga, M., Kovács, N., Lehoczki-Krsjak, S., Bagi, F., Varga, J., Mesterházy, Á. (2015). Magyar és szerb kukorica hibridek ellenállósága toxintermelő gombákkal szemben, 2012-2013. *Georgikon For Agriculture: A Multidisciplinary Journal In Agricultural Sciences*, 19(1), 57–64.

Szabó, B., Varga, M., György, A., Mesterházy, Á., Tóth, B. (2016). Role of *Fusarium* species in mycotoxin contamination of maize. *Review On Agriculture And Rural Development*, 5(1–2), 104–108.

Tóth, B., Körmöczi, P., Mesterházy, Á., Cseuz, L., **Szabó, B.** (2018). Kukorica hibridek ellenállóságának vizsgálata *Aspergillus flavus* okozta fertőzéssel szemben. *Georgikon For Agriculture: A Multidisciplinary Journal In Agricultural Sciences*, 22(1), 13–18.

Konferencia absztraktok:

Szabó, B., Toldiné, T. É., Tóth, B., Varga, M., Mesterházy, Á. (2013). Examination of resistance level of maize hybrids against *Fusarium* species. In 2nd Conference of Cereal Biotechnology and Breeding, 1, 63–64.

Szabó, B., Toldiné, T. É., Tóth, B., Varga, M., Kovács, N., Lehoczki-Krsjak, S., Szőke, Cs., Mesterházy, Á. (2015). Examination of resistance against *Fusarium*

and *Aspergillus* species in maize. In Pannonian Plant Biotechnology Workshop “Integration fundamental research into the practical agriculture”, 1, 38.

Tóth, B., Varga, M., Mesterházy, Á., György, A., **Szabó, B.**, Varga, J. (2015). Role of *Fusaria* and other fungi in mycotoxin contamination of maize in Hungary. In 13th European Fusarium Seminar: Book of Abstracts, 1, 157.

Szabó, B., Varga, M., György, A., Mesterházy, Á., Lehoczki-Krsjak, S., Tóth, B. (2016). *Fusarium* fajok szerepe a kukorica szántóföldi mikotoxin szennyeződésében. In XXII. Növénynevelési Tudományos Nap: összefoglalók, 1, 115.

Szabó, B., Berényi, A., Szieberth, D., Tóth, B. (2022). Resistance of maize genotypes against *Fusarium verticillioides* isolates with different pathogenicity in artificial inoculation experiments. In 64th Annual Maize Genetics Meeting Program and Abstracts, 1, 81.

MTMT azonosító: 10039924

Társszerzői nyilatkozat

Alulírott, Dr. Tóth Beáta és Prof. Dr. Mesterházy Ákos kijelentjük, hogy Szabó Balázs szerepe meghatározó jelentőségű volt a

Szabó, B., Tóth, B., Tóth Toldiné, É., Varga, M., Kovács, N., Varga, J., Kocsubé, S., Palágyi, A., Bagi, F., Budakov, D., Stojšin, V., Lazić, S., Bodroža-Solarov, M., Čolović, R., Bekavac, G., Purar, B., Jocković, D., Mesterházy, A. (2018). A new concept to secure food safety standards against *Fusarium* species and *Aspergillus flavus* and their toxins in maize. *Toxins*, 10(9):372, 1-25. <https://doi.org/10.3390/toxins10090372>

Mesterházy, A., Szieberth, D., Tóth Toldiné, É., Nagy, Z., **Szabó, B.**, Herczig, B., Bors, I., Tóth, B. (2022). Updating the methodology of identifying maize hybrids resistant to ear rot pathogens and their toxins—artificial inoculation tests for kernel resistance to *Fusarium graminearum*, *F. verticillioides*, and *Aspergillus flavus*. *Journal of Fungi*, 8(3), 293, 1-31. <https://doi.org/10.3390/jof8030293>

Mesterházy, A., Szieberth, D., **Szabó, B.**, Berényi, A., Tóth, B. Mycotoxin contamination of maize (*Zea mays L.*) samples in Hungary, 2012–2017. (2022). *Cereal Research Communications* 2022, 1-9. <https://doi.org/10.1007/s42976-022-00258-1>

címmel megjelent közleményekben. A publikációkban közölt eredményeket tudományos fokozat (PhD) megszerzésére a társszerzők nem használták fel és ezt a jövőben sem teszik.

Szeged, 2022. június 20.

Dr. Tóth Beáta
Kutatási igazgató

Prof. Dr. Mesterházy Ákos
Tudományos tanácsadó,
az MTA rendes tagja