B 3611

József Attila Tudományegyetem
Természettudományi Kar
Molekuláris- és Sejtbiológia Doktori Program

A genetikai variabilitás vizsgálata az *Aspergillus fumigatus* és rokon fajai esetében

Doktori (Ph.D.) Értekezés Tézisei

SZTE Egyetemi Könyvtár
SZEGED
13.

Készítette: **Rinyu Edit**
Témavezetők: **Dr. Ferenczy Lajos**
Dr. Varga János

JATE Mikrobiológiai Tanszék

Szeged

1998

A KUTATÁSI TÉMA ELŐZMÉNYEINEK ÖSSZEFOGLALÁSA

Az *Aspergillus fumigatus* (továbbiakban *A. fumigatus*), melyet Fresenius írt le először 1863-ban, a természetben elterjedten előforduló, termotoleráns fonalas gombafaj. Ez a gombafaj fontos humán patogén szervezet, a leggyakoribb etiológiai ágense az emberi aspergillosis különböző típusainak. Számos betegséget okozhat, mint pl. bronchopulmonáris aspergillosist, aspergillomát, illetve hematogén terjedéssel invazív aspergillosist, ami immunológiailag legyengült egyénekre halálos lehet (Marsh és mtsi, 1979, Staib és mtsi, 1989). Igen sokféle mikotoxint termelnek a fajba tartozó törzsek; ezek a toxinok veszélyesek lehetnek állatokra és emberekre egyaránt. Ugyanakkor egyes törzsekből antibiotikumként (pl. fumagillin, McCowen és mtsi, 1951), a rák terápiájában alkalmazható (pl. restrictocin, Müllbacher és Eichner, 1984), ill. a koleszterin szint csökkentésére használható (pyripyropének, Tomoda és mtsi, 1994) vegyületeket izoláltak. A faj egyes extracelluláris enzimaktivitásai (pl. proteázok, nukleinsavbontó enzimek, glukozidázok, cellulázok) is kiemelkedőek a többi fonalas gombával összehasonlítva.

Az *A. fumigatus*-t egy fajnak tartják, de a törzsek jelentősen különbözhetnek makro- és mikromorfológiai sajátságaikban (Leslie és mtsi., 1988). Az *A. fumigatus* faj nagyfokú variabilitása miatt kevert klinikai mintákból történő kimutatása nehéz feladat. A klinikumban a mikózisok nagyarányú elterjedése fokozódó veszélyt jelent az immunológiailag szuppresszált betegek, HIV-fertőzöttek, ill. különböző szervátültetésen átesett páciensek esetében. Ezekben az esetekben az *A. fumigatus* fajnak kiemelkedő a fertőzési rátája (Minamoto és mtsi, 1992, Arnow és mtsi, 1991). A gomba fajszintű gyors kimutatása akár életmentő is lehet a beteg kezelésének mihamarabbi elkezdése érdekében, ezért szükséges egy olyan módszer kidolgozása, mely során az *A. fumigatus* fajt gyorsan és kétséget kizáróan el lehet különíteni a mintában lévő többi mikróbától, és tisztázni lehet a fertőzés eredetét is.

Az *A. fumigatus* intraspecifikus variabilitását számos módszerrel vizsgálták.

Matsuda és mtsi (1992) az *A. fumigatus* törzseket a glutamát dehidrogenáz és glükóz-6-foszfát dehidrogenáz izoenzim mintázatok alapján különböztették meg más *Aspergillus* fajoktól.

A sejtmagi DNS és mitokondriális DNS restrikciós enzim analízisével korábban sikeresen oldották meg a fekete *Aspergillus* izolátumok karakterizálását (Varga és mtsi, 1993, 1994). A törzsek mtDNS-eit GC-gazdag felismerőhellyel rendelkező *Hae*III

(*Bsp*RI) restrikciós enzimmel vizsgálták, mely enzim alkalmazása lehetőséget teremtett az mtDNS polimorfizmusok vizsgálatára pl. az *Aspergillus* nemzetség *Nidulantes* és *Circumdati* szekcióinak tagjai esetében (Varga és mtsi, 1993; Varga és mtsi, nem publikált észlelések). A restrikciós enzimeket is sikerrel alkalmazták *A. fumigatus* törzsek tipizálására is (Denning és mtsi, 1990, 1991).

Korábbi vizsgálatok során a vizsgált primerek kis százalékával tudtak variabilitást kimutatni *A. fumigatus* törzsek között (Aufauvre-Brown és mtsi, 1992; Loudon és mtsi, 1993).

Az előzőekben leírt, különböző módszerek összehasonlítását eddig még nem végezték el.

CÉLKITŰZÉSEK

Célunk az volt, hogy egyrészt olyan módszert találjunk, mely alkalmazható az *A. fumigatus* törzsek más fajoktól való gyors elkülönítésére, másrészt hogy az *A. fumigatus* fajba tartozó törzseket valamilyen módon tipizálni tudjuk. További vizsgálataink az *A. fumigatus* és rokon fajai közötti rokonsági fok feltárására irányultak. Munkánk során mintegy 60 *A. fumigatus* gyűjteményes törzset és klinikai izolátumot, valamint mintegy 50, az *Aspergillus* nemzetség *Fumigati* szekciójába tartozó egyéb fajokat reprezentáló törzset vizsgáltunk. A célkitűzések megvalósításához a következő fenotipikus és genotipikus (nukleinsav analízisen alapuló) módszerek alkalmazása révén jutottunk el:

I. Fenotipikus módszerek

1. Morfológiai vizsgálatok (növekedési sebesség különböző hőmérsékleteken, hőtűrés, telepmorfológia, konidium alak és méret, vezikulum átmérők vizsgálata);
2. Proteáz termelés vizsgálata;
3. Izoenzim analízis;
4. Szénforráshasznosítási tesztek;
5. Mikotoxin termelés vizsgálata.

II. Genotipikus módszerek

1. Mitokondriális DNS RFLP-k vizsgálata;

2. Sejtmagi DNS RFLP-k vizsgálata;
3. Random amplifikált polimorfikus DNS (RAPD) analízis.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

I. Az *A. fumigatus* faj intraspecifikus variabilitásának vizsgálata

I.1. Az *A. fumigatus* törzsek makromorfológiája nagyon változatos. Szélsőséges különbségeket figyeltünk meg konídium termelésük, pigmentációjuk, és különböző hőmérsékleten mért növekedési sebességük alapján. A makromorfológiai variabilitás magas foka ellenére a vizsgált *A. fumigatus* törzsek egységes képet mutattak mikromorfológiájukban. Minden törzs konídium átmérője 2,5-3,5 μm közötti volt, ez a méret egyezik az irodalmi adatokkal (2,1-3,5 μm). Elliptikus formájú konídiumokkal rendelkező törzseket, szeptált fialidos, és akolumnáris fejű törzseket is észleltünk. A vizsgálatok során a különböző törzsgyűjteményekből származó törzsek mintegy 10%-áról bebizonyosodott, hogy taxonómiai besorolásuk nem megfelelő; egy *Penicillium*, egy *A. terreus*, egy *A. flavus*, két *A. oryzae*, és egy, az *A. fumigatus* fajcsoportba, de nem az *A. fumigatus* fajba tartozó törzset tudtunk azonosítani.

I.2. A proteáztermelés vizsgálata során az *A. fumigatus* faj melanint nem termelő színmutánsai mutatták a legkisebb enzimaktivitást. A patogén forrásból származó törzseknek átlagosan magasabb volt a proteázaktivitása, mint a szaprofita forrásból izolált törzseknek.

I.3. Az izoenzim profilokat tekintve polimorfizmust detektáltunk minden vizsgált izoenzimnél. A laktát dehidrogenáz, szuperoxid dizmutáz és NADP-függő glutamát dehidrogenáz izoenzim mintázatok a legtöbb vizsgált törzs esetében azonosak voltak; a laktát dehidrogenáz és szuperoxid dizmutáz csak egy, míg a glutamát dehidrogenáz esetében két törzs mutatott eltérő mintázatot. A kataláz és a glükóz-6-foszfát dehidrogenáz izoenzim mintázatok variábilisebbek voltak, de az izoenzimek polimorfizmusát főleg a savas foszfatáz (PHO) és észteráz (EST) enzimek esetében észleltük. A PHO mintázatok esetében két típust tudtunk elkülöníteni, melyek az *A.*

fumigatus törzsek csoportosítására használhatók, bár ezek a mintázatok nem különböznek eléggé ahhoz, hogy rutin tipizáló technikaként alkalmazhassuk ezeket. A PHO esetében a vizsgált két elektroforetikus csoport nem felelt meg pontosan a három észlelt EST csoport egyikének sem, bár a legtöbb A típusú észteráz mintázattal rendelkező törzs A típusú PHO mintázatú (19 törzs) és a B típusú EST mintázatú törzsek B típusú PHO mintázatúak (16 törzs). Az EST és PHO profilok alapján a vizsgált 61 *A. fumigatus* törzset 7 csoportba lehetett sorolni. Nem észleltünk összefüggést az adott törzs izoenzim mintázatai, és a törzsek eredete (szaprofita vagy patogén) között, sem növekedési rátájuk, makromorfológiájuk és izoenzim mintázataik között. Ezek az enzimpolimorfizmusok jól használhatóak az *A. fumigatus* törzsek csoportosítására.

I.4. A fenotípusos karakterek hátránya, hogy génexpressziótól függnek és nehéz standardizálni a műveleteket, mert pl. különböző tenyésztési feltételek különböző izoenzim mintázatokat eredményezhetnek. A genotípuson (DNS-en) alapuló módszerek alkalmazása esetében ezek a problémák nem jelentkeznek. Először a sejtmagi DNS és mitokondriális DNS restrikciós enzim analízisét próbáltuk alkalmazni az *A. fumigatus* törzsek összehasonlítására. Az összes *A. fumigatus* törzs *Eco*RI restrikciós enzimmel emésztett repetitív DNS mintázata megegyezett, az FRR 1266 törzs kivételével. A *SmaI*-generált repetitív DNS mintázatok két törzs, a FRR 1266 és egy kontaminánsként izolált törzs (44b) kivételével szintén megegyeztek, míg az rDNS hibdirizációs mintázatok, melyek vizsgálata során a *Sma*I-generált DNS-hez az *A. nidulans* riboszómális repeat unitját hibridizáltuk, invariábiliseknek bizonyultak, a FRR 1266 törzset kivéve. A törzsek mtDNS-eit GC-gazdag felismerőhellyel rendelkező *Hae*III (*Bsp*RI) restrikciós enzimmel vizsgáltuk. A gélben megfigyelt repetitív DNS fragmentek mitokondriális eredetét *Hae*III-mal emésztett, tisztított mtDNS mintázatokkal való összehasonlítással és a tisztított össz-mtDNS hibridizációjával bizonyítottuk. Az *A. fumigatus* törzsek *Hae*III generált mtDNS mintázatai invariábilisak voltak, kivéve a FRR 1266 törzsét. Nem észleltük az mtDNS variabilitását még abban az esetben sem, ha a *Hae*III restrikciós enzimet más enzimekkel kombinálva használtunk (*Eco*RI, *Hind*III és *Bgl*II). A fentiek alapján az rDNS és mtDNS RFLP módszerek nem használhatók az *A. fumigatus* törzsek csoportokba sorolására. Ez a megfigyelés nem mond ellent annak a korábbi észlelésnek, miszerint a restrikciós enzimeket sikerrel alkalmazták

különböző törzsek tipizálására (Denning és mtsi, 1990, 1991). Azokban a vizsgálatokban nagy méretű DNS molekulákat (>50kb) izoláltak protoplaszt technikával, és a restrikciós emésztések után nyert 10-50 kb mérettartományba eső sávok mobilitásbeli különbségei alapján sorolták csoportokba az izolátumokat.

I.5. Másik genotipikus módszerként a RAPD analízist alkalmaztuk. A legtöbb primer esetén csak néhány törzsnél észleltünk eltérő RAPD mintázatot. Bár minden primer esetén megfigyeltünk némi variabilitást az *A. fumigatus* törzsek között, 12 primer közül csak 3-nál (OPC-06, OPC-07, OPC-10) volt nagyfokú a variabilitás. Az OPC-10 és OPC-07 primerek vizsgálatával a 61 *A. fumigatus* törzset 37 csoportba osztottuk. Ez azt jelenti, hogy korlátozott számú primer (2 vagy 3) alkalmazása elegendő lehet az *A. fumigatus* izolátumok megkülönböztetésére. Az OPC-08 primer, melynek alkalmazása során egy erős sáv amplifikálódott minden *A. fumigatus* törzsben, míg más fajokban eltérő méretű fragmentek amplifikálódtak, megfelelő marker lehet az *A. fumigatus* izolátumok megkülönböztetésére olyan más potenciálisan patogén *Aspergillus* fajoktól, mint pl. az *A. flavus*, az *A. niger* vagy az *A. terreus*.

Megbeszélés:

A fenotipikus és genotipikus adatok alapján két törzsfát alkottunk. Az adatmátrixok kofenetikus korrelációs analízise összefüggést mutatott az izoenzim, ill. RAPD adatokon alapuló dendogramok között (a kofenetikus korrelációs koefficiens 0,9086 volt a különböző karakter készleteken alapuló két dendogram között). A két dendogram hasonlósága azt jelzi, hogy a kísérleteink során alkalmazott egymástól független módszerek a törzsek genetikai variabilitásának mérésére egymástól függetlenül is használhatóak. Az *A. fumigatus* törzsek jól elkülönültek a *Neosartorya fennelliae* és *Neosartorya pseudofischeri* törzsektől, melyeket mint külső összehasonlítókat vontunk be kísérleteinkbe. Mindkét dendogram az *A. fumigatus* törzsek homogenitását mutatja (legalább 80% az egyezés). Az *A. fumigatus* var. *ellipticus* és az *A. fumigatus* var. *acolumnaris* helye a dendogramon azt jelzi, hogy ezek az *A. fumigatus* "alfajok" nem elégítik ki az alfaj értelmezés kritériumait; e törzsek izoenzim, mtDNS és rDNS mintázatai megegyeznek, ill. a RAPD mintázataik is hasonlóak más *A. fumigatus* törzsekéihez. Ez a megfigyelés összhangban van azzal a korábbi feltételezéssel, melyet az *A. fumigatus* törzsek és alfajaik (*A. fumigatus* var. *ellipticus* és *A. fumigatus* var. *acolumnaris*)

antigénjeinek, mikromorfológiai és másodlagos metabolit profiljainak, ill. DNS reasszociációs kinetikájának vizsgálatai támasztanak alá, hogy ezek a törzsek csupán morfológiai variánsai az *A. fumigatus* fajoknak (Frisvad és Samson, 1990; Kim és Chaparas, 1979; Peterson, 1992). Ezen eredmények ismeretében nem értünk egyet azzal a korábbi megállapítással, miszerint morfológiai és fiziológiai kritériumok alapján az *A. fumigatus* var. *ellipticus*-t és az *A. fumigatus* var. *acolumnaris*-t új fajokként kéne leírni *A. neoellipticus* és *A. acolumnaris* néven (Kozakiewicz, 1989; Varshney és Sarbhoy, 1981). Mindkét dendogram szerint távoli kapcsolat van az FRR 1266 jelű törzs és más *A. fumigatus* törzsek között. Ezen törzs mtDNS és rDNS mintázatai is különböznek a *Fumigati* szekció minden más fajának mintázatától. Eredményeink azt mutatják, hogy ez a törzs egy új fajt reprezentál a *Fumigati* szekción belül. Ez a törzs egy heterotallikus *Neosartorya* faj egyik párosodási típus törzse lehet, mivel ez a törzs morfológiájában néhány *Neosartorya* faj anamorfjára emlékeztet, bár termőtest- vagy aszkospóra termelést nem figyeltünk meg.

II. Az interspecifikus variabilitás vizsgálata az *A. fumigatus* és közeli rokon fajok között

II. 1. A legtöbb faj jól definiálható csoportokat alkotott izoenzim és szénforrás hasznosítási mintázata alapján. Az *A. fumigatus* és *Neosartorya fischeri* fajok vizsgálataink szerint azonos csoportba tartoztak.

II. 2. Néhány ausztrál izolátum - izoenzim és szénhasznosítási mintázataik alapján - az ugyanazt a fajt képviselő más törzsekkel távoli rokonságot mutatott. Erre példa a *Neosartorya glabra* IMI 061450 és IMI 131700 és a többi vizsgált *N. glabra* törzs között megfigyelt távoli rokonság, és az *A. viridinutans* IMI 306135, *A. viridinutans* IMI 062875 és NRRL 576, és más *A. viridinutans* törzsek között megfigyelt evolúciós távolság. Ezen eredmények összhangban vannak a törzsek mitokondriális DNS genomjának vizsgálata során nyert eredményekkel, melyek szerint az ausztrál *A. viridinutans* és *N. glabra* izolátumoknak a más helyről származó izolátumoktól eltérő a restrikciós mintázata. Ezek a megfigyelések váratlanok. Nagy a kísértés annak a következtetésnek a levonására, hogy az ausztrál törzsek más evolúciós rátával fejlődnek a kontinens földrajzi izoláltsága miatt, mint az eltérő lokalizációjú törzsek.

II. 3. Az *A. fumigatus* izolátumokat és négy *A. viridinutans* törzset a *N. fischeri* illetve a *N. glabra* közeli rokonainak találtuk, mely azt jelzi, hogy a szekció evolúciója során többször is megtörténhetett a meiózis, azaz a szexuális életciklus elvesztése. Hasonló következtetést vontak le LoBuglio és mtsi (1993), akik szexuális *Talaromyces* és aszexuális *Penicillium* fajokat vizsgáltak.

II. 4. Munkánk során két, a *Fumigati* szekcióba tartozó fajban, a *N. hiratsukae* mindhárom vizsgált törzsében (NHL 3008, NHL 3009 és IMI 349860), és egy *N. quadricincta* törzsben (NRRL 2154) mutattuk ki dsRNS molekulák jelenlétét. A vizsgált *Neosartorya* törzsek az első szexuális ciklussal is rendelkező *Aspergillus* izolátumok, melyekben sikerült mikovírust kimutatni. Ezen fajok további vizsgálata lehetőséget adhat arra, hogy tisztázzuk a mikovírusok szexuális (aszkospórák) és aszexuális spórák (konídiumok) útján történő terjedésének mechanizmusát.

II. 5. Ochratoxint az IMI 306135 *A. viridinutans* törzs esetében, ELISA-n alapuló vizsgálat során észleltünk, de ezt a mikotoxint más módszerekkel (TLC, HPLC) valószínűleg a termelt ochratoxin igen kis mennyisége miatt nem tudtuk kimutatni. A többi vizsgált törzsben nem észleltünk ochratoxin termelést.

Hivatkozások:

Arnow, P.M, Sadigh, M., Costas, C., Weil, D. és Chudy, R. (1991) Endemic and epidemic aspergillosis associated with in-hospital replication of *Aspergillus* organisms. J. Infect. Dis. 164, 998-1002.

Aufauvre-Brown, A., Cohen, J. és Holden, D.,W., (1992) Use of randomly amplified polymorphic DNA markers to distinguish isolates of *Aspergillus fumigatus*. J. Clin. Microbiol. 30, 2991-2993

Cisar, C.R., TeBeest, D.O., és Spiegel, F.W. (1994) Sequence similarity of mating type idiomorphs: a method which detects similarity among the *Sordariaceae* fails to detect similar sequences in other filamentous ascomycetes. Mycologia 86, 540-546.

Croft, J.H. és Varga, J. (1994). Application of RFLPs in systematics and population genetics of *Aspergilli*. In: The genus *Aspergillus*: from taxonomy and genetics to industrial applications (szerk. Powell, K.A., Renwick, A. és Peberdy, J.F.). Plenum Press, New York. pp. 277-289.

Denning, D.W., Clemons, K.V., Hanson, L.H. és Stevens, D.A. (1990) Restriction endonuclease analysis of total cellular DNA of *Aspergillus fumigatus* isolates of geographically and epidemiologically diverse origin. J. Infect. Dis. 162, 1151-1158.

Denning, D.W., Shankland, G.S. és Stevens, D.A. (1991) DNA fingerprinting of *Aspergillus fumigatus* isolates from patients with aspergilloma. J. Med. Veter. Mycol. 29, 339-342.

Frisvad, J.C. és Samson, R.A. (1990) Chemotaxonomy and morphology of *Aspergillus fumigatus* and related taxa. In: Modern concepts in *Penicillium* and *Aspergillus* classification (szerk. R.A. Samson és J.I. Pitt), Plenum Press, New York, 201-208.

Girardin, H., Monod, M. és Latgé, J.-P. (1995). Molecular characterization of the food-borne fungus *Neosartorya fischeri* (Malloch and Cain). Appl. Environ. Microbiol. 61, 1378-1383.

Kim, S.J. és Chaparas, S.D. (1979) Characterization of antigens from *Aspergillus fumigatus*. III. Comparison of antigenic relationships of clinically important *Aspergilli*. Am. Rev. Resp. Dis. 120, 1297-1303.

Kozakiewicz, Z. (1989) *Aspergillus* species on stored products. Mycol. Papers 161, 1-188.

Leslie, C.E., Flannigan, B. és Milne, L.J.R. (1988) Morphological studies on clinical isolates of *Aspergillus fumigatus*. J. Med. Veter. Mycol. 26, 335-341.

LoBuglio, K.F., Pitt, J.I. és Taylor, J.W. (1993) Phylogenetic analysis of two ribosomal DNA regions indicates multiple independent losses of a sexual *Talaromyces* state among asexual *Penicillium* species in subgenus Biverticillium. Mycologia 85, 592-604.

Loudon, K.W., Burnie, J.P., Coke, A.P. és Matthews, R.C. (1993) Application of polymerase chain reaction to fingerprinting *Aspergillus fumigatus* by random amplification of polymorphic DNA. J. Clin. Microbiol. 31, 1117-1121

Marsh, P.B., Millner, P.D. és Kla, J.M. (1979) A guide to the recetnt literature on aspergillosis as caused by *Aspergillus fumigatus*, a fungus frequently found in self-heating organic matter. Mycopathologia 69, 67-81.

Matsuda, H., S. Kohno, S. Maesaki, H. Yamada, H. Koga, M. Tamura, H. Kuraishi, és J. Sugiyama. (1992) Application of ubiquinone systems and electrophoretic comparison of enzymes to identification of clinical isolates of *Aspergillus fumigatus* and several other species of *Aspergillus*. J. Clin. Microbiol. 30, 1999-2005.

McCowen, M.C., Callender, M.E. és Lawlis, J.F.Jr. (1951) Fumagillin (H-3), a new antibiotic with amebicidal properties. Science 113, 202-203.

Minamoto, G.Y., Barlam T.F. and van der Els, N.J. (1992) Invasive aspergillosis in patients with AIDS. Clin. Infect. Dis., 14, 66-74.

Müllbacher, A. és Eichner, R.D. (1984). Immunosuppression in vitro by a metabolite of a human pathogenic fungus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 3835-3837.

Peterson, S.W. (1992). *Neosartorya pseudofischeri* sp. nov., and its relationship to other species in *Aspergillus* section *Fumigati.* Mycol. Res. 96, 547-554.

Raper, K.B. és Fennell, D.I. (1965). The genus *Aspergillus.* Baltimore, Williams és Wilkins.

Staib, F., Seibold, M. és Grosse, G. (1980) *Aspergillus* findings in AIDS patients suffering from cryptococcosis. Mycoses 32, 516-523.

Tomoda, H., Hishida, H., Kim, Y.K., Obata, R., Sunazaka, T., Omura, S., Bordner, J., Guadliana, M., Dormer, P.G. és Smith, A.B. (1994). Relative and absolute stereochemistry of pyripyropene A, a potent, bioavailable inhibitor of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase (ACAT). J. Am. Chem. Soc. 116, 12097-12098.

Varga, J., Kevei, F., Fekete, Cs., Coenen, A., Kozakiewicz, Z. és Croft J.H. (1993) Restriction fragment length polymorphisms in the mitochondrial DNAs of the *Aspergillus niger* aggregate. Mycol. Res. 97, 1207-1212.

Varga, J., Kevei, F., Vágvölgyi, C., Vriesema, A., és Croft, J.H. (1994) Double-stranded RNA mycoviruses in section *Nigri* of the *Aspergillus* genus. Can. J. Microbiol. 40, 325-329.

Varshney, J.L. és Sarbhoy, A.K. (1981) A new species of *Aspergillus fumigatus* group and comments upon its synonymy. Mycopathologia 73, 89-92.

KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

A disszertáció eredményeihez kapcsolódó publikációk:

1. **Rinyu, E.**, Varga, J. és Ferenczy, L. (1995) Phenotypic and genotypic analysis of variability in *Aspergillus fumigatus*. J. Clin. Microbiol. 33, 2567-2575.
2. Varga, J., Kevei, É., **Rinyu, E.**, Téren, J. és Kozakiewicz, Z. (1996) Ochratoxin production by *Aspergillus* species. Appl. Environ. Microbiol. 62, 4461-4464.
3. Varga, J., **Rinyu, E.**, Kiss, I., Botos, B. and Kozakiewicz, Z. (1997) Carbon source utilization and isoenzyme analysis as taxonomic aids among toxigenic *Neosartorya* species and their relatives. Acta Microbiol. Immunol. Hung. 44, 17-27.
4. Varga, J., **Rinyu, E.**, Kevei, É., Tóth, B. és Kozakiewicz, Z. (1998) Double-stranded RNA mycoviruses in species of *Aspergillus* sections *Circumdati* and *Fumigati.* Can. J. Microbiol. 44, (in press)
5. **Rinyu, E.**, Varga, J., Kozakiewicz, Z. és Ferenczy, L. (1997) Phenotypic and genotypic variability within *Aspergillus* section *Fumigati.* In: Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification (Eds. R.A. Samson, J.I. Pitt) Harwood Academic Publishers, Amsterdam (in press)

A disszertációban nem szereplő eredményeket tartalmazó publikáció:

Téren, J., Varga, J., Hamari, Zs., **Rinyu, E.** és Kevei, F. (1996) Immunochemical detection of ochratoxin A in black *Aspergillus* strains. Mycopathologia 134, 171-176

Előadás és poszterkivonatok:

Varga, J. és **Rinyu, E.** (1991) Characterization of *Aspergillus fumigatus* strains by isoenzyme analysis. Acta Microbiol. Hung. 38, 225.

Varga, J. és **Rinyu, E.** (1993) Molecular characterization of *Aspergillus fumigatus* and related taxa. FEMS Symposium Number 69, Canterbury, Abstracts.

Varga, J. és **Rinyu, E.** (1995) RFLP analysis of species of section *Fumigati,* genus *Aspergillus*. Acta Microbiol. Immunol. Hung. 42, 127.

Rinyu, E. és Varga, J. (1996) Typing of *Aspergillus fumigatus* isolates by the random amplified polymorphic DNA technique. ECFG 3 (3. Eur. Conf. Fungal Genet.) Abstracts, Münster, 203.

Varga, J., **Rinyu, E.**, Kevei, É., Kevei, F., Hamari, Z. és Téren, J. (1997) Ochratoxin production by *Aspergillus* species. Acta Microbiol. Immunol. Hung. 44, 71.

Kevei, É., **Rinyu, E.**, Tóth, B. és Varga, J. (1997) Detection of double-stranded RNA mycoviruses in species of *Aspergillus* section *Circumdati*. Acta Microbiol. Immunol. Hung. 44, 417-418.