Az *Aspergillus* nemzetség átfogó filogenetikai analízise; potenciális mikotoxin-termelő és opportunista patogén fekete *Aspergillus* törzsek jellemzése

Doktori értekezés

Szigeti Gyöngyi

Témavezető:

Prof. Dr. Varga János

Egyetemi tanár

Biológia Doktori Iskola

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar

Mikrobiológiai Tanszék

SZEGED

2018

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke ... 4
Bevezetés ... 6
Irodalmi áttekintés ... 8
Az *Aspergillus* nemzetség jellemzése ... 8
Fekete *Aspergillus*-ok jellemzése, taxonómiai helyzetük ... 11
Az *A. niger* és *A. welwitscheae* testvérfajok közötti különbségek ... 17
Fekete *Aspergillus*-ok, mint humán patogének ... 17
Fülfertőzések ... 20
Fekete *Aspergillus* fajok mikotoxintermelő képessége ... 20
Ochratoxinok ... 20
Fumonizinek ... 21
Célkitűzések ... 24
Anyagok és módszerek ... 25
Filogenetikai analízis ... 25
DNS-kivonás, felszaporítás, szekvenálás ... 25
Filogenetikai rekonstrukció ... 29
Az *A. niger* és az *A. welwitscheae* testvérfajok közötti különbségek vizsgálata ... 29
UP-PCR analízis ... 29
Fülfertőzésekből származó fekete *Aspergillus* izolátumok vizsgálata ... 30
Vizsgált törzsek ... 30
Tiszta tenyészet létrehozása ... 31
A micélium felszaporítása, DNS izolálás ... 31
Az izolátumok molekuláris azonosítása kalmodulin szekvenciák alapján ... 31
Gélelektroforézis ... 32
A fajok meghatározása, törzsfa készítése ... 32
Fülfertőzésekből származó fekete Aspergillus izolátumok antifungális szerekkel szembeni érzékenységének vizsgálata ... 32
Élelmiszereken előforduló fekete *Aspergillus* izolátumok ... 33
Fumonizin-extrakció ... 33
Eredmények és értékelésük ... 35
Az *Aspergillus* nemzetség filogenetikai analízise ... 35
Az *A. niger* és *A. welwitschiae* fajok közötti különbség kimutatása UP-PCR analízissel ... 46
Fekete *Aspergillus*-ok, mint opportunista humán patogének ... 47
Fülfertőzésekből származó fekete Aspergillus izolátumok fajszintű azonosítása ... 47
Fülfertőzésekből származó fekete Aspergillus izolátumok antifungális szerekkel szembeni érzékenysége ... 49

Fekete *Aspergillus*-ok, mint potenciális fumonizintermelők előfordulása élelmiszerekben 52
Fekete Aspergillus-ok előfordulása és eloszlása mazsolamintákon ... 52
Mazsolaminták fumonizin-tartalmának vizsgálata ... 55
Mazsoláról származó fekete Aspergillus izolátumok fumonizintermelő képessége ... 55
Fekete *Aspergillus* izolátumok fügéről és datolyáról ... 59
Hagymán előforduló fekete *Aspergillus*-ok ... 60
Hagymáról izolált A. welwitschiae törzsek mikotoxintermelő képessége ... 63
Hagymaminták fumonizin-szennyezettsége ... 64
Összefoglalás ... 66
Summary ... 70
Irodalomjegyzék ... 74
Köszönetnyilvánítás ... 89

Rövidítések jegyzéke

AAL toxinok: *Alternaria alternata* által termelt toxinok

Acl: ATP citrát liáz

AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism (Felsokszorozott fragmentumhossz-polimorfizmus)

ATCC: American Type Culture Collection (Amerikai Típustörzs-gyűjtemény)

CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Hollandia

Cct8: chaperonin containing TCP1 subunit (dajkafehérjét kódoló lókusz)

CLSI: Clinical & Laboratory Standards Institute

cmd: kalmodulin

CREA: Creatine sucrose agar (kreatin-szacharóz agar)

CYA20S: Czapek Yeast Autolysate Agar 20% szacharózzal

DRBC: Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol Agar

FB: Fumonizin B

GTR: General Time Reversible model

IARC: International Agency for Research on Cancer (Nemzetközi Rákkutatási Ügynökség)

IGS: Intergenic Spacer, gének közötti elválasztó régió

ITS: Internal Transcribed Spacer, köztes átíródó elválasztó régió

MCM7: Mini-chromosome maintenance complex component 7 (minikromoszómák fenntartásáért felelős komplex 7-es komponense)

MEA: Malt Extract Agar (malátakivonatos agar)

MEC: Minimum Effective Concentration (Minimális hatékony koncentráció)

MIC: Minimum Inhibitory Concentration (Minimális gátlási koncentráció)

ML: Maximum Likelihood

OD: Optikai Denzitás

OTA: Ochratoxin A

PCR: Polymerase Chain Reaction (Polimeráz láncreakció)

pel (A, B): pektin-liáz gének

pki: piruvát-kináz gén

RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA (Random felsokszorozódó polimorf DNS)

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism (Restrikciós fragmentumhossz-polimorfizmus)

RPB1, RPB2: RNA Polymerase II largest and second largest subunit (RNS polimeráz II legnagyobb és második legnagyobb alegysége)

RP-HPLC/ESI-IT-MS^2: Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography with Electrospray Ionization Ion Trap tandem Mass Spectrometry

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

TAE: Trisz-ecetsav-dinátrium-EDTA

TEF1: transzlációs elongációs faktor 1α

Tsr1: 20S rRNS összeszerelésében szerepet játszó fehérjét kódoló lókusz

UP-PCR: Universally Primed Polymerase Chain Reaction (Univerzálisan bekötődő polimeráz láncreakció)

YPD: Yeast extract Pepton Dextrose tápközeg

Bevezetés

Az *Aspergillus* nemzetség a fonalasgombák egy nagyon változatos csoportját foglalja magába. Az ide tartozó fajok között találunk olyanokat, amelyek biotechnológiai és élelmiszeripari alkalmazásuknak köszönhetően igen nagy gazdasági jelentőséggel rendelkeznek. Az egész *Aspergillus* nemzetségre vonatkozóan elmondható, hogy az egymással közeli rokonságban álló fajok morfológiai karakterek alapján történő elkülönítése igen nehéz, néhány esetben nem is lehetséges. Bizonyos genomi szekvenciák azonban alkalmasak arra, hogy ezeket a fajokat elkülönítsük egymástól, mint például a kalmodulin és β-tubulin gének szekvenciái. Bár filogenetikai munkák sora enged betekintést az *Aspergillus* fajok közötti rokonsági kapcsolatokba, még mindig vannak megválaszolatlan kérdések. A korábbi munkák általában valamelyik alcsoportra (szekcióra, alnemzetségre) fókuszálnak, nemzetségszintű filogenetikai vizsgálatra eddig kevés esetben volt példa, így a rokonsági kapcsolatok pontos feltérképezése még nem történt meg (Samson és mtsai. 2014).

A rokonsági kapcsolatok megismerésének érdekében filogenetikai vizsgálatot végeztünk 93 faj bevonásával. A fajokat úgy választottuk ki, hogy a teljes *Aspergillus* nemzetséget reprezentálják. Az elemzéshez 6 génszakaszt választottunk ki. Az *RPB1* és *RPB2* (RNS polimeráz alegységei), a *Tsr1* (20S rRNS összeszerelésében játszik szerepet), illetve a *Cct8* (dajkafehérje) lókuszok Houbraken és Samson (2011) munkája alapján alkalmasnak bizonyultak az alnemzetség-szintű rokonsági kapcsolatok megállapítására a *Penicillium* nemzetségen belül, ezért ígéretesnek bizonyultak a filogenetikailag közel álló *Aspergillus* nemzetség esetén is. A vizsgálatba ezen kívül bevontuk még az *Acl1* (ATP citrát-liáz) és *MCM7* (minikromoszómák fenntartásáért felelős) lókuszokat is.

Az *Aspergillus* nemzetség *Nigri* szekciójába tartozó fajokat fekete *Aspergillus*-oknak nevezzük (Gams és mtsai. 1985). Legismertebb képviselőjük az *Aspergillus niger*, melyet széles körben alkalmaznak az élelmiszeriparban citromsav és glükonsav termeltetésére, továbbá számos enzim, pl. pektináz, amiláz előállítására is használják (Varga és mtsai. 2000). A fekete *Aspergillus*-ok humán betegségek okozói is lehetnek, valamint egyes fajok gyakran élelmiszereinket is szennyezhetik különböző mikotoxinok (ochratoxinok, fumonizinek) termelése révén, melyek az állatokra és emberekre egyaránt káros hatást fejtenek ki.

A fumonizinek karcinogén mikotoxinok, melyeket *Fusarium verticillioides*-ben (*Gibberella moniliformis*) azonosítottak először (Gelderblom és mtsai. 1988). Hatásuk egyrészt

abban nyilvánul meg, hogy gátolják a szfingolipid bioszinézist. Ennek oka, hogy szerkezetük hasonló a szfingolipid intermedierekéhez, és a ceramid szintáz enzimhez kapcsolódnak. (Wang és mtsai. 1991). Ezen kívül gátolják a folsavtranszportot is, melynek következtében a gerincvelőcső záródása nem lesz teljes az embrióban (Varga és mtsai. 2009b). Továbbá ezek a toxinok tehetők felelőssé különböző, haszonállatainkat érintő megbetegedésért, mint például lovak agylágyulásáért (Marasas és mtsai. 1988b), valamint sertések tüdőödémájáért is (Haschek és mtsai. 2001). A fekete *Aspergillus*-ok lehetséges fumonizin-termelése azért jelentős, mert sok élelmiszer- és takarmánynövényen előfordulnak, így azok fumonizint tartalmazhatnak.

Különböző mezőgazdasági termékekről gyűjtöttünk fekete *Aspergillus* izolátumokat, melyeket fajszinten meghatároztunk. Azonosításukhoz a kalmodulin gén egy szakaszának szekvenciáit használtuk. Vizsgáltuk az izolátumok fumonizintermelő képességét, valamint az adott termékek fumonizintartalmát is. Mazsola-, datolya-, füge- és hagymamintákról számos fekete *Aspergillus* törzset sikerült izolálnunk.

A fekete *Aspergillus*-okat ugyan opportunista patogénként tartjuk számon, azonban a modern immunszupresszáns terápiák elterjedésével az utóbbi években megnőtt az általuk okozott fertőzéseknek a száma és jelentősége (Cohen és mtsai. 1993). A fertőzés leggyakrabban a légzőszervrendszerben jelentkezik, de szemfertőzést (keratitisz) és fülfertőzést (otitisz) is okozhatnak. Humán fertőzések esetén a kórokozó pontos, fajszintű meghatározása rendkívül fontos, mert a különböző fajok eltérő mértékben lehetnek érzékenyek különböző antifungális szerekkel szemben (Balajee és mtsai. 2005). A gyakorlatban a fekete *Aspergillus* fajokat általában *A. niger*-ként azonosítják morfológiai alapon, pedig más közeli rokon fajok is okozhatnak fertőzéseket.

Iráni és magyarországi fülfertőzésből származó izolátumokat azonosítottunk a kalmodulin gén egy szakaszának bázissorrendje alapján. A vizsgált izolátumokat kivétel nélkül *A. niger*-ként határozták meg morfológiai karakterek figyelembevételével. Teszteltük továbbá néhány izolátum érzékenységét a klinikumban széles körben használt gombaellenes szerekkel szemben.

Irodalmi áttekintés

Az *Aspergillus* nemzetség jellemzése

Az *Aspergillus* nemzetség a fonalasgombák egy nagyon változatos csoportját foglalja magába, mely gazdaságilag is nagy jelentőséggel rendelkezik. A nemzetség (a *Penicillium* nemzetséggel együtt) az *Ascomycota* törzs *Eurotiomycetes* osztályának *Eurotiales* rendjén belül az *Aspergillaceae* családba tartozik (Houbraken és Samson 2011). A nemzetségbe sorolt, elsősorban szaprofita törzsek a világ minden táján, a legkülönbözőbb élőhelyeken előfordulnak. A csoport egyes képviselői igen jelentősek biotechnológiai eljárásokban történő alkalmazásuk miatt. Különféle metabolitokat termeltetnek velük, továbbá élelmiszer-fermentációkban történő alkalmazásuk is igen elterjedt. Ezen kívül ismertek, mint növények kártevői, élelmiszer-szennyezők, mikotoxintermelők, valamint opportunista patogénként állati és emberi megbetegedéseket is okozhatnak. A nemzetségbe tartozó fajok osztályozása és azonosítása korábban morfológiai bélyegek alapján történt, az utóbbi évtizedekben azonban megnőtt a molekuláris karakterek vizsgálatának jelentősége, így napjainkban a fajmeghatározás egyre inkább molekuláris különbségeken alapul.

Az *Aspergillus* elnevezés Pier Antonio Micheli olasz botanikus nevéhez köthető (Micheli 1729). Katolikus pap lévén, az ide tartozó gombák konídiumtartói a liturgiában használatos szenteltvíz-szóróra (*aspergillum*) emlékeztették. Később Albrecht von Haller (1768), majd Elias Magnus Fries (1832) is elismerték és megerősítették az *Aspergillus* nemzetség létét. Az ide tartozó teleomorf fajokat tizenegy nemzetségbe sorolták (Frisvad és Samson 2000; Udagawa és Uchiyama 2002): *Eurotium, Chaetosartorya, Emericella, Fennellia, Hemicarpenteles* (a közelmúltban végzett vizsgálat alapján a legtöbb korábban ide sorolt faj a *Penicillium* nemzetséghez tartozik (Visagie és mtsai. 2014a)), *Neosartorya, Petromyces, Sclerocleista* (Houbraken és Samson (2011) munkája alapján nem tartozik az *Aspergillus* nemzetséghez), *Stilbothamnium, Neopetromyces* és *Neocarpenteles*. *Aspergillus* monográfia Thom és Raper (1945), majd Raper és Fennell (1965) munkája nyomán jelent meg 89, illetve 150 leírt fajjal. Felismerve azt, hogy a taxonómiának szükségtelen és indokolatlan az azonos fajhoz tartozó anamorf és teleomorf törzseket külön névvel ellátnia, sőt éppen az egyszerűségre kellene, hogy törekedjen, figyelmen kívül hagyták a teleomorf fajok eltérő elnevezését, ellentétben az uralkodó nevezéktannal, és kizárólag az *Aspergillus* nevet használták. Ennek ellenére a kettős elnevezés mégis népszerű lett, és használata széles körben elterjedt a gomba-taxonómiában. Pitt és mtsai. (2000) egy jóval későbbi munkában 184 *Aspergillus*, és 70 ide

tartozó teleomorf fajnevet közöltek. Az említett munkákban a fajok azonosítása morfológiai karakterek alapján történt. A későbbiekben a morfológián alapuló fajkoncepciót egyre inkább a polifázikus fajkoncepció váltotta fel, melyben a morfológiai tulajdonságok mellett fiziológiai, és főként filogenetikai karakterek is meghatározóvá váltak a fajok elkülönítésében, így a fenti munkákban közölt fajlisták hamarosan idejétmúlttá váltak (Samson és mtsai. 2007). Egyre több új faj került leírásra, ami főleg arra bezethető vissza, hogy sok esetben a morfológiai karakterek alapján azonos fajhoz sorolt törzsek között a filogenetikai vizsgálatok egyértelmű különbségeket tártak fel. Jelenleg megközelítőleg 350 fajt sorolhatunk a nemzetségbe (Samson és mtsai. 2014). Korábban a nemzetségen belüli osztályozás is morfológiai eltéréseken alapult. Raper és Fennell (1965) a nemzetséget 18 csoportra osztotta, nevezéktani státuszok nélkül. Később Gams és mtsai. (1985) az ide tartozó fajokat alnemzetségekbe és szekciókba sorolták, csoportosításuk a filogenetikai karakterek alapján történő csoportosítással nagymértékű egyezést mutatott. Peterson (2008) négy lókusz vizsgálata alapján 5 alnemzetséget és 16 szekciót különített el. Houbraken és munkatársai (2014), valamint Hubka és munkatársai (2015) a nemzetség négy alnemzetségbe (*Aspergillus, Circumdati, Fumigati, Nidulantes*) és 20 szekcióba történő besorolását javasolták. Bár korábbi filogenetikai munkák sora engedett betekintést az *Aspergillus* fajok közötti rokonsági kapcsolatokba (Berbee és mtsai. 1995; Ogawa és mtsai. 1997; Tamura és mtsai. 2000; Geiser és mtsai. 2008; Peterson 2008; Peterson és mtsai. 2008; Houbraken és Samson 2011), még mindig vannak megválaszolatlan kérdések. Az eddigi munkák általában valamelyik alcsoportra (szekcióra, alnemzetségre) fókuszáltak, nemzetségszintű filogenetikai vizsgálatra eddig kevés esetben volt példa, így a rokonsági kapcsolatok pontos feltérképezése még nem történt meg (Samson és mtsai. 2014). A filogenetikai vizsgálatok a gomba-taxonómiában jelentős változásokat hoztak. Azon törekvés értelmében, hogy egy gombafaj ivartalan és ivaros alakja csak egy névvel rendelkezzen (Taylor 2011; McNeill és Turland 2011), fontos a nemzetségen belüli rokonsági kapcsolatok pontos feltérképezése. Az *Aspergillus* nemzetség tagjai fontos szerepet játszanak biotechnológiai, ipari és klinikai területeken egyaránt. Éppen ezért a nem megfelelő taxonómia és bizonytalan névhasználat rengeteg félreértéshez vezethet. Több korábbi tanulmány is alátámasztja az *Aspergillus* nemzetség monofiletikus voltát (Berbee és mtsai. 1995; Ogawa és mtsai. 1997; Tamura és mtsai. 2000). Peterson (2008) 5.8S rDNS, 28S rDNS és *RPB2* génszekvenciákon alapuló munkájában a nemzetség 3 fő kládra különült el, de a kládok közötti kapcsolat statisztikailag nem volt magasan támogatott. Ezek a kládok egyezést mutattak a nemzetség alnemzetségeivel: egy klád a *Circumdati* és *Fumigati* alnemzetségeket foglalta magába, egy a *Nidulantes* alnemzetséget reprezentálta, egy pedig az *Aspergillus* alnemzetség tagjait

tartalmazta. Geiser és munkatársai (2008) 10 génen alapuló filogenetikai munkájában a nemzetség tagjai szintén három kládra oszlanak szét: a *Circumdati, Fumigati* és *Nidulantes* alnemzetségekre. Az *Aspergillus* alnemzetségbe sorolt törzseket ebbe a munkába nem vonták be. Houbraken és Samson (2011) négy génen alapuló filogenetikai vizsgálatot végeztek, és igazolták, hogy az általuk vizsgált *Aspergillus* fajok, illetve a nemzetséghez tartozó teleomorf alakok monofiletikus csoportot alkotnak. Houbraken és munkatársai (2014) 25 gén bevonásával filogenetikai vizsgálatot végeztek biotechnológiai alkalmazásuk miatt fontos fajokkal, és szintén arra jutottak, hogy a nemzetségbe tartozó anamorf és teleomorf fajok monofiletikus csoportot alkotnak (bootstrap: 100%). A vizsgálatba bevont teleomorf törzsek nagyfokú rokonságot mutattak az egyes alnemzetségekkel, az *Eurotium* nemzetség az *Aspergillus*; a *Petromyces, Neopetromyces* és *Fennellia* nemzetségek a *Circumdati*; a *Neocarpenteles, Neosartorya* és *Dichotomomyces* nemzetségek a *Fumigati*; a *Chaetosartorya* és *Cristaspora* nemzetségek a *Cremei*; az *Emericella* nemzetség pedig a *Nidulantes* alnemzetséggel mutatott rokonságot. Azon elveknek a megvalósulása, hogy egy gombafaj csak egy névvel rendelkezzen („one fungus - one name" Nemzetközi Botanikai Kongresszus, Melbourne 2011) a nemzetség nevezéktanában változásokat követel. Ennek megoldására különböző lehetőségek vázolhatók fel (Samson és mtsai. 2014). Az egyik lehetőség a nemzetséget alkotó kládok eltérő nemzetségnevekkel történő ellátása, melynek eredményeként az egyes kládok tagjai a csoportba sorolt teleomorf alakok korábbi nemzetségneveit kapnák, mint például *Neosartorya, Emericella, Petromyces* stb. Az *Aspergillus* nevet csak az *Aspergillus* szekció tagjai őriznék meg, mivel ide tartozik a nemzetség típusfaja, az *A. glaucus*. Ez természetesen magával vonná az *Eurotium* név megszűnését. Lehetséges másik típusfaj kijelölése is, de ebben az esetben is csak az a szekció őrizhetné meg az *Aspergillus* nevet, amelybe az újonnan kijelölt típusfaj tartozik. Az új típusfaj kiválasztása viszont vitákat eredményezne, mert több szekció tagjai között is találhatunk gazdaságilag nagy jelentőségű, a klinikumban fontos, vagy egyéb szempontok alapján előtérbe helyezhető fajokat. A harmadik – és valószínűleg a legésszerűbb – megoldás az lenne, ha minden ide tartozó faj az *Aspergillus* nevet viselné, a korábbi elnevezés pedig jelzőként maradna meg (pl. *A. glaucus eurotium*-típusú *ascoma*-val).

A filogenetikai fajazonosításhoz a leggyakrabban a rRNS-eket kódoló szakasz ITS (Internal Transcribed Spacer) régióját használják, a szakasz „DNS-barcode"-ként alkalmazható a gombák esetében (Schoch és mtsai. 2012). Ez a DNS szakasz azonban sajnos nem alkalmas minden *Aspergillus* faj elkülönítésére, ezekben az esetekben másodlagos marker is szükséges a faj pontos azonosításához (Schoch és mtsai. 2012). A másodlagos marker esetében fontos, hogy

univerzális indítószekvenciák (primerek) legyenek tervezhetők rá, továbbá egyszerűen felszaporítható, és minden faj elkülönítésére alkalmas legyen. Természetesen az aktuális adatbázis teljessége is fontos szempont, olyan génszakaszt érdemes választani, amelynek bázissorrendje a legtöbb fajból már rendelkezésre áll. Ezen szempontok alapján az *Aspergillus* nemzetségben három lehetőség kínálkozik: a kalmodulint, a β-tubulint, valamint az RNS-polimeráz II második legnagyobb alegységét (*RPB2*) kódoló génszakaszok. Az *RPB2* azonban nem tartozik a könnyen amplifikálható szakaszok közé. A kalmodulint kódoló gén egy szakasza könnyen felszaporítható, a bázissorrend alapján szinte minden faj elkülöníthető egymástól (kivéve pl. *A. elegans* és *A. steynii*, melyek ITS-szekvenciáik alapján azonban elkülöníthetők; Visagie és mtsai. 2014b), és az adatbázis majdnem teljes, tehát alkalmas arra, hogy másodlagos markerként használjuk (Samson és mtsai. 2014).

Fekete *Aspergillus*-ok jellemzése, taxonómiai helyzetük

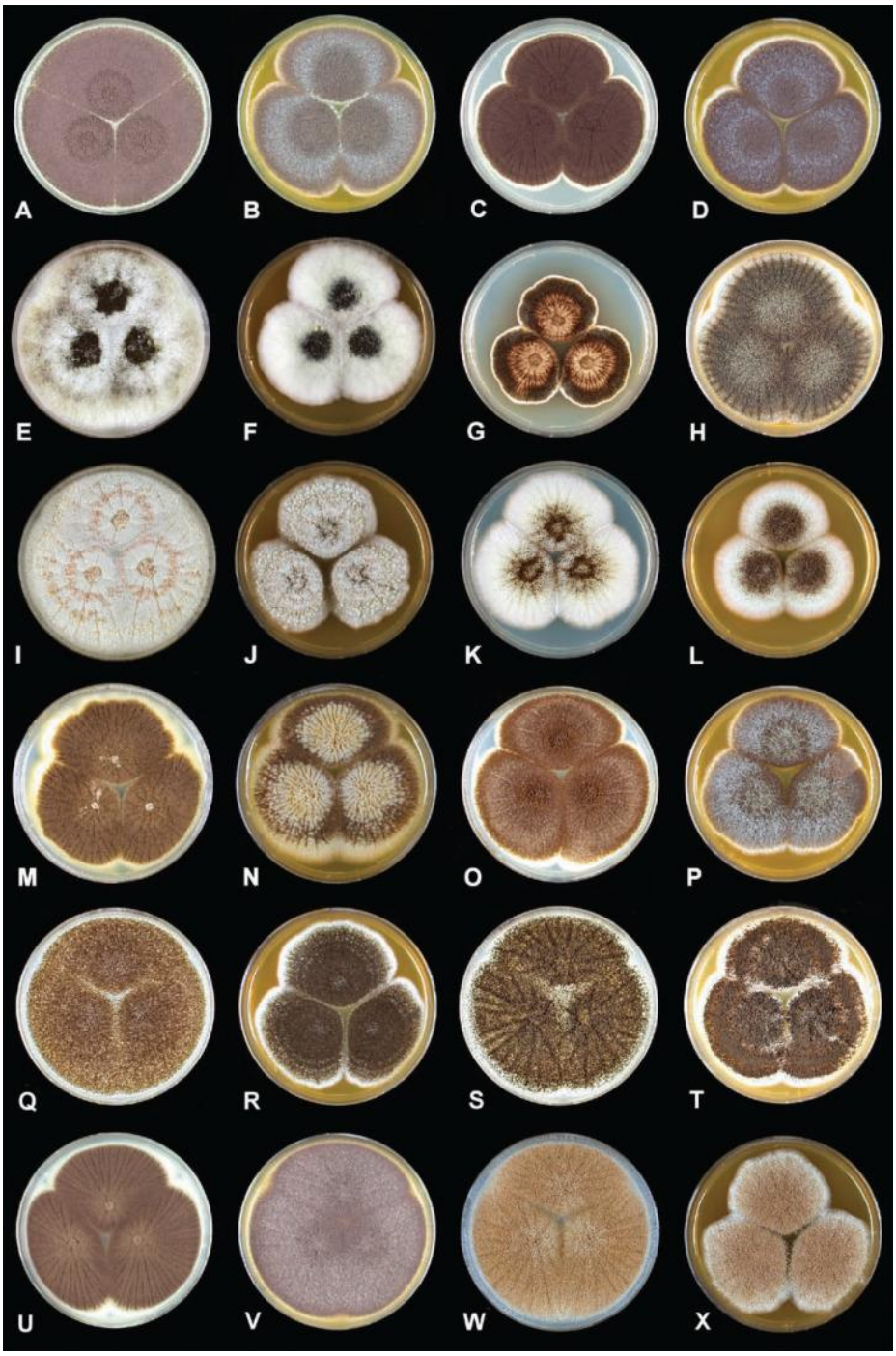
Fekete *Aspergillus*-oknak az *Aspergillus* nemzetség *Nigri* szekciójába tartozó fajokat nevezzük (Gams és mtsai. 1985). A fekete *Aspergillus*-ok konídiumai általában sötét színűek, a sötétszürke és a fekete között minden átmeneti szín jellemző lehet. A csoport egyes képviselői nagy jelentőséggel rendelkeznek orvosi, élelmiszer-mikrobiológiai, valamint biotechnológiai szempontból egyaránt. A csoport legismertebb képviselője az *A. niger*, melyet citromsav és glükonsav termeltetésére, továbbá számos enzim, pl. pektináz, amiláz előállítására is használnak (Varga és mtsai. 2000). Hasznos tulajdonságaik mellett azonban azt is meg kell említeni, hogy okozhatnak humán megbetegedéseket, általában immunszupresszált betegekben. Az ide tartozó fajok élemiszerekben is előfordulhatnak. Ennek jelentősége abban áll, hogy a fekete *Aspergillus*-ok különböző mikotoxinok (ochratoxinok, fumonizinek) termelésére képesek, melyek elfogyasztása kerülendő, hiszen ezek a mikotoxinok állatokra és emberekre egyaránt káros hatást fejtenek ki.

A fekete *Aspergillus* fajok elkülönítésére különböző módszerek léteznek, de pusztán morfológiai karakterek alapján a pontos meghatározásuk nehéz, néhány esetben pedig nem is lehetséges. Samson és munkatársai (2007) vizsgálatuk során áttekintették az egyes fajok, fajcsoportok elkülönítésére alkalmas bélyegeket. Eredményeik alapján azon fajok, melyek szkleróciumot hoznak létre (*A. carbonarius, A. ellipticus, A. aculeatus, A. costaricaensis, A. piperis, A. sclerotioniger, A. aculeatinus* és *A. sclerotiicarbonarius*), elkülöníthetők a növekedés mintázata alapján, más csoportok, mint az *A. niger* és rokonai azonban nem különböztethetők meg (1. ábra).

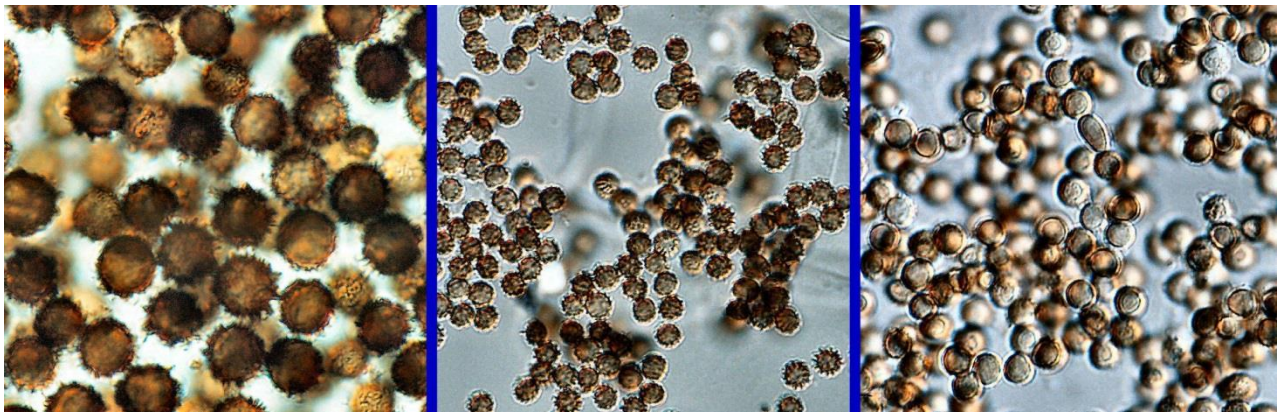
A konídiumok mérete és mintázata alapján csak fajcsoportokat különíthetünk el. Néhány fajnak nagy, 7-9 µm-es (*A. carbonarius, A. ibericus, A. homomorphus, A. sclerotiicarbonarius és A. sclerotioniger*), azonban a legtöbb fajnak ennél kisebb 3-4,5 µm-es konídiumaik vannak (2. ábra). Néhány esetben a konídium mintázata is jellemző, pl. az *A. ibericus* és *A. homomorphus* konídiumai tüskések.

A kreatin-szacharóz agar (CREA) táptalajon történő tenyésztést használják különböző gombacsoportok esetében a fajok meghatározására (pl. *Penicillium* fajok, Samson és mtsai. 2004, Frisvad és Samson 2004). Növekedésük, savtermelésük alapján a fekete *Aspergillus*-ok körében is alkalmas a módszer fajcsoportok elkülönítésére. Az *A. niger*-nél és rokon fajainál mérsékelt telepnövekedés és erős savtermelés jellemző. A MEA-B (Pollastro és mtsai. 2006) táptalajon mindössze néhány faj (*A. carbonarius, A. sclerotioniger, A. sclerotiicarbonarius*) képes konídiumot létrehozni, ennek a módszernek használatával tehát kimutathatóvá válik az ochratoxintermelő *A. carbonarius* faj esetleges jelenléte.

Az Ehrlich-reakció segítségével vizsgálhatjuk egyes indolcsoportot tartalmazó másodlagos metabolitok jelenlétét az agaron fejlődő kolóniákban. Ez alapján a fekete *Aspergillus* fajokat csoportokra oszthatjuk. Az *A. heteromorphus* és az *A. homomorphus* pozitív reakciót ad, sárga elszíneződés tapasztalható, amely körül lila gyűrű jelenik meg. Az *A. costaricaensis* telepek körül kék elszíneződés tapasztalható. Az *A. brasiliensis, A. acidus* és *A. niger* sárga reakciót adnak, míg az *A. tubingensis*-nél és rokonainál nem tapasztalható kék, lila vagy sárga elszíneződés a reagenst tartalmazó szűrőpapíron.



1. ábra. Néhány fekete *Aspergillus* faj növekedési mintázata CYA és MEA táptalajokon 25°C-on történő, 7 napos növekedés után. (A-B) *A. aculeatinus*, (C-D) *A. aculeatus*, (E-F) *A. brasiliensis*, (G-H) *A. carbonarius*, (I-J) *A. costaricaensis*, (K-L) *A. ellipticus*, (M-N) *A. foetidus*, (O-P) *A. japonicus*, (Q-R) *A. heteromorphus*, (S-T) *A. homomorphus*, (U-V) *A. ibericus*, (W-X) *A. lacticoffeatus* (Samson és mtsai. 2007).



2. ábra. Fekete *Aspergillus* fajok konídiumainak fénymikroszkópos képe. *A. carbonarius* (7-9 µm), *A. costaricaensis* (3,1-4,5 µm), *A. ellipticus* (3,3-5,5 µm) (Samson és mtsai. 2007).

A klasszikus módszerek mellett különböző molekuláris módszerek is rendelkezésre állnak a fekete *Aspergillus* fajok osztályozására. Ezek közül az egyik az RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), amely mind sejtmagi, mind mitokondriális DNS használatával sikeresen alkalmazható a fajok elkülönítésére, illetve új fajok azonosítására. Kusters-van Someren és munkatársai (1991) kiterjedt sejtmagi DNS RFLP-vizsgálatot végeztek számos, gyűjteményből származó fekete *Aspergillus* törzzsel. A riboszómális DNS (rDNS) *Sma*I restrikciós endonukleázzal történő hasítása alapján az *A. niger* fajkomplexen belül két csoportot különítettek el, melyek morfológiai karakterek alapján nem voltak elkülöníthetők. A két csoport pektin-liáz gének (*pelA, pelB*) és a piruvát kináz gén (*pki*) DNS-hibridizációs vizsgálata során is elválasztható volt egymástól. A két csoportot ezért fajszintre emelték (*A. niger* és *A. tubingensis*). Az *A. foetidus*-t Al-Musallam (1980) emelte fajszintre morfológiai alapon, azonban sejtmagi DNS RFLP alapján nem különíthető el az *A. niger*-től, az *A. helicothrix* az *A. ellipticus* morfológiai variánsának bizonyult, az *A. aculeatus* és az *A. japonicus* *Sma*I-el emésztett rDNS mintázata pedig egyforma. Varga és munkatársai (1994) négy csoportot figyeltek meg az *A. niger* fajkomplexen belül, rDNS profiljuk alapján: az I-es és III-as típusba az *A. niger* és *A. brasiliensis* törzsek, míg a II-es és IV-es csoportba az *A. tubingensis* törzsek tartoztak. Az *A. japonicus* és az *A. aculeatus* fajokat Parenicova és munkatársai (2001) azonosították RFLP analízis segítségével, munkájuk során hibridizációs próbaként *A. niger* piruvát-kináz (*pkiA*) és pektin-liáz (*pelA*), valamint *Agaricus bisporus* 28S rRNS géneket használtak, melyekkel sikerült őket egymástól elkülöníteni. A mitokondriális DNS (mtDNS) is jelentős variabilitást mutat az egyes fajok között az *A. niger* fajkomplexen belül. Mind gyűjteményből származó törzseket, mind természetes populációkat vizsgálva, elkülöníthetőek

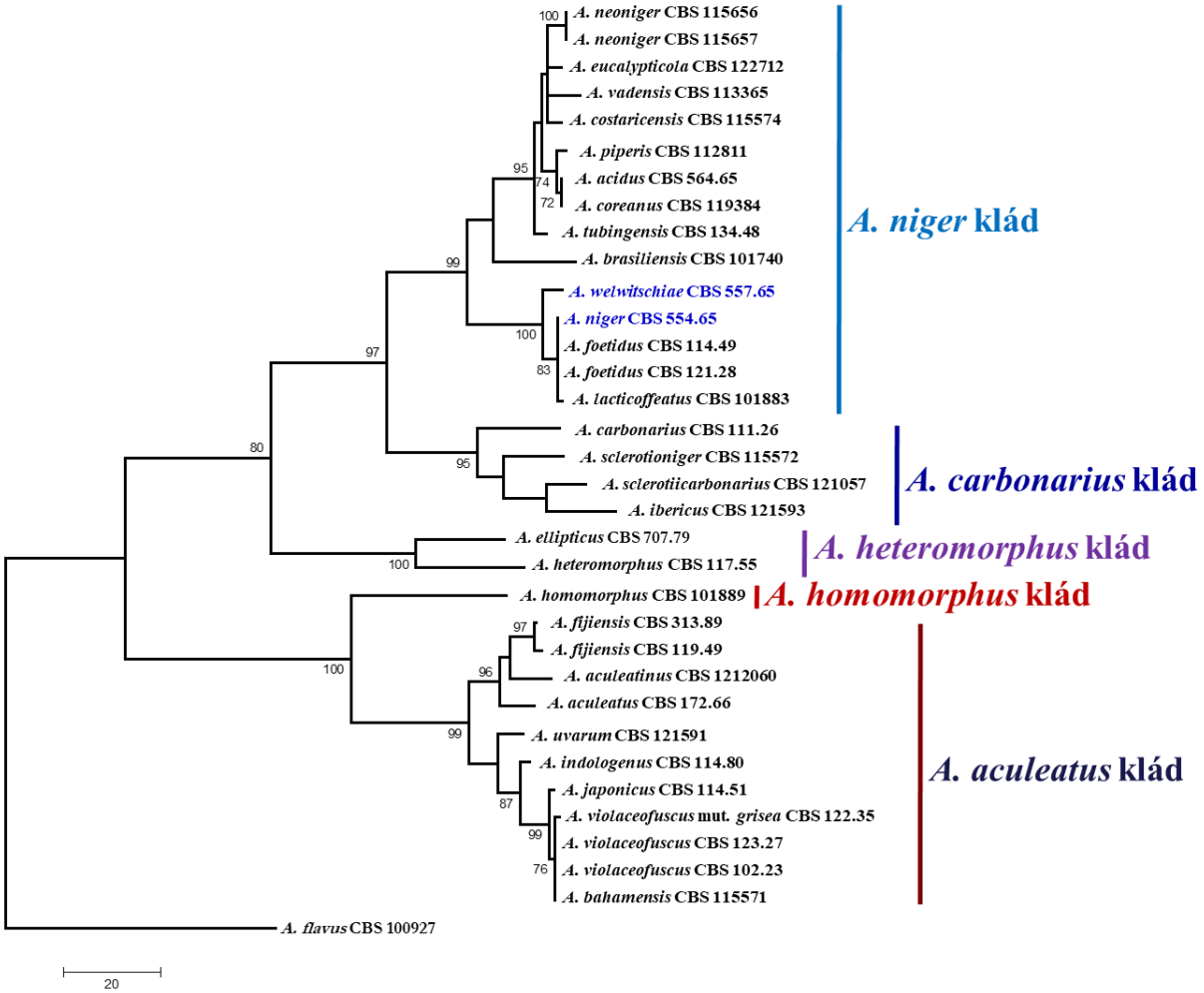
voltak egymástól az *A. niger* és *A. tubingensis* fajok *Hae*III és *Bgl*II enzimekkel hasított mtDNS-mintázataik alapján (Varga és mtsai. 1993). Néhány brazil izolátum különbözött ezektől, egy harmadik csoportot alkotva, ezeket később *A. brasiliensis* fajként írták le (Varga és mtsai. 2007).

Egy másik lehetőség a fekete *Aspergillus* fajok variabilitásának vizsgálatára a RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA - Polymerase Chain Reaction) analízis (Megnegneau és mtsai. 1993). A módszer lényege, hogy csak egy, 10 nukleotid hosszúságú primert alkalmaznak, melynek a szekvenciája ismert, de random. A felszaporított fragmentumokat agaróz gélen választják el. Megnegneau és munkatársai (1993) 6 random primer felhasználásával el tudták különíteni egymástól az *A. carbonarius, A. japonicus, A. aculeatus, A. heteromorphus* és *A. ellipticus* fajokat, valamint sikerült az *A. niger* fajkomplex törzseit ezzel a módszerrel is két csoportra osztani, melyek az *A. niger* és *A. tubingensis* fajoknak feleltek meg. Az *A. aculeatus* faj szintén megkülönböztethető az *A. japonicus* törzsektől 4 primer segítségével (Hamari és mtsai. 1997), és az *A. brasiliensis* is egyértelműen elkülöníthető az *A. niger* fajkomplex többi képviselőjétől (Varga és mtsai. 2000). Az AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) módszer szintén sikerrel alkalmazható fekete *Aspergillus* fajok elkülönítésére (Perrone és mtsai. 2006, Varga és mtsai. 2007).

Accensi és munkatársai (1999) PCR-RFLP technikával különböztettek meg *A. niger* és *A. tubingensis* izolátumokat. A módszer lényege, hogy az amplifikált DNS-fragmentumot restrikciós endonukleázzal emésztették, így kombinálni lehet a PCR és az RFLP-analízis előnyeit. Az izolátumokból felszaporított ITS-régiót *Rsa*I restrikciós endonukleázzal emésztették, a kapott mintázat alapján az *A. niger* fajkompex tagjait N és T típusokba sorolták, ami az *A niger* és az *A. tubingensis* izolátumoknak felel meg. A különbség azzal magyarázható, hogy az *A. niger*-ben található ITS-régió tartalmazza az *Rsa*I enzim restrikciós hasító helyét (5'-GT/AC-3'), míg az *A. tubingensis*-é nem. *In silico* vizsgálatok alapján a T típusba tartoznak még az *A. foetidus, A. vadensis, A. piperis* és az *A. costaricensis* izolátumok is, a többi faj pedig N típusú mintázatot mutat (Samson és mtsai. 2007).

Napjainkban a DNS és aminósav szekvenciaalapú azonosítást széles körben alkalmazzák a fajmeghatározásban. Az *Aspergillus* nemzetség *Nigri* szekcióján belül minden faj megkülönböztethető egymástól kalmodulin-szekvenciáik alapján (3. ábra), illetve egy kivételével mindegyik elkülöníthető β-tubulin szekvenciáik alapján (az *A. lacticoffeatus* β-tubulin szekvenciái megegyeznek néhány *A. niger* izolátuméval; Samson és mtsai. 2004, Varga és mtsai. 2007). ITS-szekvenciáik alapján az *A. niger* fajkomplex tagjai négy csoportba

sorolhatók: 1. *A. niger* és *A. lacticoffeatus*, 2. *A. brasiliensis*, 3. *A. costaricensis*, 4. *A. tubingensis*, *A. foetidus*, *A. vadensis* és *A. piperis* (Varga és mtsai. 2007). A többi fekete *Aspergillus* faj közül az A. *carbonarius* és az *A. sclerotioniger* ITS-szekvenciái megegyeznek, valamint a legtöbb egysoros konídiumtartójú (uniseriate) fajnak is azonos ITS-szekvenciáik vannak (*A. japonicus*, *A. aculeatus*, *A. uvarum*). Yokoyama és munkatársai (2001) a mitokondriális citokróm b gén szekvenciáit használták a fekete *Aspergillus*-ok közötti filogenetikai kapcsolatok felderítésére, melynek során az analízist nukletotid- és aminosavszekvenciákkal is elvégezték. Utóbbi alapján öt csoport különíthető el: *A. japonicus/A. aculeatus*, *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. carbonarius* és *A. ellipticus*, a nukleotidszekvenciák alapján azonban az *A. niger* és az *A. tubingensis* nem különböztethetők meg egymástól. Az IGS (Intergenic Spacer) régiót is vizsgálták, hogy használható-e fajmeghatározásra, azonban ez nagy fajon belüli variabilitást mutatott, ezért nem alkalmas fajszintű elkülönítésre (Samson és mtsai. 2007).



3. ábra. Az *Aspergillus* nemzetség *Nigri* szekciójának rokonsági viszonyai részleges kalmodulin génszekvenciáik alapján (Varga és mtsai. 2010)

Az *A. niger* és *A. welwitscheae* testvérfajok közötti különbségek

Az *Aspergillus* nemzetség *Nigri* szekciójába tartozó két faj kalmodulin, β-tubulin és transzlációs elongációs faktor 1-alfa génjeik bázissorrendjei alapján egyértelműen elkülöníthetőek egymástól, azonban morfológiai és fiziológiai tulajdonságaikban eddig nem sikerült különbségeket megállapítani (Perrone és mtsai. 2011).

Az *Aspergillus* nemzetség *Nigri* szekciójának egyes fajait különböző élelmiszerek fermentálására használják Kelet-Ázsiában. A japán Okinawa-szigeten népszerű, rizsből készült alkoholtartalmú, awamori-nak nevezett ital előállításához *A. luchuensis* és *A. awamori* törzseket alkalmaznak. Az *A. awamori* nevet Raper és Fennell (1965) egy olyan törzsnek adták, amely nem awamori fermentációból származott (CBS 557.65). Al-Musallam (1980) ezt a törzset később *A. niger* var. *awamori*-nak nevezte el. Ezt a típustörzset alapul véve Perrone és munkatársai (2011) az *A. awamori*-t, mint filogenetikai fajt írták le a *Nigri* szekción belül, mivel több gén szekvenciái alapján is egyértelműen elkülöníthető az *A. niger* csoporttól. Vizsgálatukba bevontak az awamori fermentációjához használt törzseket is, de ezek egyike sem mutatott azonosságot az *A. awamori* törzsekkel. Később bizonyítást nyert, hogy az *A. awamori* törzsek az *A. niger* törzsekhez hasonlóan képesek lehetnek fumonizinek termelésére (Varga és mtsai. 2010, 2012). Hong és munkatársai (2013) közleményükben arra hívják fel a figyelmet, hogy a filogenetikai fajként elfogadott *A. awamori*-nak nevezett törzsek nem hozhatóak kapcsolatba a japán awamori előállításánál használt törzsekkel, azonban azonosságot mutatnak a namíbiai *Welwitschia* növényekről származó *A. welwitschiae* (CBS 139.54) izolátummal. Eredményeik alapján az awamori fermentációjához használt törzsek pedig *A. niger*-nek, vagy *A. luchuensis*-nek bizonyultak. Fentiek következtében a Perrone és munkatársai (2011) által azonosított *A. awamori* filogenetikai faj az *A. welwitschiae* nevet kapta.

Fekete *Aspergillus*-ok, mint humán patogének

A fekete *Aspergillus* fajok a világ minden táján előfordulnak, konídiumaik mindenütt megtalálhatóak a levegőben, belélegzésük azonban általában nem okoz betegséget. Azok az egyének, akik valamilyen okból legyengült immunrendszerrel rendelkeznek (szervátültetettek, kemoterápiás, vagy szteroidos kezelésben részesülők, AIDS-es betegek, illetve más immunrendszert károsító betegségben szenvedők), hajlamosak a megbetegedésre, és esetükben a fertőzés halállal is végződhet (Levitz 1989). A modern immunszupresszáns terápiák elterjedésével az utóbbi években ezeknek a fertőzéseknek a száma és jelentősége egyaránt megnövekedett (Cohen és mtsai. 1993).

Az *Aspergillus* fajok által okozott humán megbetegedések három csoportba sorolhatók: allergiás aszpergillózis, aszpergillóma és invazív aszpergillózis (Hogan és mtsai. 1996). A fertőzés leggyakrabban a légzőszervrendszerben jelentkezik, de szemfertőzést (keratitisz) és fülfertőzést (otitisz) is okozhatnak. Leggyakrabban az *A. fumigatus* okoz megbetegedést, de más *Aspergillus* fajok, mint például az *A. flavus, A. terreus* és az *A. niger* is jelentősek, mint opportunista humán patogének (Latgé 1999). Egymással közeli rokonságban álló Aspergillus fajok számos esetben morfológiai alapon nem különíthetőek el egymástól, pedig a klinikai izolátumoknál fontos a faj pontos isemerete, mert a hasonló megjelenésű izolátumok eltérő mértékben lehetnek érzékenyek gombaellenes szerekre. A megfelelő fajszintű azonosítás tehát segíthet a helyes gombaellenes terápia kiválasztásában (Balajee és mtsai. 2005). A fajazonosításra használható módszerek közül a molekuláris módszerek a legbiztosabbak. A β-tubulin vagy kalmodulin gének szekvenciái megfelelőnek bizonyultak a fajszintű elkülönítéshez az *Aspergillus* nemzetségen belül (Samson és mtsai. 2007).

Balajee és munkatársai (2009) 218 *Aspergillus* izolátumot vizsgáltak, melyek szervátültetésen átesett betegekből származtak, akik feltételezhetően, vagy bizonyítottan invazív aszpergillózisban szenvedtek. A fajok meghatározását DNS-szekvenciák alapján végezték. Az ITS-szekvenciák alapján meghatározható volt, hogy az adott izolátum melyik fajkomplexhez tartozik, míg ezen belül a fajok elkülönítésére β-tubulin szekvenciákat használtak. Az izolátumokat korábban morfológiai bélyegek alapján határozták meg, mely egyezett az ITS-szekvenciák alapján végzett elkülönítéssel, tehát fajkomplex-szintig az *Aspergillus* izolátumok morfológiai alapon is meghatározhatók. A legtöbb izolátum az *A. fumigatus* fajkomplexbe tartozott, ezt követték az *A. flavus, A. niger, A. terreus, A. ustus, A. versicolor,* végül az *A. nidulans* fajkomplex képviselői. A 19 fekete *Aspergillus* közül β-tubulin szekvenciáik alapján 6-ot *A. tubingensis*-nek, 13-at pedig *A. niger*-nek határoztak. Ez az első adat arról, hogy az *A. tubingensis* invazív aszpergillózist okozhat. Vizsgálták ezen felül az egyes *Aspergillus* izolátumok érzékenységét különböző antifungális szerekre (amfotericin B, itrakonazol, vorikonazol, pozakonazol). A fekete *Aspergillus* izolátumok esetében a MIC (Minimum Inhibitory Concentration) érték alacsonynak bizonyult.

Alcazar-Fuoli és munkatársai (2009) 34, spanyol betegekből származó, klinikai fekete *Aspergillus* izolátumot vizsgáltak, melyeket korábban *A. niger*-nek határoztak morfológián alapuló módszerekkel. β-tubulin génszekvenciáik alapján az izolátumok 3 kládra különültek: a törzsek több mint fele (18) *A. tubingensis*-nek, 13 izolátum *A. niger*-nek, 3 pedig *A. acidus*-nak bizonyult. Tesztelték az izolátumok antifungális szerekkel szembeni érzékenységét is

(amfotericin B, itrakonazol, vorikonazol, ravukonazol, pozakonazol, terbinafin, kaszpofungin, mikafungin), és megállapították az egyes szerekhez tartozó MIC és MEC (Minimum Effective Concentration) értékeket. Az itrakonazolhoz tartozó MIC-értékek alapján az izolátumok három jól elkülöníthető csoportra oszthatók. Ezek az alacsony és magas MIC-értékkel rendelkezők, és egy harmadik csoport, ami esetében ez a szer egy szokatlan, paradox hatást mutatott (Chamilos és mtsai. 2007). Ez abban nyilvánult meg, hogy a gomba a MIC-értéknél magasabb koncentráció mellett képes volt növekedni. Ez az első eset, hogy azolok paradox hatását tapasztalták *Aspergillus* fajokkal szemben. Mind a paradox hatást mutató, mind a magas itrakonazol MIC-értékkel rendelkező törzsek vorikonazol és ravukonazol MIC-értékei is magasak voltak. Az összes törzs érzékeny volt amphotericin B-re, terbinafinra és echinocandinra.

Howard és munkatársai (2011) 1994 és 2007 között Nagy-Britanniában izolált 43 klinikai fekete *Aspergillus* törzset vizsgáltak, és minden izolátum ITS-, kalmodulin. és β-tubulin-régióit megszekvenálták. A kalmodulin és β-tubulin gének alapján az izolátumok 5 kládot alkottak. A 43 izolátumból 25 *A. welwitschiae*-nek, 10 *A. tubingensis*-nek, 5 *A. niger*-nek, 3 pedig *A. acidus*-nak bizonyult. Az ITS-szekvenciák nem voltak alkalmasak arra, hogy segítségükkel ezek a közeli rokon fajok elkülöníthetőek legyenek. Az izolátumok antifungális szerekkel szembeni érzékenységét is tesztelték, és azt tapasztalták, hogy 9/25 *A. welwitschiae*, 8/10 *A. tubingensis*, 2/5 *A. niger* és 3/3 *A. acidus* izolátum rezisztens volt itrakonazollal szemben (MIC > 4 mg/l). Ez alátámasztja, hogy a fajcsoporton belül egyes fajok nagyobb rezisztenciát mutatnak az azolokkal szemben.

Kredics és munjatársai (2008) szemfertőzésekből származó indiai fekete *Aspergillus* izolátumok fajszintű eloszlását vizsgálták. A 7 izolátum közül 2-2 az *A. brasiliensis*, *A. niger* és *A. tubingensis* fajba tartozott, míg 1 törzs *A. welwitschiae*-nek bizonyult kalmodulin génszekvenciáik alapján.

Fülfertőzések

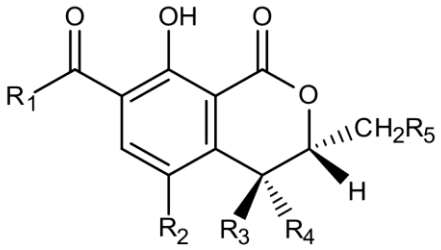
A külső hallójárat gombás eredetű gyulladását (*otitis externa mycotica*) legtöbbször a *Candida* és *Aspergillus* nemzetségekbe tartozó gombák okozzák. Az otomikózis elterjedése globálisnak tekinthető, bár a meleg, nedves, poros környezetben gyakrabban jelenik meg (Joy és mtsai. 1980). Tünetei fülviszketés, fülfájás, halláscsökkenés és fülzúgás lehetnek. A gyulladás összefüggésben áll a felületi epiteliális hámlás következtében kialakuló törmelék jelenlétével, mely hifákat tartalmazhat. Súlyos esetben a fertőzés a külső hallójáratból átterjedhet a középfülre is, sőt a hallócsontokat is befedheti, bár ez utóbbi elsősorban immunszupresszált betegek esetében fordulhat elő (Kaur és mtsai. 2000). Az eddigi irodalmi adatok szerint az *Aspergillus* fajok közül az *A. niger* felelős a legtöbb megbetegedésért (Munguia és Daniel 2008, Bonifaz és mtsai. 2010, Fasunla és mtsai. 2007, Ozcan és mtsai. 2003), azonban a fülfertőzésekből származó fekete *Aspergillus* izolátumokat minden esetben morfológiai alapon azonosították, szekvenciaalapú fajazonosítás még nem történt.

Fekete *Aspergillus* fajok mikotoxintermelő képessége

Ochratoxinok

Az ochratoxin A (OTA) mikotoxint *Aspergillus ochraceus* törzsekben azonosították először (van der Merwe és mtsai. 1965). Ez a toxin erősen nefrotoxikus és hepatotoxikus, de immunszupresszáns, teratogén és karcinogén tulajdonságát is bizonyították (Smith és Moss 1985, Lea és mtsai. 1989). Az OTA összefüggésbe hozható a balkáni endemikus nefropátiás esetekkel (Krogh és mtsai. 1977). Rágcsálókon végzett kísérletek is igazolták az OTA karcinogén hatásait (Bendele és mtsai. 1985, Boorman és mtsai. 1992), melyek értelmében az OTA az egyik legpotensebb vesekarcinogén. Az állatkísérleti adatok alapján az OTA-t a Nemzetközi Rákkutatási Ügynökség (IARC, 1993), mint lehetséges humán karcinogént, a 2B csoportba sorolta.

Az ochratoxinok kémiai szerkezetük alapján dihidroizokumarin vázhoz kapcsolódó β-fenilalanin vegyületek. Biológiai hatásuk szempontjából elsősorban a klórszármazékok akut toxicitása nagy. Az OTA kevésbé toxikus, klórmentes származéka az ochratoxin B (4. ábra).



	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5
Ochratoxin A	fenilalanil	Cl	H	H	H
Ochratoxin B	fenilalanil	H	H	H	H
Ochratoxin C	fenilalanil-etil-észter	Cl	H	H	H
Ochratoxin A-metil-észter	fenilalanil-metil-észter	Cl	H	H	H
Ochratoxin B-metil-észter	fenilalanil-metil-észter	H	H	H	H
Ochratoxin B-etil-észter	fenilalanil-etil-észter	H	H	H	H
Ochratoxin α	OH	Cl	H	H	H
Ochratoxin β	OH	H	H	H	H
4R-Hidroxiochratoxin A	fenilalanil	Cl	H	OH	H
4S-Hidroxiochratoxin A	fenilalanil	Cl	OH	H	H
10-Hidroxiochratoxin A	fenilalanil	Cl	H	H	OH

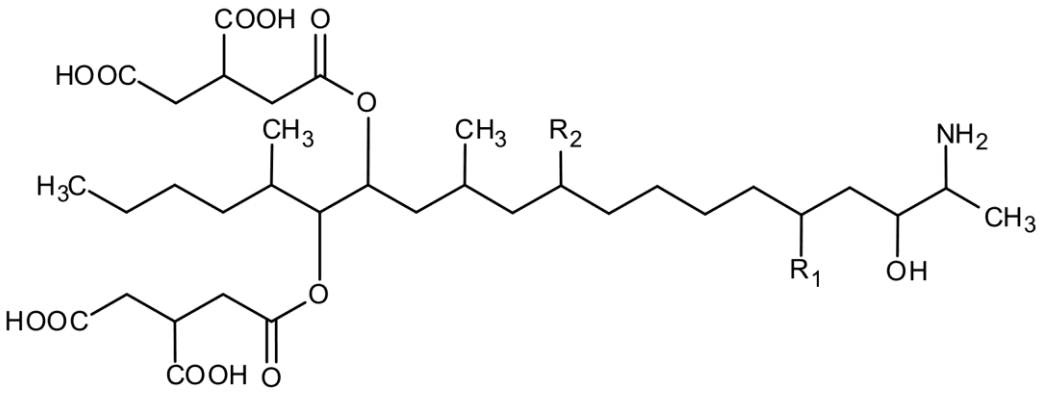
4. ábra. Ochratoxinok szerkezete

Ochratoxinokat *Aspergillus* és *Penicillium* fajok is termelhetnek. Az OTA-termelő képességgel rendelkező fajok többsége az *Aspergillus* nemzetség *Circumdati* szekciójának tagja (Krogh 1978), de a nemzetség más szekcióiba tartozó fajok között is számos OTA-termelő fordul elő. A fekete *Aspergillus* fajok közül az *A. carbonarius* termel legnagyobb mennyiségben OTA-t (Téren és mtsai. 1996), de az *A. niger* és *A. welwitschiae* is termelheti ezt a mikotoxint (Varga és mtsai. 2009a).

Fumonizinek

A fumonizinek karcinogén mikotoxinok, melyeket *Fusarium verticillioides*-ben azonosítottak először (Gelderblom és mtsai. 1988; Bezudienhout és mtsai. 1988), majd más *Fusarium* fajokban is kimutatták (Marin és mtsai. 2004). Élelmiszer- és takarmánybiztonság szempontjából a legfontosabb toxinok közé tartoznak. A fumonizinek természetes előfordulása *Fusarium verticillioides*-szel fertőzött kukorica, illetve kukoricaalapú termékek esetében jelentős. Szardínián egyes kukoricatételekben 250 μg/g fumonizint is kimutattak, míg Koreában 150 mg/kg szintet is mértek. Hazánkban a legmagasabb eddig észlelt legnagyobb szennyezettség 75 mg/kg volt (Varga és mtsai. 2009b).

Számos különböző fumonizin izomert azonosítottak (Bartók és mtsai. 2006), a leggyakrabban a B_1 (FB_1), B_2 (FB_2) és B_3 (FB_3) fordulnak elő, ezek mindegyike rákkeltő hatású (5. ábra). Szerkezetük hasonló a szfingolipid intermediereké hez, ezért akadályozzák azok metabolizmusát, azáltal, hogy gátolják a ceramid-szintáz enzimet (Wang és mtsai. 1991), így a szfinganin és a szfingozin mennyisége megemelkedik, a szfingolipidek képződése pedig gátlódik. A szabad szfingoid bázisok toxikusak, apoptózist idéznek elő a sejtben, ezáltal ezek felelősek a hepato- és nefrotoxikus hatásokért. A szfingolipidek esszenciális komponensei az eukarióta membránoknak, szerepük van továbbá a sejtnövekedésben és differenciálódásban is. A fumonizinek egyik hatása baromfiembriókban a rendellenes gericvelőcső-záródás, melyet a folsavtranszport gátlása révén idéznek elő. (Varga és mtsai. 2009b). A fumonizineket tartják felelősnek egyes dél-afrikai nyelőcsőrákos esetekért (Marasas és mtsai. 1988a; Yoshizava és mtsai. 1994), de okozhatják lovak agylágyulását (Marasas és mtsai. 1988b), valamint sertések tüdőödémáját is (Haschek és mtsai. 2001; Bouhet és mtsai. 2006). A FB_1 patkányokban májrákot okoz, valamint hepato- és nefrotoxikus hatású (Stockmann-Juvala és Savolainen 2008). Ezen eredmények alapján a Nemzetközi Rákkutatási Ügynökség (IARC, 2002) a 2B karcinogén csoportba sorolta, ami azt jelenti, hogy ez a toxin lehetséges humán karcinogén.



	R_1	R_2	Összegképlet
Fumonizin B_1	OH	OH	$C_{34}H_{59}NO_{15}$
Fumonizin B_2	OH	H	$C_{34}H_{59}NO_{14}$
Fumonizin B_3	H	OH	$C_{34}H_{59}NO_{14}$
Fumonizin B_4	H	H	$C_{34}H_{59}NO_{13}$

5. ábra. Fumonizinek szerkezete

A fumonizin génklasztert *F. verticillioides*-ben Proctor és munkatársai (2003), valamint Brown és munkatársai (2005) jellemezték. A toxin termeléséért legalább 15 gén felelős, melyek egy 42 kb méretű génklaszterben helyezkednek el. Az *A. niger* törzsek teljes genomszekvenálása után kiderült, hogy ezek is tartalmaztak, a *F. verticillioides*-sel homológ fumonizin géneket (Baker 2006; Pel és mtsai. 2007). Mivel ez a két gombanemzetség nagyon távoli rokonságban áll egymással, vertikális géntranszferrel nehéz megmagyarázni a fumonizintermelő képességüket, de annak is kicsi a valószínűsége, hogy az egész génklaszter horizontális géntranszferrel jutott át a *Fusarium*-okból az *Aspergillus*-okba (Frisvad és mtsai. 2007).

A fumonizin-bioszintézis kulcsenzime egy poliketid-szintáz. A folyamat kezdeti lépéseként egy lineáris, 18 C-atomos lánc jön létre, melyhez egy oxoamin-oxidáz (FUM8) kapcsol további 2 C-atomot és egy amino-csoportot, melyek alaninból származnak. A karbonil-csoport redukciója és oxigenáció után két propán-1,2,3-trikarboxilsav kapcsolódik észterkötéssel a molekulához. A fumonizinek szerkezetileg rokon vegyületei az *Alternaria* fajok által termelt fitotoxikus AAL (*Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*) toxinok, és az *A. fumigatus* szfingofungin nevű metabolitja (Varga és mtsai. 2009b). A *Fusarium* fajok növénykivonatot tartalmazó, alacsony só-, vagy cukortartalmú táptalajokon, magas vízaktivitás mellett, míg az *A. niger* izolátumok magas ozmotikumtartalmú (magas só- vagy cukortartalmú) táptalajokon termelnek nagyobb mennyiségben fumonizineket (Frisvad és mtsai. 2007).

A fekete *Aspergillus*-ok lehetséges fumonizin-termelése azért jelentős, mert sok élelmiszer- és takarmánynövényről tenyészthetők, így azok fumonizint tartalmazhatnak. Megtalálhatók szőlőn, kávén, hagymán, mangón, kukoricán és egyéb gabonákon, földimogyorón, szárított gyümölcsökön és még sok más terményen (Pitt és Hocking 1997). Irodalmi adatok alapján az *A. niger* fontos opportunista patogén különböző növényeken. Szőlő esetében fürt- és bogyórothadást okoz, és mazsoláról is izolálható (Varga és mtsai. 2004). Az ipari biotechnológiában az *A. niger*-t széles körben alkalmazzák, elsősorban citromsav, glükönsav és különböző extracelluláris enzimek termelésére, ezért felmerülhet ezeknek a termkeknek is a fumonizinekkel történő szennyeződése.

Az első adat *A. niger* fumonizin B_2-termeléséről Frisvad és munkatársaitól (2007) származik. Később kávéról izolált *A. niger* törzsek FB_2-termelését (Noonim és mtsai. 2009), majd szárított szőlőszemekről és mazsoláról izolált *A. niger* törzsek FB_2 és FB_4 termelését is kimutatták (Mogensen és mtsai. 2010). Mansson és munkatársai (2010) az *A. niger* FB_2 és FB_6 (izo-FB_1) termelésére való képességét igazolták, míg Logrieco és munkatársai (2009) olasz mustmintákat vizsgáltak, melyek FB_2-t tartalmaztak.

Célkitűzések

Munkánk során a következő célokat tűztük ki:

- **Az *Aspergillus* nemzetség átfogó filogenetikai elemzése az Aspergillus nemzetségen belüli rokonsági viszonyok pontos feltérképezése érdekében.** Filogenetikai analízis 93 törzs bevonásával, ML és MrBayes módszerekkel.

- **Két közeli rokon faj, az *A. niger* és *A. welwitschiae* genetikai variabilitásának vizsgálata.** A két faj morfológiai alapon nem különíthető el egymástól, de kalmodulin szekvenciáik alapján egyértelműen elkülönülnek. Kérdés, hogy ez a különbség kiterjed-e egyéb genomi régiókra is. A UP-PCR módszer alkalmas a genomszintű variabilitás vizsgálatára.

- **Fülfertőzésekből származó fekete *Aspergillus* izolátumok azonosítása, érzékenységük vizsgálata különböző antifungális szerekkel szemben.** Fülfertőzésekből eddig csak *A. niger*-t azonosítottak, de egyéb fekete *Aspergillus* fajok is okozhatnak opportunista mikózisokat. A morfológiai megjelenésükben egyforma fajok részleges kalmodulin szekveniáik alapján elkülöníthetőek. Az különböző fajok eltérő mértékben lehetnek érzékenyek antifungális szerekre. Leveshigításos mikrodilúciós módszerrel megállapítható egy törzs érzékenysége.

- **Élelmiszerekről származó fekete *Aspergillus* izolátumok azonosítása, az izolátumok fumonizin-termelésének vizsgálata, valamint a vizsgált élelmiszerek fumonizin-tartalmának vizsgálata.** Fekete *Aspergillus*-ok számos élelmiszerben előfordulhatnak, és potenciális fumonizin termelésük egészségügyi kockázatot jelent. Célunk fekete *Aspergillus* izolátumok gyűjtése, és ezek fajszintű azonosítása kalmodulin szekvenciáik alapján. A begyűjtött törzsek fumonizin termelésének, valamint a vizsgált élelmiszerek fumonizin tartalmának meghatározására HPLC-MS módszert alkalmazunk.

Anyagok és módszerek

Filogenetikai analízis

DNS-kivonás, felszaporítás, szekvenálás

A filogenetikai vizsgálathoz a 1. táblázatban feltüntetett 93 törzset használtuk, melyeket a CBS (Utrecht, Hollandia) törzsgyűjteményéből szereztük be. A genomi DNS izolálása az Ultraclean Microbial DNA isolation kit (MoBio Laboratories, Carlsbad, USA) felhasználásával történt a gyártó utasításainak megfelelően. Az *RPB1, RPB2, Tsr1, Cct8, MCM7* és *Acl1* lókuszok szakaszai kerültek amplifikálásra, majd szekvenálásra a 2. táblázatban feltüntetett indítószekvenciák segítségével. A PCR-elegyek végtérfogata 25 µl volt, összetételük az alábbi:

- 2,5 µl 10-szeres PCR puffer
- 0,75 µl 50 mM $MgCl_2$
- 1,85 µl 1 mM dNTP mix
- 0,5-0,5 µl 100 mM primer
- 16,55 µl steril bidesztillált víz
- 0,1 µl Taq- polimeráz enzim (BioTaq, Bioline)
- 1 µl templát DNS

A PCR során a következő programot alkalmaztuk:

1.) denaturáció: 30 másodperc, 94 °C
2.) hibridizáció: 30 másodperc, 51-47 °C
3.) polimerizáció: 60 másodperc, 72 °C
4.) utópolimerizáció: 10 perc, 72 °C

Az 1-3. lépések összesen 40 ciklusban ismétlődtek. Az első öt ciklusban a hibridizáció hőmérséklete 51 °C volt, ezt 5 ciklusban 49 °C-os hibridizációs hőmérséklet követte, majd az utolsó 30 ciklusban a primerkötődés 47 °C-on zajlott. Végül utópolimerizációs lépésként 72 °C-ot alkalmaztunk 10 percen keresztül. A reakció végén a fölöslegben jelenlévő primer oligonukleotidokat és a dNTP mix maradékát QIAQuick PCR Purification Kit (Qiagen) segítségével távolítottuk el. A megtisztított PCR-termékeket 50 µl steril bidesztillált vízben szuszpendáltuk.

1. táblázat: A filogenetikai analízisbe bevont *Aspergillus* törzsek (NB = nem besorolt)

Nemzetség	Faj	Szekció	Típustörzs
Aspergillus	*aculeatus*	*Nigri*	172.66T
Aspergillus	*aeneus*	*Aenei*	CBS 128.54
Aspergillus	*allahabadii*	*Terrei*	CBS 164.63
Aspergillus	*ambiguus*	*Terrei*	CBS 117.58
Aspergillus	*amylovorus*	*Usti*	600.67T
Aspergillus	*arenarius*	*Nigri*	463.65NT
Aspergillus	*aureofulgens*	*Terrei*	653.74T
Aspergillus	*avenaceus*	*Flavi*	109.46NT
Aspergillus	*biplanus*	*Sparsi*	468.65NT
Aspergillus	*bisporus*	*Bispori*	707.71T
Aspergillus	*brasiliensis*	*Nigri*	CBS 101740
Aspergillus	*calidoustus*	*Usti*	121611
Aspergillus	*campestris*	*Candidi*	CBS 348.81
Aspergillus	*candidus*	*Candidi*	566.65NT
Aspergillus	*cervinus*	*Cervini*	196.64NT
Aspergillus	*clavatoflavus*	*Flavi*	473.65NT
Aspergillus	*clavatus*	*Clavati*	128202
Aspergillus	*conjunctus*	*Sparsi*	476.65NT
Aspergillus	*coremiiformis*	*Flavi*	553.77T
Aspergillus	*deflectus*	*Usti*	CBS 109.55
Aspergillus	*duricaulis*	*Fumigati*	CBS 481.65
Aspergillus	*eburneocremeus*	*Aenei*	CBS 130.54
Aspergillus	*egyptiacus*	*Usti*	656.73NT
Aspergillus	*elongatus*	*Usti*	CBS 387.75
Aspergillus	*flavus*	*Flavi*	NRRL 3357
Aspergillus	*fumigatus*	*Fumigati*	Af293
Aspergillus	*funiculosus*	*Sparsi*	116.56NT
Aspergillus	*gorakhpurensis*	*Cremei*	CBS 648.74
Aspergillus	*gracilis*	*Restricti*	CBS 115.36
Aspergillus	*heteromorphus*	*Nigri*	CBS 117.55
Aspergillus	*heyangensis*	*Aenei*	CBS 101751
Aspergillus	*implicatus*	*Sparsi*	CBS 484.95
Aspergillus	*ivoriensis*	*Raperi*	CBS 551.77
Aspergillus	*janus*	*Terrei*	118.45T
Aspergillus	*kanagawaensis*	*Cervini*	538.65NT
Aspergillus	*leporis*	*Flavi*	151.66T
Aspergillus	*microcysticus*	*Terrei*	CBS 120.58
Aspergillus	*niger*	*Nigri*	513.88
Aspergillus	*niveus var. indicus*	*Terrei*	CBS 444.75
Aspergillus	*ochraceoroseus*	*Ochraceorosei*	101887
Aspergillus	*ochraceus*	*Circumdati*	108.08NT

Nemzetség	Faj	Szekció	Típustörzs
Aspergillus	*panamensis*	*Sparsi*	CBS 120.45
Aspergillus	*penicillioides*	*Restricti*	130294
Aspergillus	*proliferans*	*Aspergillus*	CBS 121.45
Aspergillus	*pulvinus*	*Cremei*	578.65NT
Aspergillus	*raperi*	*Raperi*	CBS 123.56
Aspergillus	*restrictus*	*Restricti*	117.33NT
Aspergillus	*robustus*	*Circumdati*	649.93T
Aspergillus	*roseoglobosus*	*Circumdati*	CBS 112800
Aspergillus	*saccharolyticus*	*Nigri*	CBS 127449
Aspergillus	*sclerotiorum*	*Circumdati*	CBS 549.65
Aspergillus	*silvaticus*	*Silvati*	CBS 128.55
Aspergillus	*sparsus*	*Sparsi*	139.61NT
Aspergillus	*steynii*	*Circumdati*	112812T
Aspergillus	*subsessilis*	*Terrei*	CBS 502.65
Aspergillus	*sydowii*	*Versicolores*	264.81
Aspergillus	*terreus*	*Terrei*	NIH 2624
Aspergillus	*togoensis*	*Flavi*	272.89
Aspergillus	*versicolor*	*Versicolores*	245.65
Aspergillus	*viridinutans*	*Fumigati*	CBS 127.56
Aspergillus	*wentii*	*Cremei*	104.07NT
Aspergillus	*westerdijkiae*	*Circumdati*	CBS 112803
Aspergillus	*zonatus*	*Flavi*	506.65NT
Aspergillus	*tamarii*	*Flavi*	SZMC 21469
Basipetospora	*halophila*	*Polypaecili*	380.74T
Chaetosartorya	*stromatoides*	*Cremei*	CBS 265.73
Cristaspora	*arxii*	*Cremei*	525.83T
Dichotomomyces	*cejpii*	*Clavati*	157.66NT
Emericella	*aurantiobrunnea*	*Nidulantes*	CBS 465.65
Emericella	*heterothallica*	*Usti*	CBS 489.65
Emericella	*nidulans*	*Nidulantes*	FGSC A4
Eurotium	*amstelodami*	*Aspergillus*	518.65NT
Eurotium	*herbariorum*	*Aspergillus*	516.65NT
Fennellia	*flavipes*	*Terrei*	260.73T
Fennellia	*neonivea*	*Terrei*	CBS 115.27
Fennellia	*nivea*	*Flavipedes*	CBS 261.73
Hamigera	*avellanea*	NB	295.48IsoT
Hemicarpenteles	*thaxteri*	NB	CBS 105.25
Neocarpenteles	*acanthosporum*	*Clavati*	558.71T
Neosartorya	*fennelliae*	*Fumigati*	CBS 598.74
Neosartorya	*fischeri*	*Fumigati*	NRRL 181T
Neosartorya	*pseudofischeri*	*Fumigati*	CBS 208.92
Neosartorya	*stramenia*	*Fumigati*	CBS 498.65
Penicillium	*inflatum*	*Cremei*	CBS 682.70

Nemzetség	Faj	Szekció	Típustörzs
Petromyces	*alliaceus*	*Flavi*	CBS 542.65
Phialosimplex	*caninus*	*Polypaecili*	128032T
Phialosimplex	*chlamydosporus*	*Polypaecili*	109945T
Phialosimplex	*sclerotialis*	*Polypaecili*	366.77T
Polypaecilium	*insolitum*	*Polypaecili*	384.61
Sclerocleista	*ornata*	NB	124.53NT
Sclerocleista	*thaxteri*	NB	105.25
Talaromyces	*marneffei*	NB	ATCC18284
Warcupiella	*spinulosa*	NB	512.65NT

2. táblázat: A filogenetikai rekonstrukció során felhasznált indítószekvenciák

Lókusz	Primer	Szekvencia (5'-3')	PCR termék mérete (bp)
Acl1	F230Asp	AAGCCMGAYCARTTGATYAAG	~770
	R943Asp	ARGCRCCRGTCTTRGCRTCC	
MCM7	F709FAsp	ACYCGIGTITCRGAYGTHAARCC	~650
	R1348Asp	GAYTTRGCVACACCRGGRTCACCCAT	
RPB1	F1843	ATTTYGAYGGTGAYGARATGAAC	~1000
	R3096	GRACRGTDCCRTCATAYTTRACC	
RPB2	5F_Eur	GAYGAYCGKGAYCAYTTCGG	~1220
	7CR_Eur	CCCATRGCYTGYTTRCCCAT	
Tsr1	F1626	GARTAYCCBCARTCNGAIATGT	~820
	R2434	ASAGYTGVARDGCCTTRAACCA	
Cct8	F660	GIGTKGTBAAGATCATGGGWGG	~850
	R1595	RTCMACRCCNGTIGTCCAGTA	

A PCR-termékek szekvenálását a CBS Gombakutató Központban (Utrecht, Hollandia) végeztük. A szekvenciákat mindkét irányból leolvastuk. A felhasznált indítószekvencia-párok megegyeztek a PCR során használtakkal. A reakció összemérésénél a DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit-et (Amersham Bioscience) használtuk. A szekvenáló reakció végtérfogata 10 µl volt, melynek összetétele a következőképpen alakult:

- 0,85 µl BigDye reagens
- 3 µl puffer
- 4,75 µl bidesztillált víz
- 0,4-0,4 µl 10 mM-os primer
- 1 µl templát DNS.

A reakció termékeit Sephadex G-50 oszlopokon (Amersham Bioscience) tisztítottuk a gyártó utasításainak megfelelően. A forward és reverz szekvenciákat a LeserGene programcsomag SeqMan programjának segítségével állítottuk össze kontiggá.

Filogenetikai rekonstrukció

A szekvenciák illesztését PRANK v.140603 módszerrel végeztük az alapértelmezett beállítások mellett (Löytynoja 2014). Az egyedi szekvenciákat a SequenceMatrix 1.8 program segítségével fűztük össze (Vaidya és mtsai. 2011). Az adathalmazból a PhyML programmal egy Maximum Likelihood (ML) törzsfát generáltunk (Silvestro és Michalak 2012). Az analízis során GTR+Γ nukleotid-szubsztitúciós modellt alkalmaztunk. Az elágazások megbízhatóságának ellenőrzésére bootstrap analízist alkalmaztunk 1000 ismétlésben. A Bayes-i analízis során a MrBayes 3.2.6 szoftvert alkalmaztuk (Ronquiest és mtsai. 2012) GTR+Γ nukleotid-szubsztitúciós modell mellett. Az alkalmazott generációszám 10^7, a „burnin” 25% volt. A két független futás alatt minden 1000. generációból történt a mintavétel. A robotok száma négy volt (1 hideg és 3 meleg lánc). Külcsoportnak egy *Talaromyces marneffei* törzset (ATCC 18224) választottunk.

Az *A. niger* és az *A. welwitscheae* testvérfajok közötti különbségek vizsgálata

UP-PCR analízis

Az analízis során a 3. táblázatban feltüntetett 8 primert használtuk fel. A mintázatokból összesen 88 fragmentumot vettünk figyelembe a bináris mátrix elkészítésénél. A filogenetikai analízist a PHYLIP programcsomag 3.67 (Felsenstein 2007) verziójának programjaival

végeztük. A filogenetikai fát „neighbor joining” módszerrel készítettük (Saitou és mtsai. 1987), a programcsomag Neighbor programjával.

3. táblázat: A UP-PCR analízis során használt indítószekvenciák (Bulat és mtsai. 1994, 2000, Lübeck és mtsai. 1998**).**

Primer neve	**Szekvencia (5’-3’)**
L45	GTAAAACGACGGCCAGT
As15inv	CATTGCTGGCGAATCGG
L15/As19	GAGGGTGGCGGCTAG
AA2M2	CTGCGACCCAGAGCGG
L21	GGATCCGAGGGTGGCGGTTCT
3-2	TAAGGGCGGTGCCAGT
AS4	TGTGGGCGCTCGACAC
AS15	GGCTAAGCGGTCGTTAC

UP-PCR program:

1.) elődenaturáció: 1 perc, 94 °C
2.) denaturáció: 30 másodperc, 94 °C
3.) hibridizáció: 45 másodperc, 55 °C
4.) polimerizáció: 1 perc, 72 °C
5.) utópolimerizáció: 2 perc, 72 °C
A 2-4. lépéseket 35 ciklusban hajtottuk végre.

Fülfertőzésekből származó fekete *Aspergillus* izolátumok vizsgálata

Vizsgált törzsek

A vizsgálathoz 14 Magyarországról és 7 Iránból származó törzset használtunk. A magyar törzseket a Szegedi Tudományegyetem Szent-Györgyi Albert Klinikai Központjából szereztük be, az iráni törzsek pedig a Jundishapur Orvostudományi Egyetemről érkeztek (Ahvaz, Irán).

Tiszta tenyészet létrehozása

Az izolátumokat MEA (Biolab, Magyarország) táptalajon tenyésztettük 5 napig 25°C-on, majd YPD (1% élesztőkivonat, 1% pepton, 1% D-glükóz, 2% agar) ferde agarra oltottuk át, további 5 napig inkubáltuk 25°C-on, majd 4°C-on tároltuk.

A micélium felszaporítása, DNS izolálás

A DNS-kivonáshoz a micélium felszaporítását mikrocentrifuga-csövekben végeztük. 1 ml YPD tápoldatba (1% élesztőkivonat, 1% pepton, 1% D-glükóz) egy kacsnyi mintát oltottunk a tiszta tenyészetekből, majd 3 napig 25 °C-on rázattuk (120-150 rpm). Amennyiben megfelelő növekedést tapasztaltunk, a mikrocentrifuga-csöveket 10000 rpm-es fordulatszámon (12350 g) centrifugáltuk 3 percig, majd eltávolítottuk a tápoldatot a leülepedett micélium tetejéről. A DNS-kivonáshoz az Epicentre Biotechnologies® MasterPure™ Yeast DNA Purification Kit-et használtuk a gyártó utasításainak megfelelően. A micéliumhoz steril homokot és lízis-puffert adtunk, és mikropisztillus segítségével mechanikai roncsolást alkalmaztunk. A DNS kivonatokat -20°C-on tároltuk.

Az izolátumok molekuláris azonosítása kalmodulin szekvenciák alapján

Cmd5 és Cmd6 indítószekvenciák (Hong és mtsai. 2006) a következők voltak:

Cmd5: CCGAGTACAAGGAGGCCTTC
Cmd6: CCGATAGAGGTCATAACGTGG

A kalmodulin PCR-reakcióelegy összetétele (20 µl-es végtérfogatban):

Egyszeres töménységű Dream Taq puffer (1,5 mM $MgCl_2$-ot tartalmaz) (Thermo Scientific)
0,02 mM dNTP-oldat (Thermo Scientific)
4-4 pmol Cmd5 és Cmd6 primer
0,2 µl (1 U) Dream-Taq DNS-polimeráz (Thermo Scientific)
1 µl (10-100 ng) templát DNS

A kalmodulin PCR program:

A kívánt génszakasz sokszorosítására a Bio-Rad cég MJ Mini Gradient Thermal Cycler készülékét használtuk. A reakció lépései a következők voltak:

1.) elődenaturáció: 2 perc, 95 °C

2.) denaturáció: 30 másodperc, 95 °C

3.) hibridizáció: 40 másodperc, 56 °C

4.) polimerizáció: 45 másodperc, 72 °C

5.) utópolimerizáció: 2 perc, 72 °C

A 2-4. lépéseket 35 ciklusban ismételtettük.

Gélelektroforézis

A PCR-termékeket 1%-os agaróz gélen futtattuk 5-10 V/cm feszültség mellett horizontális gélelektroforézis készülék segítségével. A DNS-termékek méretének meghatározásához Gene Ruler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific) molekulasúly-markert használtunk. A fragmentumok láthatóvá tételéhez GR Green DNS-festéket használtunk. Futtatás után a DNS-sávokat 254 nm-es UV-átvilágítással tettük láthatóvá. A gélfotók elkészítéséhez az UVP cég BioDoc-It™ géldokumentációs berendezését használtuk. A PCR-termékek szekvenálása a filogenetikai rekonstrukciónál leírtakhoz hasonlóan történt.

A fajok meghatározása, törzsfa készítése

A szekvenciákat a BioEdit programmal jelenítettük meg, majd ezeket egyenként a PubMed (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) internetes adatbázisával vetettük össze „nucleotide BLAST" segítségével (Altschul és mtsai. 1990). A szekvenciákat a MEGA szoftvercsomag 4. verziójának segítségével illesztettük (Tamura és mtsai. 2007). A hiányzó nukleotidokat a program ötödik karakterállapotként kezelte. A parszimónia szempontjából nem informatív karaktereket kizártuk. A program minden karaktert azonos súllyal vett figyelembe. A topológia megbízhatóságának ellenőrzésére bootstrap analízist alkalmaztunk 1000 ismétlésben (Hillis és Bull 1993). Külcsoportnak egy *A. flavus* törzset vontunk be a vizsgálatba.

Fülfertőzésekből származó fekete Aspergillus izolátumok antifungális szerekkel szembeni érzékenységének vizsgálata

Az kiválasztott antifungális szerek *in vitro* antifungális aktivitását leveshígításos mikrodilúciós módszerrel vizsgáltuk a Klinikai és Laboratóriumi Standardok Intézetének

(Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI) ajánlása alapján (NCCLS 2002). A minimális gátló koncentráció (minimum inhibitory concentration - MIC) értékeket 96 lyukat tartalmazó mikrotiter-lemezeken határoztuk meg úgy, hogy az optikai denzitást (OD) mértük 620 nm-en Jupiter HD mikrotiterlap-olvasó fotométer segítségével (ASYS Hitech GmbH, Eugendorf, Ausztria). A vizsgálathoz RPMI 1640 médiumot (Sigma-Aldrich) használtunk, mely tartalmazott L-glutamint, de nem tartalmazott Na-bikarbonátot. A tápleves pH-ját 7,0-re állítottuk be 0,165 M MOPS-oldat hozzáadásával.

Az izolátumokat YPD agarlemezen tenyésztettük 5 napig 25 °C-on, majd konídium-szuszpenziót készítettünk steril fiziológiás sóoldatban. A konídiumok számát Bürker-kamra segítségével határoztuk meg, és $5x10^4$ konídium/ml értékre állítottuk be. Ehhez a hígítást RPMI 1640 táplevesben végeztük. A vizsgálatba a következő antifungális szereket vontuk be: flukonazol, itrakonazol, ketokonazol, terbinafin, amfotericin B (Sigma-Aldrich). Az antifungális szereket DMSO-ban oldottuk fel. Az itrakonazol, terbinafin és amfotericin B esetében 0,031-16 µg/ml, a ketokonazolnál 0,062-32 µg/ml, míg flukonazolnál 0,125-64 µg/ml koncentráció-tartományt állítottunk be felező hígítással. A lemezeket 35 °C-on inkubáltuk 48 órán keresztül, majd meghatároztuk azt a koncentrációt, amely 100%-os növekedési gátlást eredményezett (MIC_{100}).

Élelmiszereken előforduló fekete *Aspergillus* izolátumok

A vizsgált növényi részeket Diklorán-bengálrózsa-kloramfenikol (DRBC, 0,5% pepton, 1% glükóz, 0,1% KH_2PO_4, 0,0002% Dichloran, 0,05% $MgSO_4$, 0,01% kloramfenikol, 0,0025% bengálrózsa, 2% agar) agarlemez felületére helyeztük, majd a lemezeket 3 napig 25 °C-on, sötétben inkubáltuk. A tenyészetekből YPD agarlemezeken tiszta tenyészeteket készítettünk. A törzseket YPD ferde agaron, 4 °C-on tároltuk. A fajszintű azonosításhoz és a törzsfa készítéséhez a fülfertőzésekből származó törzsek esetén alkalmazott módszereket használtuk.

Fumonizin-extrakció

A vizsgált élelmiszerek fumonizin-tartalmának vizsgálata során a növényi részek 1 g-jához 8 ml metanol:víz (1:3, v/v) elegyet mértünk. UltraTurrax T25 (IKA, Staufen, Németország) nagysebességű homogenizátort alkalmazva rázattuk a mintákat (20000 rpm, 4 perc) majd 10 percig 10000 rpm fordulaton centrifugáltuk. A felülúszó fumonizintartalmát közvetlenül mértük RP-HPLC/ESI-IT-MS^2 (Reversed-Phase High-Performance Liquid

Chromatography with Electrospray Ionization Ion Trap Tandem Mass Spectrometry) technikát alkalmazva.

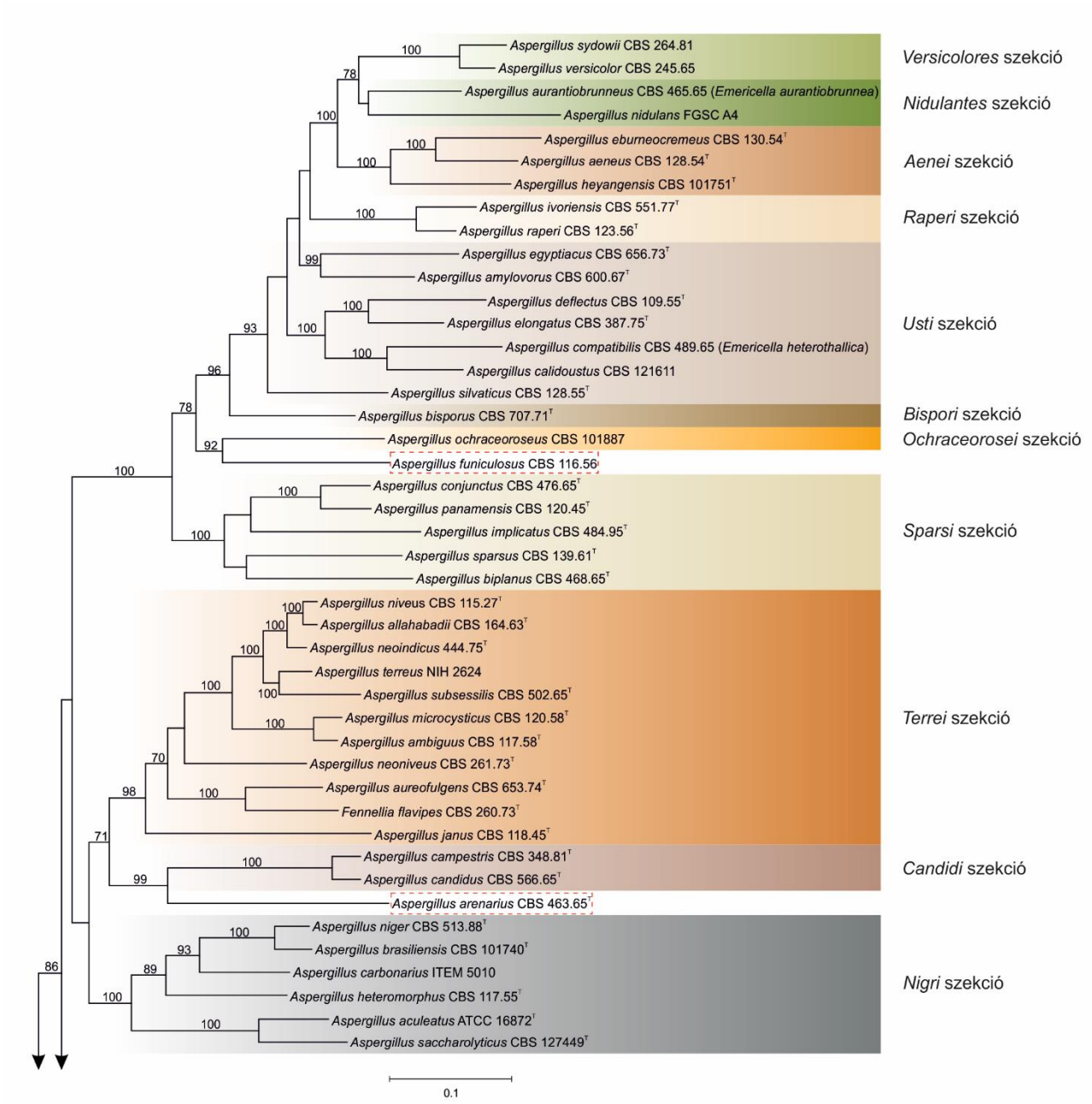
Az izolátumok fumonizintermelő képességének vizsgálata során a törzseket CYA20S táptalajon (20% szacharóz, 0,5% élesztőkivonat, 0,1% K_2HPO_4, 0,03% $NaNO_3$, 0,005% KCl, 0,005% $MgSO_4$, 0,0001% $FeSO_4$, 0,0001% $ZnSO^4$, 0,00005% $CuSO_4$, 2% agar) tenyésztettük 25 °C-on, 7 napig. Az agarlemezekből dugófúróval 5 db 6 mm átmérőjű korongot vágtunk ki csészénként. Az extrakciót 6 ml metanol:víz (3:1; v/v) elegyével végeztük. A fent említett nagysebességű homogenizátort alkalmazva rázattuk a mintákat (20000 rpm, 4 perc), majd 10 percig 10000 rpm fordulaton centrifugáltuk. A felülúszóból 2 ml-t beszárítottunk, majd újra feloldottuk 500 µl metanol:víz (3:1, v/v) elegyében. Ennek fumonizintartalmát közvetlenül vizsgáltuk RP-HPLC/ESI-IT-MS^2 technikával.

Az analízis reverz fázisú HPLC/ESI-IT_MS módszerrel történt (Bartók és mtsai. 2006, 2010), egy Agilent 1090 Series II HPLC (Waldbronn, Germany) készülékkel. A HPLC elválasztást YMC-Pack J'sphere ODS H80 (YMC Europe GmbH, Dinslaken, Németország) (250 mm x 2,1 mm, 4 µm) HPLC oszlopokon végeztük. Az oldószergrádiens alkotói egyrészt desztillált víz és 0,1% hangyasav, másrészt acetonitril és 0,1% hangyasav voltak. Egy-egy µl mintát fecskendeztünk az oszlopokra. Az elválasztott vegyületeket Varian (Palo Alto, CA, USA) 500 IT-MS készülékkel detektáltuk, melyhez egy ESI forrás volt csatlakoztatva. A különböző fumonizin izomerek mennyiségét kalibrációs egyenes alapján számoltuk ki.

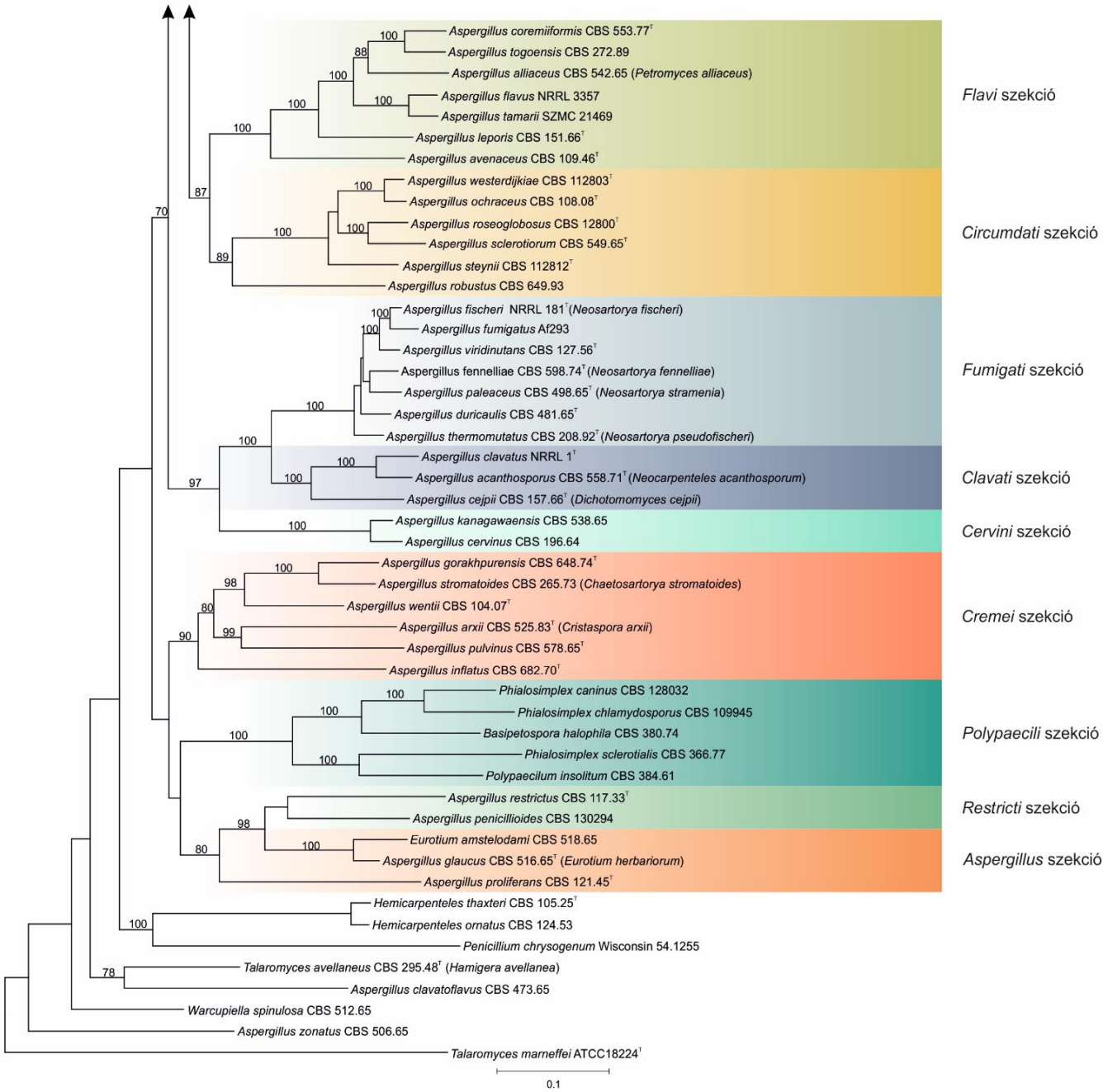
Eredmények és értékelésük

Az *Aspergillus* nemzetség filogenetikai analízise

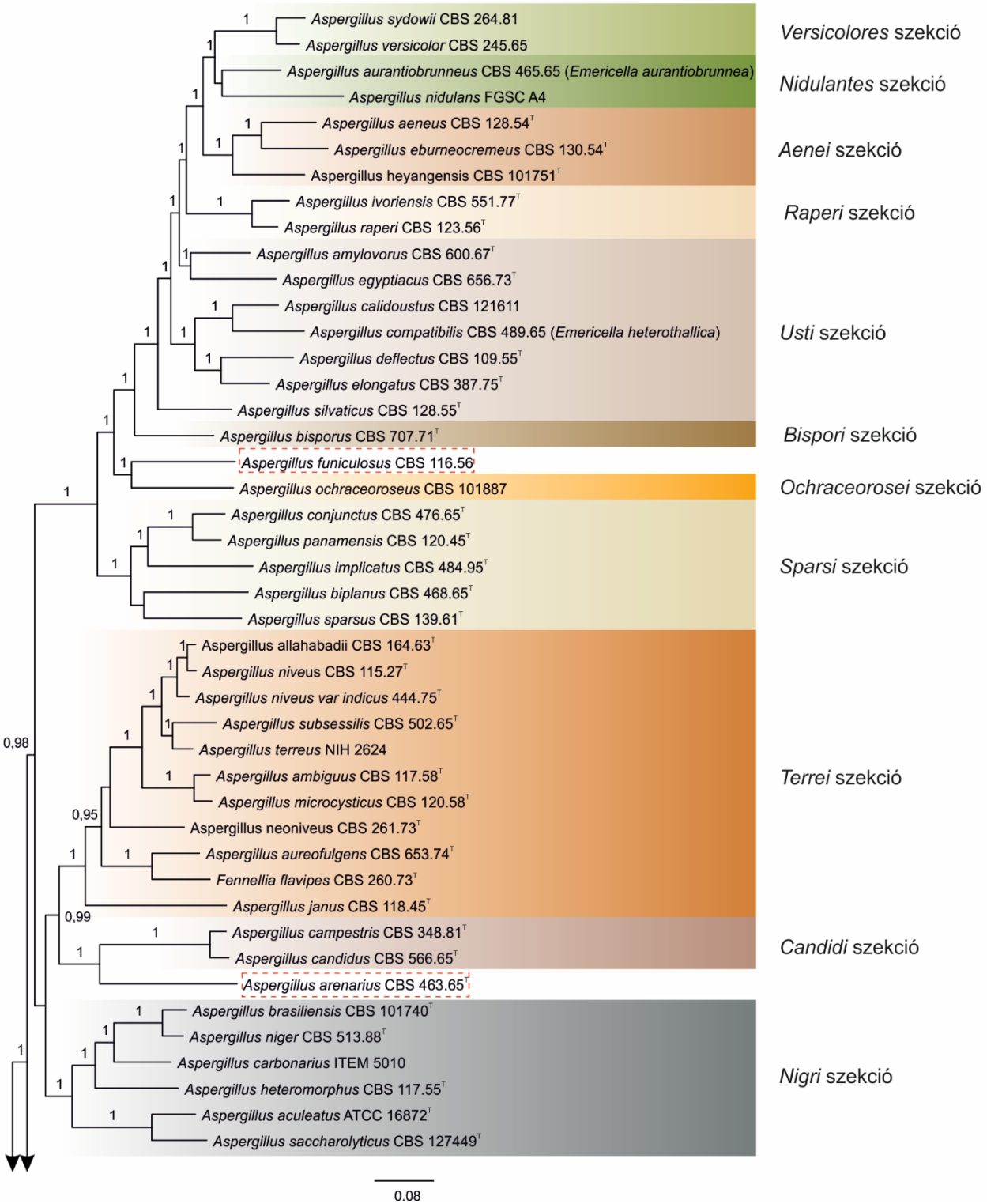
A teljes *Aspergillus* nemzetséget reprezentatívan mintázó filogenetikai vizsgálatot végeztünk 93 faj bevonásával. Az elemzés során 6 génszakaszt szaporítottunk fel, majd bázissorrendjüket meghatároztuk. Az *RPB1*, *RPB2*, *Tsr1*, illetve a *Cct8* (dajkafehérje) lókuszok már alkalmasnak bizonyultak az alnemzetség-szintű rokonsági kapcsolatok megállapítására a *Penicillium* nemzetségen belül (Houbraken és Samson 2011). Ezeken kívül bevontuk az *Acl1* és *MCM7* lókuszokat is az analízisbe. A szekvenciaadatok a GénBankba a következő azonosítókkal kerültek feltöltésre: KY006730-KY006827. A kapott szekvenciák adatait első megközelítésben önállóan, lókuszonként vizsgáltuk, majd – mivel az egyes lókuszok alapján számolt törzsfák között lényeges topológiai eltérés nem mutatkozott - egy kombinált adatsort hoztunk létre. A filogenetikai analízist ML és MrBayes módszerekkel végeztük el. A filogenetikai rekonstrukció eredményeit a 6. és 7. ábrák szemléltetik.



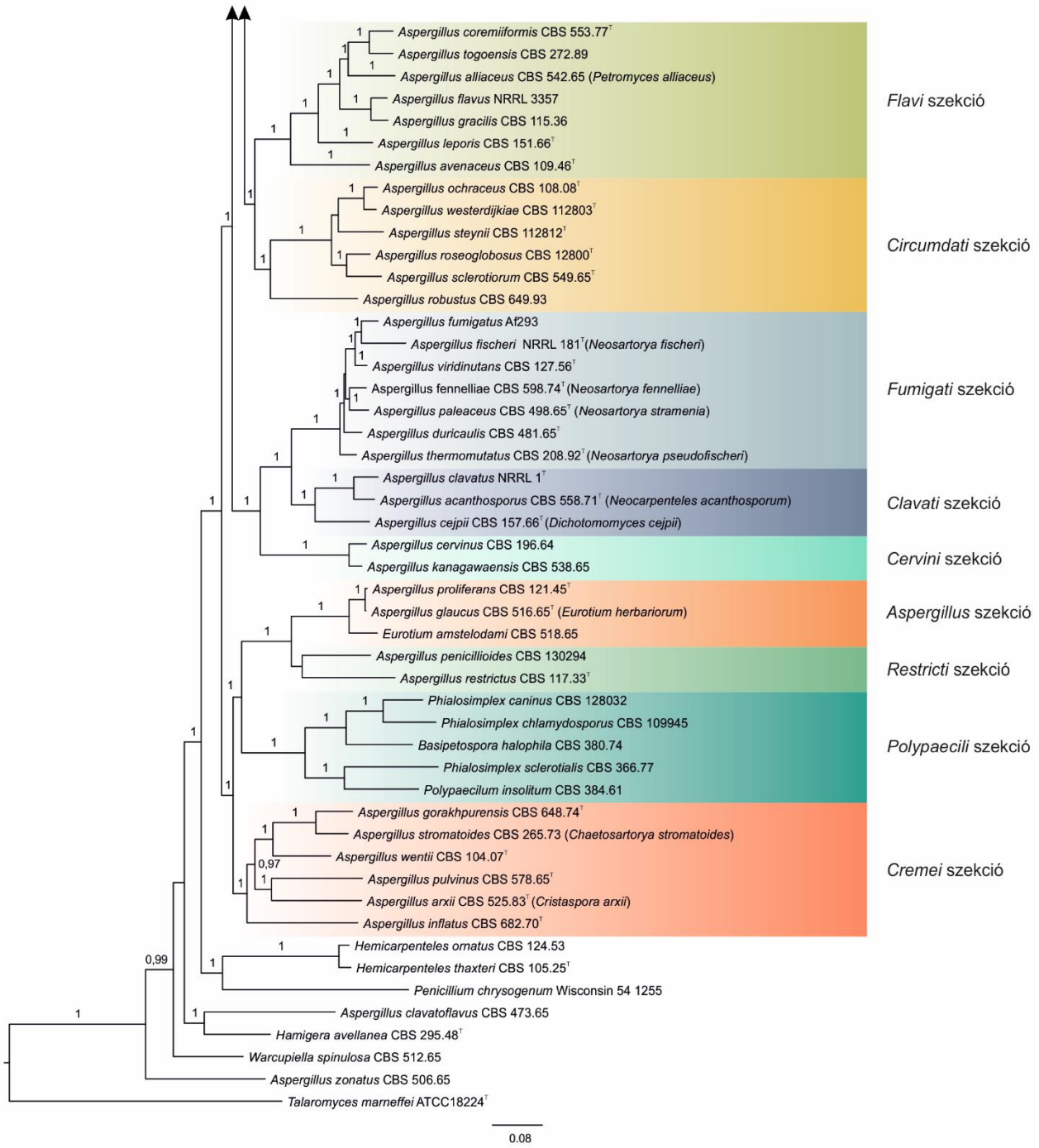
6. ábra. Az *Aspergillus* nemzetséget reprezentáló 6 génen (*RPB1*, *RPB2*, *Tsr1*, *Cct8*, *Acl1*, *MCM7*) alapuló Makimum Likelihood (ML) módszerrel készített filogenetikai fa. Az ágakon a bootstrap értékek láthatók. Csak a 70% feletti értékeket tüntettük fel.



6. ábra (folytatás). Az *Aspergillus* nemzetséget reprezentáló 6 génen (*RPB1*, *RPB2*, *Tsr1*, *Cct8*, *Acl1*, *MCM7*) alapuló Makimum Likelihood (ML) módszerrel készített filogenetikai fa. Az ágakon a bootstrap értékek láthatók. Csak a 70% feletti értékeket tüntettük fel.



7. ábra. Az *Aspergillus* nemzetséget reprezentáló 6 génen (*RPB1*, *RPB2*, *Tsr1*, *Cct8*, *Acl1*, *MCM7*) alapuló MrBayes módszerrel készített filogenetikai fa. Az ágakon a poszterior valószínűségek értékei láthatók. Csak a 0,95 feletti értékeket tüntettük fel.



7. ábra (folytatás). Az *Aspergillus* nemzetséget reprezentáló 6 génen (*RPB1, RPB2, Tsr1, Cct8, Acl1, MCM7*) alapuló MrBayes módszerrel készített filogenetikai fa. Az ágakon a poszterior valószínűségek értékei láthatók. Csak a 0,95 feletti értékeket tüntettük fel.

Eredményeink alapján az *Aspergillus* nemzetség 6 alnemzetségre és 23 szekcióra bontható (4. táblázat). Az *Aspergillus* (bootstrap érték: 80 / poszterior valószínűség: 1), *Polypaecili* (100/1), *Cremei* (90/1), *Fumigati* (97/1) és *Nidulantes* (100/1) alnemzetségek magas támogatottsági értékekkel rendelkeznek, a *Circumdati* (47/1) alnemzetség támogatottsága kisebb a ML analízis alapján. A filogenetikai analízis egyértelműen azt mutatja, hogy az *A. clavatoflavus* és az *A. zonatus* fajok kívül esnek az *Aspergillus* nemzetségen. A nemzetségen belül a ML analízis alapján az *Usti* szekció kivételével minden szekció monofiletikusnak bizonyult közepes, vagy magas támogatottsági értékek mellett. Mind a ML- mind a MrBayes analízis alapján az *Usti* szekció két csoportra különült, ahol az *A. amylovorus* és az *A. egyptiacus* fajok egy jól elhatárolódó kládot alkotnak magas támogatottsági értékek mellett (92/1). Houbraken és Samson (2011) munkájuk során elsősorban a *Penicillium* nemzetség átfogó filogenetikai vizsgálatára helyezték a hangsúlyt, de kitértek az egész *Trichocomaceae* család rokonsági viszonyaira is, így vizsgálatukba számos *Aspergillus* törzset is bevontak. Eredményeik alapján utaltak arra, hogy a vizsgált *Polypaecilum* és *Phialosimplex* nemzetségbe tartozó gombák az *Aspergillus* nemzetség *Cremei* és *Aspergillus* szekciójába tartozó fajokkal mutatnak rokonságot. Ezt az általunk végzett vizsgálat is megerősítette. Ennek következtében ezeket a fajokat ezentúl az *Aspergillus* nemzetség tagjainak tekintjük, ami a nevezéktanban is ennek megfelelő változást von maga után. Így a korábban *Phialosimplex caninus*, *Phialosimplex clamydosporus*, *Phialosimplex sclerotiales*, *Polypaecilum insolitum*, *Polypaecilum pisci* neveket viselő fajok az *Aspergillus* nemzetségnevet kapták (Kocsubé és mtsai. 2016).

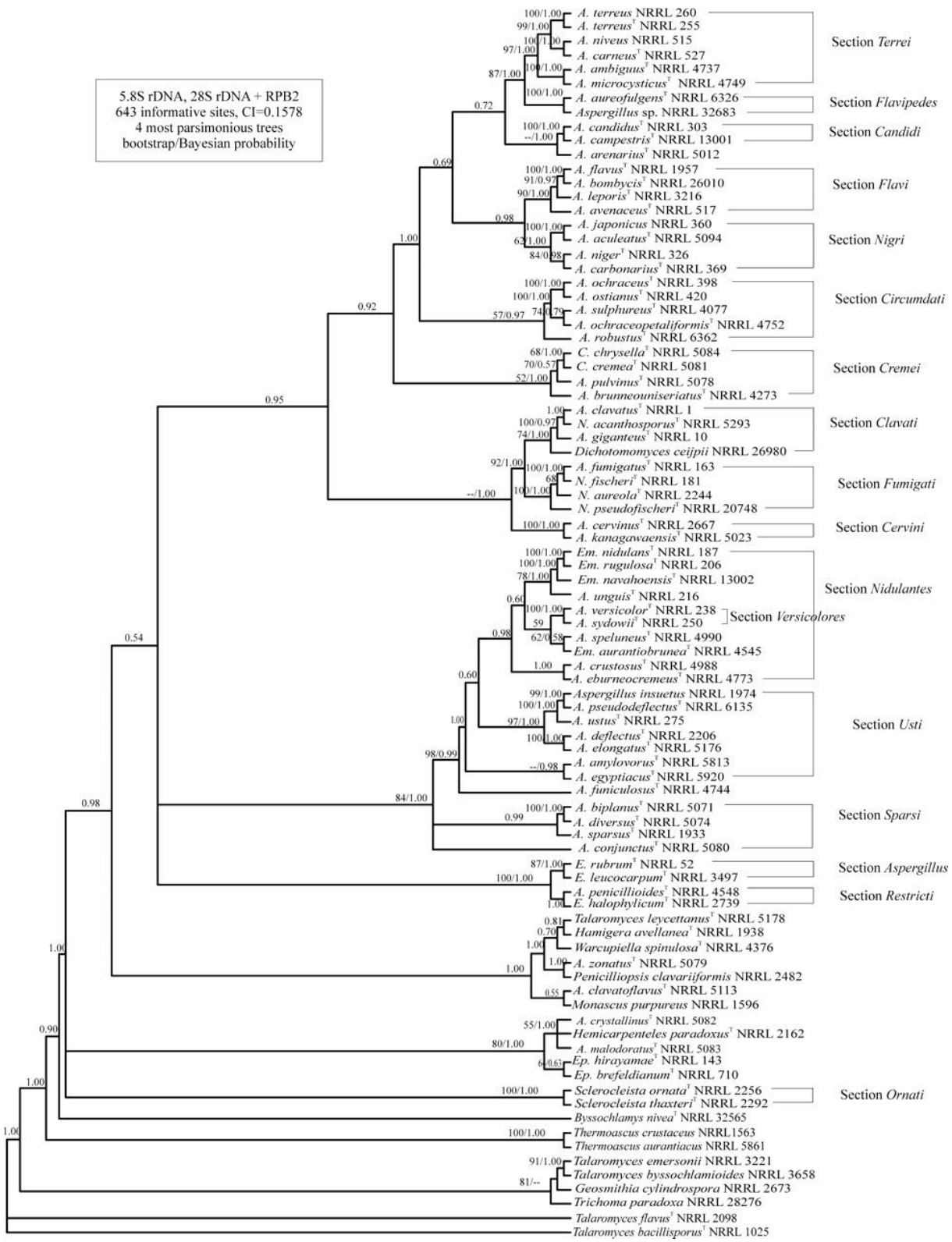
4. táblázat: Az alnemzetségek és szekciók alakulása az *Aspergillus* nemzetségen belül (A *Petersoni* szekciót nem vontuk be a dolgozatban részletezett munkába, de a Kocsubé és munkatársai (2016) által publikált vizsgálat megerősíti a helyzetüket.)

Szekció	**Alnemzetség**
Usti	*Nidulantes*
Cavernicola	
Ochraceorosei	
Bispori	
Sparsi	
Nidulantes	
Aenei	
Raperi	
Terrei	*Circumdati*
Candidi	
Nigri	
Flavi	
Circumdati	
Flavipedes	
Jani	
Petersoni	
Fumigati	*Fumigati*
Clavati	
Cervini	
Cremei	*Cremei*
Aspergillus	*Aspergillus*
Restricti	
Polypaecili	*Polypaecili*

Eredményeink alapján a korábban *Penicillium inflatum*-ként ismert faj az *Aspergillus* nemzetség *Cremei* szekciójában lévő fajokkal mutatott rokonságot. Peterson (1995, 2000) tanulmányozta korábban ezt a szekciót, és molekuláris tulajdonságok alapján ide sorolta az addig más szekciókba tartozó *A. wentii* (*Wentii* szekcióból), *A. dimorphicus* (*Circumdati* szekcióból), *A. gorakhpurensis* és *A. pulvinus* (*Versicolores* szekcióból) fajokat. A *P. inflatum* fajt Stolk és Malla (1971) írták le. Megfigyelték, hogy a konídiofórok megduzzadt csúcsi része

és az erősen elágazó metula inkább az *Aspergillus* nemzetség tagjaira jellemző, de a talpsejtek hiánya, a konídiofórok vékony fala, és a metula nem egyidejűleg történő fejlődése miatt úgy döntöttek, hogy a fajt a *Penicillium* nemzetséghez sorolják. A *P. inflatum* termel sterigmatocisztint (Rank és mtsai. 2011), mely vegyületet kizárólag *Aspergillus* fajok termelnek (Samson és mtsai. 2014), ami szintén megerősíti, hogy ez a faj inkább az *Aspergillus* nemzetségbe sorolható, ezért az *Aspergillus inflatus* nevet kapta (Kocsubé és mtsai. 2016).

Egy Peterson (2008) munkája nyomán készült törzsfa 3 gén (*RPB2,* 5,8S és részleges 28S rDNS) szekvenciáit alapul véve ábrázolja az *Aspergillus* nemzetség legfontosabb szekcióit, melyek három nagy csoportra különülnek (8. ábra). Ezen a törzsfán a *Terrei, Flavipedes* és *Candidi* szekciók egy nagy kládot alkotnak. A *Nigri* szekció a *Flavi* szekció testvérkládjaként jelenik meg, magas támogatottsági érték mellett. A *Circumdati* és *Cremei* szekciók önálló kládként jelennek meg. A *Fumigati, Clavati* és *Cervini* szekciók egy ágon helyezkednek el, egymástól azonban jól elkülönülnek. A törzsfán elhelyezkedő fajok következő nagy csoportját a *Nidulantes, Usti* és *Sparsi* szekciók alkotják. A *Versicolores* szekció a *Nidulantes* szekción belül helyezkedik el. Az *Aspergillus* és *Restricti* szekciók testvérkládokat alkotnak.



8. ábra. *RPB2*, 5.8S és 28S rDNS szekvenciákon alapuló MrBayes módszerrel készített konszenzus fa (Peterson 2008).

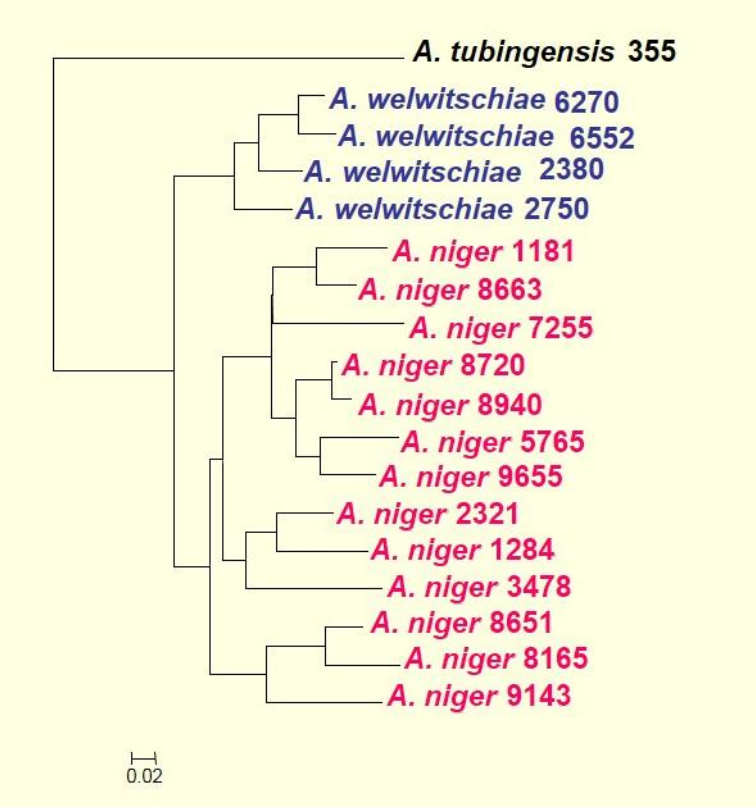
Az általunk kapott eredmények szerint a *Versicolores, Nidulantes, Aenei, Raperi, Usti, Bispori, Ochraceorosei* és *Sparsi* szekciók alkotnak egy nagy csoportot (*Nidulantes* alnemzetség). Ezen belül a *Nidulantes* és *Versicolores* szekciók ugyan elkülönülnek egymástól, de nem szekciószinten. Chen és munkatársai (2016) a *Nidulantes* szekcióra fókuszálva végeztek filogenetikai elemzést, az általuk kapott törzsfán a *Versicolores* szekció tagjai beágyazódnak a *Nidulantes* szekcióba. Ennek okán nem indokolt a *Versicolores* szekció megtartása, a korábban ide sorolt fajok ezentúl a *Nidulantes* szekcióban foglalnak helyet. Peterson és munkatársai (2008) a *Circumdati* alnemzetségbe sorolják a *Cervini, Circumdati, Nigri, Flavi* és *Cremei* szekciókat. A *Terrei* és *Flavipedes* szekciókat alnemzetség szintre emelik (*Subgenus Terrei*). A *Candidi* szekció is külön alnemzetséget alkot. Eredményeink alapján a *Nigri* szekció nem a *Flavi*, hanem a *Terrei* és *Candidi* szekciókkal alkot testvércsoportot. A *Flavi* szekció testvérkládja a *Circumdati* szekció, a *Cremei* szekció pedig a távoli *Polypaecili, Restricti* és *Aspergillus* szekciókkal mutat rokonságot. A *Fumigati, Clavati* és *Cervini* szekciók ebben az esetben is egy közös csoportot alkotnak. De Vries és munkatársai (2017) számos *Aspergillus* faj teljes genomját hasonlították össze, és szintén arra következtettek, hogy a *Circumdati* alnemzetség polifiletikus, a *Nigri* és *Flavi* szekciók pedig nem testvérkládjai egymásnak. A korábban a *Sparsi* szekcióba sorolt *A. funiculosus* (Peterson 2008) eredményeink alapján az *A. ochraceorosei*-vel mutat rokonságot, így inkább tekinthető az *Ochraceorosei* szekció tagjának. A 8. ábrán szaggatott téglalappal jelölt *A. arenarius* szokatlan helyzete valószínűleg az adott törzs nem megfelelő azonosításának eredménye.

Taylor és munkatársai (2016) azt tapasztalták, hogy az *Aspergillus* nemzetség nem monofiletikus, ugyanis a *Phialosimplex, Polypaecilum* és *Cristaspora* nemzetségek beékelődnek az egyes *Aspergillus* szekciók közé. Ezért azt a javaslatot tették, hogy az *Aspergillus* nemzetség esetében a nevezéktant gyökeresen meg kell változtatni, és csak egy szűk csoport tarthatná meg az *Aspergillus* nevet (subgenus *Circumdati*), a többi csoportot pedig a jellemző teleomorf nemzetségnevek jelölnék. Egy kutatócsoportunk közreműködésével létrejött tanulmány azonban bizonyítja az *Aspergillus* nemzetség monofiletikus voltát (Kocsubé és mtsai. 2016). Két független filogenetikai analízis került összehasonlításra 96 és 204 törzset felhasználva, hat és kilenc gén bevonásával (ebben szerepeltek a jelen dolgozatban részletezett munka során generált szekvenciaadatok is). A vizsgált fajok lefedték az *Aspergillus* nemzetség összes szekcióját, a *Penicillium* nemzetséget, valamint egyéb nemzetségek képviselőit is bevonták a vizsgálatba az *Aspergillaceae, Thermoascaceae* és *Trichocomaceae* családokból. Mindkét vizsgálat egyértelműen bizonyította az *Aspergillus* nemzetség monofiletikus voltát,

mind MrBayes, mind ML módszer mellett. A *Penicillium* nemzetség mindkét filogenetikai fán az *Aspergillus* nemzetség monofiletikus testvérkládjaként jelent meg, magas támogatottsági értékek mellett. Ebből arra következtethetünk, hogy nincs filogenetikai megalapozottsága annak a javaslatnak, hogy az *Aspergillus* nemzetséget nevezéktanilag felosszuk, és különböző nemzetségneveket kapjanak az ide tartozó csoportok. Emellett a nemzetség egységességét kemotaxonómiai adatok is alátámasztják (Kocsubé és mtsai. 2016). Az *Aspergillus*-okkal foglalkozó kutatók körében egyértelműen többségben vannak azok, akik az *Aspergillus* név megtartása mellett foglalnak állást (Samson és mtsai. 2017). A Taylor és munkatársai (2016) által javasolt új nevezéktan körülbelül 180 új fajnév létrejöttét eredményezné, szemben az általunk is javasolt megoldással, mely 26 fajnév megváltoztatásával megvalósítható lenne (Samson és mtsai. 2017). Fentiek alapján a Nevezéktani Bizottság (Nomenclature Committee for Fungi, NCF) felé közlésre került azon kérés, hogy a Taylor és munkatársai (2016), valamint a Pitt és Taylor (2016) által közölt publikációkban tett javaslatot elvesse. Információink alapján a Nevezéktani Bizottság az általunk is képviselt javaslatot fogadta el, mely szerint a nemzetség tagjai megőrizhetik az *Aspergillus* nevet, az idetartozó egyéb fajok pedig, melyek eddig nem rendelkeztek *Aspergillus* nemzetségnévvel, megkapják azt.

Az *A. niger* és *A. welwitschiae* fajok közötti különbség kimutatása UP-PCR analízissel

Munkánk során a két nagyon közeli csoport, az *A. niger* és az *A. welwitschiae* törzsek izolátumainak genetikai variabilitását UP-PCR módszerrel vizsgáltuk. Ez a technika nagyban hasonlít a RAPD-technikához, de az indítószekvenciák hosszabbak, továbbá az indítószekvencia templát DNS-hez való kötődéséhez magasabb hőmérsékletet alkalmazunk, így a RAPD-analízisnél megbízhatóbb, reprodukálható mintázatokat kapunk. A 88 fragmentum figyelembe vételével készített binomiális mátrix alapján létrehozott Neighbour-joining fán az izolátumok két egyértelműen elkülönülő csoportot alkotnak (9. ábra), így elmondhatjuk, hogy az *A. niger* és az *A. welwitschiae* izolátumok UP-PCR módszerrel elkülöníthetőek egymástól.



9. ábra. Az *A. niger* és *A. welwitschiae* klaszter analízise a UP-PCR profilok alapján

Perrone és munkatársai (2011) azt tapasztalták, hogy az AFLP-módszer is alkalmas az *A. niger* és az *A. welwitschiae* csoportok elkülönítésére, tehát megalapozottnak tűnik az az állítás, hogy a két csoport között az egyes génszekvenciákban megmutatkozó variabilitás a teljes genomra kiterjed.

A DNS-alapú molekuláris módszereket napjainkban széles körben használják a fajok azonosítására számos gombacsoporton belül. A polifázikus fajkoncepciónak megfelelően azonban arra kell törekednünk, hogy egyéb (morfológiai, fiziológiai stb.) karaktereket is

keressünk a fajhatárok megállapításánál (Samson és Varga 2009). A termelt metabolitok tekintetében nem sikerült különbséget kimutatni, mindkét csoport termelhet OTA és FB2 mikotoxinokat, ezen kívül piranonigrin A-t, tenzidol B-t, funalenont, malforminokat és nafto-γ-pironokat (Perrone és mtsai. 2011).

Egy korábbi vizsgálatunk alapján bizonyítást nyert, hogy mindkét csoporthoz tartozó izolátumok okozhatnak opportunista mikózisokat a légzőszervrendszerben (ez az anyag nem képezi a disszertáció részét; az eredmény nem került leközlésre). A betegség kialakítása során virulenciafaktor lehet, hogy az adott törzs milyen mértékű elasztáz enzimaktivitással rendelkezik. Ezt követően tüdőmikózisból származó klinikai *A. niger* és *A. welwitschiae* izolátumok elasztáz aktivitását vizsgáltuk, és azt tapasztaltuk, hogy az *A. niger* izolátumok elasztáz aktivitása szignifikánsan alacsonyabb volt, mint az *A. welwitschiae* izolátumoké (χ^2=8.017; p=0,0046), azonban az *A. niger* izolátumok között volt egy kiugróan magas aktivitású törzs (Varga és mtsai. 2010).

Fekete *Aspergillus*-ok, mint opportunista humán patogének

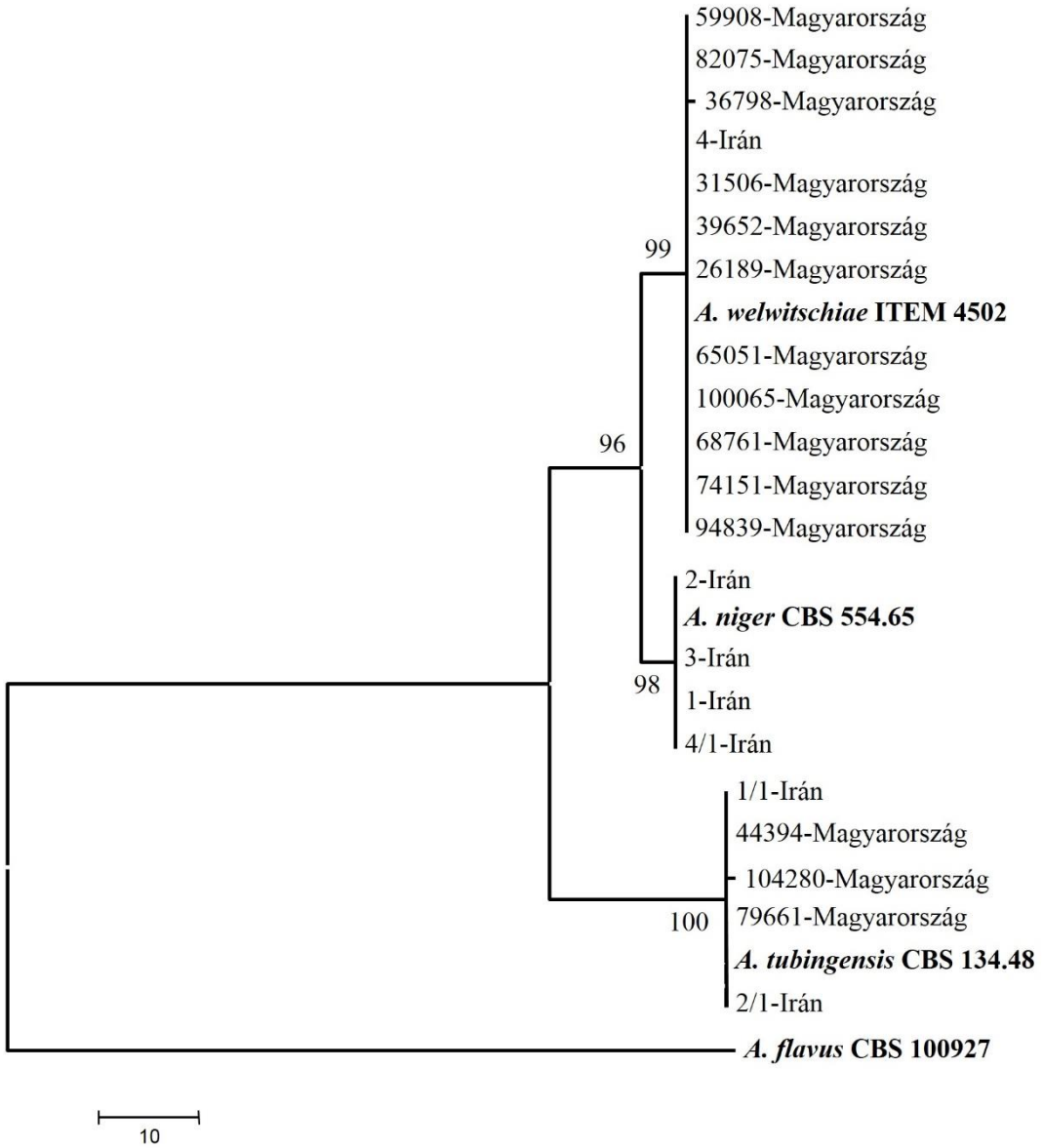
Fülfertőzésekből származó fekete* Aspergillus *izolátumok fajszintű azonosítása

Munkánk során 7 iráni és 14 magyarországi fülfertőzésből származó izolátumot vizsgáltunk, melyeket kivétel nélkül *A. niger*-ként azonosítottak a hagyományos, morfológián alapuló módszerrel (5. táblázat). A kalmodulin gén egy szakaszának bázissorrendje alapján elvégeztük az izolátumok fajszintű besorolását. A Maximum Parszimónia módszerrel készített filogenetikai analízis eredményét a 10. ábra szemlélteti, melyen mind a magyarországi, mind az iráni izolátumok láthatóak. Az iráni izolátumok közül 4 az *A. niger,* 2 az *A. tubingensis,* 1 pedig az *A. welwitschiae* faj képviselőjének bizonyult. A Magyarországon izolált minták közül 11 az *A. welwitschiae,* míg 3 az *A. tubingensis* fajhoz tartozott, *A. niger*-t egy esetben sem azonosítottunk.

Az *A. niger*-t tartják a gombás fülfertőzések egyik leggyakoribb okozójának a világ minden táján (Vennewald és Klemm 2010; Zarei és mtsai. 2010; Bonifaz és mtsai. 2010). Azonban az *Aspergillus* nemzetség *Nigri* szekciójába tartozó fajok nagy része nem különböztethető meg egymástól pusztán morfológiai, vagy fiziológiai karakterek alapján (Samson és mtsai. 2007). Munkánk során először azonosítottunk fülfertőzésből származó fekete *Aspergillus* izolátumokat molekuláris módszerrel, mely a kalmodulin gén egy szakaszának szekvencia-analízisén alapult, hiszen ez a génszakasz már korábban alkalmasnak bizonyult a fekete *Aspergillus* fajok elkülönítésére (Samson és mtsai. 2007). Eredményeink alapján az *A. niger* mellett az *A. welwitschiae* és az *A. tubingensis* fajok is okozhatnak fülfertőzéseket.

5. táblázat: Fülfertőzésekből származó fekete *Aspergillus* izolátumok

Izolátum	Nem	Kor	Származás	Faj
26189	Nő	54	Magyarország	*A. welwitschiae*
29652	Nő	61	Magyarország	*A. welwitschiae*
31506	Férfi	36	Magyarország	*A. welwitschiae*
36798	Nő	83	Magyarország	*A. welwitschiae*
44394	Nő	46	Magyarország	*A. tubingensis*
59908	Nő	53	Magyarország	*A. welwitschiae*
65051	Férfi	16	Magyarország	*A. welwitschiae*
68761	Nő	64	Magyarország	*A. welwitschiae*
74151	Férfi	41	Magyarország	*A. welwitschiae*
79661	Nő	75	Magyarország	*A. tubingensis*
82075	Férfi	36	Magyarország	*A. welwitschiae*
94839	Nő	65	Magyarország	*A. welwitschiae*
100065	Nő	36	Magyarország	*A. welwitschiae*
104280	Nő	61	Magyarország	*A. tubingensis*
1	Nő	26	Irán	*A. niger*
1/1	Nő	32	Irán	*A. tubingensis*
2	Férfi	38	Irán	*A. niger*
2/1	Nő	29	Irán	*A. tubingensis*
3	Férfi	42	Irán	*A. niger*
4	Férfi	40	Irán	*A. welwitschiae*
4/1	Férfi	36	Irán	*A. niger*



10. ábra. Kalmodulin gén egy szakaszán alapuló filogenetikai fa az iráni és magyarországi fülfertőzésekből származó izolátumokkal

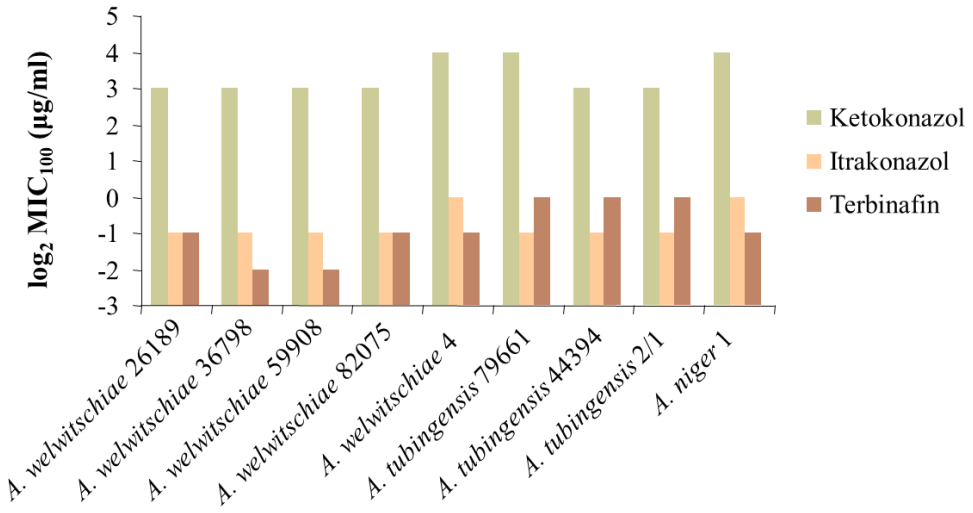
Fülfertőzésekből származó fekete Aspergillus izolátumok antifungális szerekkel szembeni érzékenysége

Az iráni izolátumok közül három törzs érzékenységét vizsgáltuk öt, a klinikumban széles körben használt gombaellenes szerrel (flukonazol, itrakonazol, ketokonazol, terbinafin, amfotericin B) szemben, leveshigításos mikrodilúciós módszert alkalmazva. Az érzékenységet a teljes gátlást okozó minimális gátló koncentráció (MIC_{100}) értékek alapján határoztuk meg (6. táblázat). Mindhárom izolátum rezisztensnek bizonyult flukonazollal szemben (MIC_{100}>64 µg/ml), így ennek a szernek a hatását a Magyarországról származó izolátumokra már nem

vizsgáltuk. A hazai izolátumok közül 4 *A. welwitschiae* és 2 *A. tubingensis* izolátum érzékenységét vizsgáltuk. A MIC_{100}-értékek alapján nem mutatkozott jelentős különbség az eltérő fajok érzékenységében, de elmondhatjuk, hogy a terbinafin (MIC_{100}: 0.25-1 µg/ml) és itrakonazol (MIC_{100}: 0.5-1 µg/ml) hatásosabbnak bizonyultak, mint a ketokonazol (MIC_{100}: 8-16 µg/ml; 11. ábra). Az amfotericin B-vel szemben a magyarországi izolátumok érzékenyebbek voltak, mint az iráni izolátumok, ennek okát nem ismerjük.

6. táblázat: Fülfertőzésekből származó izolátumok antifungális szerekkel szembeni érzékenysége

Törzs	**MIC_{100}-értékek (µg/ml)**			
	Itrakonazol	**Ketokonazol**	**Terbinafin**	**Amfotericin B**
A. welwitschiae 26189	0,5	8	0,5	0,5
A. welwitschiae 36798	0,5	8	0,25	1
A. welwitschiae 59908	0,5	8	0,25	0,5
A. welwitschiae 82075	0,5	8	0,5	1
A. tubingensis 44394	0,5	8	1	0,5
A tubingensis 79661	0,5	16	1	0,5
A. welwitschiae Irán (4)	2	16	1	8-16
A. niger Irán (1)	2	32	1	4
A. tubingensis Irán (2/1)	1	8	2	8



11. ábra. Fülfertőzésekből származó izolátumok érzékenysége antifungális szerekkel szemben

Yenisehirli és munkatársai (2009) otomikózisból származó izolátumok érzékenységét vizsgálták különböző azolokkal szemben, és hasonlóan az általunk kapott eredményekhez, azt tapasztalták, hogy az összes vizsgált *Aspergillus* izolátum rezisztens volt flukonazolra. Ugyanezt figyelték meg Kredics és munkatársai (2009) szemfertőzésekből származó *A. tubingensis* törzsek esetén is. Az általunk vizsgált izolátumok érzékenysége magas volt terbinafinnel szemben. Korábbi munkák is megerősítik, hogy a fekete *Aspergillus* izolátumok érzékenyek terbinafinra (Alcazar-Fuoli és mtsai. 2009; Karaarslan és mtsai. 2004; Moore és mtsai. 2001). Az itrakonazol esetében 0,5-2 µg/ml-es MIC_{100} értékeket tapasztaltunk. A szakirodalomban eltérő információkat találunk az *A. niger* itrakonazollal szembeni érzékenységére vonatkozóan. Yenisehirli és munkatársai (2009) $MIC_{100} \leq 1$ µg/ml értékeket tapasztaltak ennek az antifungális szernek az esetében. Karaarslan és munkatársai (2004) 0,125-1 µg/ml-es MIC_{100}-értékeket állapítottak meg itrakonazol vonatkozásában. Kaya és Kiraz (2007) eredményei alapján otomikózisból származó *A. niger* törzsek rezisztensnek bizonyultak itrakonazollal szemben. Pagiotti és munkatársai (2011) is alacsony antifungális aktivitást tulajdonítottak az itrakonazolnak *A. niger*-rel szemben ($MIC_{100} > 16$ µg/ml). A vizsgált izolátumok ketokonazollal szemben alacsony érzékenységet mutattak (MIC_{100} = 8-32 µg/ml). Ezzel szemben Kredics és munkatársai (2009) szemfertőzésekből származó *A. tubingensis* izolátumok vizsgálata során alacsonyabb MIC-értékeket tapasztaltak (0,5-1 µg/ml). Aktas és Yigit (2009) 0,25-4 µg/ml-es értékeket írtak le *A. niger*-ként azonosított izolátumoknál.

A magyarországi izolátumok esetében alacsony MIC_{100}-értékeket tapasztaltunk amfotericin B vonatkozásában. Ez összhangban van több korábbi munkában megfigyelt eredménnyel is (Kaya és Kiraz 2007; Moore és mtsai. 2001). Alcazar-Fuoli és munkatársai (2009) 0,12-0,28 µg/ml MIC_{100}-értékeket írtak le *A. niger* és *A. tubingensis* törzsekre, Pagiotti és munkatársai (2011) azonban $MIC_{100} \geq 8$ µg/ml értékeket figyeltek meg, mely eredmény az általunk mért, iráni izolátumoknál tapasztalt értékekkel áll összhangban. Eredményeink és az irodalmi adatok összevetése alapján elmondható, hogy a fekete *Aspergillus* izolátumok amfotericin B-vel szembeni érzékenysége igen széles skálán mozog, mely nincs összefüggésben azzal, hogy az adott izolátum melyik fajhoz tartozik.

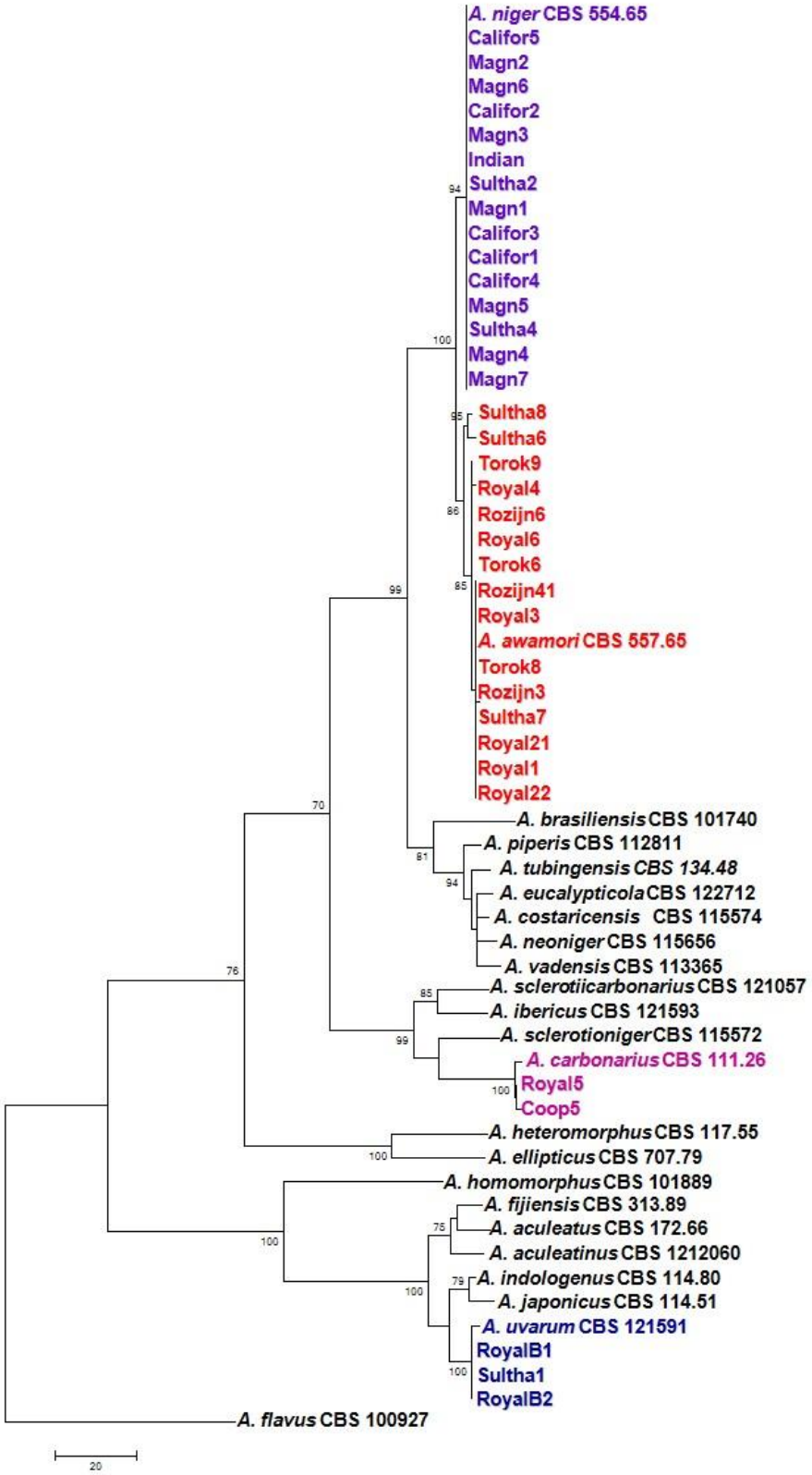
Fekete *Aspergillus*-ok, mint potenciális fumonizintermelők előfordulása élelmiszerekben

Fekete Aspergillus-ok előfordulása és eloszlása mazsolamintákon

Munkánk során 13 mazsolaminta mikobiótáját vizsgáltuk. Mintáink Törökországból, Dél-Afrikából, Görögországból, Iránból, az Amerikai Egyesült Államokból, Kínából és Indiából származtak. A 13 mintából 11 erősen szennyezett volt fekete *Aspergillus*-okkal, és ezekben az esetekben a szennyezettség jellemző volt a mazsolaszemek felszínén. A mintákról összesen 72 fekete *Aspergillus* törzset izoláltunk. PCR-RFLP analízis során először PCR-technika segítségével felszaporítottuk az izolátumok ITS-régióját, majd a kapott terméket *Rsa*I restrikciós endonukleázzal emésztettük. A 72 izolátum közül 35 tartozott a N típushoz, mely csoportba az *A. niger* fajkomplex tagjai tartoznak, a többi izolátum a T típushoz tartozott, mely az *A. tubingensis*-t és közeli rokon fajait foglalja magában. Jelenlegi ismereteink alapján a T típushoz tartozó törzsek nem képesek mikotoxinok termelésére (Samson és mtsai. 2007), ezért ezeket az izolátumokat nem vizsgáltuk tovább. A 11 erősen szennyezett mintából 2-2 kínai és török, illetve 1-1 indiai és iráni minta esetében a T típusba tartozó törzsek domináltak (7. táblázat). Az N típushoz tartozó törzsek esetében a fajszintű azonosításhoz felszaporítottuk a kalmodulin gén egy szakaszát, meghatároztuk a kapott PCR-termékek bázissorrendjét, majd Maximális Parszimónia módszer alkalmazásával filogenetikai analízist végeztünk. Az adatállomány 361 karakteréből 151 volt parszimónia-informatív. Az analízis 197 maximálisan parszimónikus fát eredményezett (hossz: 467, konziszteciaindex: 0,5967, retenciós index: 0,8638), melyek közül az egyiket az 12. ábra szemlélteti. Eredményeink alapján az izolátumok legnagyobb része (n=30) az *A. niger* és az *A. welwitschiae* fajhoz tartozott, melyek mikotoxinok termelésére képesek lehetnek. A fennmaradó 5 izolátum közül 2 *A. carbonarius*-nak, 3 pedig *A. uvarum*-nak bizonyult. Az *A. uvarum* fajt eddig kizárólag szőlőből, illetve szőlőt tartalmazó termékekből sikerült izolálni (Perrone és mtsai. 2008).

7. táblázat: A vizsgált mazsolaminták és a róluk izolált fekete *Aspergillus*-ok

Minta sorszáma	**Származás (vásárlás) helye**	**Fekete *Aspergillus* izolátumok száma**	**N típushoz tartozó izolátumok**	**Azonosított fajok (izolátumok száma)**
1	Kalifornia (Florida)	5	5	*A. niger* (5)
2	Kalifornia (Florida)	8	7	*A. niger* (7)
3	Nem ismert (Hollandia)	11	9	*A. welwitschiae* (6), *A. uvarum* (2), *A. carbonarius* (1)
4	Törökország (Hollandia)	7	3	*A. welwitschiae* (3)
5	Kína (Magyarország)	9	1	*A. carbonarius* (1)
6	Törökország (India)	8	6	*A. welwitschiae* (3), *A. niger* (2), *A. uvarum* (1)
7	Törökország (Törökország)	10	3	*A. welwitschiae* (3)
8	India (India)	1	1	*A. niger* (1)
9	Kína (Magyarország)	3	-	-
10	Irán (Magyarország)	6	-	-
11	India (India)	4	-	-
12	Dél-Afrika (Hollandia)	-	-	-
13	Törökország (Hollandia)	-	-	-



12. ábra. Kalmodulin gén egy szakaszán alapuló filogenetikai fa

Fekete *Aspergillus*-ok közé tartozó típustörzsekkel, valamint a mazsolamintákról származó izolátumokkal. Az ágakon láthatók a 70%-nál magasabb bootstrap értékek. Az ábrán a CBS 557.65 számú törzs még a korábbi *A. awamori* nevet viseli, a törzs jelenlegi neve *A. welwitschiae*.

Mazsolaminták fumonizin-tartalmának vizsgálata

A mazsolaminták fumonizintartalmát RP-HPLC/ESI-ITMS-technika segítségével mértük. Hét mintát választottunk, melyek esetében előzetesen tapasztaltuk lehetséges fumonizintermelő fekete *Aspergillus*-ok (*A. niger* vagy *A. welwitschiae*) jelenlétét. Minden minta esetében sikerült detektálnunk fumonizineket. A mazsolamintákban 10 különböző fumonizin izomer fordult elő, ezek a következők: FB_1, izo-FB_1, FB_2, FB_3, 3-epi-FB_3, FB_4, 3-epi-FB_4, izo-$FB_{2,3}$, FB_5, izo-FB_5 (8. táblázat). A minták fumonizintartalma 4,55 és 35,49 mg/kg között változott, az átlag 7,22 mg/kg volt.

Az Európai Bizottság 1126/2007/EK rendeletében a FB_1- és FB_2-tartalomra vonatkozóan határértékeket állapítanak meg, azonban ezek a határértékek kizárólag kukorica-alapú termékekre vonatkoznak. A rendelet a legmagasabb határértéket (4 mg/kg) feldolgozatlan kukorica esetében állapítja meg, a legalacsonyabbat (0,2 mg/kg) pedig csecsemők és kisgyermekek számára készült kukoricaalapú élelmiszerek esetében. A mazsolára vonatkozóan ugyan nincs megállapított határérték a fumonizin-tartalomra, figyelmet érdemel az a tény, hogy az általunk vizsgált mazsolaminták átlagos fumonizintartalma a feldolgozatlan kukoricára vonatkozó határérték közel 2-szerese volt, az egyik Kaliforniából származó mintában pedig a határérték 9-szeresének megfelelő mennyiségű fumonizint detektáltunk.

8. táblázat: Mazsolaminták fumonizintartalma

Minta sorszáma	Detektált fumonizin izomerek mennyisége (µg/kg)										
	FB_1	FB_3	3-epi-FB_4	FB_4	FB_2	izo-FB_5	FB_5	3-epi-FB_3	izo-FB_1	izo-$FB_{2,3}$(1)	Összes FB
1	17321,5	3716,03	673,10	1483,92	11515,78	11,99	43,80	489,93	68,08	163,40	35487,5
2	243,42	55,05	-	59,58	325,63	-	-	-	-	-	683,68
3	247,38	50,27	-	-	157,14	-	-	-	-	-	454,79
4	358,18	106,84	48,46	84,50	424,60	-	-	-	-	-	1022,58
6	502,85	236,11	98,09	236,20	1055,95	-	-	-	-	-	2129,20
7	299,33	122,50	30,19	94,19	379,15	-	-	-	-	-	925,36
8	1491,18	489,95	179,22	425,61	2095,40	-	-	62,38	-	-	4755,74

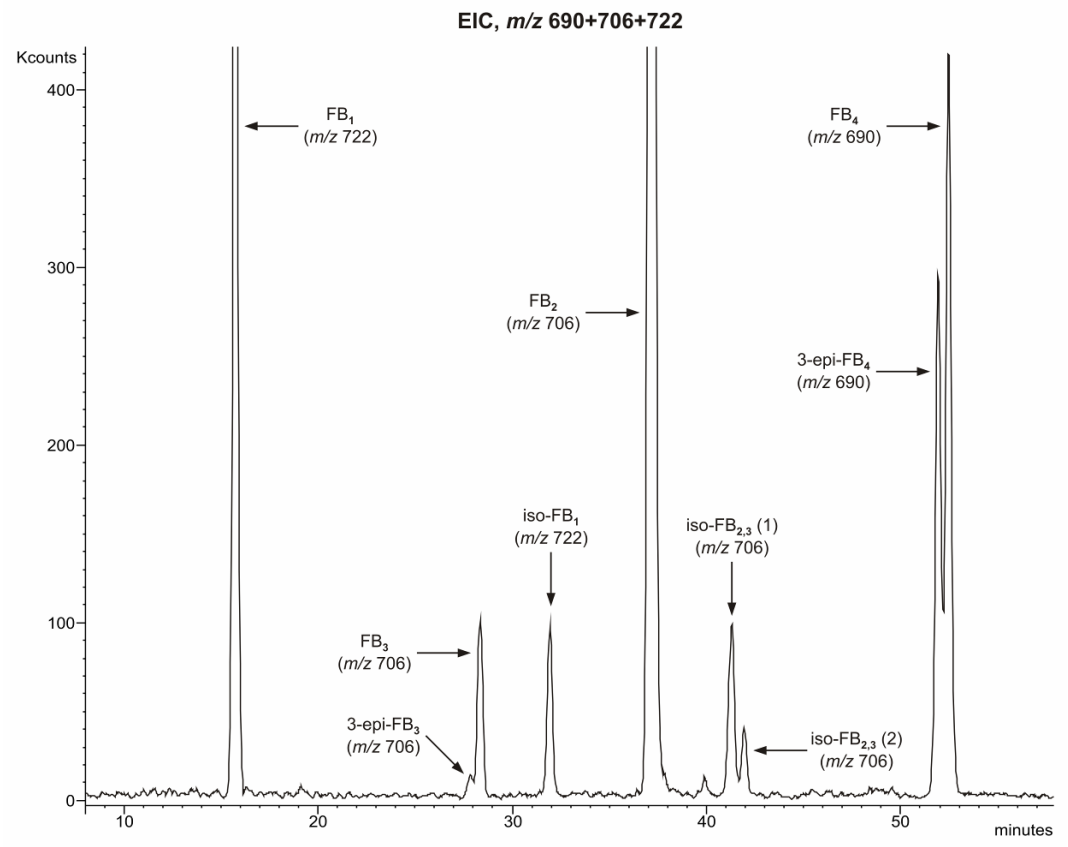
Mazsoláról származó fekete **Aspergillus** *izolátumok fumonizintermelő képessége*

Összesen 30 *A. niger* és *A. welwitschiae* izolátum fumonizintermelő képességét vizsgáltuk, melyek közül 20 izolátum esetében tapasztaltuk különböző fumonizin izomerek jelenlétét, ez az izolátumok 66%-ának felel meg (9. táblázat). Az *A. niger* izolátumok 80%-a, míg az *A. welwitschiae* izolátumok 53.3%-a bizonyult képesnek fumonizinek termelésére. Noonim és munkatársai (2009) kávéról izolált *A. niger* izolátumok vizsgálata során azt

tapasztalták, hogy az izolátumok 76%-a volt képes fumonizineket előállítani. Mogensen és munkatársai (2010) szőlőről és mazsoláról izoláltak *A. niger* törzseket, melyeknek 77%-a termelt fumonizineket. Az eddigi irodalmi adatok alapján az *A. niger* faj FB_2 (Frisvad és mtsai. 2007), FB_4 (Noonim és mtsai. 2009) és izo-FB_1 (FB_6; Mansson és mtsai. 2010) termelésére való képessége nyert bizonyítást. A FB_1, FB_3, 3-epi-FB_3, 3-epi-FB_4 és izo-$FB_{2,3}$ izomereket elsőként azonosítottuk, mint fekete *Aspergillus*-ok által termelt fumonizinek (13. ábra). Egyik izolátum sem termelte az egyik mazsolamintában detektált FB_5 és izo-FB_5 izomereket. Ennek több oka lehet. Előfordulhat, hogy az izomereket termelő *Aspergillus* törzset nem izoláltuk, vagy az általunk használt táptalajon (CYA20S) nem termelte ezeket az izomereket. Annak a lehetőségét sem zárhatjuk ki, hogy az említett izomereket tartalmazó mazsolaminta *Fusarium*-mal is szennyezett volt. A vizsgált izolátumok 0,017-19,6 mg/kg mennyiségű fumonizint termeltek, átlagosan 5,16 mg/kg-t. Az *A. welwitschiae* izolátumok tekintetében az átlagos fumonizintartalom 3,31 mg/kg, míg az *A. niger* izolátumok esetében 6,39 mg/kg volt. Mogensen és munkatársai (2010) szőlőről és mazsoláról származó *A. niger* izolátumok fuminizintermelő képességének vizsgálata során jóval kisebb értékeket tapasztaltak (1-14 µg/kg). Szécsi és munkatársai (2010) Magyarországon gyűjtött *F. verticillioides* törzsek fumonizintermelő képességét vizsgálták. Eredményeik alapján a *F. verticillioides* törzsek jóval magasabb mennyiségű fumonizin termelésére képesek, mint az *Aspergillus* izolátumok, de a szőlőszemek szárításának hatására a fumonizintartalom akkumulálódhat. Frisvad és munkatársai (2007) azt tapasztalták, hogy az *A. niger* törzsek a *F. verticillioides* törzsekkel ellentétben az alacsony vízaktivitású közegekben termelnek elsősorban fumonizineket. Ez a tény előrevetíti, hogy a mazsola kifejezetten jó táptalaj a fekete *Aspergillus*-ok fumonizin-termeléséhez. Az *A. niger* borszőlőn gyakran előfordul (Varga és mtsai. 2004), ezért feltehető, hogy a fekete *Aspergillus*-ok már a szárítást megelőzően jelen vannak a szőlőszemeken. Logrieco és munkatársai (2009) fekete *Aspergillus*-ok által termelt fumonizin általi szennyezettséget tapasztaltak szőlőminták vizsgálata során.

9. táblázat: Mazsoláról származó *A. niger* és *A. welwitschiae* izolátumok fumonizintermelő képessége

Izolátum	Detektált fumonizin izomerek mennyisége (µg/kg)									
	FB_1	FB_2	izo-$FB_{2,3}$(1)	izo-$FB_{2,3}$(2)	3-epi-FB_4	FB_4	FB_3	3-epi-FB_3	izo-FB_1	Összes FB
1.1	-	4908,33	196,34	70,07	91,52	366,47	-	-	260,75	5893,48
1.2	-	3109,12	98,52	37,38	161,77	335,63	-	-	181,48	3923,90
1.3	23,03	3310,45	113,90	34,16	168,05	291,03	-	-	189,57	4130,19
1.4	28,39	246,57	-	-	-	-	-	-	19,81	294,77
1.5	17,63	7153,52	226,08	69,68	143,22	418,71	-	-	458,22	8487,06
2.1	22,30	6572,47	226,45	82,87	71,79	461,02	-	-	333,82	7770,72
2.2	13,10	6689,70	417,95	105,96	63,69	594,05	-	-	296,64	8181,09
2.4	14,11	1562,46	63,46	21,11	26,81	153,16	-	-	89,33	1930,44
2.5	12,57	2971,50	92,76	32,73	35,23	140,20	-	-	221,17	3506,16
2.7	17,90	4816,58	154,19	81,34	38,48	382,27	-	-	389,28	5880,04
3.4	17,41	-	-	-	-	-	-	-	-	17,41
3.6	56,43	26,89	-	-	-	-	-	-	-	83,32
4.3	19,44	24,66	-	-	-	-	-	-	-	44,10
4.4	29,21	2239,33	118,50	50,15	102,87	474,78	-	-	85,65	3100,42
6.2	27,87	7102,55	269,88	86,16	505,10	698,28	-	-	318,38	9008,22
6.4	15,72	14350,36	458,21	133,04	832,33	1237,79	-	-	643,51	17670,96
6.6	21,55	18,52	-	-	-	-	-	-	-	40,07
6.7	2481,39	11649,00	593,79	183,08	1541,56	2155,48	538,49	73,36	379,49	19595,64
6.8	25,62	17,47	-	-	-	-	-	-	-	43,09
7.8	12,44	3239,09	21,80	12,44	4,32	27,17	-	-	267,49	3584,75



13. ábra. RP-HPLC/ESI-ITMS kromatogram a 6.7-es *A. welwitschiae* izolátum által termelt fumonizin-izomerekkel

Következtetésképpen elmondható, hogy az *A. niger* és *A. welwitschiae* fajok felelősek a mazsola fumonizin-szennyezettségéért világszerte, mely tényt alátámasztja, hogy az *A. niger* és az *A. welwitschiae* izolátumok nagy része képes magas cukortartalmú közegben fumonizinek termelésére.

Fekete Aspergillus izolátumok fügéről és datolyáról

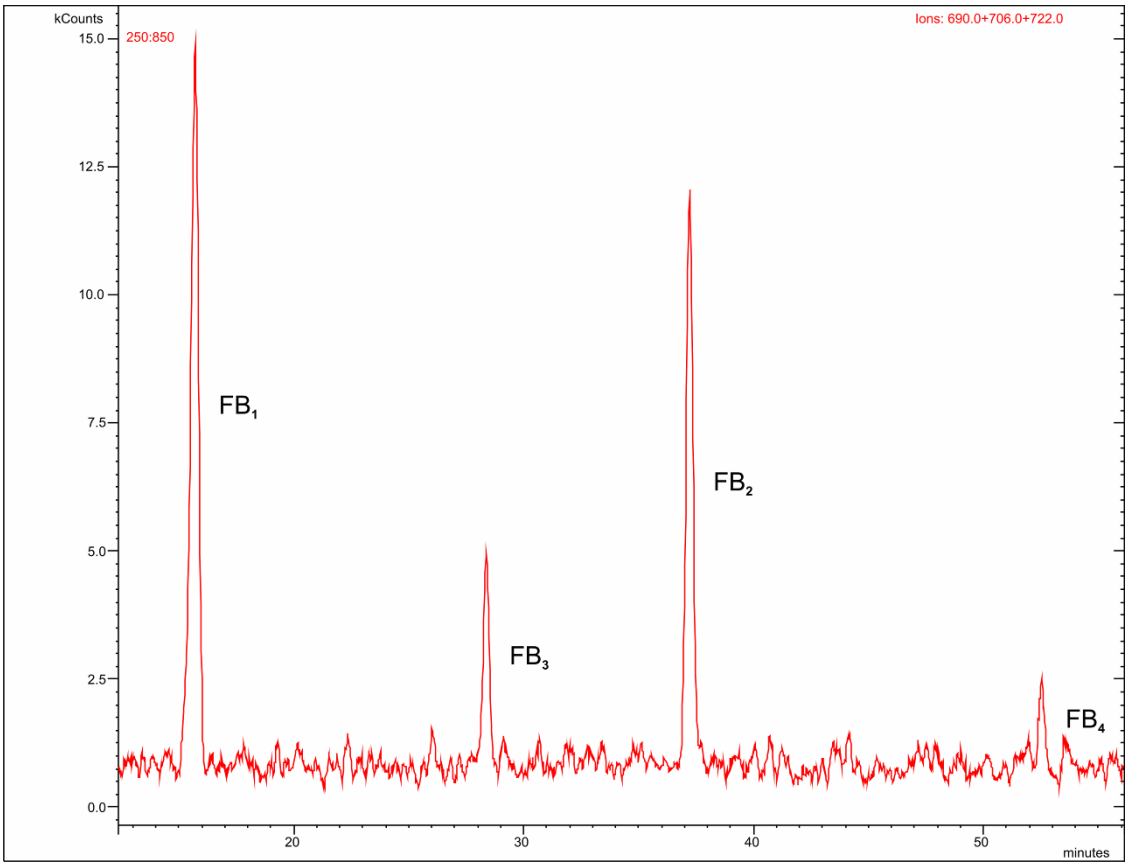
Munkánk során vizsgáltuk egyéb aszalt gyümölcsökön előforduló potenciálisan mikotoxin termelő fekete *Aspergillus* törzsek előfordulását. Munkánkba 5 datolya- és 4 fügemintát vontunk be. A Magyarországon vásárolt gyümölcsök Tunéziából és Iránból származtak (10. táblázat). Mind az öt datolyamintáról, valamint a három fügemintáról sikerült fekete *Aspergillus* törzseket izolálnunk. Az izolátumok fajszintű azonosításához a kalmodulin gén egy szakaszát felszaporítottuk, majd a szekvenciákat az NCBI GenBank adatbázisában lévő szekvenciákkal vetettük össze. A datolyamintákon kizárólag *A. tubingensis* fordult elő. Ez a faj eddigi ismereteink alapján mikotoxinok termelésére nem képes. A fügeminták esetében is az *A. tubingensis* faj dominált, de *A. niger* jelenlétét is kimutattuk. Mivel ez a faj képes lehet fumonizinek termelésére, ezért ebben az esetben felmerül a fügeminták *A. niger* általi fumonizin-szennyezettségének lehetősége. A vizsgált 3 fügemintából 1 mintában tudtuk fumonizinek jelenlétét kimutatni (14. ábra): Négy különböző fumonizin-izomer volt jelen a mintában, és jóval kisebb koncentrációban, mint azt a mazsolaminták esetében tapasztaltuk (összesen 0,16 mg/kg; 11. táblázat).

10. táblázat: Datolyáról és fügéről származó fekete *Aspergillus* izolátumok

Minta	**Származás helye (minták száma)**	**Fekete *Aspergillus* izolátumok száma**	**Azonosított fajok (izolátumok száma)**
Datolya	Tunézia (2), Irán (3)	35	*A. tubingensis* (35)
Füge	Tunézia (2), Irán (2)	23	*A. tubingensis* (17), *A. niger* (6)

11. táblázat: A fügeminta fumonizintartalma

Minta	**Detektált fumonizin izomerek mennyisége (µg/kg)**				
	FB_1	FB_2	FB_3	FB_4	Összes FB
Füge (Irán)	82,41	56,78	19,09	7,94	166,22



14. ábra. A fügemintában detektált fumonizin-izomerek

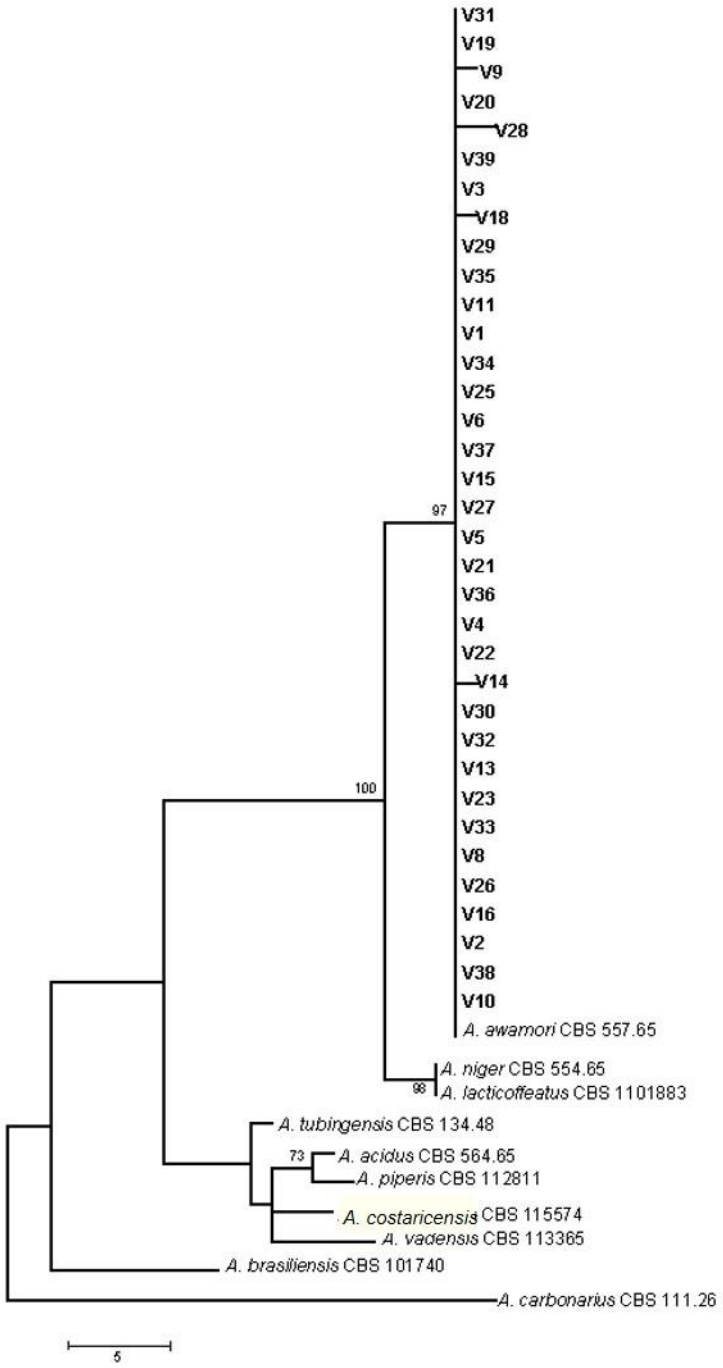
Hagymán előforduló fekete Aspergillus-ok

Fekete *Aspergillus*-ok igen gyakran fordulnak elő hagymán, és a növény fekete rothadással járó megbetegedését eredményezik (Varga és mtsai. 2008). Ezen tényből kiindulva kezdtük el hagymaminták vizsgálatát, potenciálisan fumonizintermelő törzsek azonosítása céljából. Hat db Magyarországon vásárolt hagymamintát vontunk be vizsgálatainkba. Egyetlen kivétellel minden mintáról sikeresen izoláltunk fekete *Aspergillus* törzseket. A fertőzöttség jellemző volt mind a belső húsos, mind a külső száraz leveleken. A fertőzés tünetmentes lehet a teljes érettség eléréséig, ami azt jelzi, hogy a gomba endofitaként jelen van a növényi szövetekben, de nem okoz megbetegedést a fiatal növényben (Lorbeer 2002). Tapasztalataink alapján is elmondható, hogy a fekete *Aspergillus*-ok jelenléte a hagymamintákban akkor is feltételezhető, ha a fertőzöttség szemmel nem látható. A látható tünetek a tárolás során jelennek meg, és jelentős károkat okozhatnak.

Az izolátumok fajszintű azonosításához felszaporítottuk a kalmodulin gén egy szakaszát, meghatároztuk a kapott PCR-termékek bázissorrendjét, majd Maximális Parszimónia módszer alkalmazásával filogenetikai analízist végeztünk. Az adatállomány 250

karakteréből 26 volt parszimónia-informatív. Az analízis 653 maximálisan parszimónikus fát eredményezett (hossz: 81, konzisztecia index: 0,74419, retenciós index: 0,9052), melyek közül az egyiket az 15. ábra szemlélteti. Eredményeink alapján mind a 35 izolátum az *A. welwitschiae* fajhoz tartozott.

Különböző országokból (Magyarország különböző területei, Lengyelország, Anglia, USA, India) származó hagymamintákat gyűjtöttünk, melyekről összesen 70 fekete *Aspergillus* törzset izoláltunk. Ezeket egy, a kutatócsoportunk által tervezett fajspecifikus primerpár segítségével azonosítottuk, mely egyértelműen alkalmas az *A. niger* és *A. welwitschiae* törzsek elkülönítésére (Gherbawy és mtsai. 2015). Az izolált törzsek mindegyike *A. welwitschiae*-nek bizonyult. Számos korábbi munkában említést tesznek arról, hogy a hagymán leggyakrabban előforduló penészgombafaj az *A. niger* (Walker és Lindegren 1924; Curtis és mtsai. 1974; Tyson és Fullerton 2004), azonban ezekben az esetekben a fajazonosítás morfológiai karakterek alapján történt. Mivel az *A. niger* és *A. welwitschiae* törzsek morfológiai alapon nem különíthetőek el egymástól, így valószínűsíthető, hogy ezek az izolátumok is az *A. welwitschiae* fajhoz tartoztak. Gherbawy és munkatársai (2015) 40 hagymamintáról izoláltak 60 penészgombatörzset. Harminchét hagymáról fekete *Aspergillus*-okat (összesen 37 törzset), melyek azonosítását a kalmodulin génszekvenciák alapján végezték, és hasonlóan az általunk megfigyelt eredményekhez, azt tapasztalták, hogy a hagymáról származó fekete *Aspergillus* izolátumok kivétel nélkül az *A. welwitschiae* fajhoz tartoztak. Hagymából készített kivonatok növekedésgátló hatását figyeltük meg az *A. niger* törzsek esetében, míg ez a gátló hatás az *A. welwitschiae* törzsek esetében nem mutatkozott (nem publikált adat).



15. ábra. Kalmodulin gén egy szakaszán alapuló filogenetikai fa

Fekete *Aspergillus*-ok közé tartozó típustörzsek, valamint a hagymamintákról származó izolátumok. Az ágakon láthatók a 70%-nál magasabb bootstrap-értékek. Az ábrán a CBS 557.65 számú törzs még a korábbi *A. awamori* nevet viseli, a törzs jelenlegi neve *A. welwitschiae*.

Hagymáról izolált A. welwitschiae törzsek mikotoxintermelő képessége

Összesen 59 izolátum fumonizin- és ochratoxintermelő képességét vizsgáltuk. A törzsek 15%-a (9/59) volt képes fumonizinek, míg 17%-a (10/59) OTA termelésére (12. táblázat). Ezek közül összesen egy olyan törzs volt, amelyik fumonizineket és OTA-t egyránt termelt.

12. táblázat: Hagymamintákról származó *A. welwitschiae* törzsek mikotoxintermelő képessége

Törzs	**FumonizinB (µg/kg)**	**OTA (µg/kg)**
V1	-	-
V2	-	-
V3	-	-
V4	11586,6	-
V5	-	-
V6	-	-
V8	-	-
V9	-	-
V10	-	356,232
V11	13134,1	-
V12	-	-
V13	-	-
V14	-	-
V15	-	-
V16	-	-
V17	-	153,914
V18	8634	-
V19	-	-
V20	-	-
V21	-	-
V23	-	-
V24	-	-
V24	-	-
V25	-	-
V26	-	602,946
V27	-	-
V28	-	-
V29	-	-
V30	-	-
V31	-	-
V32	-	-
V33	-	-
V34	-	-
V35	6986,7	-
V36	-	-
V37	-	-
V38	-	-
V39	-	-
I1a	2844,5	-
I1b	-	163,696
J1a	-	21,664
J1c	-	28,08

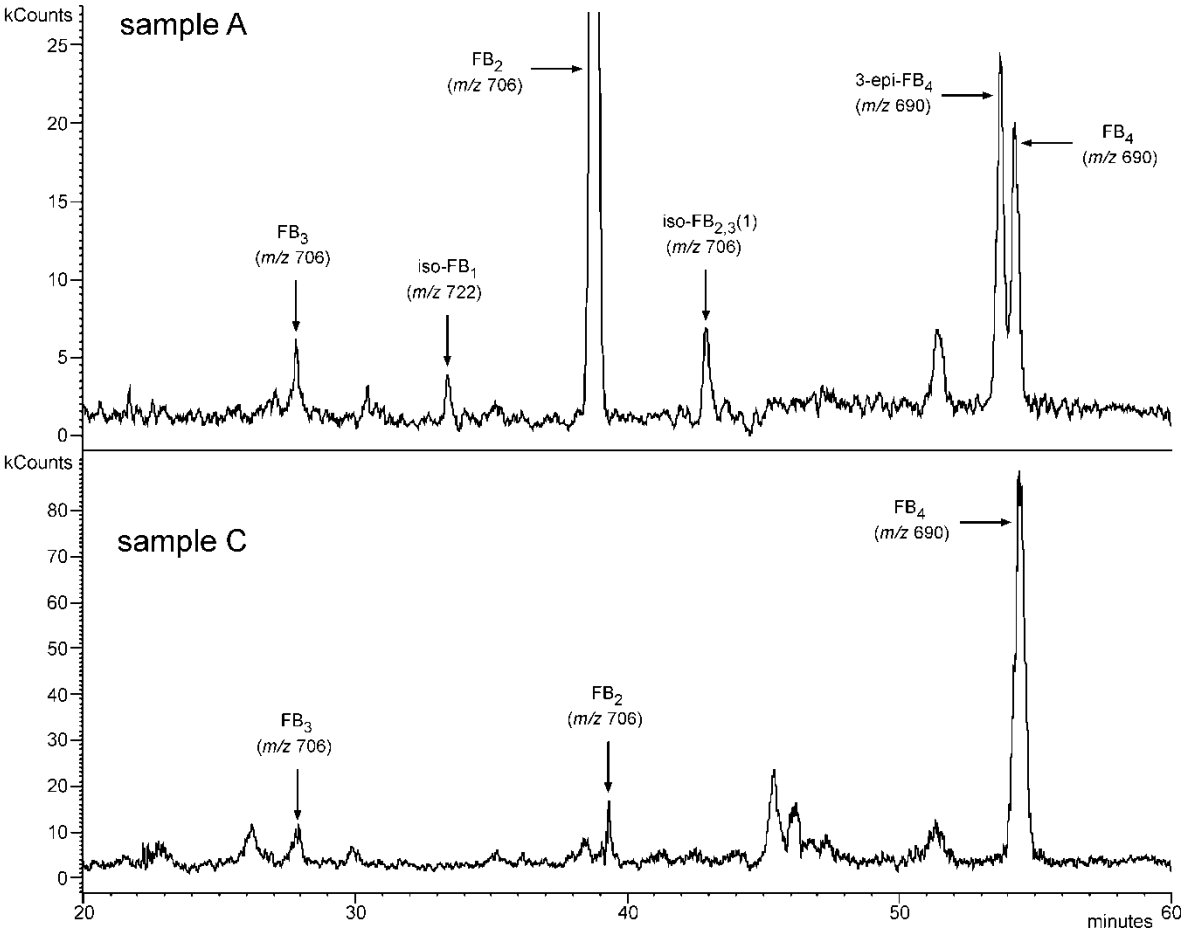
Törzs	FumonizinB (µg/kg)	OTA (µg/kg)
J2a	-	-
J2c	378,3	-
M1b	77	-
M3b	5478,5	20,44
M4a	-	281,845
M5a	-	-
M5b	-	-
P1a	-	-
P1b	-	-
P1c	-	-
P2a	-	-
S1b	-	39,584
S1c	-	28,31
S2b	-	-
S2c	-	-
Sp1a	-	-
Sp2a	1145,7	-

Hagymaminták fumonizin-szennyezettsége

A hagymaminták fumonizintartalmát RP-HPLC/ESI-ITMS-technikával mértük. Fumonizineket két hagymamintában detektáltunk, ezekben kis mennyiségben (0,32 és 0,33 mg/kg) FB_2, FB_3, FB_4, 3-epi-FB_4, izo-FB_1 izomereket mutattunk ki (13. táblázat, 16. ábra).

13. táblázat: Hagymaminták fumonizintartalma

Minta	Detektált fumonizin-izomerek mennyisége (µg/kg)						
	FB_2	FB_3	FB_4	3-epi-FB_4	izo-FB_1	izo-$FB_{2,3}$(1)	Összes FB
A	203,75	9,50	48,46	58,58	6,21	16,14	324,64
C	16,73	25,06	288,22	-	-	-	330,01



16. ábra. Az „A” és „C” hagymamintákban kimutatott fumonizin-izomerek

A hagymanövényt, a benne található alliin és egyéb antimikrobiális vegyületek miatt csak kevés penészgomba képes kolonizálni, következésképpen mikotoxinok jelenlétére is kicsi az esély. Filtenborg és munkatársai (1996) hagymaminták OTA-tartalmát vizsgálták, de nem találtak kimutatható mennyiségű mikotoxint. Frank (1977) munkája során mesterségesen fertőzött meg hagymamintákat patulintermelő *Penicillium expansum, P. urticae* és *Byssochlamys nivea* törzsekkel, de ennek ellenére sem tapasztalt patulin-szennyezettséget a vizsgált mintákban. Az *A. niger* által termelt malformin másodlagos metabolitot már kimutatták hagymaminták külső leveléből (Curtis és mtsai. 1974). Seefelder és munkatársai (2002) *F. proliferatum*-mal fertőzött fokhagymában detektáltak fumonizin B_1-et. Az eddigi irodalmi adatok alapján vöröshagymában fumonizint még nem mutattak ki. Frisvad és munkatársai (2007) azt tapasztalták, hogy a fumonizinek termelésére képes fekete *Aspergillus*-ok (*A. niger* és *A. welwitschiae*) a kis vízaktivitású, magas só-, vagy cukortartalmú tápközegekben termelnek elsősorban fumonizineket, ezért feltételezhető, hogy – a száraz külső leveleket leszámítva - nagy víztartalmú hagymanövény nem segíti elő a fekete *Aspergillus* törzsek fumonizin-termelését.

Összefoglalás

Az *Aspergillus* nemzetség a fonalasgombák egy nagyon változatos csoportját foglalja magába, mely gazdaságilag is nagy jelentőséggel rendelkezik. Az egész *Aspergillus* nemzetségre vonatkozóan elmondható, hogy az egymással közeli rokonságban álló fajok morfológiai alapon történő elkülönítése igen nehéz, néhány esetben nem is lehetséges. Erre a célra a genomi szekvenciák (pl. a kalmodulin és β-tubulin gének szekvenciái) alapján történő fajelkülönítés sokkal jobban alkalmazható. Számos tanulmány született már az *Aspergillus* nemzetség filogenetikai kapcsolatainak feltérképezése érdekében, azonban az eddigi munkák általában valamelyik alcsoportra (szekcióra, alnemzetségre) fókuszálnak, nemzetség szintű áttekintásre kevés példát találunk (Samson és mtsai. 2014).

A fekete *Aspergillus*-oknak a nemzetség *Nigri* szekciójában elhelyezkedő fajokat nevezzük, az ide tartozó legismertebb faj az *A. niger* (Gams és mtsai. 1985). Ismertségét annak köszönheti, hogy igen széles körben elterjedt a biotechnológiai alkalmazása. Elsősorban citromsav, glükonsav ipari mértékű előállítására használják, de emellett számos enzim, pl.: pektináz, amiláz gazdaságos előállítása is lehetséges általuk (Varga és mtsai. 2000). Hasznos tulajdonságaik ellenére károkat is okozhatnak, mert humán megbetegedéseket válthatnak ki, valamint egyes fajok mikotoxinok előállítására is képesek, melyek előfordulhatnak élelmiszereinkben, és elfogyasztásuk hosszú távon káros hatást fejt ki egészségünkre. Az egyik ilyen mikotoxin-csoport a fumonizinek csoportja. Ezek karcinogén mikotoxinok, melyek számos betegséggel hozhatók összefüggésbe mind emberek, mind állatok esetén.

Fekete *Aspergillus*-ok különböző megbetegedések okozói lehetnek. Opportunista patogének lévén, olyan esetekben okoz fertőzést, amelyekben az immunrendszer valamilyen okból nem megfelelően működik. A modern immunoszupresszáns terápiák napjainkban egyre elterjedtebbé válnak, ezért az ilyen jellegű fertőzéseknek a száma és jelentősége egyre növekszik (Cohen és mtsai. 1993). A fekete Aspergillus-ok elsősorban a légzőszervrendszerben szaporodnak el, de szemfertőzést (keratitisz) és fülfertőzést (otitisz) is okozhatnak. A légzőszervrendszerben jelentkező fertőzés sok esetben halálos kimenetelű lehet, ezért ezekben az esetekben nagyon fontos, hogy a lehető leghatékonyabb terápiát lehessen alkalmazni, és ezzel csökkenteni a gomba szaporodásának lehetőségét. Ehhez elengedhetetle, hogy pontosan tudjuk, melyik faj okozta a megbetegedést, mert a különböző fajok eltérő mértékben lehetnek érzékenyek antifungális szerekkel szemben (Balajee és mtsai. 2005). Az eddigi gyakorlat azt mutatja, hogy a klinikai fekete *Aspergillus* izolátumokat általában *A. niger*-ként azonosítják

morfológiai alapon, azonban több olyan, egymással közeli rokonságban álló fekete *Aspergillus* faj is okozhatnak humán fertőzéseket, amelyek morfológiai karakterek alapján nem különíthetőek el egymástól.

Munkám főbb eredményeit az alábbiakban foglalom össze:

1. Az *Aspergillus* nemzetség filogenetikai analízise.

A teljes *Aspergillus* nemzetséget reprezentatívan mintázó filogenetikai vizsgálatot végeztünk 93 faj bevonásával. Az elemzés során 6 génszakaszt szaporítottunk fel, majd bázissorrendjüket meghatároztuk. A felszaporított génszakaszok a következők voltak: *RPB1*, *RPB2* (RNS polimeráz II alegységei), *Tsr1* (20S rRNS összeszerelésében szerepet játszó fehérje), illetve a *Cct8* (dajkafehérje), *Acl1* (ATP citrát-liáz) és *MCM7* (minikromoszómák fenntartásáért felelős). A filogenetikai analízist Maximum Likelihood és MrBayes módszerekkel végeztük el. Eredményeink alapján az *Aspergillus* nemzetség 6 alnemzetségre és 23 szekcióra bontható. Az *Aspergillus* (bootstrap-érték: 100 / poszterior valószínűség: 1), *Polypaecili* (100/1), *Cremei* (90/1), *Fumigati* (100/1) és *Nidulantes* (100/1) alnemzetségek magas támogatottsági értékekkel rendelkeznek, a *Circumdati* (47/1) alnemzetség támogatottsága kisebb a ML-analízis alapján. A nemzetségen belül a ML-analízis alapján az *Usti* és *Restricti* szekciók kivételével minden szekció monofiletikusnak bizonyult közepes, vagy magas támogatottsági értékek mellett. Mind a ML, mind a MrBayes analízis alapján az *Usti* szekció két csoportra különült, ahol az *A. amylovorus*, *A. subsessilis* és *A. egyptiacus* fajok egy jól elhatárolódó kládot alkotnak magas támogatottsági értékek mellett (92/1). A *Restricti* szekció képviselői nem alkotnak elkülönülő kládot. A *Polypaecilum* és *Phialosimplex* nemzetségekbe tartozó gombák az *Aspergillus* nemzetség *Cremei* és *Aspergillus* szekciójába tartozó fajokkal mutatnak rokonságot, ennek következtében ezeket a fajokat az *Aspergillus* nemzetség tagjainak tekintjük, ami a nevezéktanban is ennek megfelelő változást von maga után. Így a korábban *Phialosimplex caninus*, *Phialosimplex clamydosporus*, *Phialosimplex sclerotiales*, *Polypaecilum insolitum*, *Polypaecilum pisci* neveket viselő fajok az *Aspergillus* nemzetségnevet kapták. A *Penicillium inflatum* faj az *Aspergillus* nemzetségbe sorolható, ezért az *Aspergillus inflatus* nevet kapta. Az általunk tapasztalt eredmények szerint a *Versicolores*, *Nidulantes*, *Aenei*, *Raperi*, *Usti*, *Bispori*, *Ochraceorosei* és *Sparsi* szekciók egy nagy csoportot alkotnak, melyen belül a *Nidulantes* és *Versicolores* szekciók ugyan elkülönülnek egymástól, de nem szekciószinten. Eredményeink alapján a *Nigri* szekció nem a *Flavi*, hanem a *Terrei*, *Flavipedes*, *Jani* és *Candidi* szekciókkal alkot testvércsoportot. A *Flavi* szekció testvérkládja a

Circumdati szekció, a *Cremei* szekció pedig a távoli *Polypaecili, Restricti* és *Aspergillus* szekciókkal mutat rokonságot. A korábban a *Sparsi* szekcióba sorolt *A. funiculosus* az *A. ochraceorosei*-vel mutat rokonságot, így inkább tekinthető az *Ochraceorosei* szekció tagjának.

2. Az *A. niger* és *A. welwitschiae* törzsek genetikai variabilitásának vizsgálata.

Két nagyon közeli csoport, az *A. niger* és *A. welwitschiae* törzsek izolátumainak genetikai variabilitását UP-PCR módszerrel vizsgáltuk. A 88 fragment figyelembe vételével készített binomiális mátrix alapján létrehozott Neighbour-joining fán az izolátumok két egyértelműen elkülönülő csoportot alkotnak, így elmondhatjuk, hogy az *A. niger* és *A. welwitschiae* izolátumok UP-PCR módszerrel elkülöníthetőek egymástól.

3. Fülfertőzésekből származó fekete *Aspergillus* izolátumok azonosítása, érzékenységük antifungális szerekkel szemben.

Munkánk során 7 iráni ás 14 magyarországi fülfertőzésből származó izolátumot vizsgáltunk, melyeket kivétel nélkül *A. niger*-ként azonosítottak a hagyományos, morfológián alapuló módszerrel. A kalmodulin gén egy szakaszának szekvenciái alapján elvégeztük az izolátumok fajszintű besorolását. Eredményeink alapján az *A. niger*-en kívül más fekete *Aspergillus* fajok (*A. welwitschiae* és *A. tubingensis*) is okozhatnak fülfertőzéseket. Az izolátumok érzékenységét a klinikumban széles körben használt gombaellenes szerekkel (flukonazol, itrakonazol, ketokonazol, terbinafin, amfotericin B) szemben vizsgálatuk. A MIC_{100}-értékek alapján nem mutatkozott szignifikáns különbség az eltérő fajok érzékenységében, de elmondhatjuk, hogy a terbinafin (MIC_{100}: 0,25-1 µg/ml) és itrakonazol (MIC_{100}: 0,5-1 µg/ml) hatásosabbnak bizonyultak, mint a ketokonazol (MIC_{100}: 8-16 µg/ml). Az amfotericin B-vel szemben a magyarországi izolátumok érzékenyebbek, mint az iráni izolátumok, ennek okát nem ismerjük.

4. Fekete *Aspergillus* izolátumok előfordulása élelmiszereken, a törzsek fuminizin-termelésének és az adott élelmiszerek fuminizin-tartalmának vizsgálata

Fekete *Aspergillus* izolátumokat gyűjtöttünk mazsola-, datolya-, füge- és hagymamintákról, majd részleges kalmodulin génszekvenciáik alapján fajszinten azonosítottuk őket. A mazsolamintákról származó izolátumok közül 16 *A. welwitschiae*-nek, 16 pedig *A. niger*-nek bizonyult. Az izolátumok 66%-a termelt fumonizineket átlagosan 5 mg/kg mennyiségben, két izolátum azonban kiugróan nagy, 15 és 17 mg/kg koncentrációban termelte

ezeket a mikotoxinokat. A mazsolaminták fumonizintartalmát vizsgálva megállapítottuk, hogy a minták átlagosan 7 mg/kg koncentrációban voltak szennyezettek, azonban egy minta esetében kiugróan magas, 35 mg/kg koncentrációt tapasztaltunk. Összehasonlításképpen megemlítendő, hogy az Európai Unió által a fumonizin-szennyezettséget illetően az elfogadott legmagasabb határérték 4 mg/kg, ami feldolgozatlan kukoricára vonatkozik. Datolyamintákról 35 fekete *Aspergillus* törzset izoláltunk, a szekvenciaadatok alapján ezek mindegyike az *A. tubingensis* fajba tartozott, mely mikotoxinok termelésére nem képes. A fügéről származó izolátumok többsége is az *A. tubingensis* fajba tartozott, kivéve 6 izolátumot, melyek az *A. niger* fajba sorolhatóak. A fügeminták közül egy Iránból származó mintában tudtunk fumonizineket kimutatni: FB_1, FB_2, FB_3 és FB_4 izomereket detektáltunk, 0,16 mg kg^{-1} összmennyiségben. Hagymáról 35 fekete *Aspergillus* törzset izoláltunk, mind a külső száraz, mind a belső húsos levelekből. Részleges kalmodulin génszekvenciáik alapján az összes izolátum az *A. niger*-rel nagyon közeli rokonságban álló *A. welwitschiae* fajba sorolható. Vizsgáltuk az izolátumok mikotoxintermelő képességét, mely alapján 15%-ukat találtuk képesnek fumonizinek, 17%-ukat pedig ochratoxin A termelésére. A vizsgált 5 hagymaminta esetében két mintában találtunk fumonizin-izomereket 0,32 és 0,33 mg kg^{-1} mennyiségben. A fumonizin-izomerek között a FB_{2-4}, 3-epi-FB_4, izo-FB_1 (FB_6) és izo-$FB_{2,3}$ formákat azonosítottuk.

Summary

Aspergillus is a diverse genus with high economic and social impact. Several closely related species cannot be reliably distinguished on the basis of morphological criteria alone. Molecular tools have been developed to solve this issue, with sequence-based methods being the most valuable for species delimitation. Partial sequences of the calmodulin or β-tubulin genes are suitable to discriminate species within the genus *Aspergillus*. *Aspergillus* has been the subject of a large number of taxonomic studies using DNA sequence data. Many of these studies focused on specific groups (species, sections, subgenera) within *Aspergillus* and the number of phylogenetic studies at the genus level and above are limited (Samson *et al.* 2014). The black aspergilli (*Aspergillus* section *Nigri*) is an important group of species in food mycology, medical mycology and biotechnology. *A. niger* is used in the fermentation industry to produce hydrolytic enzymes, such as amylases or lipases, and organic acids, such as citric acid and gluconic acid (Varga *et al.* 2000). Besides their economic importance, black aspergilli are also important as opportunistic human pathogens and many species cause food spoilage and are potential producers of mycotoxins (fumonisins, ochratoxin A) which contaminate several agricultural products.

Black aspergilli are opportunistic human pathogens, but the importance of these diseases is growing with the spreading of immunosuppressive therapy (Cohen *et al*. 1993). The disease usually occurs in the respiratory system, but they can also cause keratitis and otitis. In order to select the appropriate treatment, the correct identification of these clinical isolates is essential, as not all species have the same susceptibility patterns against several antifungal drugs (Balajee et al. 2005). Clinical black *Aspergilli* are usually identified as *A. niger* using conventional morphological methods. However, recent molecular analyses showed that, apart from *A. niger* other black *Aspergilli* are also important as potential opportunistic pathogens in human infections (Munguia and Daniel 2008).

The objectives of the present study were:

- Production of a robustm genus-wide phylogeny to get insight into the evolutionary relationships of this economically important genus.
- Analysis of the genetic variability of the two closely related black *Aspergillus* species *A. niger* and *A. welwitschiae*.
- Identification of black *Aspergillus* isolates from otomycosis cases, and investigation of their susceptibility against several antifungal drugs.

- Identification of black *Aspergillus* isolates from food samples, and analysis of their fumonisin producing ability and the fumonisin content of the investigated food samples.

Our main results were the following:

1. Phylogenetic analysis of the genus *Aspergillus*

Ninety-three species had been involved in the analysis, which represent the genus properly. The Acl1 (ATP citrate lyase), MCM7 (mini-chromosome maintenance complex component 7), *RPB1*, *RPB2* (RNA Polymerase II largest and second largest subunit), *Tsr1* (ribosome maturation factor) and *Cct8* (chaperonin containing TCP1 subunit) genes were amplified and sequenced. Combined sequence data were created and the phylogenetic analysis was carried out by Maximum Likelihood and MrBayes methods. According to our data the genus *Aspergillus* can be divided into 6 subgenera and 22 sections. The *Aspergillus* (bootstrap value: 100/ posterior probability: 1), *Polypaecili* (100/1), *Cremei* (90/1), *Fumigati* (97/1) and *Nidulantes* (100/1) subgenera have high support values, however the subgenus *Circumdati* has lower bootstrap value (47/1). Except *Usti*, all the sections are monophyletic according to the ML analysis with moderate or high bootstrap values. The section *Usti* is divided into two groups, and *A. amylovorus* and *A. egypticus* represent a separate clade with high support values (92/1). Fungi belonging to *Polypaecilum* and *Phialosimplex* seem to be in relation with members of sections *Cremei* and *Aspergillus*, thus the former *Phialosimplex caninus*, *Phialosimplex clamydosporus*, *Phialosimplex sclerotiales*, *Polypaecilum insolitum* and *Polypaecilum pisci* species get the genus name *Aspergillus*. *Penicillium inflatum* is related to genus *Aspergillus*, consequently this species is transferred to genus *Aspergillus* under the name *A. inflatus*. According to our data, sections *Versicolores*, *Nidulantes*, *Aenei*, *Raperi*, *Usti*, *Bispori*, *Ochraceorosei* and *Sparsi* belong to one group. Species of *Versicolores* and *Nidulantes* are divided, but not at the section level. Section *Nigri* is the sister group of *Candidi* and *Terrei*, not *Flavi*. The sister group of *Flavi* is section *Circumdati*. Section *Cremei* is related to sections *Polypaecili*, *Restricti* and *Aspergillus*. *A. funiculosus* has been classified to section *Sparsi*, but this speies is related to *A. ochraceoroseus*, thus belongs to section *Ochraceorosei*.

2. Intvestigation of the genetic variability of two closely related black *Aspergillus* species, *A. niger* and *A. welwitschiae*

The genetic variability of *A. niger* and *A. welwitschiae* was studied by the UP-PCR method. A Neighbour-joining tree was generated based on a binomial matrix which contains

the data of 88 fragments. On this tree the two species appear in separated clades, thus these closely related species can be distinguished from each other with this method.

3. Identification of black *Aspergillus* isolates from otomycosis cases, and their susceptibility to different antifungal drugs

Seven samples from Iran and 14 samples from Hungary were investigated. According to the clinical implication, all of them were identified as *A. niger* on the basis of conventional morphological methods. However, based on sequence analysis of a part of the calmodulin gene, our data showed that apart from *A. niger*, other *Aspergillus* species (*A. welwitschiae* and *A. tubingensis*) can also cause otomycosis. The susceptibilities of the isolates to commonly used antifungal agents (amphotericin B, itraconazole, fluconazole, ketoconazole and terbinafine) were tested *in vitro*. Based on the MIC_{100} values there were no significant differences among the susceptibilities of the different species. Terbinafine (MIC_{100}: 0.25-1 μg/ml) and itraconazole (MIC_{100}: 0.5-1 μg/ml) were more effective than ketoconazole (MIC_{100}: 8-16 μg/ml). Amphotericin B was more effective against the isolates from Hungary, than against the isolates from Iran.

4. Presence of black *Aspergilli* on food samples and their ability to produce fumonisins, fumonisin content of food samples contaminated by black *Aspergillus* strains.

Black *Aspergillus* strains were isolated from raisin, date, fig and onion samples. The isolates were identified based on partial calmodulin gene sequences. Among 32 black *Aspergillus* isolates from raisins, 16 were found to belong to *A. niger* and 16 to *A. welwitschiae*. Sixty-six % of the isolates were found to be able to produce fumonisins. Several isomers of fumonisins were identified in the extracts of the isolates. The average production of fumonisins by the toxinogenic species was around 5 mg/kg, but two of the isolates produced fumonisins in a very high concentration (15 and 17 mg/kg, respectively). The average fumonisin content of the raisin samples was around 7 mg/kg, but in the case of one sample we could detect 35 mg/kg (for comparison, the EU limit for unprocessed maize is 4 mg/kg). Regulations do not exist for the fumonisin content of raisins.

All of the 35 black *Aspergillus* strains isolated from dates were found to belong to *A. tubingensis* based on calmodulin sequence data. This species is not able to produce mycotoxins.

The majority of the isolates originated from figs were also belonging to *A. tubingensis*, but 6 *A. niger* isolates were also detected. One fig sample was contaminated by fumonisins at a low concentration (0.16 mg/kg).

All of the 35 black *Aspergillus* strains isolated from onion samples were found to belong to *A. welwitschiae* based on calmodulin sequence data. Fifteen % of the isolates were able to produce fumonisins, while 17% produced ochratoxin A. Two of the onion samples were contaminated by fumonisins at low concentrations (0.32 and 0.33 mg/kg).

Irodalomjegyzék

Accensi, F., Cano, J., Figuera, L., Abarca, M. L., Cabañes, F. J. 1999. New PCR methods to differentiate species in the *Aspergillus niger* aggregate. *FEMS Microbiol. Lett.* 180: 191-196.

Aktas, E., Yigit, N. 2009. Determination of antifungal susceptibility of *Aspergillus* spp. responsible for otomycosis by E-test method. *J. Mycol. Med.* 19: 122-125.

Alcazar-Fuoli, L., Mellado, E., Alastruey-Izquierdo, A., Cuenca-Estrella, M., Rodriguez-Tudela, J. L. 2009. Species identification and antifungal susceptibility patterns of species belonging to *Aspergillus* section *Nigri*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53: 4514-4517.

Al-Musallam, A. 1980. Revision of the black *Aspergillus* species. Thesis, Utrecht University, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. 1990. Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.

Baker, S. E. 2006. *Aspergillus niger* genomics: past, present and into the future. *Med. Mycol.* 44: 17-21.

Balajee, S. A., Gribskov, J., Brandt, M., Ito, J., Fothergill, A., Marr, K. A. 2005. Mistaken identity: *Neosartorya pseudofischeri* and its anamorph masquerading as *Aspergillus fumigatus*. *J. Clin. Microbiol.* 43: 5996-5999.

Balajee, S. A., Kano, R., Baddley, J. W., Moser, S. A., Marr, K. A., Alexander, B. D., Andes, D., Kontoyiannis, D. P., Perrone, G., Peterson, S., Brandt, M. E., Pappas, P. G., Chiller, T. 2009. Molecular identification of *Aspergillus* species: Transplant Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET). *J. Clin. Microbiol*. 47: 3138-3141.

Bartók, T., Szécsi, Á., Szekeres, A., Mesterházy, Á., Bartók, M. 2006. Detection of new fumonisin mycotoxins and fumonisin-like compounds by reversed-phase high-performance liquid chromatography / electrospray ionization ion trap mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20: 2447-2462.

Bartók, T., Tölgyesi, L., Szekeres, A., Varga, M., Bartha, R., Szécsi, Á., Bartók, M., Mesterházy, Á. 2010. Detection and characterization of twenty-eight isomers of fumonisin B_1 (FB_1) mycotoxin in a solid rice culture infected with *Fusarium verticillioides* by reversed-phase high-performance liquid chromatography / electrospray ionization time-of-flight and ion trap mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 24: 35-42.

Bendele, A. M., Neal, S. B., Oberly, T. J., Thompson, C. Z., Bewsey, B. J., Hill, L. E., Rexroat, M. A., Carlton, W. W., Probst, G. S. 1985. Evaluation of ochratoxin A for mutagenicity in a battery of bacterial and mammalian cell assays. *Food Chem. Toxicol.* 23: 911-918.

Berbee, M. L., Yoshimura, A., Sugiyama, J., Taylor, J. W. 1995. Is *Penicillium* monophyletic – an evaluation of phylogeny in the family *Trichocomaceae* from 18S, 5.8S and ITS ribosomal DNA-sequence data. *Mycologia* 87: 210-222.

Bezuidenhout, S. C., Gelderblom, W. C. A., Gorst-Allman, C. P., Horak, R. M., Marasas, W. F. O., Spiteller, G., Vleggaar, R. 1988. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 743-745.

Bonifaz, A., Chavolla-Magana, R., Araiza, J. 2010. *Aspergillus* otitis. In: Pasqualotto, A. C. (szerk.) Aspergillosis: from diagnosis to prevention. pp. 999-1006. *Springer*, Dordrecht.

Boorman, G. A., Mcdonald, M. R., Imoto, S., Persing, R. 1992. Renal lesions induced by ochratoxin A exposure in the F344 rat. *Toxicol. Pathol.* 20: 236-247.

Bouhet, S., Le Dorze, E., Peres, S., Fairbrother, J. M., Oswald, I. P. 2006. Mycotoxin fumonisin B1 selectively down-regulates the basal IL-8 expression in pig intestine: *in* v*ivo* and *in* v*itro* studies. *Food Chem. Toxicol.* 44: 1768-1773.

Brown, D. W., Cheung, F., Proctor, R. H., Butchko, R. A., Zheng, L., Lee, Y., Utterback, T., Smith, S., Feldblyum, T., Glenn, A. E., Plattner, R. D., Kendra, D. F., Town, C. D., Whitelaw, C. A. 2005. Comparative analysis of 87.000 expressed sequence tags from the fumonisin-producing fungus *Fusarium* v*erticillioides*. *Fungal Genet. Biol.* 42: 848-861.

Bulat, S. A., Lübeck, M., Alekhina, I. A., Jensen, D. F., Knudsen, I. M. B. and Lübeck, P. S. 2000. Identification of a universally primed-PCR-derived sequence characterized amplified region marker for an antagonistic strain of *Clonostachys rosea* and development of a strain-specific PCR detection assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4758-4763.

Bulat, S. A., Mironenko, N. V., Lapteva, M. N., Strelchenko, P. P. 1994. Polymerase chain reaction with universal primers (UP-PCR) and its application to plant genome analysis. In: Adams, R. P., Miller, J. S., Goldenberg, E. M., Adams, J. E. (szerk.) Conservation of plant genes II. 8. Utilization of ancient and modern DNA. *St. Louis: Missouri Botanical Garden* pp. 113-129.

Chamilos, G., Lewis, R. E., Albert, N., Kontoyiannis, D. P. 2007. Paradoxical effect of echinocandins across *Candida* species *in vitro*: evidence for echinocandin-specific and *Candida* species-related differences. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51: 2257-2259.

Chen, A. J., Frisvad, J. C., Sun, B. D., Varga, J., Kocsubé, S., Dijksterhuis, J., Kim, D. H, Hong, S. B., Houbraken, J., Samson, R. A. 2016. *Aspergillus* section *Nidulantes* (formerly *Emericella*): Polyphasic taxonomy, chemistry and biology. *Stud. Mycol*. 84: 1-118.

Cohen, J., Denning, D. W., Viviani, M. A. 1993. Epidemiology of invasive aspergillosis in European cancer centres. EORTC Invasive Fungal Infections Cooperative Group. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 12: 392-393.

Curtis, R.W., Stevenson, W.R., and Tuit, J. 1974. Malformin in *Aspergillus niger* infected onion bulbs (*Allium cepa*). *Appl. Microbiol*. 28: 362-365.

de Vries, R. P., Riley, R., Wiebenga, A., Aguilar-Osorio, G., Amillis, S., Uchima, C. A., Anderluh, G., Asadollahi, M., Askin, M., Barry, K., Battaglia, E., Bayram, Ö., Benocci, T., Braus-Stromáeyer, S. A., Caldana, C., Cánovas, D., Cerqueira, G. C., Chen, F., Chen, W., Choi, C., Clum, A., Corrêa dos Santos, R. A., de Lima Damásio, A. R., Diallinas, G., Emri, T., Fekete, E., Flipphi, M., Freyberg, S., Gallo, A., Gournas, C., Habgood, R., Hainaut, M., Harispe, M. L., Henrissat, B., Hildén, K. S., Hope, R., Hossain, A., Karabika, E., Karaffa, L., Karányi, Zs., Kraševec, N., Kuo, A., Kusch, H., LaButti, K., Lagendijk, E. L., Lapidus, A., Levasseur, A., Lindquist, E., Lipzen, A., Logrieco, A. F., MacCabe, A., Mäkelä, M. R., Malavazi, I., Melin, P., Meyer, V., Mielnichuk, N., Miskei, M., Molnár, Á. P., Mulé, G., Ngan, C. Y., Orejas, M., Orosz, E., Ouedraogo, J. P., Overkamp, K. M., Park, H. S., Perrone, G., Piumi, F., Punt, P. J., Ram, A. F. J., Ramón, A., Rauscher, S., Record, E., Riaño-Pachón, D. M., Robert, V., Röhrig, J., Ruller, R., Salamov, A., Salih, N. S., Samson, R. A., Sándor, E., Sanguinetti, M., Schütze, T., Sepčić, K., Shelest, E., Sherlock, G., Sophianopoulou, V., Squina, F. M., Sun, H., Susca, A., Todd, R. B., Tsang, A., Unkles, S. E., van de Wiele, N., van Rossen-Uffink, D., Velasco de Castro Oliveira, J., Vesth, T. C., Visser, J., Yu, J. H., Zhou, M., Andersen, M. R., Archer, D. B., Baker, S. E., Benoit, I., Brakhage, A. A., Braus, G. H., Fischer, R., Frisvad, J. C., Goldman, G. H., Houbraken, J., Oakley, B., Pócsi, I., Scazzocchio, C., Seiboth, B., vanKuyk, P. A., Wortman, J., Dyer P. S., Grigoriev, I. V. 2017. Comparative genomics reveals high biological diversity and specific adaptations in the industrially and medically important fungal genus *Aspergillus*. *Genome Biol.* 18: 28.

Fasunla, J., Ibekwe, T., Onakoya, P. 2007. Otomycosis in western Nigeria. *Mycoses*. 51: 67-70.

Felsenstein, J. 2007. PHYLIP (Phylogeny Inference Package). Version 3.67 Distributed by the author. Department of Genome Sciences and Department of Biology University of Washington, Seattle.

Filtenborg, O., Frisvad, J. C., Thrane, U. 1996. Moulds in food spoilage. *Int. J. Food Microbiol*. 33: 85-102.

Frank, H. K. 1977. Occurrence of patulin in fruit and vegetables. *Ann. Nutr. Aliment*. 31: 459-465.

Fries, E. M. 1832. *Sistema Mycologicum.* Moritz, Gryphiswald

Frisvad, J. C., Samson, R. A. 2000. *Neopetromyces* gen. nov. and an overview of teleomorphs of *Aspergillus* subgenus *Circumdati*. *Stud. Mycol*. 45: 201-208.

Frisvad, J. C., Samson, R. A. 2004. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Stud. Mycol*. 49: 1-173.

Frisvad, J. C., Smedsgaard, J., Samson, R. A., Larsen, T. O., Thrane, U. 2007. Fumonisin B2 production by *Aspergillus niger*. *J. Agric. Food Chem*. 55: 9727-9732.

Gams, W., Christensen, M., Onions, A. H., Pitt, J. I., Samson, R. A. 1985. Infrageneric taxa of *Aspergillus*. In: Samson, R. A., Pitt, J. I. (szerk.) Advances in *Penicillium* and *Aspergillus* Systematics. pp. 55-62. *Plenum Press*, New York.

Geiser, D. M., Samson, R. A., Varga, J. 2008. A review of molecular phylogenetics in *Aspergillus* and prospects for a robust genus-wide phylogeny. In: Varga, J., Samson, R. A. (szerk.) *Aspergillus* in the genomic era. pp. 17-32. *Academic Publishers*, Wageningen.

Gelderblom, W. C. A., Jaskiewicz, K., Marasas, W. F. O., Thiel, P. G., Horak, R., M., Vleggaar, R., Kriek, N. P. J. 1988. Fumonisins – Novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Appl. Environt. Microbiol*. 54: 1806-1811.

Gelderblom, W. C. A., Sewram, V., Shephard, G.S., Snijman, P.W., Tenza, K., van der Westhuizen, L., Vleggaar, R. 2007. Structure and natural occurrence of stereoisomers of the fumonisin B series mycotoxins. *J. Agricult. Food Chem.* 55: 4388-4394.

Gherbawy, Y., Elhariry, H., Kocsubé, S., Bahobial, A., Deeb, B. E., Altalhi, A., Varga, J., Vágvölgyi, Cs. 2015. Molecular characterization of black *Aspergillus* species from onion and their potential for Ochratoxin A and Fumonisin B2 production. *Foodborne Pathog. Dis.* 12: 414-423.

Hamari, Z., Kevei, F., Kovács, E., Varga, J., Kozakiewicz, Z., Croft, J. H. 1997. Molecular and phenotypic characterization of *Aspergillus japonicus* and *Aspergillus aculeatus* strains with special regard to their mitochondrial DNA polymorphisms. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* 72: 337-347.

Haschek, W. M., Gumprecht, L. A., Smith, G., Tumbleson, M. E., Constable, P. D. 2001. Fumonisin toxicosis in swine: an overview of porcine pulmonary oedema and current perspectives. *Environ. Health Perspect.* 109: 251-257.

Hillis, D.M., Bull, J. J. 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Syst. Biol*. 42: 182-192.

Hogan, L. H., Klein, B. S., Levitz, S. M. 1996. Virulence factors of medically important fungi. *Clin. Microbiol. Rev*. 9: 469-488.

Hong, S. B., Cho, H. S., Shin, H. D., Frisvad, J. C., Samson, R. A. 2006. Novel *Neosartorya* species isolated from soil in Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 477-486.

Hong, S. B., Lee, M., Kim, D. H., Varga, J., Frisvad, J. C., Perrone, G., Gomi, K., Yamada, O., Machida, M., Houbraken, J., Samson, R A. 2013. *Aspergillus luchuensis*, an industrially important black *Aspergillus* in East Asia. *PLOS One* 8: 1-9.

Houbraken, J., Samson, R. A. 2011. Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of *Trichocomaceae* into three families. *Stud. Mycol.* 70: 1-51.

Houbraken, J., Vries, R. P., Samson, R. A. 2014. Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species. *Adv. Appl. Microbiol*. 86: 199-249.

Howard, S. J., Harrison, E., Bowyer, P., Varga, J., Denning, D. W. 2011. Cryptic species and azole resistance in the *Aspergillus niger* complex. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55: 4802-4809.

Hubka, V, Nováková, A., Kolarík, A., Jurjevic, Z., Peterson, S. W. 2015. Revision of *Aspergillus* section *Flavipedes*: seven new species and proposal of section *Jani* sect. nov. *Mycologia*: 1: 169-208.

IARC 2002. Fumonisin B1. *IARC Monogr*. 82: 301.

IARC 1993. Ochratoxin A. *IARC Monogr*. 56: 489.

Joy, M. J., Agarwal, M. K., H. Samant, H. C., Gupta, O. P., Sharma, B. M. 1980. Mycological and bacteriological studies in otomycosis. *Indian J. Otolaryngol*. 32: 72-75.

Karaarslan, A., Arikan, S., Ozcan, M., Ozcan, K. M. 2004. *In vitro* activity of terbinafine and itraconazole against *Aspergillus* species isolated from otomycosis. *Mycoses* 47: 284-287.

Kaur, R., Mittal, N., Kakkar, M., Aggarwal, A. K., Maheshwar D. M. 2000. Otomycosis: A clinicomycologic study. *Ear Nose Throat J.* 79: 606-609.

Kaya, A., Kiraz, N. 2007. *In vitro* susceptibilities of *Aspergillus* spp. causing otomycosis to amphotericin B, voriconazole and itraconazole. *Mycoses* 50: 447-450.

Kocsubé, S., Perrone, G., Magista, D., Houbraken, J., Varga, J., Szigeti, Gy., Hubka, V., Hong, S. B., Frisvad, J. C., Samson, R. A. 2016. *Aspergillus* is monophyletic: Evidence from multiple gene phylogenies and extrolites profiles. *Stud. Mycol*. 85: 199-213.

Kredics, L., Varga, J., Antal, Z., Samson, R.A., Vágvölgyi, C., Manikandan, P. 2008. Black Aspergilli in tropical infections. *Rev. Med. Microbiol*. 19: 65-78.

Kredics, L., Varga, J., Kocsubé, S., Revathi, R., Raghavan, A., Dóczi, I., Németh, T. M., Narendran, V., Vágvölgyi, C., Samson, R. A., Manoharan, C., Manikandan, P. 2009. Infective keratitis due to *Aspergillus tubingensis*. *Cornea* 28: 951-954.

Krogh, P. 1978. Causal associations of mycotoxic nephropathy. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect*. 269: 1-28.

Krogh, P., Hald, B., Plestina, R., Ceovic, S. 1977. Balkan (endemic) nephropathy and food-borne ochratoxin A: preliminary results of a survey of foodstuff. *Acta Pathol. Microbiol*. 85: 238-240.

Kusters-van Someren, M. A., Samson, R. A., Visser, J. 1991. The use of RFLP analysis in classification of the black aspergilli: reinterpretation of *Aspergillus niger* aggregate. *Curr. Genet.* 19: 21-26.

Latgé, J. P. 1999. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 12: 310-350.

Lea, T., Steien, K., Stormer, C. 1989. Mechanism of ochratoxin A-induced immunosuppression. *Mycopathologia* 107: 153-159.

Levitz, S. M. 1989. Aspergillosis. *Infect. Dis. Clin. North. Am*. 3: 1-18.

Logerico, A., Ferracane, R, Haidukowsky, M., Cozzi, G., Visconti, A., Ritieni, A. 2009. Fumonisin B_2 production by *Aspergillus niger* from grapes and natural occurence in must. *Food Addit. Contam.* 26: 1495-1500.

Logrieco, A., Ferracane, R., Haidukowsky, M., Cozzi, G., Visconti, A., Ritieni, A., 2009. Fumonisin B2 production by *Aspergillus niger* from grapes and natural occurrence in must. *Food Addit. Contam*. 26: 1495-1500.

Lorbeer, J. W., Tuffley, J. W., Ransom, V. E., Snover, K. L. 2002. The nature of *Aspergillus niger* as an endophytic fungus in onion plants and subsequent development of black mold. National *Allium* Research Conference, Pasco, WA, USA, Dec. 11-14 2002, Conference Abstracts pp. 20.

Löytynoja, A. 2014. Phylogeny-aware alignment with PRANK. *Meth. Mol. Biol*. 1079: 155-170.

Lübeck, P. S., Alekhina, I. A., Lübeck, M., Bulat, S., A. 1998. UP-PCR genotyping and rDNA analysis of *Ascochyta pisi*. *Lib. J. Phytopathol.* 146: 51-55.

Mansson, M., Kleijnstrup, M. L., Phipps, R. K., Nielsen, K. F., Frisvad, J., Gotfredsen, C. H., Larsen, T. O. 2010. Isolation and NMR characterization of fumonisin B_2 and a new fumonisin B_6 from *Aspergillus niger*. *J. Agricult. Food Chem.* 58: 949-953.

Marasas, W. F. O., Jaskiewicz, K., Venter, F. S., van Schalkwyk, D. J. 1988a. *Fusarium moniliforme* contamination of maize in esophageal cancer areas in Transkei. *South Afr. Med. J.* 74: 110-114.

Marasas, W. F. O., Kellerman, T. S., Gelderblom, W. C. A., Coetzer, J. A. W., Thiel, P. G., van der Lugt, J. J. 1988b. Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B1 isolated from *Fusarium moniliforme*. *Onderstepoort J. Vet. Res*. 55: 197-203.

Marin, S., Magan, N., Ramos, A. J., Sanchis, V. 2004. Fumonisin producing strains of *Fusarium*: a review of their ecophysiology. *J. Food Prot.* 67: 1792-1805.

McNeill, J., Turland, N. J. 2011. Major changes to the Code of Nomenclature—Melbourne, July 2011. *Taxon* 60: 1495-1497.

Megnegneau, B., Debets, F., Hoekstra, R. F. 1993. Genetic variability and relatedness in the complex group of black aspergilli based on random amplification of polymorphic DNA. *Curr. Genet.* 23: 323-329.

Micheli, P. A. 1729. *Nova plantarum genera.* Florentiae

Mogensen, J. M., Frisvad, J. C., Thrane, U., Nielsen, K. F. 2010. Production of fumonisin B2 and B4 by *Aspergillus niger* on grapes and raisins. *J. Agric. Food Chem*. 58: 954-958.

Moore, C. B., Walls, C. M., Denning, D. W. 2001. *In vitro* activities of terbinafine against *Aspergillus* species in comparison with those of itraconazole and amphotericin B. *Antimicrob. Agents Chemother*. 45: 1882-1885.

Munguia, R., Daniel, S. J. Ototopical antifungals and otomycosis: a review. 2008. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol*. 72: 453-459.

NCCLS (2002) Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard, Document M38-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, USA.

Noonim, P., Mahakarnchanakul, W., Nielsen, K. F., Frisvad, J. C., Samson, R. A. 2009. Fumonisin B2 production by *Aspergillus niger* from Thai coffee beans. *Food Addit. Contam*. 26: 94-100.

Ogawa, H., Yoshimura, A., Sugiyama, J. 1997. Polyphyletic origins of species of the anamorphic genus *Geosmithia* and the relationships of the cleistothecial genera: evidence from 18S, 5S and 28S rDNA sequence analyses. *Mycologia* 89: 756-771.

Ozcan, K. M., Ozcan, M., Karaarslan, A., Karaarslan, F. 2003. Otomycosis in Turkey: predisposing factors, etiology and therapy. *J. Laryngol. Otol*. 117: 39-42.

Pagiotti, R., Angelini, P., Rubini, A., Tirillini, B., Granetti, B. 2011. Identification and characterisation of human pathogenic filamentous fungi and susceptibility to *Thymus schimperi* essential oil. *Mycoses* 54: 364-376.

Parenicova, L., Skouboe, P., Frisvad, J., Samson, R. A., Rossen, L., ten Hoor-Suykerbuyk, M., Visser, J. 2001. Combined molecular and biochemical approach identifies *Aspergillus japonicus* and *Aspergillus aculeatus* as two species. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 521-527.

Pel, H. J., de Winde, J. H., Archer, D. B., Dyer, P. S., Hofmann, G., Schaap, P. J., Turner, G., de Vries, R. P., Albang, R., Albermann, K., Andersen, M. R., Bendtsen, J. D., Benen, J. A. E., van den Berg, M., Breestraat, S., Caddick, M. X., Contreras, R., Cornell, M., Coutinho, P. M., Danchin, E. G. J., Debets, A. J. M., Dekker, P., van Dijck, P. W. M., van Dijk, A., Dijkhuizen, L., Driessen, A. J. M., d'Enfert, C., Geysens, S., Goosen, C., Groot, G. S. P., de Groot, P. W. J., Guillemette, T., Henrissat, B., Herweijer, M., van den Hombergh, J. P. T. W., van den Hondel, C. A. M. J., van der Heijden, R. T. J. M., van der Kaaij, R. M., Klis, F. M., Kools, H. J., Kubicek, C. P., van Kuyk, P. A., Lauber, J., Lu, X., van der Maarel, M. J. E. C., Meulenberg, R., Menke, H., Mortimer, M. A., Nielsen, J., Oliver, S. G., Olsthoorn, M., Pal, K., van Peij, N. N. M. E., Ram, A. F. J., Rinas, U., Roubos, J. A., Sagt, C. M. J., Schmoll, M., Sun, J. B., Ussery, D., Varga, J., Vervecken, W., de Vondervoort, P. J. J. V.,Wedler, H.,Wösten, H. A. B., Zeng, A. P., van Ooyen, A. J. J., Visser, J., Stam, H. 2007. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nat. Biotechnol.* 25: 221-231.

Perrone, G., Stea, G., Epifani, F., Varga, J., Frisvad, J. C., Samson, R. A. 2011. *Aspergillus niger* contains the cryptic phylogenetic species *A. awamori*. *Fungal Biol.* 115: 1138-1150.

Perrone, G., Susca, A., Epifani, F., Mule, G. 2006. AFLP characterization of Southern Europe population of *Aspergillus* Section *Nigri* from grapes. *Int. J. Food Microbiol.* 111: 22-27.

Perrone, G., Varga, J., Susca, A., Frisvad, J. C., Stea, G., Kocsubé, S., Tóth, B., Kozakiewicz, Z., Samson, R. A., 2008. *Aspergillus uvarum* sp. nov., an uniseriate black *Aspergillus* species isolated from grapes in Europe. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. 58: 1032-1039.

Peterson, S. W. 1995. Phylogenetic analysis of *Aspergillus* sections *Cremei* and *Wentii*, based on ribosomal DNA sequences. *Mycol. Res*. 99: 1349-1355.

Peterson, S. W. 2000. Phylogenetic relationships in *Aspergillus* based on rDNA sequence analysis. In: Samson, R. A., Pitt, J. I. (szerk.) Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. pp. 323-355. *Harwood Academic Publishers*, Amsterdam.

Peterson, S. W. 2008. Phylogenetic analyses of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. *Mycologia* 100: 205-226.

Peterson, S. W., Varga, J., Frisvad, J. C. 2008. Phylogeny and subgeneric taxonomy of *Aspergillus*. In: Varga, J., Samson, R. A. (szerk.) *Aspergillus* in the genomic era. pp. 33-56. *Academic Publishers*, Wageningen.

Pitt, J. I., Hocking, A. D. 1997. *Fungi and food spoilage*. 2nd ed.; Blackie Academic and Professional: London, U.K.

Pitt, J. I., Samson, R. A., Frisvad, J. C. 2000. List of accepted species and their synonyms in the family *Trichocomaceae.* In: Samson, R. A., Pitt, J. I. (szerk.) Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. pp. 9–79. *Harwood Academic Publishers*, Amsterdam.

Pitt, J. I., Taylor, J. W. 2016. Proposal to conserve the name *Aspergillus* (Fungi: Eurotiales: Trichocomaceae) with a conserved type to maintain also the name *Eurotium*. *Taxon* 65: 631-632.

Pollastro, S., De Miccolis, R. M., Faretta, F. 2006. A new semi-selective medium for the ochratoxigenic fungus *Aspergillus carbonarius*. *J. Plant Pathol*. 88: 107-112.

Proctor, R. H., Brown, D. W., Plattner, R. D., Desjardins, A. E. 2003. Co-expression of 15 contiguous genes delineates a fumonisin biosynthetic gene cluster in *Gibberella moniliformis*. *Fungal Genet. Biol.* 38: 237-249.

Rank, C., Nielsen, K. F., Larsen, T. O., Varga, J., Samson, R. A., Frisvad, J. C. 2011. Distribution of sterigmatocystin in filamentous fungi. *Fungal Biol*. 115: 406-420.

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

Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M. A., Huelsenbeck, J. P. 2012. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. Syst. Biol. 61: 539-542.

Saitou N., Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol*. 4: 406-425.

Samson, R. A., Hoekstra, E. S., Frisvad, J.C. 2004. *Introduction to Food- and Airborne Fungi.* 7th ed.; Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands.

Samson, R. A., Noonim, P., Meijer, M., Houbraken, J., Frisvad, J. C., Varga, J. 2007. Diagnostic tools to identify black aspergilli. *Stud. Mycol*. 59: 129-145.

Samson, R. A., Varga, J. 2009. What is a species in *Aspergillus*? *Med. Mycol.* 47: 13-20.

Samson, R. A., Visagie, C. M., Houbraken, J., Hong, S. B., Hubka, V., Klaassen, C. H. W., Perrone, G., Seifert, K. A., Susca, A., Tanney, J. B., Varga, J., Kocsubé, S., Szigeti, Gy., Yaguchi, T., Frisvad, J. C. 2014. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud. Mycol*. 78: 141-173.

Samson, R. A., Hubka, V., Varga, J., Houbraken, J., Hong, S. B., Klaassen, C. H. W., Perrone, G., Seifert, K. A., Magista, D., Visagie, C. M., Kocsubé, S., Szigeti, Gy., Yaguchi, T., Peterson, S. W., Frisvad, J. C. 2017. Conversation of *Aspergillus* with *A. niger* as the conserved type is unnecessary and potentially disruptive. *Taxon* 66: 1439-1446.

Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W., Fungal Barcoding Consortium 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109: 6241-6246.

Seefelder, W., Gossmann, M., Humpf, H. U. 2002. Analysis of fumonisin B1 in *Fusarium proliferatum*-infected asparagus spears and garlic bulbs from Germany by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem*. 50: 2778-2781.

Silvestro, D., Michalak, I. 2012. raxmlGUI: a graphical front-end for RAxML. *Organ. Divers. Evol*. 12: 335-345.

Sklenar, F., Jurjevic, Z., Zalar, P., et al. (2017). Phylogeny of osmophillic aspergilli (subgenus *Aspergillus*) and taxonomic revision of section Restricti. Studies in Mycology.

Smith, J. E., Moss, M. O. 1985. *Mycotoxins. Formation, analysis and significance*. John Wiley and Sons, Chichester, England.

Stockmann-Juvala, H., Savolainen, K. 2008. A review of the toxic effects and mechanisms of action of fumonisin B1. *Hum. Exp. Toxicol*. 27: 799-809.

Stolk, A. C., Malla. D. S. 1971. *Penicillium inflatum* sp. nov. *Persoonia* 6: 197-200.

Szécsi, Á., Szekeres, A., Bartók, T., Oros, G., Bartók, M., Mesterházy, Á., 2010. Fumonisin B1-4-producing capacity of Hungarian *Fusarium verticillioides* isolates. *World Mycotoxin J*. 3: 67-76.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596-1599.

Tamura, M., Kawahara, K., Sugiyama, J. 2000. Molecular phylogeny of *Aspergillus* and associated teleomorphs in the *Trichocomaceae* (*Eurotiales*). In: Samson, R. A., Pitt, J. I. (szerk.) Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. pp. 357-372. *Harwood Academic Publishers*, Amsterdam.

Taylor, J. W. 2011. One Fungus = One Name: DNA and fungal nomenclature twenty years after PCR. *IMA Fungus* 2: 113-120.

Taylor, J. W., Göker, M., Pitt, J. I. 2016. Choosing one name for pleomorphic fungi: The example of *Aspergillus* versus *Eurotium*, *Neosartorya* and *Emericella*. *Taxon* 65: 593-601.

Téren, J., Varga, J., Hamari, Zs., Rinyu, E., Kevei, F. 1996. Immunochemical detection of ochratoxin A in black *Aspergillus* strains. *Mycopathologia* 174: 171-176.

Thom, C., Raper, K. B. 1945. *A manual of the Aspergilli*. The Williams & Wilkins Company, Baltimore.

Tyson, J. L., Fullerton, R. A. 2004. Effect of soil-borne inoculum on incidence of onion black mould (*Aspergillus niger*). *New Zeal. Plant Prot*. 57: 138-141.

Udagawa, S., Uchiyama, S. 2002. *Neocarpenteles*: a new ascomycete genus to accommodate *Hemicarpenteles acanthosporus*. *Mycoscience* 43: 3-6.

Vaidya, G., Lohman, D. J., Meier, R. 2011. SequenceMatrix: concatenation software for the fast assembly of multi-gene datasets with character set and codon information. *Cladistics* 27: 171-180.

van der Merwe, K. J., Stein, P. S., Fourie, L., Scott, D. B., Theron, J. J. 1965. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus Wilh. Nature* 205: 1112-1113.

Varga, J., Frisvad, J. C., Samson, R. A. 2010. New and revisiting species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Stud. Mycol.* 69: 1-17.

Varga, J., Houbraken, J., Samson, R. A., Frisvad, J. C. 2008. Molecular diversity of *Aspergillus* and *Penicillium* species on fruits and vegetables. In: Barkai-Golan, B., Paster, N. (szerk.) Mycotoxins in fruits and vegetables. pp. 205-223 *Academic Press.*

Varga, J., Juhász, ., Kevei, F., Kozakiewicz, Z. 2004. Molecular diversity of agriculturally important *Aspergillus* species. *Eur. J. Plant Pathol.* 110: 627-640.

Varga, J., Kevei, F., Debets, F., Kozakiewicz, Z., Croft, J. H. 1994. Mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphisms in field isolates of the *Aspergillus niger* aggregate. *Can. J. Microbiol.* 40: 612-621.

Varga, J., Kevei, F., Fekete, C., Coenen, A., Kozakiewicz, Z., 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., Hamari, Z., Tóth, B., Téren, J., Croft, J. H., Kozakiewicz, Z. 2000. Genotypic and phenotypic variability among black aspergilli. In: Samson, R. A., Pitt, J. I. (szerk.) Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. pp. 397-411. *Harwood Academic Publishers*, Amsterdam.

Varga, J., Kocsubé, S., Péteri, Z., Samson, R.A. 2009a. An overview of ochratoxin research. In: Rai, M., Bridge, P. (szerk.) Applied Mycology, pp. 38-55. *CABI Publishers.*

Varga, J., Kocsubé, S., Suri, K., Szigeti, Gy., Szekeres, A., Varga, M., Tóth, B., Bartók, T. 2010. Fumonisin contamination and fumonisin producing black *Aspergilli* in dried vine fruits of different origin. *Int. J. Food Microbiol*. 143: 143-149.

Varga, J., Kocsubé, S., Szigeti, Gy., Mán, V., Tóth, B., Vágvölgyi, Cs., Bartók, T. 2012. Black *Aspergilli* and fumonisin contamination in onions purchased in Hungary. *Acta Aliment*. 41: 414-423.

Varga, J., Kocsubé, S., Tóth, B., Frisvad, J. C., Perrone, G., Susca, A., Meijer, M., Samson, R. A. 2007. *Aspergillus brasiliensis* sp. nov., a biseriate black *Aspergillus* species with world-wide distribution. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 1925-1932.

Varga, J., Téren, J., Rigó, K., Tóth, B., Kocsubé, S. 2009b. *Gombák másodlagos anyagcseretermékei: mikotoxinok, gombamérgek. JATE Press*, Szeged

Vennewald, I., Klemm, E., Otomycosis: diagnosis and treatment. 2010. *Clin. Dermatol*. 28: 202-211.

Visagie, C. M., Houbraken, J., Frisvad, J. C., Hong, S. B., Klaassen, C. H. W., Perrone, G., Seifert, K. A., Varga, J., Yaguchi, T., Samson, R. A. 2014a. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Stud. Mycol*. 78: 343-371.

Visagie, C. M., Varga, J., Houbraken, J., Meijer, M., Kocsubé, S., Yilmaz, N., Fotedar, R., Seifert, K. A., Frisvad, J. C., Samson, R. A. 2014b. Ochratoxin production and taxonomy of the yellow aspergilli (*Aspergillus* section *Circumdati*). *Stud. Mycol*. 78: 1–61.

von Haller, A. 1768. *Historia stripium indigenarum Helvetiae inchoata*. Bernae: *Sumptibus Societatis typographicae* (*ex officina* Dan. Brunneri & Alb. Halleri)

Walker, J. C., Lindegren, C. C. 1924. Further studies on the relation of onion scale pigmentation to disease resistance. *J. Agric. Res*. 29: 507-514.

Wang, E., Norred, W. P., Bacon, C. W., Riley, R. T., Merrill, A. H. 1991. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. Implications for dieases associated with *Fusarium moniliforme*. *J. Biol. Chem*. 266: 14486-14490.

Yenisehirli, G., Bulut, Y., Guven, M., Gunday, E. 2009. *In vitro* activities of fluconazole, itraconazole and voriconazole against otomycotic fungal pathogens. *J. Laryng. Otol.* 123: 978-981.

Yokoyama, K., Wang, L., Miyaji, M., Nishimura, K. 2001. Identification, classification and phylogeny of the *Aspergillus* section *Nigri* inferred from mitochondrial cytochrome b gene. *FEMS Microbiol. Lett.* 200: 241-246.

Yoshizawa, T., Yamashita, A., Luo, Y. 1994. Fumonisin occurrence in corn from high-risk and low risk areas for human esophageal cancer in China. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1626-1629.

Zarei, M. A., Masoomi, S. A., Mohammadi, H. 2010. Clinical and mycological studies of otomycosis. *Pak. J. Med. Sci*. 26: 187-190.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom mindenekelőtt **Prof. Dr. Varga János**nak, témavezetőmnek, hogy betekintést nyerhettem ennek a szakterületnek a rejtelmeibe, amelynek ő igen jeles képviselője volt. Széleskörű szaktudásával, emberi hozzáállásával folyamatosan segítségemre volt, és egyengette utamat.

Köszönöm **Prof. Dr. Vágvölgyi Csabá**nak, hogy Ph. D. munkámat az általa vezetett tanszéken végezhettem, és részese lehettem egy szakmailag igényes munkaközösségnek.

Köszönöm **Dr. Kocsubé Sándor**nak, hogy már szakdolgozó koromtól folyamatosan segítette a munkámat, mind elméleti, mind gyakorlati vonatkozásban. Rengeteg praktikát, logikus laboratóriumi gondolkodásmódot tanulhattam tőle, amiért nagyon hálás vagyok.

Hálával tartozom **Prof. Dr. Robert A. Samson**-nak és **Dr. Jos Houbraken**-nek, hogy a filogenetikai vizsgálatokhoz szükséges laboratóriumi munkát a CBS Gombakutató Központban, Utrechtben végezhettem. Köszönöm, hogy mind anyagi, mind szakmai értelemben segítették a munkámat, és a szükséges törzsekhez hozzáférést biztosítottak számomra.

Köszönöm **Dr. Baranyi Nikolett**nek, Ph. D.-hallgató társamnak, hogy gyakorlati vonatkozásban segítette a munkámat.

Köszönetemet szeretném kifejezni **Suri Katalin**nak, **Horányi Adrienn**ek és **Mán Viktória**nak, kutatócsoportunk korábbi szakdolgozóinak, akik munkájukkal hozzájárultak ahhoz, hogy ez a disszertáció létrejöhessen.

Dr. Bartók Tibornak, **Dr. Szekeres András**nak és **Dr. Bencsik Ottó**nak köszönöm a HPLC-mérések során nyújtott nélkülözhetetlen segítséget.

Köszönöm a **309-es labor** és a **tanszék minden munkatársá**nak, hogy segítőkész hozzáállásukkal támogatták munkám haladását.

Köszönettel tartozom **Szüleim**nek, akik mindvégig támogattak tanulmányaimban.

Szeretném megköszönni férjemnek, **Petkovits Tamás**nak, hogy türelmesen kitartott mellettem, és erőt adott a disszertáció elkészítése során.

A dolgozattal kapcsolatos kutatásokat az „Új utak a természetes anyag alapú gyógyszerkutatásban: Rendszermetabolomikai megközelítések növényi és mikrobiális eredetű bioaktív terpenoidok felkutatására.” című, GINOP-2.3.2-15-2016-00012 számú projekt támogatta. Az infrastrukturális hátteret a GINOP-2.3.3-15-2016-00006 számú, „Mikrobiális génbankoz kapcsolódó integrált élettudományi és hatóanyag kutatás-fejlesztési centrum” című pályázat biztosította.