

Magyarország szántóterületének közel kétharmadán, 2,7 millió hektáron termelnek gabonaféléket. A klímaváltozás jelentős hatást gyakorol a mezőgazdasági termelésre, ezáltal az élelmiszerbiztonságra is. A globális felmelegedés egyik legfontosabb negatív hatása - a mikotoxinok szempontjából - a melegkedvelő gombafajok megjelenése mérsékelt égövi országokban.

Az *Aspergillus flavus* által termelt aflatoxinok korábban elsősorban a trópusi, szubtrópusi országok terményeiben fordultak elő. A közelmúltban azonban számos közlemény jelent meg, melyekben aflatoxin termelő gombák előfordulásáról, illetve a megengedettnél nagyobb aflatoxin szintek észleléséről számoltak be mérsékelt égövi európai országok mezőgazdasági termékeiben.

A fekete *Aspergillus* fajok jelentősek, mint különböző ipari enzimek illetve szerves savak termelői, mint humán patogének, és mint növényi termékek raktári károsítói. Ezen fajok, melyek közül néhány ochratoxinokat és fumonizineket is képes termelni, ugyancsak melegkedvelők, így a klímaváltozás hatására tömeges megjelenésükre számíthatunk hazánkban is.

A „termőföldtől az asztalig” tartó élelmiszerlánc számos kritikus ponttal rendelkezik, és mindegyiket ellenőrzés alatt kell tartani ahhoz, hogy a végtermék, akár takarmány, akár élelmiszer biztonságát garantálni lehessen. A kukorica hibridek toxikus gombákkal szembeni ellenállóságának vizsgálata, szűrése a megfelelő hibridválasztást segíti. Ezen túl fontos, hogy a megtermelt egészséges termék a tárolás után is az maradjon, ezért a tárolási körülményeknek a gombapopulációkra és a toxintartalomra kifejtett hatását is tanulmányoztuk.

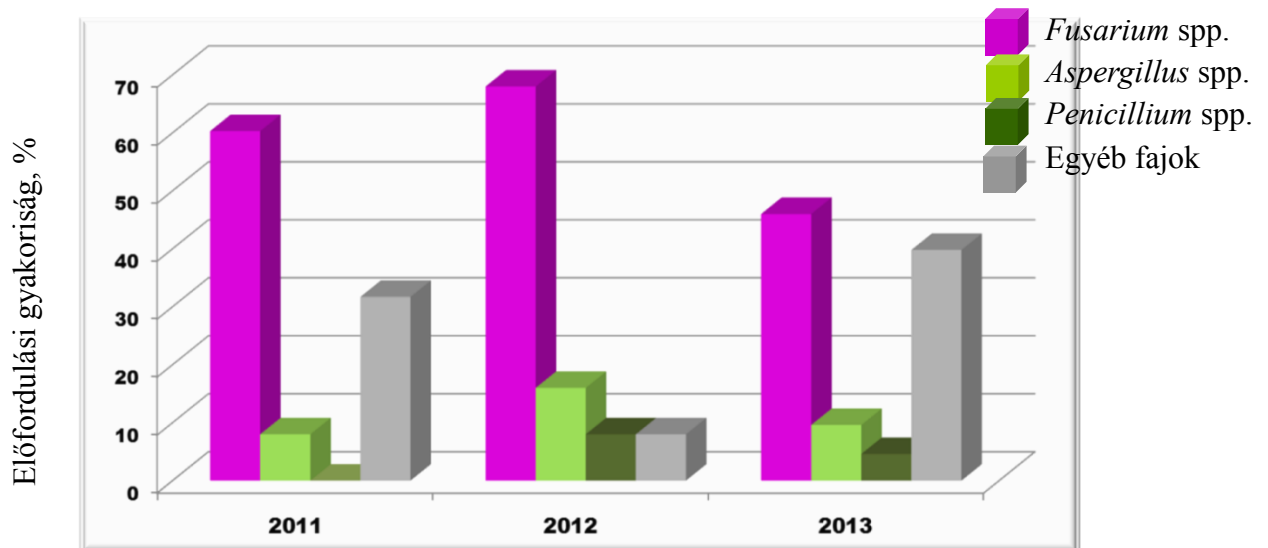
### Gabonatételek gombaszennyezettsége

A 2011 és 2014 között végzett kutatásaink során az *Aspergillus* és *Penicillium* fajok, valamint az általuk termelt mikotoxinok (aflatoxinok, ochratoxinok, fumonizinek) előfordulását mértük fel hazai gabonamintákból. Az aratáskori gabonamintákat hazánk különböző termőhelyeiről gyűjtöttük be (a Magyar Kukorica Klub és a Gabonakutató Nonprofit Kft. kísérleti hálózata). A mintánkénti 50 felületsterilizált szemet szelektív táptalajra helyeztük, majd az izolált gombatorzseket morfológiailag meghatároztuk. A kukoricamintákról összesen 600 tiszta izolátumot készítettünk, a búzamintákról mintegy 500, az egyéb kalászos gabonafélékről 150 izolátumot nyertünk. A tisztatenyészetekből szelektált izolátumok fajszerű azonosítását megfelelő genomiális régiók (*Aspergillus*, *Penicillium* fajok: kalmodulin gén egy szakasza, *Fusarium* fajok: transzlációs elongációs faktor gén, egyéb fajok: ITS régió) szekvencia analízisével végeztük.

A 2011. évre meleg és száraz időjárás volt jellemző, a **kukoricatételek** szemfertőzöttsége 14%-os volt. Az izolált gombatenyészeteken belül az *Aspergillus* izolátumok részaránya 8%-ot tett ki (1. ábra). Az *A. flavus* mellett az *A. niger* faj képviselőit is azonosítottunk, melyek ochratoxinokat illetve fumonizineket termelhetnek (2. ábra). A *Penicillium* nemzetség tagjainak jelenlétét ebben az évben nem tudtunk mintáinkból kimutatni. Az 1. ábrán látható, hogy a vizsgált kukoricatételek gombaszennyezettségéért legnagyobb mértékben, mindhárom vizsgálati évben a *Fusarium* nemzetség tagjai a felelősek.

2011-ben a *Fusarium*ok részaránya közel 60% volt, melyek közül a legtöbb izolátum a *F. verticillioides* fajba tartozott, de előfordult *F. graminearum* és *F. proliferatum* is a mintákban.

Azonosítottunk több endofita *Sarocladium zae* (szinonim: *Acremonium zae*) izolátumot is. Ez a faj a mikotoxinogén *A. flavus* és *F. verticillioides* antagonistája, ez az első adat hazai előfordulásáról. Antimikrobiális aktivitás tesztekben a *Sarocladium zae* tenyészetekből származó pyrrocin tartalmú extraktumok gátló hatást gyakoroltak a fenti két patogén gombafajra. Más gombanemzetségek (pl. *Alternaria*, *Nigrospora*, *Daldinia*, *Epicoccum* és *Cladosporium*) is előfordultak a mintákban.



1. ábra. Mikotoxinogén gombák előfordulási gyakorisága hazai kukoricatételekben, 2011-2013



2. ábra. *Aspergillus flavus* (balra), és *Aspergillus niger* (középen) fertőzött kukoricaszemek és *Aspergillus ochraceus* (jobbra) által fertőzött rozs DRBC táptalajon

A 2012. év forró, száraz klímájának köszönhetően a szemek gombafertőzöttsége 9,16%-ra csökkent, viszont az izolált gombatenyészetek 16%-a az *Aspergillus* nemzetséghez tartozott. Ezek nagy része a potenciális aflatoxin termelő *A. flavus*, kisebb részarányú a potenciális patulin termelő *A. clavatus*. Ebben az évben hazánk déli területein igen komoly

problémát okozott a kukorica aflatoxin szennyezettsége, a RASFF gyorsvészjelző rendszerben év végén három bejelentés is érkezett magyarországi tej határérték feletti szennyezettségéről. Számos szakmai fórumon tartottunk ekkor beszámolót az OTKA támogatta kutatásainkról, az eredményekről és az aflatoxin szennyeződés megelőzési lehetőségeiről. A *Penicillium* nemzetség tagjai közül ebben az évben csak *P. oxalicum*-ot tudtuk mintáinkból kimutatni. A *Fusarium*-ok részaránya 68% volt, melyek közül a legtöbb izolátum a *F. verticillioides* fajba tartozott, de előfordult *F. graminearum* és *F. proliferatum* is a mintákban.

A 2013. évet a hőmérséklet és a csapadék mennyiségét tekintve is a kettőség jellemezte, kukoricatermő területekről származó minták között az elmúlt évhez hasonlóan találtunk aflatoxinnal szennyezett mintákat, és az átlagos gombaszennyezettség is magasabb volt (50,1%). Az izolált gombatörzsek 9,6%-a az *Aspergillus* nemzetségbe tartozott. Ezek jelentős része a potenciális aflatoxin termelő *A. flavus*, kisebb részarányú volt az *A. niger* és az *A. ochraceus* előfordulása. A *Penicillium* szennyezettség 4,6%-os volt, a *P. oxalicum* faj képviselői mellett *P. crustosum* és *P. brevicompactum* fordult elő a mintákban. A *Fusarium* fajok részaránya 46% volt, melyek közül a legtöbb izolátum a *F. verticillioides* fajba tartozott.

A **búzatételek** gombaszennyezettsége a szárazabb 2011-ben és 2012-ben is közel 45%-os volt, míg az egyéb fajok (árpa, zab, rozs, tritikálé) ehhez viszonyítva lényegesen alacsonyabb fertőzöttséget mutattak (14,15%). 2013-ban és 2014-ben, amikor a hőmérsékleti szélsőértékek nem voltak kiugróak, a csapadék mennyisége viszont az előző két évhez képest emelkedett, a búza és egyéb gabonafélék fertőzöttségi értéke átlagosan 85%-os volt.

2011-ben búzáról, árpáról, rozsról és tritikáléről számos *A. flavus* és *A. niger* törzset azonosítottunk, előfordulási gyakoriságuk átlagosan 3% volt.

Búzában és egyéb gabonaféléken *Aspergillus* szennyezettséget a 2012. évi mintákban nem tapasztaltunk. Az egyéb kalászos minták közül 2013-ban a dél-keleti régió zab és rozs mintáinak 4%-a volt *A. ochraceus* szennyezett (2. ábra), 2014-ben búzában az *A. flavus* előfordulási gyakorisága 0,4%-os volt. *Penicillium* szennyezettséget egyik vizsgálati évben sem detektáltunk.

### **Gabonatételek mikotoxin szennyezettsége**

A begyűjtött gabonatételek aflatoxin B1 (AFB1), fumonizin B1 (FB1) és B2 (FB2) és ochratoxin A szennyezettségét a Gabonakutató Nonprofit Kft. Analitikai Laboratóriumában, HPLC-MS módszerrel vizsgáltuk.

**Kukorica** esetében a 2011. évben, amikor az izolált gombatenyészeteken belül az *Aspergillus* izolátumok részaránya 8%-ot tett ki, kimutatható aflatoxin szennyezettséget nem találtunk (1. táblázat). 2012-ben 16%-os részarányánál a minták 6%-a volt pozitív (dél-dunántúli, dél-alföldi régió), az átlag AFB1 szennyezettség meghaladta az 5 µg/kg határérték feletti szintet. 2013-ban két termőhelyről (Csongrád és Fejér megye) származó minták esetében detektáltunk AFB1 szennyezettséget a határérték felett (egy kiszombori minta 31 µg/kg aflatoxin B<sub>2</sub>-t is tartalmazott). A termőhelyenkénti átlagos fumonizin szennyezettség mindhárom évben határérték (4mg/kg) alatti volt, annak ellenére, hogy a vizsgált kukoricatételek gombaszennyezettségéért legnagyobb mértékben a *Fusarium verticillioides* faj képviselői voltak a felelősek. Ochratoxin A jelenlétét a mintákban nem tudtuk kimutatni.

**1. Táblázat.** A vizsgált kukoricatételek aflatoxin B1, fumonizin B1+B2 és DON szennyezettsége 2011-2013 között

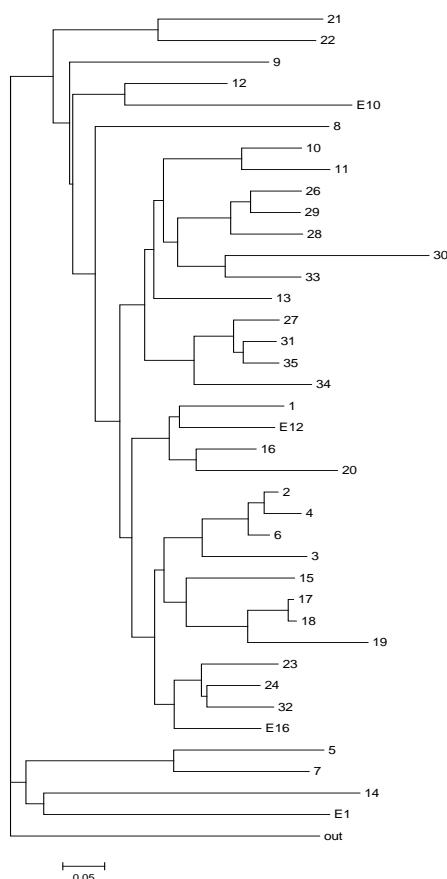
Mikotoxinok	2011			2012			2013		
	FB1+FB2 (mg/kg)	DON (mg/kg)	AFB1 (µg/kg)	FB1+FB2 (mg/kg)	DON (mg/kg)	AFB1 (µg/kg)	FB1+FB2 (mg/kg)	DON (mg/kg)	AFB1 (µg/kg)
Pozitív minták (%)	<b>20.00</b>	61.66	<b>0.00</b>	<b>47.91</b>	2.08	6.25	<b>69.70</b>	3.03	4.55
A legmagasabb szennyezettségi érték	<b>30.16</b>	1.60	<b>n.d.</b>	<b>8.51</b>	3.00	245.00	<b>34.49</b>	0.90	397.00
<i>Átlag</i>	<i>1.48</i>	<i>0.68</i>	<i>n.d.</i>	<i>0.47</i>	<i>0.06</i>	<i>6.48</i>	<i>1.51</i>	<i>0.02</i>	<i>9.03</i>
A pozitív minták átlag szennyezettsége	<b>7.39</b>	0.42	<b>n.d.</b>	<b>0.98</b>	3.00	103.16	<b>2.16</b>	0.45	198.66

A búza és az egyéb kalászos minták toxinvizsgálata során 2011-ben és 2013-ban detektáltunk fumonizin B1 és B2-t, két-két tétel tartalmazott határérték alatti mennyiséget. A mikológiai vizsgálatok során e mintákban azonosított *A. niger* törzsek felelősek lehetnek a kimutatott fumonizin szennyezésért. 2012-ben a búza tételek 8%-a volt AFB1 szennyezett, az átlag szennyezettség 0,76 µg/kg, annak ellenére, hogy a mintákból nem sikerült *A. flavus*-t azonosítanunk. Ochratoxin A jelenlétét ezekben a mintákban sem tudtuk kimutatni.

***Aspergillus* populációgenetikai vizsgálatok**

2011-ben kukoricáról, búzáról, árpáról, rozsról számos, az *A. niger* fajkomplexbé tartozó izolátumot azonosítottunk, ezek közül 48 *A. niger* izolátumot tartalmazó populáció genetikai variabilitását vizsgáltuk. Az UP-PCR adatokon alapuló törzsfán valamennyi izolátum különálló haplotípusba volt sorolható. A faj heterotallikus, tehát egy adott izolátum vagy az egyik, vagy a másik párosodási típus gént hordozza. Az *A. niger* izolátumok 74,5%-a a MAT1-2 idiomorfot hordozta. A párosodási típus gének aránytalan megoszlása a populációban arra utal, hogy a populáció klonális szerkezetű. Ennek megerősítésére vizsgáltuk a hazai *A. niger* populációk szerkezetét az UP-PCR adatok alapján az asszociációs index és a fahossz permutációs tesztekkel is, ez alapján a populáció szintén klonális szerkezetűnek bizonyult.

2012-ben a kukoricatermő területeken igen komoly problémát okozott a kukorica aflatoxin szennyezettsége. Kiszombori tenyészkertünkben származó természetes fertőzöttségű mintákból nagyszámú *A. flavus* törzset izoláltunk, közülük 38 izolátum genetikai variabilitását vizsgáltuk (3. ábra). Az UP-PCR adatok alapján elemeztük az *A. flavus* populáció szerkezetét az asszociációs index és fahossz permutációs tesztek alkalmazásával. Az *A. flavus* populáció esetében az asszociációs index 7,003 volt, ami szignifikánsan magasabb, mint 1000 rekombinálandó adatsor átlagos asszociációs indexe. A fahossz tesztek során az észlelt fahossz (408) szignifikánsan rövidebb, mint a rekombinálandó adatmátrixok átlagos fahossza (542).



A fenti két teszt eredménye alapján jelzett klonális populáció szerkezet arra utal, hogy ez a faj hazánkban elsősorban aszexuálisan szaporodik. Ezt támasztja alá a molekuláris vizsgálataink eredményei is. A párosodási típusok megoszlását molekuláris markerekkel vizsgáltuk. A kiszombori populáció tagjainak 100%-a a MAT1-1 idiomorfot hordozta, tehát a párosodási típusok aránya teljes mértékben eltolódott ebben a populációban.

Vizsgáltuk az *Aspergillus flavus* izolátumok aflatoxin termelő képességét is. Eredményeink alapján az izolátumok 23,7%-a termelt aflatoxin B<sub>1</sub>-et, egy izolátum pedig aflatoxin B<sub>2</sub>-t is. Egyik izolátum sem termelt G típusú aflatoxinokat, összhangban az irodalmi adatokkal, melyek szerint az *A. flavus* csak B típusú aflatoxinok bioszintézisére képes.

**3. ábra.** Az *Aspergillus flavus* izolátumok UP-PCR adatokon alapuló dendogramja

### **Kukoricahibridek rezisztenciaszintjének szántóföldi vizsgálata toxintermelő *Aspergillus* fajokkal szemben**

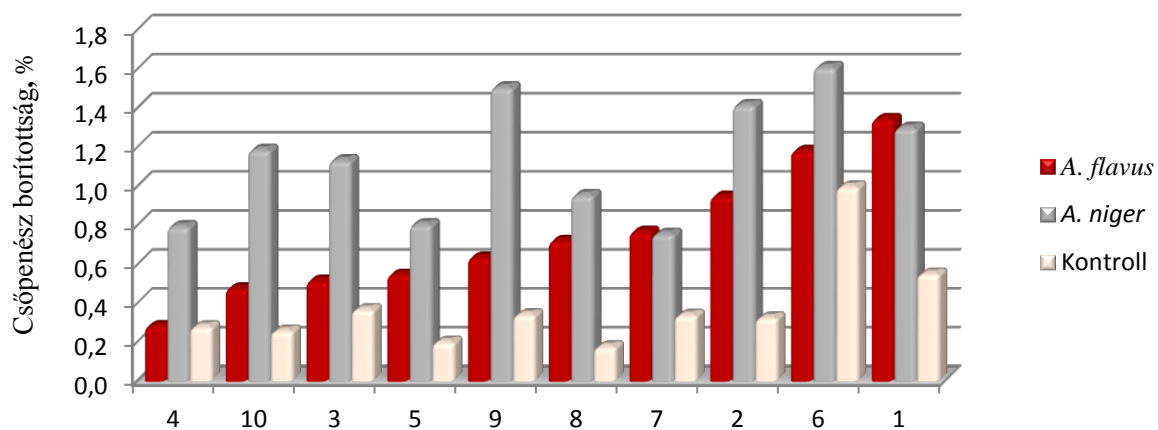
2012 és 2014 között kiszombori tenyészkertünkben tíz, a hazánkban legnagyobb vetésterületen termesztett kukorica hibrid rezisztenciaszintjét vizsgáltuk különböző *Aspergillus* fajokkal (*A. flavus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. clavatus*) szemben. A természetes fertőződés mértékének felmérésére három sort kontrollként használtunk. Mivel a rovarkár mindkét évben jelentős volt, így az általunk mesterségesen, fogvájóval fertőzött csöveken nagy százalékban független fertőzés is előfordult, emiatt külön értékeltük a csak mesterséges illetve a csak természetes úton létrejött fertőződéseket. A virágzás kori mesterséges inokulációs kísérletekben 2012-ben és 2013-ban is nagyon alacsonyok voltak a fertőzöttségi szintek: *A. flavus* fertőzés estében az átlag fertőzöttség 1,19% és 0,35%, *A. niger* esetében 1,74 és 0,31%, az *A. clavatus* esetében 0,61 és 0,30%, míg az *A. ochraceus* fertőzéseknél 0,29 és 0,20% volt a fertőzöttségi értékek átlaga.

2014 tavaszán ismét beállítottunk egy kísérletet, melyben már csak *A. flavus* és *A. niger* izolátumokkal fertőztük a hibrideket (4. ábra). Kísérleteinkben az átlagos *A. flavus* fertőzöttségi szint 0,66 %, az *A. niger* okozta átlagos fertőződés 1,37 % volt.



**4. ábra.** *Aspergillus flavus* (balra) és *A. niger* (jobbra) izolátumokkal mesterségesen inokulált kukoricacsövek

A hibridek *Aspergillus* fertőzöttségi adatait az 5. ábra mutatja be. A három éves kísérlet átlageredményei alapján a hibridek között többszörös, szignifikáns ellenállásbeli különbségeket kaptunk.



**5. ábra.** Kukorica hibridek (1-10) *Aspergillus* fajok 2-2 izolátumával szembeni ellenállósága, 2012-2014

Toxinvizsgálatok során az aflatoxinok, fumonizinek és ochratoxinok kimutatását LC/MS/MS módszerrel végzünk. A 2. táblázat a három ismétléses kísérlet toxinadatainak átlagértékeit mutatja be. 2014-ben a minták kimutatható mennyiségben nem tartalmaztak sem aflatoxinokat, sem ochratoxinokat.

Az első négy, a mesterséges inokulációs kísérletekben legjobb ellenállóságot mutató hibrid egyik évben sem tartalmazott kimutatható mennyiségben aflatoxin B<sub>1</sub>-et.

Az *A. ochraceus*-sal fertőzött mintákból ochratoxint csak 2012-ben, öt kukoricamintában tudtunk kimutatni. Mivel a kísérleti években jelentős volt a rovarkár, így a természetes *Fusarium verticillioides* és *F. graminearum* fertőzöttség miatt a kontrollok és a minták jelentős része is tartalmazott fumonizin B<sub>1</sub> és B<sub>2</sub>-t valamint DON-t.

Kísérleti eredményeink bizonyítják, hogy Magyarországon a köztermesztésben lévő hibridek között találhatóak jó *Aspergillus* ellenállóságú hibridek. A termesztés toxinszennyezési kockázatának csökkentése érdekében azonban a növényi betegség ellenállóság figyelembe vétele mellett fontos a növényvédelmi és agronómiai eszközök megfelelő alkalmazása is.

**2. táblázat.** A mesterségesen fertőzött kukoricaminták aflatoxin és ochratoxin szennyezettsége, 2012-2013.

Hibrid	2012		2013	
	AFB1+B2 (µg/kg)	OTA (µg/kg)	AFB1+B2 (µg/kg)	OTA (µg/kg)
1	27	0,1	n.d.	n.d.
2	395	0,1	3	n.d.
3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
5	n.d.	0,1	n.d.	n.d.
6	36	n.d.	41	n.d.
7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
8	65	n.d.	8	n.d.
9	10	n.d.	n.d.	n.d.
10	n.d.	6	n.d.	n.d.
	53	0,6	5	0

### Tárolási kísérletek

A gabonafélék tárolása során előfordul, hogy korábban egyéb célt (legtöbbször állattartási tevékenységet) szolgáló épületek szolgálnak magtárként, ahol számos esetben a legalapvetőbb feltételek sem biztosítottak a gabona minőségének megőrzéshez.

Ezt a tárolási módot modellezve helyeztünk el szántóföldről beérkezett, 40 különböző gabonamintát Szeged, Kecskés-telepen illetve Kiszomboron, zárt, fűtetlen raktárakban 2011 és 2013 között. Az 1-1 kg-os mintáknak meghatároztuk a gombaszennyezettségét, toxin-szennyezettségét és nedvességtartalmát. A minták mellé mindkét helyre Testo Mini adatgyűjtőt helyeztünk (hőmérséklet és páratartalom mérés). A tárolás hatásának kiértékeléséhez a mintákat január végén és júliusban gyűjtöttük be. A mintánként 50 felületsterilizált szemet szelektív táptalajra helyeztük, az izolált gombatörzseket morfológiailag meghatároztuk. A tisztatenyészetekből szelektált izolátumok fajszintű azonosítását megfelelő genomiális régióik szekvencia analízisével végeztük.

Kukoricaminták esetében a három hónapos tárolás után a minták gomba szennyezettsége 73%-kal nőtt, 8 hónap elteltével viszont a kiindulási szennyezettségnél csak 16 % -kal volt magasabb ez az érték. A 1,5%-os átlagos *Penicillium* szennyezettségi érték 3 hónap elteltével 9%-ra emelkedett, júliusra 1,3 %-ra csökkent. A betakarításkor meghatározott 8,27%-os *Aspergillus* szennyezettség kezdetben csökkent (1,73%), majd július hónapban 17,24%-os volt, tehát közel kétszeresére nőtt. A mikrobiológiai vizsgálat során új gombanemzetségek előfordulását nem tapasztaltuk. A toxinvizsgálat során kevesebb mintából tudtunk aflatoxint kimutatni, és gyakran a betárolt, aflatoxinnal szennyezett tétel nyolc hónap elteltével már nem tartalmazta ezt a toxint kimutatható mennyiségben.

További vizsgálatokat folytatunk annak megállapítására, hogy milyen egyéb mikrobiológiai vagy környezeti feltételek okozhatták az aflatoxin bomlását a mintákban. A tárolási kísérlet folytatását tervezzük nagyobb mennyiségű gabonaminták bevonásával és eltérő tárolástechnológiák (hűtve történő tárolás) vizsgálatával.