

Az aflatoxin képződése mezőgazdasági termékeken

Kovács Szilvia – Pusztahelyi Tünde – Borbélyné Varga Mária

Debreceni Egyetem Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar,

Agrárműszer Központ, Debrecen

kovacs.szilvia@agr.unideb.hu

ÖSSZEFOGLALÁS

Az aflatoxinok toxikusságuk miatt jelentős gazdasági és humán-egészségügyi kárt okoznak, ezért fontos, hogy kivédjük ezt a fajta szennyezettséget a mezőgazdasági termékekben. Eddig főként a trópusi, szubtrópusi eredetű élelmiszereken fordult elő jelentősebb aflatoxin szennyezés, mivel a termelő *Aspergillus*ok optimális növekedése 32–38 °C között van. Ugyanakkor napjainkban már Magyarországon is egyre aktuálisabb téma az aflatoxin szennyezés, az importcikk megjelenése, a növekvő átlaghőmérséklet, az éghajlatváltozás miatt. Jelentős ismeretekkel bírunk az aflatoxin termelés genetikai, környezeti tényezőivel kapcsolatban, a fertőzés kivédése mégis problémát jelent a gazdaság számára, mind a növénytermesztés, mind az állattenyésztés szempontjából. Ebben a munkában megkíséreltük röviden összefoglalni ismereteinket az aflatoxin termeléséről és a kivédési lehetőségekről.

Kulcsszavak: *Aspergillus*, aflatoxinok, ható tényezők, szabályozás

SUMMARY

Aflatoxins due to their toxicity pose significant economic and human health threat; therefore, it is important to avoid this type of contamination in agricultural products. Until now significant aflatoxin contamination occurred mainly in foods of tropical and subtropical origin because the optimal growth of the producer *Aspergillus* species is between 32–38 °C. Nowadays the aflatoxin contamination is becoming higher threat in Hungary, due to the imported products, the rising average temperature and the climatic changes. There is a significant knowledge on the genetic and environmental effectors of the aflatoxin production; however, it is remained a great problem to control mold contamination and toxin production in farming and stock-raising. Here we attempted to summarize the knowledge on aflatoxin production and attempts of the elimination.

Keywords: *Aspergillus*, aflatoxins, effectors, regulation.

BEVEZETÉS

A mikotoxinok kis molekulatömegű, penészgombák által termelt másodlagos anyagcseretermékek, amelyek a környezeti tényezőkkel szemben nagyon ellenállóak. Magas hőmérsékleten stabilak és rezisztensek a gyomor savas pH-jával szemben is, ezért toxikus hatásuk megmarad az állati szervezetekben. Az aflatoxinok a mezőgazdasági termékekben az egyik legjelentősebb és legmérgezőbb mikotoxinok. Több kémiai módosulatuk ismert, az aflatoxin B1, B2, G1, G2 a legjelentősebb, és amelyek közül az aflatoxin B1 a legtoxikusabb. Az aflatoxinnal szennyezett takarmány fogyasztása után a májban a kevésbé mérgező aflatoxin M1 képződik, ami kiválasztódik a tejbe. Hatásuk szerint az aflatoxinok immunszuppresszív, karcinogén, teratogén és mutagén hatásúak, ezért fontos az élelmiszerekben, takarmányokban történő vizsgálatuk. Az aflatoxinokat főként az *Aspergillus flavus* és *Aspergillus parasiticus* termeli (Mayer et al., 2003; Schmidt-Heydt et al., 2008), de egyéb *Aspergillus* és *Rhizopus* fajoknál is leírták a termelést (Erdogan, 2004; Cary et al., 2005; Varga et al., 2009). Sajnos a kutatók eddig semmilyen megfelelő hatékonyságú fungicid kezelést, illetve rezisztens kukorica fajtát nem tudtak kifejleszteni ellenük (Schmidt, 2013).

Az aflatoxinok kvalitatív és kvantitatív kimutatására legpontosabb és legmegbízhatóbb kémiai analitikai módszer a nagynyomású-folyadékromatográfia (HPLC). Ezen kívül széles körben alkalmazzák az antitest alapú kimutatási módszereket (pl. ELISA).

AZ AFLATOXIN TERMELÉSÉT MEGHATÁROZÓ GENETIKAI TÉNYEZŐK

A másodlagos anyagcseretermékek bioszintézisében résztvevő gének gyakran csoportosulnak egy génklaszterbe. Az *A. flavus*ban kb. 40 másodlagos metabolit termelésért felelős génklaszter van (Keller et al., 2005) és a legtöbb klaszter még ismeretlen metabolit kódol. Az *A. nidulans*ban a 60 kbp méretű szterigmatocisztin bioszintézis génklaszter 25 génterméket és így legalább 21 enzimátikus lépést kódol (Brown et al., 1996; Yu et al., 2004b). Az *A. flavus*ban és az *A. parasiticus*ban az aflatoxin bioszintézis génklaszter 75 kbp méretű (Yu et al., 2004a; Yu et al., 2004b).

Az aflatoxin egy poliketid típusú vegyület, ami több aromás gyűrűből épül fel. Szintézisét a poliketid szintáz A (PKSA) megaszintáz végzi, ami hat enzimet foglal magába. Első lépésben egy hexanoil-csoport és 7 malonil-CoA egyesül egy 20 szénatomos intermediterré, norsolorinsavvá. Majd ebből keletkezik több lépés során szterigmatocisztin, végül aflatoxin B1, amely B2-vé alakulhat, vagy pedig az B1-ből G1, majd G2 keletkezik (Ames és Tsai, 2009). A poliketid szintáz gén (*pksA*) expressziójára a BrlA (aszexuális fejlődést reguláló transzkripció faktor), a PacC (pH-függő regulációs transzkripció faktor), a CreA (szén katabolizmus represszor) és az AflR transzkripció faktor hat (Chang et al., 1995; Ehrlich et al., 2003; Pusztahelyi és Pócsi, 2013). Az *aflR* gén egy szekvencia specifikus DNS-kötő két-magvú cink fehérjét kódol, ami a legtöbb aflatoxin bioszintézisben résztvevő struktúrgén transz-

kripció aktivációjához szükséges (Payne et al., 1993; Woloshuk et al., 1994; Chang et al., 1993, 1995, 1999a,b; Yu et al., 1996; Flaherty és Payne, 1997; Ehrlich et al., 1998; Price et al., 2006). Az *A. nidulans*-ban és az *A. fumigatus*-ban is van *aflR* gén, de ezek génszekvenciájában eltérés van (Carbone et al., 2007). Az *A. flavus* génszekvenciájában hat gén expressziója független az *AflR* szabályozásától (Georgianna és Payne, 2009).

Fonális gombákban szoros kapcsolat van a másodlagos anyagcsere és a fejlődés között. A szignál transzdukciós útvonalak együttesen szabályozzák a konídium képződést és a szterigmatocisztin/aflatoxin szintézist (1. ábra). Ennek az útvonalnak a részei a sejtmembránban található receptorok, amelyek észlelik az extracelluláris jeleket, mint például fény, ionok, aminosavak, cukrok (1. táblázat), szteroidok, polipeptidok, zsírsavak jelenléte (Pierce et al., 2002).

A G proteinek GTP kötő fehérjék, amelyek a GPCR receptorok által közvetített extracelluláris jelek révén aktiválódnak. A G-protein jelátvitel a G proteín/cAMP (ciklikus AMP)/PKA (protein kináz A) jelátviteli útvonalon keresztül köti össze az aszexuális sporulációt és a szterigmatocisztin/aflatoxin bioszintézis szabályozását az *Aspergillus*-okban (1. ábra). A heterotrimer G proteín α alegységét a *fadA* kódolja (Yu et al., 1996). A FadA fehérje aktivációjával gátolódik a szterigmatocisztin képződés és az ivartalan konídium képződés az *A. nidulans*-ban; *A. flavus*-ban, illetve *A. parasiticus*-ban pedig az aflatoxin bioszintézise gátolódik (Hicks et al., 1997; McDonald et al., 2004). A FadA GTP-vel aktiválódik és aktiválja az adenilát cikláz enzimet, ami hatására cAMP keletkezik, és ez szabályozza a PkaA-t, ami viszont gátolja az *aflR* aktivitását (Hicks et al., 1997) (1. ábra). Az FlbA G-protein regulátor fehérje

gátolja a FadA-GTP keletkezését, és így közvetett módon aktiválja a PkaA-t (Yu et al., 1996; Hicks et al., 1997; Shimizu és Keller, 2001); ugyanakkor az *aflR*-t az FlbA cAMP és PkaA független módon is szabályozza (Shimizu et al., 2003). A PkaA az *aflR* gén expresszióját negatív transzkripció szabályozással, illetve az *AflR* fehérjét foszforilációs poszttranszkripció szabályozással inaktíválja (Shimizu és Keller, 2001; Shimizu et al., 2003). A PkaA alacsony expressziós szintje vagy túlermelése sem kedvez az aflatoxin termelésének (Shimizu et al., 2003). Ezzel szemben a FluG fehérjének az FlbA közvetítésével kedvező hatása van a szterigmatocisztin termelésre, és szükséges a konídium képződésben is (Lee és Adams, 1994a,b, 1996; Hicks et al., 1997; D'Souza et al., 2001). A BrlA szintén hatással van az aflatoxin képződésre (Ehrlich et al., 2003). A VeA (1. ábra) számos regulátor gén transzkripcióját szabályozza (pl. *brlA*, *aflR*) és a LaeA aktivációja révén irányítja az aflatoxin bioszintézist (Kato et al., 2003; Calvo, 2008), ugyanakkor a szexuális szaporodást is szabályozza (Kato et al., 2003). A LaeA egy protein metiltransferáz, ami fontos, de nem létfontosságú a szekunder metabolit képződéséhez (Bok et al., 2006). A VeA fitokromokkal van kölcsönhatásban, amelyek érzékelik a fényt: az *A. nidulans*-ban a vörös és fehér fény gátolja, a kék fény pedig stimulálja a mikotoxin bioszintézist (Purschwitz et al., 2008). A VeA, VelB és LaeA kölcsönhatások irányítják a fejlődést és a másodlagos anyagcsere-termékek képződését (Atoui et al., 2010). A LaeA pozitívan befolyásolja az *aflR* génexpresszióját, ugyanakkor az *AflR* és a PkaA negatívan szabályozza a LaeA expresszióját (Bok és Keller, 2004; Roze et al., 2007).

1. ábra: A szterigmatocisztin/aflatoxin szabályozásához kapcsolódó szignál transzdukciós szabályozó útvonalak

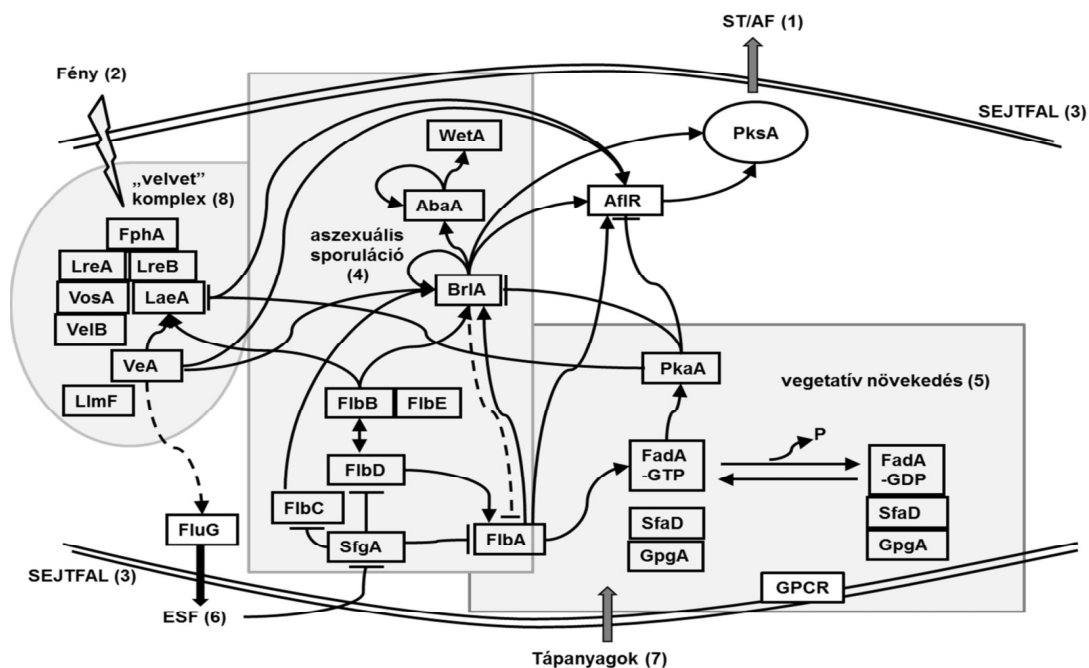


Figure 1: Signal transduction regulatory pathways associated with the ST/AF production

ST/AF – Sterigmatocystin/Aflatoxin(1), Light(2), Cell wall(3), Asexual sporulation(4), Vegetative growth(5), ESF – Extracellular factors(6), Nutrients(7), Velvet complex(8). Inhibition (closed lines) or stimulation (arrowheads) of gene expressions were shown as well as presumptive regulatory connections (dashed lines).

Az aflatoxin termelésre ható szerves, szervetlen és környezeti tényezők

Ható tényező(1)	Gátlás(2)	Stimuláció(3)	Irodalom(4)
Hőmérséklet(5)	<18 °C, >35 °C	28–30 °C	Mann et al. (1967), Schindler et al. (1967), Yazdanpanah et al. (2005)
Vízaktivitás(6)	0,85	0,96	Astoreca et al. (2012)
Glükóz(7)		15%	
Ribóz(8)		15%	
Xilóz(9)		15%	
Piruvát(10)	5%		Davis és Diener (1968)
Citrát(11)	8%		
Szukcinát(12)	6%		
α -Ketoglutarát(13)	4%		
Prolin(14)		↑	
Aszparagin(15)		↑	Payne és Hagler (1983)
Kazein(16)		↑	
Szerves nitrogén(17)		↑	
Nitrát(18)	↓		Kachholz és Demain (1983)
(NH ₄) ₂ SO ₄		↑	Payne és Hagler (1983)
Reaktív oxigén fajták(19)		↑	Huang et al. (2008)
Antioxidánsok(20)	↓		Jayashree és Subramanyam (2000), Mahoney és Molyneux (2004), Reverberi et al. (2008), Huang et al. (2008)
Zn ²⁺	>10 µg/ml	<10 µg/ml	
Mn ²⁺	>5 µg/ml	<10 µg/ml	
Fe ²⁺	>1 µg/ml	<1 µg/ml	
Cu ²⁺	1–25 µg/ml		Marsh et al. (1975)
Cd ²⁺	1–25 µg/ml		
Ag ⁺	0,2–5 µg/ml		
Cr ³⁺	>0,5 µg/ml	<0,5 µg/ml	
Pb ²⁺	>5 µg/ml		

Table 1: Effect of organic, inorganic and environmental factors on aflatoxin production

Effector(1), Inhibition(2), Stimulation(3), References(4), Temperature(5), Water activity(6), Glucose(7), Ribose(8), Xylose(9), Pyruvic acid(10), Citric acid(11), Succinic acid(12), α -Ketoglutaric acid(13), Proline(14), Asparagine(15), Casein(16), Organic nitrogen(17), Nitrate(18), Reactive Oxygen Species(19), Antioxidants(20)

AZ AFLATOXIN JELENLÉTE MEZŐGAZDASÁGI TERMÉKEKBEN

Az aflatoxin vegyületek földimogyoróban, dióban, gyapotmagban, mandulában, pisztáciában, fűszerekben, szárított gyümölcsökben, kukoricában, kukorica alapú takarmányokban fordulnak elő leggyakrabban. A kukorica aflatoxintartalmát a betakarítási idő, trágyázás, öntözés, a növény védekezési mechanizmusai, a siló nedvességtartalma és a tárolás befolyásolja. Az aflatoxin képződését ezen kívül a magok mechanikai sérülése is befolyásolja, mivel a sérült magokba könnyebben tudnak behatolni a gombák (Prandini et al., 2007). Az aflatoxin képződésének a monokultúrák alkalmazása és a rovarok okozta magkárosodás szintén kedvez. Megfelelő hibridek alkalmazásával, optimális vetési idővel és sűrűséggel, megfelelő szántás és trágyázás alkalmazásával azonban csökkenthető a szennyezettség. Ugyanakkor a magas nitrogén tartalmú trágyák használata elősegíti a gombák és rovarok elszaporodását és a növény károsodását (Munkvold, 2003). Az *Aspergillus spp.* betakarítás előtti fertőzése megelőzhető a vetéságy megfelelő előkészítésével, vetésforgó és megfelelő rovarölök használatával (Meeke és Kohl, 2002). A betakarítás után a szennyeződés megakadályozható a magok megfelelő tisztításával, hűtésével, szellőztetésével (Prandini et al., 2007). Fontos a takar-

mány nedvességtartalma: hosszú tárolás előtt a magokat szárítani kell. A silózásakor keletkező szerves savak csökkentik a gombák fejlődését és ezért a mikotoxin képződést (Prandini et al., 2007). Az alkoholos fermentáció (pl. sörgyártás) folyamata csökkenti az aflatoxin tartalmat (Burdaspal és Legarda, 2012), míg a tejsavas fermentáció nincs hatással az aflatoxin koncentrációra (Prandini et al., 2007). Az aflatoxin eliminálásának egyik lehetősége, amelyet Afrikában már vizsgálnak, hogy toxint nem képző *A. flavus* törzsekkel fertőzik a földeket, hogy a toxinogén törzsek ne tudjanak növekedni a növényeken. Mivel a növényekkel szembeni virulenciája az atoxinogén törzseknek ugyanakkora (Probst et al., 2011), mint az aflatoxin termelőknél, ezért ez használhatónak tűnik, bár a gazdálkodók számára ez a technológia nehezen elfogadható.

Az élelmiszerekben a penészgombák felhalmozódása és az aflatoxin termelés függ a hőmérséklettől, vízaktivitástól, pH-tól, a légkör összetételétől, a termelő fajoktól, de ezen kívül számos szerves és szervetlen vegyület befolyásolja (1. táblázat).

Az aflatoxin a tejbe közvetett szennyezéssel, a szarvasmarha aflatoxin tartalmú takarmány fogyasztásával jut. A szennyezett takarmány elfogyasztása után általában 2–3 nappal jelenik meg a tejben az aflatoxin M1 változata. Ha a szarvasmarha kevesebb, mint 40 µg/nap aflatoxin B1-et fogyaszt, akkor a tej M1 tar-

talma 0,05 µg/kg-nál kevesebb lesz. Azt, hogy az aflatoxin B1 hány százaléka jut a tejbe, számos tényező befolyásolja: nagy változatosságot tapasztaltak az egyedek között, de összefüggést mutat a tőgyfertőzéssel, illetve az ellés óta eltelt idővel is (Van Egmond, 1989; Prandini et al., 2007). A hőkezelésnek (pasztörizálás, sterilizálás), illetve az alacsony hőmérsékleten való tárolásnak nincs hatása a tejtermék aflatoxin M1 tartalmára. Ugyanakkor az aflatoxin M1 tartalomra hatással van, ha a tej koncentrációja változik (a tej szárazanyagtartalmára vonatkoztatva); pl. beszáritás esetén a toxin érzékenyebb lesz a külső környezeti destabilizáló tényezőkre. A tejszín vagy vajgyártásnál az aflatoxin M1 adszorbeálódik a kazein részecskékhez és csak

kisebb része megy át a tejszínbe, vajba. A sajtgyártásnál a lágy sajtok aflatoxin M1 tartalma háromszor, a kemény sajtoké átlagosan ötször nagyobb, mint a nyers tejé (Prandini, 2007).

Az aflatoxin M1 eliminálásának egyik lehetősége, ha előtt *Saccharomyces cerevisiae* élesztőt vagy tejsavbaktériumokat tesznek a sovány tejbe, ugyanis a *S. cerevisiae* és a *Lactobacillus* sejtek poliszacharid, illetve peptidoglikán sejtalkomponensei megkötik az aflatoxin M1-et (Corassin et al., 2012).

Jelenleg is folynak kutatásaink az *Aspergillus spp.* aflatoxinképző képességének és szabályozási folyamatainak vizsgálatára.

IRODALOM

- Ames, B. D.–Tsai, S. C. (2009): Structural enzymology of polyketide synthases. *Methods Enzymology*. 459: 17.
- Astoreca, G.–Vaamonde, A.–Dalcero, A. J.–Ramos, S. (2012): Modelling the effect of temperature and water activity of *Aspergillus flavus* isolates from corn. *International Journal of Food Microbiology*. 156: 60–67.
- Atoui, A.–Kastner, C.–Larey, C. M.–Thokala, R.–Etxebeste, O.–Espeso, E. A.–Fischer, R.–Calvo, A. M. (2010): Cross-talk between light and glucose regulation controls toxin production and morphogenesis in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology*. 47: 962–972.
- Bok, J. W.–Keller, N. P. (2004): LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus spp.* *Eukaryotic Cell*. 3: 527–535.
- Bok, J. W.–Hoffmeister, D.–Maggio-Hall, L. A.–Murillo, R.–Glasner, J. D.–Keller, N. P. (2006): Genomic mining for *Aspergillus* natural products. *Chemistry and Biology*. 13: 31–37.
- Brown, D. W.–Yu, J. H.–Kelkar, H. S.–Fernandes, M.–Nesbitt, T. C.–Keller, N. P.–Adams, T. H.–Leonard, T. J. (1996): Twenty-five coregulated transcripts define a sterigmatocystin gene cluster in *Aspergillus nidulans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93: 1418–1422.
- Burdaspal, P. A.–Legarda, T. M. (2012): Survey on aflatoxin in beer sold in Spain and other European countries. *World Mycotoxin Journal*. 6: 93–101.
- Calvo, A. M. (2008): The VeA regulatory system and its role in morphological and chemical development in fungi. *Fungal Genetics and Biology*. 45: 1053–1061.
- Carbone, I.–Ramirez-Prado, J. H.–Jakobek, J. L.–Horn, B. W. (2007): Gene duplication, modularity and adaptation in the evolution of the aflatoxin gene cluster. *BMC Evolutionary Biology*. 7: 111.
- Cary, J. W.–Klich, M. A.–Beltz, S. B. (2005): Characterization of aflatoxin-producing fungi outside of *Aspergillus* section Flavi. *Mycologia*. 97: 425–432.
- Chang, P. K.–Cary, J. W.–Bhatnagar, D.–Cleveland, T. E.–Bennett, J. W.–Linz, J. E.–Woloshuk, C. P.–Payne, G. A. (1993): Cloning of the *Aspergillus parasiticus* apa-2 gene associated with the regulation of aflatoxin biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology*. 59: 3273–3279.
- Chang, P. K.–Cary, J. W.–Yu, J.–Bhatnagar, D.–Cleveland, T. E. (1995): The *Aspergillus parasiticus* polyketide synthase gene *pksA*, a homolog of *Aspergillus nidulans* wA, is required for aflatoxin B1 biosynthesis. *Molecular Genetics and Genomics*. 248: 270–277.
- Chang, P. K.–Yu, J.–Bhatnagar, D.–Cleveland, T. E. (1999a): Repressor-AflR interaction modulates aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus*. *Mycopathologia*. 147: 105–112.
- Chang, P. K.–Yu, J.–Bhatnagar, D.–Cleveland, T. E. (1999b): The carboxy-terminal portion of the aflatoxin pathway regulatory protein AflR of *Aspergillus parasiticus* activates GAL1: *lacZ* gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 2508–2512.
- Corassin, C. H.–Bovo, F.–Rosim, R. E.–Oliveira, C. A. F. (2012): Efficiency of *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria strains to bind aflatoxin M1 in UHT skim milk. *Food Control*. 31: 80–83.
- Davis, N. D.–Diener, U. L. (1968): Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* from various carbon sources. *Applied and Environmental Microbiology*. 16: 158–159.
- D'Souza, C. A.–Lee, B. N.–Adams, T. H. (2001): Characterization of the role of the FluG protein in asexual development of *Aspergillus nidulans*. *Genetics*. 158: 1027–1036.
- Ehrlich, K. C.–Montalbano, B. G.–Bhatnagar, D.–Cleveland, T. (1998): Alteration of different domains in AflR affects aflatoxin pathway metabolism in *Aspergillus parasiticus* transformants. *Fungal Genetics and Biology*. 23: 279–287.
- Ehrlich, K. C.–Montalbano, B. G.–Cotty, P. J. (2003): Sequence comparison of aflR from different *Aspergillus* species provides evidence for variability in regulation of aflatoxin production. *Fungal Genetics and Biology*. 38: 63–74.
- Erdogan, A. (2004): The aflatoxin contamination of some pepper types sold in Turkey. *Chemosphere*. 56: 321–325.
- Flaherty, J. E.–Payne, G. A. (1997): Overexpression of aflR leads to upregulation of pathway gene transcription and increased aflatoxin production in *Aspergillus flavus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 3995–4000.
- Georgianna, D. R.–Payne, G. A. (2009): Genetic regulation of aflatoxin biosynthesis: From gene to genome. *Fungal Genetics and Biology*. 46: 113–125.
- Hicks, J. K.–Yu, J. H.–Keller, N. P.–Adams, T. H. (1997): *Aspergillus* sporulation and mycotoxin production both require inactivation of the FadA G α protein-dependent signaling pathway. *EMBO Journal*. 16: 4916–4923.
- Huang, J. Q.–Jiang, H. F.–Zhou, Y. Q.–Lei, Y.–Wang, S. Y.–Liao, B. S. (2008): Ethylene inhibited aflatoxin biosynthesis is due to oxidative stress alleviation and related to glutathione redox state changes in *Aspergillus flavus*. *International Journal of Food Microbiology*. 130: 17–21.
- Jayashree, T.–Subramanyam, C. (2000): Oxidative stress as a prerequisite for aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Free Radical Biology and Medicine*. 29: 981–985.
- Kachholz, T.–Demain, A. L. (1983): Nitrate repression of averufin and aflatoxin biosynthesis. *Journal of Natural Products*. 46: 499–506.

- Kato, N.–Brooks, W.–Calvo, A. M. (2003): The expression of sterigmatocystin and penicillin genes in *Aspergillus nidulans* is controlled by *veA*, a gene required for sexual development. *Eukaryotic Cell*. 2: 1178–1186.
- Keller, N. P.–Turner, G.–Bennett, J. W. (2005): Fungal secondary metabolism from biochemistry to genomics. *Nature Reviews Microbiology*. 3: 937–947.
- Lee, B. N.–Adams, T. H. (1994a): The *Aspergillus nidulans fluG* gene is required for production of an extracellular developmental signal and is related to prokaryotic glutamine synthetase I. *Genes and Development*. 8: 641–651.
- Lee, B. N.–Adams, T. H. (1994b): Overexpression of *flbA*, an early regulator of *Aspergillus* asexual sporulation leads to activation of *brlA* and premature initiation of development. *Molecular Microbiology*. 14: 323–334.
- Lee, B. N.–Adams, T. H. (1996): The *fluG* and *flbA* function interdependently to initiate conidiophore development in *Aspergillus nidulans* through *brlA* activation. *EMBO Journal*. 15: 299–309.
- Mahoney, N.–Molyneux, R. J. (2004): Phytochemical inhibition of aflatoxigenicity in *Aspergillus flavus* by constituents of walnut (*Juglans regia*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52: 1882–1889.
- Mann, G. E.–Codifer, L. P.–Dellea, F. G. (1967): Effect of heat on aflatoxin in oil seed meals. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 15: 1090–1092.
- Marsh, P. B.–Simpson, M. E.–Trucksess, M. W. (1975): Effects of trace metals on the production of aflatoxins by *Aspergillus parasiticus*. *Journal of Applied Microbiology*. 30: 52–57.
- Mayer, Z.–Färber, P.–Geisen, R. (2003): Monitoring the production of aflatoxin B1 in wheat by measuring the concentration of nor-1 mRNA. *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 1154–1158.
- McDonald, T.–Devi, T.–Shimizu, K.–Sim, S. C.–Keller, N. P. (2004): Signaling events connecting mycotoxin biosynthesis and sporulation in *Aspergillus* and *Fusarium* spp. [In: Yoshizawa, T. (ed.) *New Horizon of Mycotoxicology for Assuring Food Safety*.] Takamatsu: Bookish Co. 139–147.
- Meekes, E. T. M.–Kohl, J. (2002): Risk factors in *Fusarium* head blight epidemics. [In: Scholten, O. E. et al. (eds.) *Food safety of cereals: A chain-wide approach to reduce Fusarium Mycotoxins*.] FAIR-CT98-4094 EU Commission.
- Munkvold, G. P. (2003): Cultural and genetic approaches to managing mycotoxins in maize. *Annual Review of Phytopathology*. 41: 99–116.
- Payne, G. A.–Hagler, Jr. W. M. (1983): Effect of specific amino acids on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus* in defined media. *Applied and Environmental Microbiology*. 46: 805–812.
- Payne, G. A.–Nystrom, G. J.–Bhatnagar, D.–Cleveland, T. E.–Woloshuk, C. P. (1993): Cloning of the *afI2* gene involved in aflatoxin biosynthesis from *Aspergillus flavus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 59: 156–162.
- Pierce, K. L.–Premont, R. T.–Lefkowitz, R. J. (2002): Seven transmembrane receptors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 3: 639–650.
- Prandini, G.–Tansini, S.–Sigolo, L.–Filippi, M.–Laporta, G. (2007): On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. *Food and Chemical Toxicology*. 47: 984–991.
- Price, M. S.–Yu, J.–Niernan, W. C.–Kim, H. S.–Pritchard, B.–Jacobus, C. A.–Bhatnagar, D.–Cleveland, T. E.–Payne, G. A. (2006): The aflatoxin pathway regulator AflR induces gene transcription inside and outside of the aflatoxin biosynthetic cluster. *FEMS Microbiology Letters*. 255: 275–279.
- Probst, C.–Bandyopadhyay, R.–Price, L. E.–Cotty, P. J. (2011): Identification of atoxigenic *Aspergillus flavus* isolates to reduce aflatoxin contamination of maize in Kenya. *Plant Disease*. 95: 212–218.
- Purschwitz, J.–Müller, S.–Kastner, C.–Schöser, M.–Haas, H.–Espeso, E. A.–Atoui, A.–Calvo, A. M.–Fisher, R. (2008): Functional and physical interaction of blue- and red-light sensors in *Aspergillus nidulans*. *Current Biology*. 18: 255–259.
- Pusztahelyi, T.–Pócsi, I. (2013): Functions, cooperation and interplays of the vegetative growth signaling pathway in the aspergilli. *Journal of Mycology*. Paper 83252: 11.
- Reverberi, M.–Zjalic, S.–Ricelli, A.–Punelli, F.–Camera, E.–Fabbri, C.–Picardo, M.–Fanelli, C.–Fabbri, A. A. (2008): Modulation of antioxidant defense in *Aspergillus parasiticus* is involved in aflatoxin biosynthesis: a role for *ApyapA* gene. *Eukaryotic Cell*. 25: 25–30.
- Roze, L. V.–Arthur, A. E.–Hong, S. Y.–Chanda, A.–Linz, J. E. (2007): The initiation and pattern of spread of histone H4 acetylation parallel the order of transcriptional activation of genes in the aflatoxin cluster. *Molecular Microbiology*. 66: 713–726.
- Schindler, A. F.–Palmer, J. G.–Eisenberg, W. V. (1967): Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* as related to various temperatures. *Journal of Applied Microbiology*. 15: 1006–1009.
- Schmidt, C. W. (2013): Breaking the mold: new strategies for fighting aflatoxins. *Environmental Health Perspectives*. 121: A270–A275.
- Schmidt-Heydt, M.–Magan, N.–Geisen, R. (2008): Stress induction of mycotoxin biosynthesis genes by abiotic factors. *FEMS Microbiology Letters*. 284: 142–149.
- Shimizu, K.–Keller, N. P. (2001): Genetic involvement of a cAMP dependent protein kinase in a G protein signaling pathway regulating morphological and chemical transitions in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*. 157: 591–600.
- Shimizu, K.–Hicks, J. K.–Huang, T. P.–Keller, N. P. (2003): Pka, Ras and RGS protein interactions regulate activity of AflR, a Zn(II)2Cys6 transcription factor in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*. 165: 1095–1104.
- Van Egmond, H. P. (1989): Aflatoxin M1: occurrence, toxicity, regulation. [In: Van Egmond, H. P. (ed.) *Mycotoxins in dairy products*.] Elsevier Applied Science. 11–55.
- Varga, J.–Frisvad, J. C.–Samson, R. A. (2009): A reappraisal of fungi producing aflatoxins. *World Mycotoxin Journal*. 2: 263–277.
- Woloshuk, C. P.–Foutz, K. R.–Brewer, J. F.–Bhatnagar, D.–Cleveland, T. E.–Payne, G. A. (1994): Molecular characterization of *afIR*, a regulatory locus for aflatoxin biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology*. 60: 2408–2414.
- Yazdanpanah, H.–Mohammadi, T.–Abouhossain, G.–Majid Cheraghali, A. (2005): Effect of roasting on degradation of aflatoxins in contaminated pistachio nuts. *Food and Chemical Toxicology*. 43: 1135–1139.
- Yu, J. H.–Butchko, R. A. E.–Fernandes, M.–Keller, N. P.–Leonard, T. J.–Adams, T. H. (1996): Conservation of structure and function of the aflatoxin regulatory gene *afIR* from *Aspergillus nidulans* and *A. flavus*. *Current Genetics*. 29: 549–555.
- Yu, J.–Bhatnagar, D.–Cleveland, T. D. (2004a): Completed sequence of aflatoxin pathway gene cluster in *Aspergillus parasiticus*. *FEBS Letters*. 564: 126–130.
- Yu, J.–Chang, P. K.–Ehrlich, K. C.–Cary, J. W.–Bhatnagar, D.–Cleveland, T. E.–Payne, G. A.–Linz, J. E.–Woloshuk, C. P.–Bennett, J. W. (2004b): Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology*. 70: 1253–1262.

