

## Az alternatív oxidáz, mint lehetséges marker a *Botrytis cinerea* filogenetikai vizsgálatában

Szojka Anikó – Sándor Erzsébet

Debreceni Egyetem Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar,  
Élelmiszertudományi Intézet, Debrecen  
aniko.szojka@gmail.com

### ÖSSZEFOGLALÁS

A *Botrytis cinerea* (teleomorf: *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel) képes számos, gazdasági szempontból jelentős növényt megtámadni és azokon a szürkerothadást kiváltani. A *Botrytis cinerea* fajkomplex két rejtett fajt foglal magába (*B. cinerea* és *B. pseudocinerea*), melyek eltérő módon tolerálják a különböző fungicideket. A két testvérfajt nagyon nehéz megkülönböztetni klasszikus rendszertani kritériumok alapján, ezért elkülönítésük molekuláris módszerrel történik, mely több marker vizsgálatán alapszik és rendkívül időigényes. Célunk az volt, hogy egy olyan specifikus markert keressünk, amely alkalmas a két faj elkülönítésére. A cianid rezisztens alternatív oxidáz enzimet kódoló gén nukleotid szekvenciáit tesztelve a vizsgált *B. cinerea* és *B. pseudocinerea* törzsek egyértelműen elkülöníthetőek voltak. Továbbá az enzim fehérjeszekvenciáinak „maximum likelihood” módszerrel történt elemzése jól tükrözte a gombák rendszertani kapcsolatait.

**Kulcsszavak:** *Botrytis cinerea*, *Botrytis pseudocinerea*, alternatív oxidáz

### SUMMARY

*Botrytis cinerea* (teleomorph *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel) is able to attack several economically important plants causing gray rot. *Botrytis cinerea* species complex includes two cryptic species (*B. cinerea* and *B. pseudocinerea*) that tolerate fungicides differently. On the basis of classical taxonomic markers, the two related species are very difficult to be distinguished; therefore, their separation is usually performed using molecular methods based on the time-consuming molecular analysis of several markers. Our goal was to find markers, which are suitable for the differentiation. Testing the nucleotide sequences of the alternative oxidase encoding gene, *B. cinerea* and *B. pseudocinerea* strains were clearly differentiated. Moreover, the analysis of the protein sequences of the enzyme with the maximum likelihood method reflected well the taxonomic relationships of the different fungi.

**Keywords:** *Botrytis cinerea*, *Botrytis pseudocinerea*, alternative oxidase

### BEVEZETÉS

A legtöbb eukarióta mitokondrium elágazó légzési láncsal rendelkezik. Az alternatív útvonalak nem tesznek lehetővé nagy mennyiségű ATP szintézist, tehát nem energia megőrző ágai a légzési elektrontranszport láncnak. Ezek közül kiemelkedő az alternatív cianid-rezisztens légzés, melynek kulcsenzime az alternatív oxidáz (AOX) (McDonald és Vanlerberghe, 2005). Az AOX egy terminális kinon oxidáz, melynek expressziója gyakran megnő biotikus és abiotikus stressz hatására és szerepet játszik az élőlények különböző körülményekhez való alkalmazkodásában (Juszczuk és Rychter, 2003; Borecky et al., 2006; Castro-Guerrero et al., 2008). Valószínűleg az AOX egyfajta rugalmasságot biztosít a légzési elektrontranszport láncnak, ami előnyös a gyakori stressznek kitett, különösképpen a citokróm reakcióút hatékonyságát korlátozó feltételek közt élő organizmusok számára (McDonald, 2008). Az AOX rezisztens több olyan vegyületre, melyek gátolják a citokróm oxidázt (komplex IV), vagy a komplex III-at. Ilyen inhibitorok például a szulfid (Azcón-Bieto et al., 1989), a kadmium (Castro-Guerrero et al., 2008), a nitrogén-oxid (Huang et al., 2002), az azid (Baurain et al., 2003), az antimycin A (Chae et al., 2007) vagy a myxothiazol (Cournac et al., 2002). Az AOX képes a légzési elektrontranszport lánc túlredukálódását is megelőzni és ezáltal csökkenti a reaktív oxigénradikálok (ROS) képződésének valószínűségét (Maxwell et al., 1999; Møller, 2001).

A nekrotrof *Botrytis cinerea* (teleomorf *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel) a szürkerothadás nevű betegség kórokozója, mely több mint kétszáz, gazdasági szempontból fontos növényt képes megtámadni. Elsőként 1997-ben Giraud és munkatársai fedezték fel, hogy a Champagne régióból (Franciaország) származó törzsek függetlenül a kolonizált szőlőnövény fajtájától, a megtámadott szervtől vagy a begyűjtés idejétől, eltérő mértékben hordoznak a genomjukban bizonyos transzpozon elemeket (Boty, Flipper). Ezeknek megfelelően két rejtett, vagy testvérfajt véltek felfedezni, és transposa névvel illették a transzpozon elemeket hordozó törzseket, míg a transzpozonokkal nem rendelkezők *vacua* elnevezést kaptak. Később, további 15marker (PCR-RFLP, transzpozon elemek, fungicid rezisztencia) és 21 különböző gazdanövényről származó izolátum bevonása után a *B. cinerea*-t, mint testvérfajok komplexét említik. Emellett észlelték, hogy a testvérfajok eltérő mértékű fungicid rezisztenciát mutatnak, valamint különbségek lehettek fel a patogenitásukban is (Giraud et al., 2008). A két csoportot rendkívül nehéz klasszikus rendszertani módszerekkel megkülönböztetni, elkülönítésük csak molekuláris markerek felhasználásával lehetséges.

Fournier et al. (2002) kilenc mikroszatellit szekvenciát azonosítottak (Bc1, Bc2, Bc3, Bc4, Bc5, Bc6, Bc7, Bc8, Bc9-10) és kereszt-amplifikációs, valamint polimorfizmus vizsgálatok alapján a *B. cinerea* törzseket két csoportba sorolták: I. csoport (*B. pseudocinerea*) és II. csoport (*B. cinerea sensu stricto*). Majd egy újabb

populációs marker, a *Bc-hch* gén polimorfizmusának vizsgálatát is bevezették (Fournier et al., 2003). Ahmed és Hamada (2005) a *Bc-hch* gén RFLP analízise segítségével különítették el az I. és II. csoportba tartozó *B. cinerea* izolátumokat. Az I. csoport izolátumainál a legnagyobb fragmentum 601 bp nagyságú, míg a II. csoport izolátumainál 517 bp nagyságú volt. Az eltérés abból adódik, hogy a II. csoport *Bc-hch* amplikonja öt (119, 274, 283, 367, 884 pozíciókban), míg az I. csoporté csak négy (mivel a 367 pozícióban mutáció található) restriktions helyet tartalmaz. Ezért az I. csoport emésztett fragmentumainak nagysága 601, 287, 155, 119, 84 bp, a II. csoporté pedig 517, 287, 155, 119 és 84 bp.

Jelenleg a *B. cinerea* fajkomplexnek tekinthető, mely több lókusz ( $\beta$ -tubulin, *Bc-hch*, Cyp51, 63R) vizsgálati eredményei alapján két rejtett (cryptic) faj foglal magába (Fournier et al., 2005). Különbségek figyelhetők meg a két csoport fenológiájában: az I. csoport tavasszal, míg a II. csoport tavasszal és ősszel egyaránt megtalálható a szőlőn. Az I. csoportba tartozó *B. cinerea* esetében szűkebb gazdanövény kört találtak, mint a II. csoport tagjainál. Az I. csoportba tartozó gombák természetes rezisztenciát mutattak a hidroxianilidek közé tartozó fenhexamiddal szemben.

A *B. cinerea* elleni védekezés főként kemikáliákkal történik. A quinol oxidáz gátlók (QoI-k) talán a leghatékonyabb, mezőgazdaságban alkalmazott fungicid család. Fontos szerepet töltenek be számos növényi fertőzéssel szembeni védekezésben. A citokróm bcI enzim komplexhez kötődve megakadályozzák az elektronáramlást a citokróm b és a citokróm cI között, így gátolják a mitokondriális légzést és ezáltal az ATP szintézist (Bartlett et al., 2002). Az ellenük kialakult rezisztencia hátterében két mechanizmus áll. Az egyik a citokróm b gén (*cytb*) pontmutációja: egyetlen glicin alaninra történő szubsztitúciója a 143-as kodonpozícióban (G143A) nagyfokú rezisztenciához vezet (Gisi et al., 2002). Mérsékelt, megfelelő dózisu fungicid kezeléssel még kontrollálható rezisztenciához vezető pontmutációkat is leírtak: egy fenilalanin változása leucinra a 129-es kodonon (F129L) (Gisi et al., 2002), valamint a 137-es glicin szubsztitúciója argininre (G137A) (Sierotzki et al., 2006). A másik rezisztencia mechanizmus szerint az alternatív, cianid rezisztens légzésben az AOX elkerüli a gátlás helyét, mivel a III. és IV. légzési komplexet átugorja. Szabadföldi körülmények közt azonban nem képes ellensúlyozni a QoI fungicidek hatását, mivel nem rendelkezik protonpumpa aktivitással, így a nagy energiát igénylő, és a növény kolonizációjában kritikus szerepet játszó folyamatok, mint a spóracsírázás és a gazdanövénybe való behatolás nem lehetséges. Ezen kívül a növényekben a fertőzés hatására antioxidánsok szabadulnak fel, melyek kioltják a QoI fungicidek hatására keletkező, az AOX-ot kódoló gén indukálásához nélkülözhetetlen reaktív oxigén csoportokat (Wood et al., 2003).

Célunk az volt, hogy megvizsgáljuk: (i) található-e különbség a *B. cinerea* fajkomplexben belül az I. csoport (*B. pseudocinerea*) és a II. csoport (*B. cinerea sensu stricto*) AOX-ot kódoló DNS szakasz szekvenciájában, illetve (ii) alkalmas-e az AOX szekvenciája, illetve annak egy része a két rejtett faj elkülönítésére.

## ANYAG ÉS MÓDSZER

### Törzsek és törzsfenntartás

A B05.10 izolátum benomilos kezelés után szőlőről (*Vitis vinifera*) izolált és deponált (Büttner et al., 1994; Quidde et al., 1998), feltehetőleg haploid törzs.

A T4 egy üvegházi paradicsom növényről származó izolátumból (Levis et al., 1997) származtatott törzs. Mindkét törzs teljes genomszekvenciája ismert (Amselem et al., 2011). A szekvenciák elérhetők: B05.10 (*Botrytis cinerea* Sequencing Project, Broad Institute of Harvard and MIT; [http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/botrytis\\_cinerea/MultiHome.html](http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/botrytis_cinerea/MultiHome.html); Staats és van Kan 2012), T4 (*Botrytis cinerea* genome project, URGI, Genoscope; <http://urgi.versailles.inra.fr/Species/Botrytis>).

A további megemlélt *Botrytis* törzsek a Debreceni Egyetem TTK Biomérnöki Tanszékének, valamint a MEK Élelmiszertudományi Intézetének közös tulajdonát képező törzsgyűjteményéből származó, I-es (8001, 8002, 8003, 8004, 8005, 8006, 8007, 8008, 8029, 8030, 8031, 8032, 8047) és II-es (8022, 8061, 9001, 9043, 9090) csoportokba tartozó törzsek. Fenntartásuk burgonya-dextróz (Biolab) táptalajon történt (PDA: 4 g/l burgonya kivonat, 20 g/l dextróz, pH 5,1).

### DNS izolálás, felszaporítás, tisztítás

A DNS-t PDA-n növesztett, kétnapos tenyészet micéliumából nyertük ki. A sejtek feltárását MagNa Lysér (Roche) készülékkel végeztük. Az extrakció Nucleo Spin®-Plant II (Macherey-Nagel) kit-el történt a gyártó utasítása szerint.

A polimeráz láncreakcióhoz (PCR) szükséges aox oligonukleotid primerpárt Gene Runner 3.05 (Hastings Software Inc. Hastings, NY, USA; <http://www.generunner.com>) programmal terveztük a National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) adatbázisban elérhető *Botrytis fückeliana* T4 SuperContig (FQ790291) szekvencia felhasználásával. A forward BcAOX-F: TCACATCA-CATCAACTCAG és a reverse BcAOX-R: CTAAATA ACCTCATCCCTC oligonukleotid primereket az IBA GmbH – Solutions For Life Sciences (Göttingen, Németország) cég gyártotta le.

A gén PCR-es felszaporítását 25  $\mu$ l térfogatban végeztük, melyben 12,5  $\mu$ l 2 $\times$  GoTaq® Green Master Mix (Promega), 10,5  $\mu$ l nukleáz mentes víz, 1  $\mu$ l genomi DNS, és 0,5–0,5  $\mu$ l forward és reverz primer (10 pmol/ $\mu$ l) volt. A reakciók inkubációs programját MyGenie 96 Gradient Thermal Block (Bioneer) PCR készülékben futtatuk: 1 $\times$ [első denaturáció: 95 °C, 5 perc], 5 $\times$ [denaturáció: 95 °C, 1 perc; anelláció: 50 °C, 1 perc; polimerizáció: 72 °C, 1 perc 30 másodperc], 30 $\times$ [denaturáció: 90 °C, 1 perc; anelláció: 50 °C, 1 perc; polimerizáció: 72 °C, 1 perc 30 másodperc], 1 $\times$ [végső polimerizáció: 72 °C, 15 perc].

Az amplifikációt agaróz gélelektroforézis segítségével ellenőriztük: 1% agaróz (Bioline), 1 $\times$ TAE puffer (AccuGene), 70V. A PCR termékek koncentrációjának meghatározása NanoDrop 2000 (ThermoScientific) spektrofotométerrel történt.

A fragmentek tisztítását NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) kit-el végeztük a gyártó utasítása szerint.

#### A DNS fragmentek szekvenciáinak meghatározása

A tisztított PCR termékek szekvenciájának meghatározását a Microsynth Austria GmbH Sequencing Service (Bécs, Ausztria) végezte Sanger-féle módszer segítségével. A beküldött minták a cég követelményeinek megfelelően kerültek összeállításra: (2 pmol/μl primer+100 bázispáronként 1,5 ng/μl DNS) 1265 bázis esetén 285 ng DNS-t tartalmazó minta+3 μl forward primer 15 μl végtérfojtóban.

#### Az alternatív oxidáz szekvenciák illesztése és filogenetikai elemzése

A *Botrytis cinerea* és *B. pseudocinerea* szekvenciák ellenőrzését Chromas Lite 2.1.1 (Technelysium Pty Ltd, Ausztria; <http://www.technelysium.com.au/>), illesztésüket ClustalX 2.1 (Thompson et al., 1997) és GeneDoc 2.7.0 (Nicholas et al., 1997) szoftverekkel végeztük.

A gomba alternatív oxidáz enzimek filogenetikai vizsgálatához felhasznált fehérjeszekvenciákat BLAST program segítségével gyűjtöttük a National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) adatbázisban deponált szekvenciák közül: *Ajellomyces capsulatus* (EEH11461.1, EGC46440.1, Q9Y711.1, XP\_001541623.1), *Ajellomyces dermatitidis* (XP\_002623988.1), *Arthrotrichum oligospora* (EGX48333.1), *Arthroderma benhamiae* (XP\_003016707.1), *Arthroderma gypseum* (XP\_003174543.1), *Arthroderma otae* (XP\_002847008.1), *Aspergillus clavatus* (XP\_001272693.1, XP\_001273620.1), *Aspergillus flavus* (XP\_002377300.1), *Aspergillus fumigatus* (XP\_749637.1), *Aspergillus kawachii* (GAA83790.1), *Aspergillus nidulans* (EMENI\_Q9P959.2, XP\_659703.1), *Aspergillus niger* (EHA19643.1, O74180.2, XP\_001394472.1, XP\_003188816.1), *Aspergillus oryzae* (BAE64585.1, EIT74348.1, XP\_001819511.1), *Aspergillus terreus* (XP\_001215177.1, XP\_001216061.1), *Baudoinia compniacensis* (EMC96090.1), *Beauveria bassiana* (EJP63955.1), *Blumeria graminis* (Q8X1N9.1), *Botryotinia fuckeliana* (CCD48110.1), *Botryotinia fuckeliana* B05.10 (XP\_001556179.1), *Botryotinia fuckeliana* BOTFU (Q8NJ59.1), *Chaetomium globosum* (XP\_001224246.1), *Coccidioides immitis* (XP\_001247280.1), *Coccidioides posadasii* (XP\_003066085.1), *Cochliobolus heterostrophus* (EMD94986.1), *Cochliobolus sativus* (EMD66258.1), *Colletotrichum gloeosporioides* (ELA23528.1), *Dothistroma septosporum* (EME42443.1), *Emericella nidulans* (AAN39883.1), *Exophiala dermatitidis* (EHY58134.1), *Fusarium oxysporum* (EGU73992.1, EGU89319.1, EGU89342.1), *Fusarium pseudograminearum* (EKJ76470.1), *Gaeumannomyces graminis* (EJT73094.1), *Gelasinospora* sp. (Q8J1Z2.1), *Geomyces destructans* (ELR03173.1), *Gibberella zeae* (XP\_381518.1), *Glomerella graminicola* (EFQ28793.1), *Leptosphaeria maculans* (XP\_003837720.1), *Macrophomina phaseolina*

(EKG17769.1), *Magnaporthe oryzae* (ELQ38976.1, XP\_003712663.1), *Marssonina brunnea* (EKD15584.1), *Metarhizium acridum* (EFY89413.1), *Metarhizium anisopliae* (EFZ03151.1), *Microdochium nivale* (BAI44020.1), *Monascus ruber* (ACY56340.1), *Monilinia fructicola* (Q96UR9.1), *Myceliophthora thermophila* (XP\_003660860.1), *Mycosphaerella populorum* (EMF12844.1), *Nectria haematococca* (XP\_003053363.1), *Neosartorya fischeri* (XP\_001260128.1), *Neurospora crassa* (Q01355.1, XP\_962086.1), *Neurospora tetrasperma* (EGO58795.1), *Paecilomyces* sp. (ACJ71742.1), *Paracoccidioides brasiliensis* (EEH19342.1, EEH47663.1), *Paracoccidioides* sp. (XP\_002797219.1), *Penicillium chrysogenum* (AAR08189.1, XP\_002557865.1, XP\_002562471.1), *Penicillium digitatum* (EKV16227.1), *Phaeosphaeria nodorum* (XP\_001793620.1), *Podospora anserina* (XP\_001903441.1), *Pseudocercospora fijiensis* (EME81280.1), *Pyrenophora teres* (XP\_003295728.1), *Pyrenophora tritici-repentis* (XP\_001941938.1), *Sclerotinia sclerotiorum* (XP\_001596660.1), *Talaromyces marneffei* (XP\_002144622.1), *Talaromyces stipitatus* (XP\_002340904.1), *Thielavia terrestris* (XP\_003653558.1), *Trichoderma atroviride* (EHK50085.1), *Trichoderma reesei* (EGR50555.1), *Trichoderma virens* (EHK16393.1), *Trichophyton rubrum* (XP\_003236294.1), *Trichophyton tonsurans* (EGD95380.1), *Trichophyton verrucosum* (XP\_003022769.1), *Tuber melanosporum* (XP\_002839033.1), *Uncinocarpus reesii* (XP\_002541480.1), *Venturia inaequalis* (AAK61349.1), *Venturia inaequalis* (Q9P429.1), *Verticillium dahliae* (EGY21769.1), *Yarrowia lipolytica* (AAQ08896.1, XP\_502637.1), *Zymoseptoria tritici* (XP\_003851917.1).

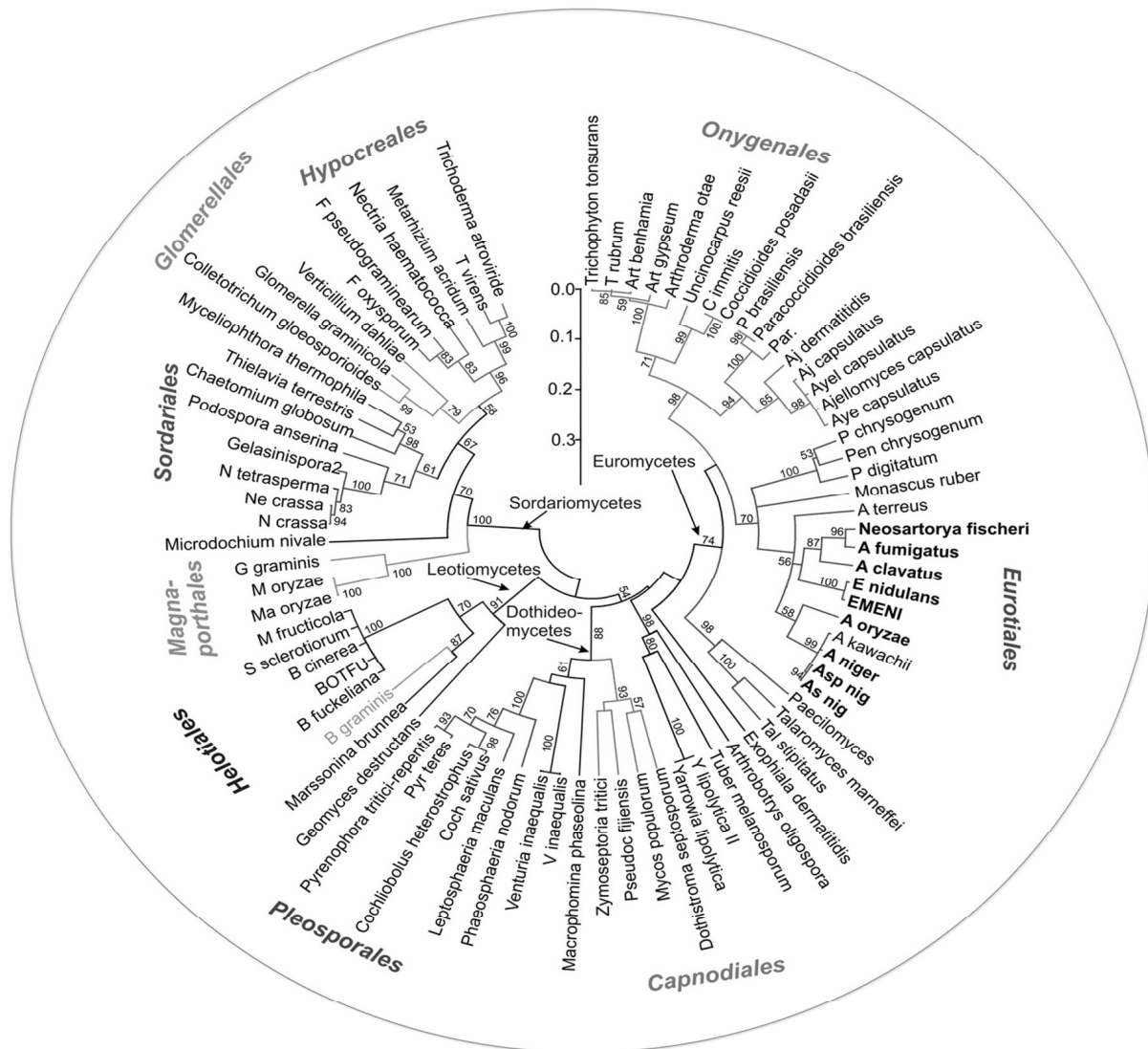
A filogenetikai törzsfá elkészítése MEGA 5.0 (Tamura et al., 2011) program felhasználásával, „maximum likelihood” módszerrel történt.

#### EREDMÉNYEK

A gombák alternatív oxidázainak fehérjeszekvenciái jól tükrözik a fajok közötti, más molekuláris markerek alapján felállított rendszertani kapcsolatokat (1. ábra).

A BcAOX-F és BcAOX-R primerpár alkalmas volt a *Botrytis cinerea* és a *Botrytis pseudocinerea* (aox) gének PCR technikával történő amplifikációjához. A genomi AOX szekvenciákat a *B. cinerea* fajcsoport két fajának izolátumaiból szaporítottunk fel, és hasonlítottuk össze a két deponált típus törzs szekvenciájával. A szekvencia meghatározást követően a 1215 bázispár hosszúságú gén 827 bázispárnyi részletét (154–980. nukleotid) kaptuk meg és hasonlítottuk össze. A vizsgált génszakaszokban 25 nukleotid különbséget fedeztünk fel (2. ábra). Ezek közül 18 esetben mindig ugyanazon eltérések voltak megfigyelhetőek a *Botrytis cinerea* és a *Botrytis pseudocinerea* szekvenciák között, melyek egyaránt előfordultak a gén kódoló és nem kódoló régióiban. Ez alapján valószínűsíthető, hogy az alternatív oxidáz eredményesen használható a fajok elkülönítésére DNS barcoding vizsgálatokban, illetve érdemes megvizsgálni, a rejtett fajok esetén is, mint molekuláris markert.

1. ábra: A gombák AOX szekvenciái alapján felállított, gyökértelen filogenetikai törzsfá

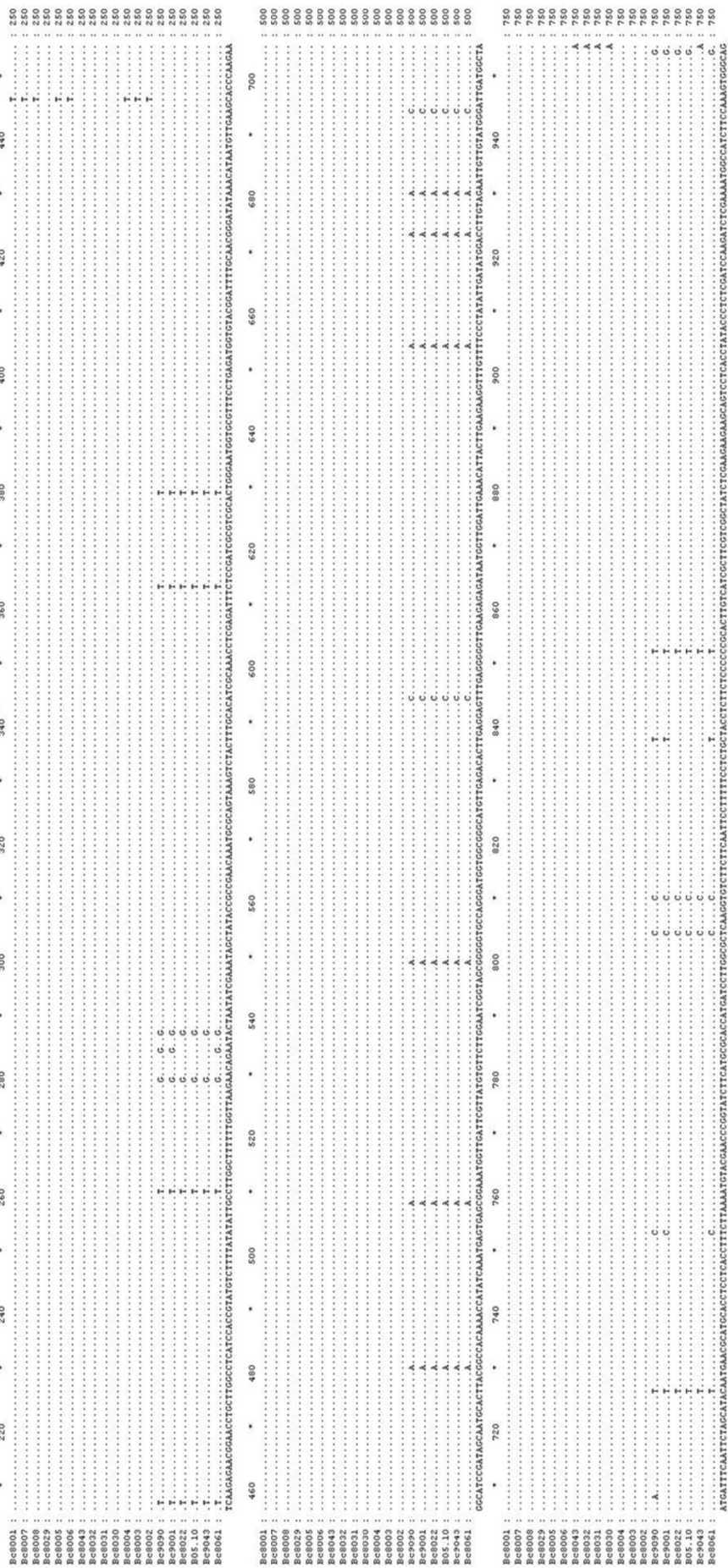


Megjegyzés: a „maximum likelihood” módszerrel szerkesztett törzsfá 97 AOX protein szekvencia elemzése során készült. Az elágazások hossza arányos a nukleotid eltérések számával (a skála felül, középen található). Az elágazások melletti szürke szám a „bootstrap” analízis (1000 ismétlés) eredményét mutatja. Csak az 50%-nál nagyobb értékeket jelöltük. Az elemzést a MEGA 5 programmal (Tamura et al., 2011) végeztük.

Figure 1: Unrooted phylogenetic tree based on fungal AOX sequences

Note: the phylogenetic tree that structured by maximum likelihood method was based on analysis of 97 protein sequences. The branch lengths are proportional to the genetic distance (scale is shown). Gray numbers next to the branches show the results of the bootstrap analysis (1000 repetitions). Only values that are greater than 50% are indicated. The analysis was performed using the software MEGA 5 (Tamura et al., 2011).

2. ábra: Illesztési kép a *B. cinerea* és *B. pseudocinerea* alternatív oxidázát kódoló genomai szekvencia részletéről



Megjegyzés: a szekvenciák összehasonlítása ClustalX program segítségével történt. *B. pseudocinerea* törzsek: Bc8001, Bc8002, Bc8003, Bc8004, Bc8005, Bc8006, Bc8007, Bc8008, Bc8029, Bc8030, Bc8031, Bc8032 és Bc8047. *B. cinerea* törzsek: Bc8022, Bc8061, Bc9001, Bc9043, Bc9090 és Bc05\_10. A megjelölt nukleotidok a szekvencia eltéréseket jelzik.

Figure 2. Multiple nucleotide alignment of the partial alternative oxidase sequences of *B. cinerea* and *B. pseudocinerea*

Note: the multiple alignment was made with ClustalX. *B. pseudocinerea* strains: Bc8001, Bc8002, Bc8003, Bc8004, Bc8005, Bc8006, Bc8007, Bc8008, Bc8029, Bc8030, Bc8031, Bc8032 and Bc8047. *B. cinerea* strains: Bc8022, Bc8061, Bc9001, Bc9043, Bc9090 and Bc05\_10. The presented nucleotides indicate the differences of the sequences.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A kutatás a TÁMOP-4.2.4.A/2-11/1-2012-0001 azonosító számú Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító

rendszer kidolgozása és működtetése konvergencia program című kiemelt projekt keretében zajlott. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.

## IRODALOM

- Ahmed, B.–Hamada, W. (2005): Genetic diversity of some Tunisian *Botrytis cinerea* isolates using molecular markers. *Phytopathologia Mediterranea*. 44: 300–306.
- Amselem, J.–Cuomo, C. A.–van Kan, J. A. L.–Viaud, M.–Benito, E. P. (2011) Genomic analysis of the necrotrophic fungal pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *PLoS Genetics*. 7: e1002230.
- Azcón-Bieto, J.–Ribas-Carbó, M.–González-Meler, M.–Peñuelas, J. (1989): Sulfide resistant respiration in leaves of *Elodea canadensis Michx*: comparison with cyanide-resistant respiration. *Plant Physiology*. 90: 1249–1251.
- Bartlett, D. W.–Clough, J. M.–Godwin, J. R.–Hall, A. A.–Hamer, M.–Parr-Dobrzanski, B. (2002): The strobilurin fungicides. *Pest Management Science*. 58: 649–662.
- Baurain, D.–Dinant, M.–Coosemans, N.–Matagne, R. F. (2003): Regulation of the alternative oxidase *Aox1* gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. Role of the nitrogen source on the expression of a reporter gene under the control of the *Aox1* promoter. *Plant Physiology*. 131: 1418–1430.
- Borecky, J.–Nogueira, F. T.–de Oliveira, K. A.–Maia, I. G.–Vercesi, A. E.–Arruda, P. (2006): The plant energy-dissipating mitochondrial systems: depicting the genomic structure and the expression profiles of the gene families of uncoupling protein and alternative oxidase in monocots and dicots. *Journal of Experimental Botany*. 57: 849–864.
- Büttner, P.–Koch, F.–Voigt, K.–Quidde, T.–Risch, S.–Blaich, R.–Brückner, B.–Tudzynski, P. (1994): Variations in ploidy among isolates of *Botrytis cinerea*: implications for genetic and molecular analyses. *Current Genetics*. 25: 445–450.
- Castro-Guerrero, N. A.–Rodríguez-Zavala, J. S.–Marín-Hernández, A.–Rodríguez-Enríquez, S.–Moreno-Sánchez, R. (2008): Enhanced alternative oxidase and antioxidant enzymes under Cd<sup>2+</sup> stress in *Euglena*. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 40: 227–235.
- Chae, M. S.–Lin, C. C.–Kessler, K. E.–Nargang, C. E.–Tanton, L. L.–Hahn, L. B.–Nargang, F. E. (2007): Identification of an alternative oxidase induction motif in the promoter region of the *aod-1* gene in *Neurospora crassa*. *Genetics*. 175: 1597–1606.
- Cournac, L.–Latouche, G.–Cerovic, Z.–Redding, K.–Ravenel, J.–Peltier, G. (2002): In vivo interactions between photosynthesis, mitorespiration, and chlororespiration in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*. 129: 1921–1928.
- Fournier, E.–Giraud, T.–Brygoo, Y. (2005): Partition of the *Botrytis cinerea* complex in France using multiple gene genealogies. *Mycologia*. 97: 1251–1267.
- Fournier, E.–Giraud, T.–Loiseau, A.–Vautrin, D.–Estoup, A.–Solignac, M.–Cornuet, J. M.–Brygoo, Y. (2002): Characterization of nine polymorphic microsatellite loci in the fungus *Botrytis cinerea* (*Ascomycota*). *Molecular Ecology Notes*. 2: 253–255.
- Fournier, E.–Levis, C.–Fortini, D.–Leroux, P.–Giraud, T.–Brygoo, Y. (2003): Characterisation of Bc-hch, the *Botrytis cinerea* homolog of the *Neurospora crassa* het-c vegetative incompatibility locus and its use as a population marker. *Mycologia*. 95: 943–951.
- Giraud, T.–Fortini, D.–Levis, C.–Brygoo, Y. (1997): RFLP markers show genetic recombination in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) and transposable elements reveal two sympatric species. *Molecular Biology and Evolution*. 14: 1177–1185.
- Giraud, T.–Refregier, G.–Le Gac, M.–de Vienne, D. M.–Hood, M. E. (2008): Speciation in fungi. *Fungal Genetics and Biology*. 45: 791–802.
- Gisi, U.–Sierotzki, H.–Cook, A.–McCaffery, A. (2002): Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides. *Pest Management Science*. 58: 859–867.
- Huang, X.–von Rad, U.–Durner, J. (2002): Nitric oxide induces transcriptional activation of the nitric oxide-tolerant alternative oxidase in *Arabidopsis* suspension cells. *Planta*. 215: 914–923.
- Juszczuk, I. M.–Rychter, A. M. (2003): Alternative oxidase in higher plants. *Acta Biochimica Polonica*. 50: 1257–1271.
- Levis, C.–Fortini, D.–Brygoo, Y. (1997): Transformation of *Botrytis cinerea* with the nitrate reductase gene (*niaD*) shows a high frequency of homologous recombination. *Current Genetics*. 32: 157–162.
- Maxwell, D. P.–Wang, Y.–McIntosh, L. (1999): The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96: 8271–8276.
- McDonald, A. E. (2008): Alternative oxidase: an inter-kingdom perspective on the function and regulation of this broadly distributed ‘cyanide-resistant’ terminal oxidase. *Functional Plant Biology*. 35: 535–552.
- McDonald, A. E.–Vanlerberghe, G. C. (2005): Alternative oxidase and plastoquinol terminal oxidase in marine prokaryotes of the Sargasso Sea. *Gene*. 349: 15–24.
- Møller, I. M. (2001): Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annual Review of Plant Physiology*. 52: 561–591.
- Nicholas, K. B.–Nicholas, H. B. Jr.–Deerfield, D. W. II. (1997): GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. *Embnnet News*. 4: 14.
- Quidde, T.–Osborn, A. E.–Tudzynski, P. (1998): Detoxification of a-tomatine by *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 52: 151–165.
- Sierotzki, H.–Frey, R.–Wullschlegel, J.–Palermo, S.–Karlin, S.–Godwin, J.–Gisi, U. (2006): Cytochrome b gene sequence and structure of *Pyrenophora teres* and *P. tritici-repentis* and implications for QoI resistance. *Pest Management Science*. 63: 225–233.
- Staats, M.–van Kan, J. A. (2012): Genome update of *Botrytis cinerea* strains B05.10 and T4. *Eukaryotic Cell*. 11: 1413–1414.
- Tamura, K.–Peterson, D.–Peterson, N.–Stecher, G.–Nei, M.–Kumar, S. (2011): MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*. 28: 2731–2739.
- Thompson, J. D.–Gibson, T. J.–Plewniak, F.–Jeanmougin, F.–Higgins, D. G. (1997): The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*. 24: 4876–4882.
- Wood, P. M.–Hollomon, D. W. (2003): A critical evaluation of the role of alternative oxidase in the performance of strobilurin and related fungicides acting at the Qo site of complex III. *Pest Management Science*. 59: 499–511.