

A szürke penész (*Botrytis cinerea*) elleni vegyszeres védekezés csökkentését megalapozó kutatások

Sándor Erzsébet

Debreceni Egyetem Agrár- és Gazdálkodástudományok Centruma, Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar, Élelmiszertudományi, Minőségbiztosítási és Mikrobiológiai Intézet, Debrecen
karaffa@agr.unideb.hu

ÖSSZEFOGLALÁS

A *Botrytis cinerea*, a szürkerothadás kórokozója rendkívül polifág gomba, mely több, gazdaságilag is jelentős növényt képes megtámadni. A kórokozó gombapopulációk genetikai szerkezetének jobb megismerésére segít a hatékonyabb és mérsékelt fungicid felhasználást lehetővé tevő technológiák kidolgozásában. A magyarországi *B. cinerea* populációk jellemzéséhez különböző genetikai paramétereket vizsgáltunk. Kimutattuk, hogy Magyarországon csak ritkán, és alacsony arányban fordultak elő az I-es csoportba tartozó izolátumok, melyek közt jelentős arányban fordult elő fenhexamid hatóanyaggal szembeni rezisztencia. A populációk nagyfokú genetikai variabilitása és az ivaros szaporodás megléte a gombánál pedig felhívja a figyelmet a szerrotáció jelentőségére a szürkerothadás elleni védekezésben.

Kulcsszavak: *Botrytis cinerea*, *Botrytis pseudocinerea*, populáció, genetikai diverzitás, fungicid rezisztencia, patogenitás

SUMMARY

Botrytis cinerea causes gray mold on a high number of crop plants. Information about the populations of plant pathogen fungi may help to develop new strategies for the effective and economic crop protection with reduced fungicide usage. Hungarian *B. cinerea* populations were characterized with using different molecular genetic parameters. *B. cinerea* group I strains, characterized with high rate of fenhexamid resistance, could be detected only in restricted number. The Hungarian *B. cinerea* populations were characterized with high genetic diversity, and the regular occurrence of sexual reproduction. These results highlight the importance of rotating different type of fungicide in the plant protection technology against grey mould.

Keywords: *Botrytis cinerea*, *Botrytis pseudocinerea*, population, genetic diversity, fungicide resistance, pathogenicity

BEVEZETÉS

A növénykórokozó gombákkal szembeni hatékony és gazdaságos védekezéshez szükség van a kórokozó populációinak megismerésére. A növényvédelem egyik fő problémája, hogy sem a növényi rezisztenciagének, sem a fungicidek nem jelentenek tartós védelmet adott kórokozóval szemben (McDonald és McDermott, 1993). A fontosabb populációs paraméterek, például a genetikai variabilitás mértéke, a szexuális szaporodás megléte illetve gyakorisága ismeretében hatékonyabb védekezés kidolgozására nyílik lehetőség (McDonald és Linde, 2002). Például ha egy gombapopuláción belül nagy a genetikai variáció, akkor gyorsabban képes alkalmazkodni a rezisztens gazdához, vagy az új fungicidhez. A növényi kórokozó gombák jelentős része elsősorban ivartalan úton szaporodik. Ha azonban rend-

szerezsen előfordul szexuális szaporodás adott patogén gombánál, lehetővé válik a rezisztencia gyorsan kialakulása és a virulencia gének új kombinációja (McDonald és McDermott, 1993).

A *Botrytis cinerea* (teleomorph: *Botryotinia fuckeliana*), a szürkerothadás kórokozója minden évben jelentős gazdasági kárt okoz világszerte a természet növényeiken. A gomba gazdanövényköze igen széles, eddig bizonyítottan 235 növényt képes megtámadni (Prins, 2000). Termesztett növényeink közül a *B. cinerea* megjelenhet szőlőn, bogyós gyümölcsökön (pl. szamóca, málna), szántóföldi növényeken (napraforgó, repce), virágokon (pl. rózsza), zöldségeken (pl. saláta, hagyma) (Jarvis, 1980). A termelők különböző fungicidek alkalmazásával próbálnak védekezni a szürkerothadást okozó *B. cinerea* ellen, de egyre gyakrabban jelennek meg a különböző fungicidekkel szemben rezisztens törzsek (Alfonso et al., 2000; Lattore et al., 2002; Weber és Hahn, 2011). Az eredményes védekezést megnehezíti, hogy a *B. cinerea* nagyon változatos megjelenésű, és genotípusában is nagy változékonyságot mutat (Fournier és Giraud, 2008; Beever és Weeds, 2004).

A *B. cinerea* a legújabb kutatások szerint egy I-es csoportra (*Botrytis pseudocinerea*) és egy II-es csoportra (*B. cinerea sensu stricto*) testvér fajokra elkülönülő fajkomplex. A két csoport csak genetikai markerek alapján különíthető el biztosan, de fungicid érzékenységükben jelentős különbségek figyelhetők meg. Edigi tanulmányok alapján a II csoportba tartozó *B. cinerea* van döntő mértékben jelen a fertőzött növényekről származó mintákban (Walker et al., 2011).

EREDMÉNYEK

Több éven át (2003–2009), különböző gazdanövényekről (szőlő, málna, szamóca, repce) gyűjtöttünk *B. cinerea* egyspórás izolátumokat (Váczy et al., 2008; Fekete et al., 2011). Az egyes törzsekből azután DNS kivonását követően különböző molekuláris genetikai markerek meghatározását végeztük el.

A *B. cinerea* I-es és II-es csoportjának elkülönítését a korábban leírt molekuláris genetikai markerek segítségével végeztük el. A több mint ötszáz megvizsgált izolátumból mindössze 13 tartozott az I-es csoportba a β -tubulin szekvenciája és a Bc-hch gén HhaI restrikciós endonukleáz emésztése alapján. Ez talán azzal is magyarázható, hogy az I-es csoportba tartozó izolátumok patogenitása általában kisebbnek mutatkozott a fertőzéses kísérletekben (Asadollahi et al., 2011b). Ezek között, hasonlóan a korábban leírtakhoz nagy arányban voltak jelen fenhexamiddel szemben nagymértékben rezisztens izolátumok. A Magyarországon

döntő mértékben jelen levő II-es csoportba tartozó izolátumoknál viszont fenhexamidral szemben érzékenyek, vagy csupán kis mértékben ellenállónak mutatkoztak (Fekete et al., 2011). Egy másik hatóanyag esetében éppen fordított volt a helyzet. Az II-es csoportba tartozó izolátumoknál az azoxistrobinnal szembeni nagyfokú rezisztenciát egy pontmutáció okozza citokróm-b fehérjét kódoló szekvenciában (Asadollahi et al., 2010). Ez elég gyakran kimutatható volt a II-es csoportba tartozó *B. cinerea* mintákban (Szojka et al., 2011; Takács et al., 2011). Ugyanakkor az I-csoport izolátumainál fixálódott nukleotid sorrend megakadályozza a nagyfokú rezisztenciáért felelős pontmutáció kialakulását, így ebben az esetben az azoxistrobin megfelelő koncentrációban alkalmazva mindig hatékony (Asadollahi et al., 2012).

A populációs paraméterek megállapításához olyan markereket választottunk ki, amelyek függetlenek a szelektív nyomás alatt álló tulajdonságoktól, és kellőképpen változékonyak a fajon belüli különbségek megjelenítéséhez. Ezek közül leginformatívabbnak a miniszatellit és mikroszatellit szekvenciák bizonyultak (Váczy et al., 2008; Fekete et al., 2011). A szatellit szekvenciák olyan, géneket nem kódoló DNS szakaszok, melyek tandem módon ismétlődő szekvenciából állnak. A mikroszatellitek esetében az ismétlődő szakaszok rövidebbek, 2–4 bázisból épülnek fel. A *B. cinerea*-ban kilenc mikroszatellit szekvenciát írtak le eddig (Fournier et al., 2002). Ezek közül öt mikroszatellit fragment analízisét végeztük el, melyek elegendőnek mutatkoztak a populáció változékonyságának meghatározására (Váczy et al., 2008; Fekete et al., 2011). Az eddig elvégzett két mintacsoport alapján az Egri borvidék 109 *B. cinerea* mintája esetén 55 különböző mikroszatellit genotípust találtunk, míg a Nagy-rédéről származó 467 izolátum 167 különböző genotípusba tartozott (Váczy et al., 2008; Fekete et al., 2012). Már ez a paraméter is jelezte a populációk nagymértékű genetikai változékonyságát. Az eredmények alapján számított géndiverzitásra vonatkozó populációs paraméterek alapján egyértelműen megállapítható volt, hogy a magyarországi *B. cinerea* populációk genetikai változékonysága igen nagy, és alig találhatók ivartalanul szaporodó (klonális) csoportok. Egy másik számított paraméter, az asszociációs index alapján bizonyítható volt a szexuális szaporodás megléte a szürkerothadás kórokozójánál az országban, noha mind-egyik nem sikerült megtalálni az ivaros szaporítóképleteket (Váczy et al., 2008; Fekete et al., 2012). A mikroszatellit markerek elemzésével földrajzi elkülönülés nem volt kimutatható az Egri borvidék különböző helyeiről származó gombaizolátumai között (Váczy et al., 2008). Ugyanakkor bizonyítani tudtuk az elkülönülést a különböző gazdanövényekről származó mintákban (Asadollahi et al., 2011 a).

A miniszatellitek esetében a mikrosatelliteknél hosszabb, 6–120 bázispár hosszúságú nukleotid szekvenciák ismétlődnek. Teljes hosszuk 0,5–120 kilobázis (kb). Erősen variábilis régiók, melyekben egyrészt a felépítő egységek szekvenciája, másrészt az ismétlődő

egységek száma változik. Giraud et al. 1998-ban találták meg a *B. cinerea* MSB1-nek elnevezett miniszatellit szekvenciáját. Az MSB1 csak egy lokuszon található a genomban, és 37 bp-nyi ismétlődő szakaszokból áll. A miniszatellitek esetében az MSB1 szekvenciájának meghatározást követően végeztük el a populációgenetikai elemzéseket. Ezek alátámasztották a mikroszatellit markerek által megállapított eredményeket: a *B. cinerea* izolátumokmba nagyfokú genetikai diverzitást, és a gazdanövény szerinti elkülönülést (Váczy et al., 2008; Fekete et al., 2012; Asadollahi et al., 2011a).

KÖVETKEZTETÉSEK

A szürkerothadás elleni hatékony, kevesebb fungicid alkalmazásával is hatékony növényvédelmi technológiák kidolgozásával csökkenthető a növényi élelmiszerek kémiai szennyeződésének mértéke, illetve a környezet kémiai terhelése.

A szürkerothadás kórokozója, a *B. cinerea* magyarországi populációinak vizsgálata alapján több, a gyakorlat számára is fontos eredmény született.

Botrytis cinerea fajkomplexeen belül található két, fungicid rezisztenciájában eltérést mutató csoport közül Magyarországon ritkán, és alacsony arányban fordultak elő az I-es csoportba tartozó izolátumok. Nem kell tehát számolnunk a fenhexamiddal szemben nagymértékű rezisztenciát hordozó gombák megjelenésére (Fekete et al., 2012). Az azoxistrobin használatánál viszont figyelembe kell venni, hogy rezisztens törzsek jelen vannak a magyarországi populációkban (Asadollahi et al., 2012). Ezért az azoxistrobin, és más, azonos hatóhelyű készítmények alkalmazása nem javasolt egy alkalomnál többször a szürkerothadás elleni védekezésben.

A gomba semleges genetikai markereken alapuló populációgenetikai paraméterei alapján nagy genetikai változékonyságot mutatott a vizsgált Magyarországi területeken (Váczy et al., 2008; Asadollahi et al., 2011a). Ha egy kórokozó populációban a genetikai variáció mértéke nagy, mindenképpen számítani lehet arra, hogy a kórokozók gyorsabban alkalmazkodnak a rezisztens gazdához, vagy az új fungicidhez. A szürkerothadás elleni védekezés gyakorlatában tehát mindenképpen javasolt egy-egy hatóanyag egymást követő használatának kerülése, illetve egy vegetációs időszakban csak egy-két alkalommal történő felhasználása.

Szintén genetikai markerek elemzésével lehetett bizonyítani, hogy a magyarországi *B. cinerea* populációkban az ivaros szaporodás meglétét. Azokban a patogén populációkban, ahol az ivaros szaporodás rendszeresen jelen van, lehetőség van a virulencia gének, és a különböző növényvédőszerrel szembeni rezisztenciáért felelős gének kombinálódására.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A publikáció elkészítését az NKTH; A2-2006-0017, a TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0024 és a TÁMOP-4.2.1/B-09/1/KONV-2010-0007 számú projektek támogatták.

IRODALOM

- Alfonso, C.–Raposo, R.–Melgareji, P. (2000): Genetic diversity in *Botrytis cinerea* populations on vegetable crops in greenhouses in south-eastern Spain. *Plant Pathology*. 49: 243–251.
- Asadollahi, M.–Fekete É.–Fekete E.–Karaffa L.–Irinyi L.–Sándor E. (2010): Magyarországi *Botrytis cinerea* izolátumok citokróm-b génjének diverzitása. *Agrártudományi Közlemények*. 39: 18–21.
- Asadollahi, M.–Fekete, É.–Fekete, E.–Irinyi, L.–Karaffa, L.–Árnyasi, M.–Szojka, A.–Kövics, Gy. J.–Sándor, E. (2011a): Comparison of *Botrytis cinerea* populations isolated from two cultivated host plants. *Botrytis-Sclerotinia Post-Genome workshop*, 15th–17th September 2011. Lyon. France. Abstract Book. 27.
- Asadollahi, M.–Fekete É.–Fekete E.–Karaffa L.–Sándor E. (2011b): Az I-es és a II-es csoportba tartozó *Botrytis cinerea* izolátumok patogénitása különböző növényeken. *Agrártudományi Közlemények*. 43. 81–85.
- Beever, R. E.–Weeds, P. (2004) Genetic variation of *Botrytis* and *Botryotinia*. [In: Elad, Y.–Williamson, B.–Tudzynski, P. (eds.) *Botrytis: biology, pathology and control*.] Dordrecht. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers. 29–52.
- Fekete, É.–Fekete, E.–Irinyi, L.–Karaffa, L.–Árnyasi, M.–Asadollahi, M.–Sándor, E. (2012): Genetic diversity of a *Botrytis cinerea* cryptic species complex in Hungary. *Microbiological Research*. 167: 283–291.
- Fournier, E.–Giraud, T. (2008): Sympatric genetic differentiation of a generalist pathogenic fungus, *Botrytis cinerea*, on two different host plants, grapevine and bramble. *J. Evol. Biol.* 21: 122–32.
- Fournier, E.–Giraud, T.–Loiesau, 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). *Mol. Ecol. Notes*. 2: 25–35.
- Giraud, T.–Fortini, D.–Levis, C.–Brygoo, Y. (1998): The minisatellite MSB1, in the fungus *Botrytis cinerea*, probably mutates by slippage. *Mol. Biol. Evol.* 15. 11: 1524–1531.
- Jarvis, W. R. (1980): Taxonomy. [In: Coley-Smith, J. R.–Verhoeff, K.–Jarvis, W. R. (eds.) *The Biology of Botrytis*.] Academic Press. London. 1–18.
- Latorre, B. A.–Spadaro, I.–Rioja, M. E. (2002): Occurrence of resistant strains of *Botrytis cinerea* to anilinopyrimidine fungicides in table grapes in Chile. *Crop Protection*. 21: 957–961.
- McDonald, B. A.–Linde, C. (2002): Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology*. 40: 349–379.
- McDonald, B. A.–McDermott, J. M. (1993): Population genetics of plant pathogenic fungi. *BioScience*. 43: 311–319.
- Milgroom, M. G.–Peever, T. L. (2003): Population biology of plant pathogens: the synthesis of plant disease epidemiology and population genetics. *Plant Disease*. 87: 608–617.
- Prins, T. W. (2000): Infection strategies of *Botrytis cinerea* and related necrotrophic pathogens. [In: Kronstad J. (ed.) *Fungal pathology*.] Dordrecht. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers. 33–64.
- Szojka A.–Asadollah, M.–Fekete É.–Fekete E.–Karaffa L.–Sándor E. (2011): Magyarországi *Botrytis cinerea* izolátumok azoxystrobin rezisztenciájának vizsgálata real-time PCR technika segítségével. *Agrártudományi Közlemények*. 43. 41–44.
- Takács F.–Asadollahi, M.–Karaffa E. (2011): A *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. Azoxistrobin rezisztenciájának vizsgálata. *Agrártudományi Közlemények*. 43. 56–63.
- Váczy, K. Z.–Sándor, E.–Karaffa, L.–Fekete, E.–Fekete, É.–Árnyasi, M.–Czeglédi, L.–Kövics, G. J.–Druzhinina, I. S.–Kubicek, C. P. (2008): Sexual recombination in the *Botrytis cinerea* populations in Hungarian vineyards. *Phytopathology*. 98: 1312–1319.
- Walker, A. S.–Gautier, A.–Confais, J.–Martinho, D.–Viaud, M.–Le Pêcheur, P.–Dupont, J.–Fournier, E. (2011): *Botrytis pseudo-cinerea*, a new cryptic species causing grey mould in French vineyards in sympatry with *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*. 12: 1433–1445.
- Weber, R. W. S.–Hahn, M. (2011): A rapid and simple method for determining fungicide resistance in *Botrytis*. *J. Plant Dis. Protect.* 118: 17–25.

