

Magyarországi *Botrytis cinerea* izolátumok azoxystrobin rezisztenciájának vizsgálata real-time PCR technika segítségével

Szójka Anikó^{1,2} – Mojtaba Asadollahi^{1,2} – Fekete Éva² – Fekete Erzsébet² – Karaffa Levente² – Sándor Erzsébet¹

¹Debreceni Egyetem, Növényvédelmi Intézet

²Debreceni Egyetem, Biomérnöki Tanszék

karaffa@agr.unideb.hu

ÖSSZEFOGLALÁS

A mitokondriális DNS-ben elhelyezkedő gének elsősorban a sejtlegzés enzimeit kódolják. A quinol oxidáz gátlók (QoI) családjába tartozó fungicidok fontos szerepet töltenek be számos, gomba okozta növényi fertőzés elleni védekezésben. A mitokondriális légzést, így az ATP képződést gátolják azáltal, hogy kötődnek a citokróm bc1 enzim komplexhez, megakadályozva az elektron transzferet a citokróm b és a citokróm c1 között. Az ellenük kialakult rezisztencia hátterében két mechanizmus áll. Az egyik a citokróm b gén (CYTB) pontmutációja, például egyetlen glicin alaninra történő szubsztitúciója a 143-as kodonpozícióban magasfokú rezisztenciához vezet. A másik mechanizmus az alternatív, cianid rezisztens légzés, melyet az alternatív oxidáz tart fenn.

Egy sejtben több mitokondrium található. Homoplazmiáról beszélünk, amennyiben a sejtben lévő összes mitokondrium genomja azonos. Ha közülük egyben mutáció keletkezik, a sejtben „vad” és mutáns mitokondriális DNS egyaránt észlelhető, melyet a heteroplazmia kifejezéssel illetnek. Az, hogy a mitokondriumban kialakult mutáció okoz-e fenotípusos változást dózis-függő, azaz azon múlik, hogy az adott sejtben mekkora százalékban fordulnak elő a megváltozott mitokondriumok.

Munkánk során 2008-2009 években különböző gazdanövényekről begyűjtött *B. cinerea* egyspórás izolátumokat vizsgáltunk. Arra kerestük a választ, hogy a heteroplazmia mértéke befolyásolta-e a rezisztencia szintjét. Sikeresen kimutattuk a heteroplazmia mértékének, ezáltal a rezisztencia szintjének változását a fungiciddal történő kezelés hatására.

SUMMARY

The genes being in the mitochondrial DNA primarily encode the enzymes of cellular respiration. Fungicides belonging to the family of quinol oxidase inhibitors (QoIs) play an important role in the protection against several plant diseases caused by fungi. These fungicides bind to the cytochrome bc1 complex so they block electron transport between cytochrome b and cytochrome c1. This way these fungicides inhibit the ATP synthesis consequently they inhibit the mitochondrial respiration. The QoI resistance has two mechanisms. One of them is the point mutation of the cytochrome b gene (CYTB), e.g. the substitution of a single glycine by alanine at position 143 results in high-resistance. The other is the cyanide-resistant alternative respiration sustained by the alternative oxidase.

In a cell there are several mitochondria. The phenomenon when the genomes of all mitochondria in the cell are identical is called homoplazmy. If in the cell there is wild and mutant mitochondrial DNA this is called heteroplazmy. Whether the mutation in the mitochondria causes phenotypical diversity or does not depend on the dose, i.e. it depends on the percentage of the changed mitochondria.

During our work we investigated *Botrytis cinerea* single spore isolates which have been collected in 2008-2009 on different host plants. Our goal was to decide whether heteroplazmy influences the level of resistance. We managed to detect the change of the level of heteroplazmy, so the change the level of the resistance due to the treatment with fungicide.

Kulcsszavak: *Botrytis cinerea*, citokróm b, QoI rezisztencia

Keywords: *Botrytis cinerea*, cytochrome b, QoI resistance

BEVEZETÉS

A *Botrytis* nemzetség fitopatogén és mezőgazdaságilag jelentős kórokozókat tartalmaz. Előfordulása nagyobb részt a mérsékelt övre korlátozódik, és ott nagyszámú, eddig bizonyítottan 235 gazdanövényt képes megtámadni, és rajtuk a szürkerothadás nevű megbetegedést kiváltani (Jarvis, 1977). A szürkerothadás elleni küzdelem hagyományosan kemikáliákkal történik. A védelem megvalósítása azonban nem egyszerű feladat, mivel a gomba rendkívüli genetikai változékonysága miatt nagyon hamar kialakulhatnak a rezisztens törzsek, valamint a kezeléseknek komoly anyagi, környezetterhelési illetve élelmiszer-biztonsági vonatkozásai vannak.

A quinol oxidáz gátló (QoI) fungicidok hatásmechanizmusa a mitokondriális légzés gátlása. A fungicid blokkolja az elektron transzportot a citokróm b és citokróm c1 között egy kötés által, mely az inhibitor és a citokróm bc1 úgynevezett Quinol oxidációs (Quinol outside – Qo) helye közt jön létre az enzimkomplex ubiquinon oxidációs centrumában (Fernández-Ortuño *et al.*, 2008). A QoI rezisztencia molekuláris mechanizmusát tanulmányozva bebizonyították, hogy a citokróm b gén (CYTB) egyetlen pontmutációjának hatására létrejövő egyetlen aminosav cseréje kiválthatja a rezisztenciát az enzimben. Magasfokú rezisztenciához vezet a glicin alaninra történő kicserélődése a 143-as kodonpozícióban (G143A), míg mérsékelt rezisztenciát eredményez két további aminosav szubsztitúciója: fenilalanin cseréje leucinra a 129-es kodonon (F129L), valamint a 137. aminosav glicinről argininra történő változása (G137A) (Fernández-Ortuño *et al.*, 2008).

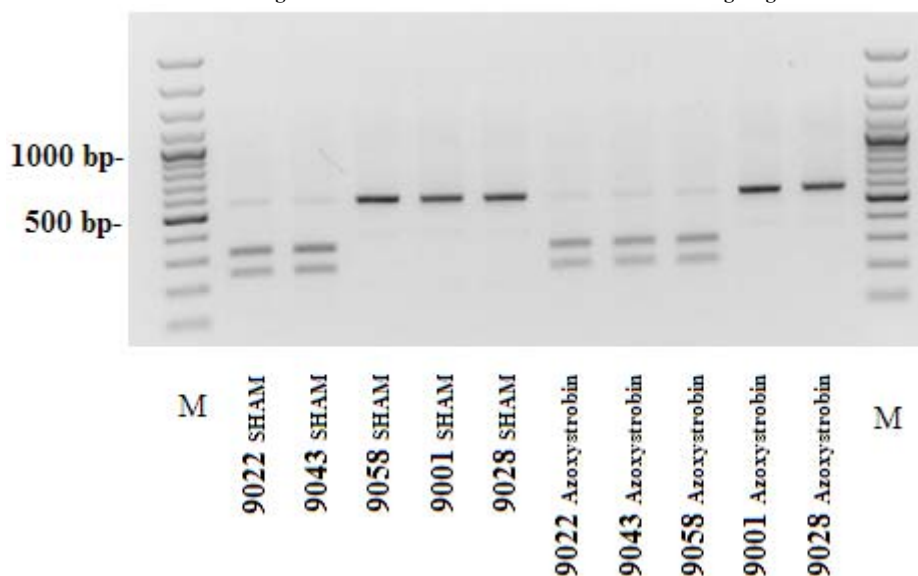
Mindezek miatt egyre inkább szükséges a *B. cinerea* genotípusok és populációs struktúrák vizsgálata a korszerű növényvédelmi stratégiák kialakításához.

ANYAG ÉS MÓDSZER

A vizsgálatban szereplő *Botrytis cinerea* mintákat 2008 és 2009 években gyűjtött, szabadföldi izolátumokból készített törzsgyűjteményből választottuk (Fekete *et al.*, 2009). Az izolátumokat kategorizálták azoxystrobinnal szemben tanúsított rezisztencia mértékének szempontjából Saito *et al.*, (2008) leírása szerint, valamint vizsgálták a CYTB gén pontmutációjának (G143A) meglétét allélspecifikus PCR reakció segítségével, Grasso *et al.* (2009) módszerével, és az I. intron előfordulását a 143-as kodon után PCR fragment analízis alkalmazásával Jiang *et al.*, (2009) munkája alapján (Mojtaba *et al.*, 2010). A munkánk során vizsgált törzsek szenzitívnek bizonyultak azoxystrobinnal szemben, ugyanakkor a G143A mutáció kimutatására alkalmas BcAR primerpárral végzett PCR reakció során pozitív eredményt adtak és nem tartalmazták az 1205 bp hosszúságú nagy intront, mely gyakran megtalálható a mitokondriális genom elektrontranszport rendszerét, valamint a riboszómális RNS-t kódoló génekben (Foury *et al.*, 1998).

A heteroplazmia jelenségét szenzitivitási vizsgálatokkal és PCR-RFLP analízis segítségével igazoltuk. Az eredményeket real-time PCR kísérletekkel támasztottuk alá. A reakciók inkubációs programját Rotor Gene 6000 (Corbett Research) real-time PCR készüléken futtattuk. Az eredmények kiértékelése Rotor Gene 1.7.61 software segítségével történt.

1. ábra: CYTB gén emésztése Fnu4HI restrikciós endonukleáz segítségével



M: molekulasúly marker (*O'GeneRuler*TM 100bp Plus DNA Ladder, Fermentas)

9001, 9022, 9028, 9043, 9058: *B. cinerea* izolátumok száma

Figure 1: Digestion of CYTB gene by Fnu4HI restriction enzyme

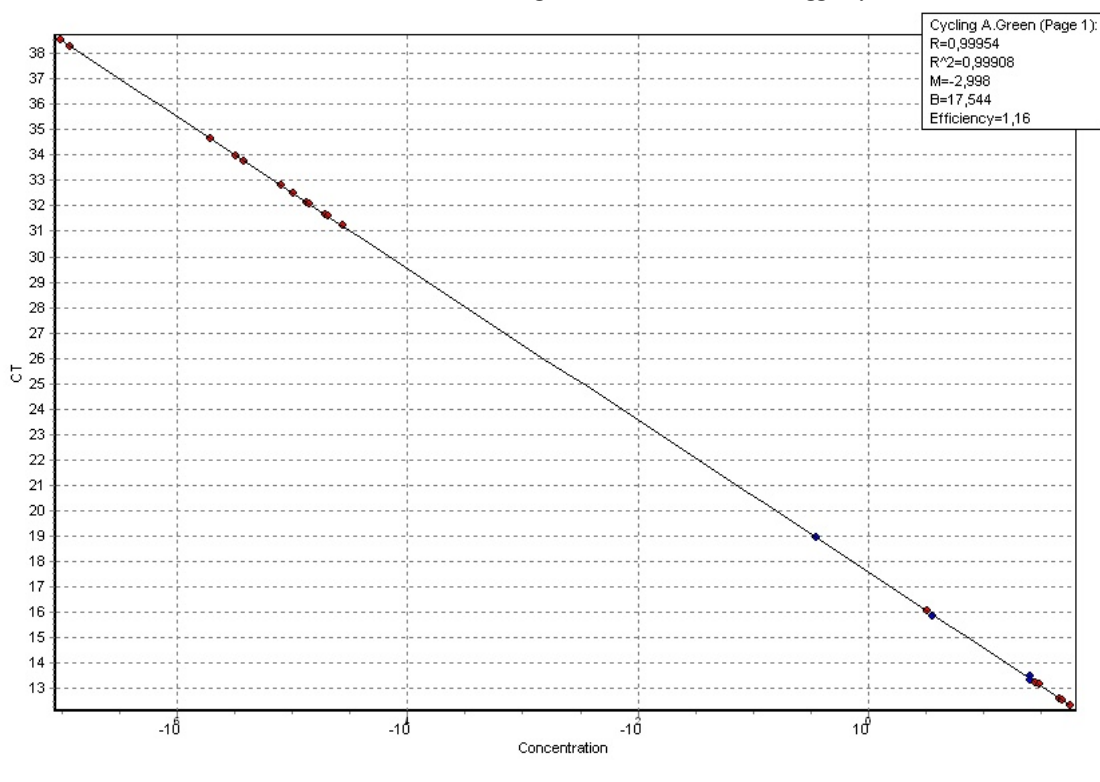
M: molecular marker (*O'GeneRuler*TM 100bp Plus DNA Ladder, Fermentas), 9001, 9022, 9028, 9043, 9058: *B. cinerea* isolates

EREDMÉNYEK

A PCR-RFLP vizsgálat során a CYTB génre specifikus BcCOX1-F és BcCOX1-R primerpár segítségével szaporítottuk fel a vizsgálandó DNS szakaszt, majd FastDigest® Fnu4HI (SaiI) restrikciós endonukleázzal emésztettük. Az enzim abban az esetben vágta ketté a DNS-t, amennyiben az tartalmazta a magasfokú rezisztenciát okozó G143A pontmutációt (Ishii *et al.*, 2009). Volt olyan minta (9058), melyben a pontmutáció csak az azoxystrobinnal kezelt törzsben volt kimutatható (1. ábra).

A real-time PCR vizsgálatok során a CYTB gén pontmutációjának kimutatására alkalmas BcAR-F és BcAR-R primerpárral dolgoztunk. Az adatok kiértékelése az abszolút kvantitálás módszerével történt. Ismert koncentrációjú templátból (standard) hígítási sort készítettünk, a Ct-t (küszöbérték ciklusszám) minden hígításra real-time PCR készülékkel határoztuk meg, és az így kapott Ct-koncentráció összefüggés (2. ábra) alapján a vizsgálandó minta Ct-jéből a koncentráció meghatározható (1. táblázat). A kapott eredmények alátámasztották, hogy 9058-as minta esetében a heteroplazmia azoxystrobinnal kiváltott szelekciós nyomás hatására vált detektálhatóvá. A fungiciddel történő kezelés 15 napig tartott, ezalatt a mutáns mitokondriumok aránya elérte a közel 58%-ot.

2. ábra: Real-time PCR standard hígítási sor: Ct-koncentráció függvény



Ct: küszöbérték ciklusszám

Concentration: a DNS koncentrációk logaritmus

R: korrelációs együttható

R²: korrelációs együttható négyzete

M: az egyenes dőlésszöge

B: az egyenes y-tengellyel való metszéspontja

Efficiency: a reakció hatékonysága

Figure 2: Real-time PCR standard curve: Ct-concentration function

Ct: cycle threshold, Concentration: logarithm of the concentration of the DNA, R: correlation coefficient, R²: square of correlation coefficient, M: slope, B: y-intercept, Efficiency: efficiency of the reaction

KÖVETKEZTETÉSEK

Belátható, hogy azokkal a növény védőszerekkel szemben nagyobb eséllyel alakul ki rezisztencia, melyek hatásmechanismusa egyoldalú. A quinol oxidáz inhibitorok (QoI) valószínűleg a leghatékonyabb mezőgazdaságban alkalmazott fungicidok, melyek a sejtlégzést gátolják. Ellenük egyetlen aminosav szubsztitúciója a mitokondriális CYTB génben magasfokú rezisztenciát képes okozni. A rezisztencia mértéke függ a mutáns és „vad” típusú mitokondriumok arányától. A lisztharmat kórokozójának strobilurin (QoI) rezisztencia vizsgálata során azt tapasztalták, hogy rezisztens törzsek ismét szenzitívvé váltak a fungicid hiányában (Fraaije *et al.*, 2002). Ezek alapján feltételezhető, hogy a mutáció csökkenti a patogén fitnessét, tehát csak fungicid jelenlétében jelent szelekciós előnyt (Fernández-Ortuño *et al.*, 2008).

A heteroplazmia követésére alkalmas módszert fejlesztettünk ki valós idejű (real-time) PCR segítségével. A vizsgálatokban a mitokondriális genomban található egykópiás gént (COX1) használtuk standardként, és ehhez viszonyítottuk az azoxystrobinnal szembeni rezisztenciát okozó G143A pontmutációt hordozó mitokondriális DNS arányának változását a szenzitív, „vad” szekvenciához képest.

A kifejlesztett módszer segítségével bebizonyítottuk, hogy azoxystrobin jelenlétében a rezisztenciát hordozó mitokondriális genom aránya megnő a szenzitív hatóhelyet kódoló szekvenciával szemben. A rezisztencia jelensége megfigyelhető volt a micéliális növekedésgátlást mérő rezisztencia tesztekben is. Ugyanakkor azoxystrobin hiányában növesztett tenyészetekből izolált genomban a G143A pontmutáció kimutathatatlan volt. A szabadföldi *B. cinerea* elleni fungicid védekezések során tehát mindenképpen el kell kerülni az azoxystrobin egymás után történő többszöri használatát, hiszen az elősegíti a rezisztens törzsek nagymértékű, gyors elszaporodását.

1.táblázat

Real-time PCR adatok: a koncentráció meghatározása a Ct értékek és a standard hígítási sor segítségével

Törzsek (1)	Standard hígítások (2)	Ct-értékek (3)	Standard koncentrációk (ng/μl) (4)	Számolt koncentrációk (ng/μl) (5)
9001 SHAM		31,87		0
9001 Azoxystrobin		34,64		0
9022 SHAM	1x	13,37	24,9	24,726
9022 SHAM	7x	15,83	3,55	3,724
9022 SHAM	70x	18,92	0,355	0,347
9022 Azoxystrobin		12,46		49,830
9028 SHAM		36,15		0
9028 Azoxystrobin		32,10		0
9058 SHAM		33,28		0
9058 Azoxystrobin		13,17		28,791

Table 1: Real-time PCR data: determination of the concentrations using Ct-values and standard dilutions

Strain number (1), Standard dilution (2), Ct-value (3), Standard concentration (4), Computed concentration (5)

IRODALOM

- Asadollahi M.-Fekete É.-Fekete E.-Karaffa L.-Irinyi L.-Sándor E. (2010): Magyarországi *Botrytis cinerea* izolátumok citokróm b génjének diverzitása. Agrártudományi Közlemények, 2010/39. KÜLÖNSZÁM 18-21.
- Fekete É.-Fekete E.-Karaffa L.-Kövics Gy. J.-Sándor E. (2009): *Botrytis cinerea* group I isolates from different hosts in Hungary. Journal of Agricultural Sciences, Debrecen, 2009/38 Supplement, 15-19.
- Fernández-Ortuño, D.-Torés, J.A.- de Vicente, A.-Pérez-García, A. (2008): Mechanisms of resistance to QoI fungicides in phytopathogenic fungi. Int. Microbiol., 11: 1-9.
- Foury, F.-Roganti, T.-Lecrenier, N.-Purnelle, B. (1998): The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*, FEBS Lett., 440 325-331.
- Fraaije, B. A.-Butters, J. A.-Coelho, J. M.-Jones, D. R.-Hollomon, D. W. (2002): Following the dynamics of strobilurin resistance in *Blumeria Graminis* f.sp. *tritici* using quantitative allele-specific real-time PCR measurements with the fluorescent dye SYBR Green I. Plant Pathology, 51: 45-54.
- Grasso, V. -Palermo, S.-Sierotzki, H.-Garibaldi, A.-Gisi, U. (2006): L Cytochrome b gene structure and consequences for resistance to Qo inhibitor fungicides in plant pathogens. Pest Manag. Sci., 62: 465-472.
- Ishii, H.-Fountaine, J.-Chung, W.-Kansako, M.-Nishimura, K.-Takahashi, K.-Oshima, M. (2009): Characterisation of QoI-resistant field isolates of *Botrytis cinerea* from citrus and strawberry. Pest Manag Sci., 65: 916-92
- Jarvis, W. R. (1977) *Botryotinia* and *Botrytis* Species: Taxonomy, Physiology and Pathogenicity. Research Branch, Canada Department of Agriculture, Ottawa, Canada.
- Jiang, J.-Ding L.-Michailides, T. J.-Li, H.-Maa, Z. (2009): Molecular characterization of field azoxystrobin-resistant isolates of *Botrytis cinerea*. Pesticide Biochemistry and Physiology, 93: 72-76.
- Saito, S.-Suzuki, S.-Takayanagi, T. (2008): Nested PCR-RFLP is a high-speed method to detect fungicide-resistant *Botrytis cinerea* at an early growth stage of grapes. Pest Manag. Sci., 65: 197-204.