

A *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. azoxistrobin rezisztenciájának vizsgálata

Takács Ferenc¹ – Mojtaba Asadollahi² – Karaffa Erzsébet²

¹Újfehértói GYKSZ Nonprofit Közhasznú Kft., Újfehértó

²Debreceni Egyetem Agrár- és Gazdálkodástudományok Centruma, Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar
Növényvédelmi Intézet
takacs72@gmail.com

ÖSSZEFOGLALÁS

A fungicid-rezisztencia napjainkban a gyakorlati növényvédelem hatékonyságát veszélyeztető egyik legfontosabb probléma. A specifikus hatásmódú gombaölő szerekkel szemben a hosszú ideig tartó egyoldalú szerhasználat miatt a növénypatogén gombáknak rezisztens populációi alakulnak ki. Ez különösen igaz azokra a fajokra, amelyek minden évben járványszerűen jelennek meg. Ezek közé tartozik a *Botrytis cinerea* gomba is.

A *Botrytis cinerea* elleni védekezés legfőbb módját napjainkban is a kemikáliák használata jelenti, ezért a védekezési eljárások ésszerű tervezése szükségessé teszi a fungicid-rezisztencia alaposabb feltérképezését a kórokozók szabadföldi populációiban.

A vizsgálataink eredményei alapján megállapíthatjuk, hogy a vizsgált *Botrytis cinerea* törzsek növekedése nagy eltérést mutatott in vitro körülmények között, ami a magyarországi populációk nagyfokú változékonyságára utal. A kísérletben szereplő 25 különböző helyről és növényről begyűjtött *Botrytis cinerea* izolátum közül 7 esetben mutattunk ki magas fokú rezisztenciát és 8 mintánál pedig alacsony fokú rezisztenciát az azoxistrobin hatóanyagra.

Kísérletünkben sikerült bizonyítanunk, hogy a *Botrytis cinerea* gomba képes kikerülni azt a pontot a mitokondriális elektrontranszportban, ahol az azoxistrobin hatáshelye van, és egy alternatív légzési útvonalat használva az azoxistrobin hatását nagymértékben csökkenti.

SUMMARY

Fungicide resistance is one of the most important problems endangering the effectivity of practical plant protection today. The frequent and subsequent usage of specific fungicides results the emergence of resistant fungal populations. This threatens is especially high in case of *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. being an endemic pathogen with frequent infection. Nowadays the main method of protection as against *Botrytis cinerea* is the application of chemical fungicides chemicals. Therefore, a better knowledge of local populations is necessary for the planning of the protection procedures.

Based on the results of our examinations we may establish that the growth of the examined samples showed a significant difference under in vitro circumstances, which shows a great deal of variability of the *Botrytis cinerea* populations in Hungary. Twenty-five *Botrytis cinerea* samples from different hosts were analyzed in this study. High resistance was found towards azoxistrobin in seven cases, and low resistance in eight cases.

It was also proved, that the *B. cinerea* is able to bypass the inhibition site of the azoxistrobin via the alternative oxidase. The presence of this alternative mitochondrial electrotransport route considerably reduces the effectivity of the chemical.

Kulcsszavak: *Botrytis cinerea*, azoxistrobin, fungicid-rezisztencia

Keywords: *Botrytis cinerea*, azoxistrobin, fungicide resistance

BEVEZETÉS

A növényvédő szerek használata nélkülözhetetlen a kiváló minőségű és megfelelő mennyiségű termés biztonságos előállításához, de a meg gondolatlan vegyszerhasználat óriási problémákat rejt magában. A fungicid-rezisztencia napjainkban a gyakorlati növényvédelem hatékonyságát veszélyeztető egyik legfontosabb probléma. A specifikus hatásmódú gombaölő szerekkel szemben a hosszú ideig tartó egyoldalú szerhasználat miatt a növénypatogén gombáknak rezisztens populációi alakulnak ki. Ez különösen igaz azokra a fajokra, amelyek minden évben járványszerűen jelennek meg. Ezek közé tartozik a *Botrytis cinerea* is.

A *Botrytis* nemzetség előfordulása nagyobb részt a mérsékelt övre korlátozódik, és ott nagyszámú, eddig bizonyítottan 235 gazdanövény fajt képes megtámadni (Jarvis, 1977). A természetű növények olyan fontos csoportjai veszélyeztetettek, mint a szántóföldi és üvegházi kultúrák, a szőlő, a bogyós gyümölcsök, köztük a szamóca, valamint számos egyéb nagyjelentőségű gyümölcsfaj is. A *Botrytis* nemzetség által okozott megbetegedések megelőzésében és növényvédelmi kezelésében jelentős szerepe van a QoI-fungicideknek, mely vegyületeket a *Strobilurus tenacellus* bazidiumos gombából izolált természetes strobilurin molekulák alapján fejlesztettek ki. Ezek a készítmények egy hatáshelyű fungicidek, ezért velük szemben nagy a rezisztencia kialakulásának a veszélye. A rezisztencia kialakulása a növénypatogén gombákban természetes mutáció eredménye. A rezisztens mutánsok arányának növekedését a gombaölő szer hatásának a csökkenése jelzi.

A QoI-fungicidek olyan vegyületek, melyeket az erdőtalajok korhadó növényi maradványain élő *Strobilurus tenacellus* bazidiumos gombából izolált természetes strobilurin molekulák (Anke, 1995) alapján fejlesztettek ki. Megfigyelték, hogy a szaprofiton kalaposgomba-faj körül más gombák nem telepednek meg. A *Strobilurus*

tenacellusból nyert kivonatnak erős gombaölő hatása volt (Anke *et al.*, 1977). Az agrokémiai iparág kutatói gyorsan felfigyeltek a vegyületekben rejlő lehetőségre. A strobilurinek gombaölő hatása abban rejlik, hogy a mitokondriális respirációt gátolják. A QoI-fungicidok a gombák mitokondriális légzését gátolják a „Quinone outer”-nak nevezett lépésnél. Innen kapták a nevüket is: QoI = Quinone outside Inhibitors. Hazánk területén a QoI-fungicidokat 1998 óta alkalmazzák. Legelőször az azoxistrobint és a kresoxim-metilt vezették be. Ezeket követte a többi vegyület (Taksonyi *et al.*, 2009). A QoI-fungicidok gátló hatásukat a mitokondriumokban fejtik ki. Egyedi hatásmechanizmusuk révén olyan kórokozók ellen is eredményesen alkalmazhatóak, amelyek más gombaölő szerekkel szemben már toleránsak vagy rezisztensek.

ANYAG ÉS MÓDSZER

A megfigyeléseinkhez és vizsgálatainkhoz szükséges mintákat és növényi anyagot az Újfehértói Gyümölcsstermesztési Kutató és Szaktanácsadó Nonprofit Közhasznú Kft. (továbbiakban: Újfehértói Kutató Állomás) ültetvényeiből és a hűtőtárolóban tárolt gyümölcsökről gyűjtöttük, valamint már korábban, a Debreceni Egyetem Agrár- és Gazdálkodástudományok Centruma (AGTC), Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási (MÉK) Kar Növényvédelmi Intézet munkatársai által izolált törzseket használtunk (1. táblázat). A laboratóriumi munkákat ugyancsak a Debreceni Egyetem AGTC MÉK Növényvédelmi Intézet laboratóriumában végeztük.

1. táblázat

A vizsgálatainkhoz használt *Botrytis cinerea* izolátumok

Izolátum jele (1)	Gazdanövény (2)	Mintavétel ideje (3)	Mintavétel helye (4)	Gyűjtő/Izoláló (5)
8001	Repce	2008.04.24.	Nagyréde	Kövics György/Fekete Éva
8002	Repce	2008.04.24.	Nagyréde	Kövics György/Fekete Éva
8003	Repce	2008.04.24.	Nagyréde	Kövics György/Fekete Éva
8004	Repce	2008.04.24.	Nagyréde	Kövics György/Fekete Éva
8005	Repce	2008.04.24.	Nagyréde	Kövics György/Fekete Éva
8006	Repce	2008.04.24.	Nagyréde	Kövics György/Fekete Éva
8007	Repce	2008.04.24.	Nagyréde	Kövics György/Fekete Éva
8008	Repce	2008.04.24.	Nagyréde	Kövics György/Fekete Éva
8020	Málna	2008.05.18.	Nagyréde	Kövics György/Fekete Éva
8021	Málna	2008.05.18.	Nagyréde	Kövics György/Fekete Éva
8022	Málna	2008.05.18.	Nagyréde	Kövics György/Fekete Éva
8029	Szamóca	2008.05.18.	Nagyréde	Kövics György/Fekete Éva
8030	Szamóca	2008.05.18.	Nagyréde	Kövics György/Fekete Éva
8031	Szamóca	2008.05.18.	Nagyréde	Kövics György/Fekete Éva
8032	Szamóca	2008.05.18.	Nagyréde	Kövics György/Fekete Éva
8033	Szamóca	2008.05.18.	Nagyréde	Kövics György/Fekete Éva
8034	Szamóca	2008.05.18.	Nagyréde	Kövics György/Fekete Éva
8047	Szamóca	2008.06.07.	Nagyréde	Kövics György/Fekete Éva
8048	Szamóca	2008.06.07.	Nagyréde	Kövics György/Fekete Éva
8049	Szamóca	2008.06.07.	Nagyréde	Kövics György/Fekete Éva
8061	Szamóca	2008.06.07.	Nagyréde	Kövics György/Fekete Éva
K100401	Körte	2010.01.	Újfehértó tároló	Takács Ferenc
K100402	Körte	2010.01.	Újfehértó tároló	Takács Ferenc
K100501	Körte	2010.01.	Újfehértó tároló	Takács Ferenc
K100502	Körte	2010.01.	Újfehértó tároló	Takács Ferenc

Table 1: *Botrytis cinerea* strains

Strain (1), Host (2), Isolation date (3), Place of isolation (4), Collector/Deponator's name (5)

A vizsgálathoz szükséges mintákat vagy közvetlenül a beteg növényekről izoláltuk a laboratóriumban, vagy steril, vattapálcát tartalmazó mintavevő segítségével gyűjtött konídiumokat szélesztettünk szelektív bengál-rózsa (Sharlau) táptalajra spóraszórással, illetve vattapálcás technikával. Az egy konídiumos tenyészeteket burgonya-dextróz agar táptalajon (PDA, Scharlau) növesztettük, melyet a gyártó utasításának megfelelően 24 g/l burgonya-dextróz, és 15 g/l agar felhasználásával készítettünk. A táptalajokat 500 ml-es üvegekben, autoklávban (Raypa, Spanyolország) sterilizáltuk 20 percig 125 °C-on, 1 bar nyomáson. A minták fungicid-rezisztenciáját a Quadris márkajelzésű, a Syngenta által gyártott szisztemikus fungiciddel vizsgáltuk. A készítmény hatóanyaga 250 g/l azoxistrobin, melyet a szamóca szürkepenészes rothadása ellen kiterjedten alkalmaznak a gyakorlatban. A vizsgálat során alkalmazott koncentrációikat a 2. táblázat tartalmazza. Az azoxistrobinnal mérgezett táptalajba kiegészítésként szalicil-hidroxám savat (*SHAM*) adtunk annak érdekében, hogy gátoljuk az alternatív légzési útvonalat a gomba számára.

A fungicid-rezisztencia vizsgálat során alkalmazott hatóanyagok és koncentrációk

Kezelés (1)	Táptalaj (2)	Hatóanyag (3)	Koncentráció (4)	Egyéb (5)
1.	PDA	azoxistrobin	0,5 mg/l	100 mg/l SHAM
2.	PDA	azoxistrobin	100 mg/l	100 mg/l SHAM
kontroll	PDA	azoxistrobin	0 mg/l	0 mg/l SHAM

Table 2: Chemicals used in fungicide resistance test

Identification of treatment (1), medium (2), chemical agent (3), concentration (4), Other components (5)

Az aktívan növekvő, különböző gyümölcsökről begyűjtött *Botrytis cinerea* izolátumokból 10 mm átmérőjű korongokat vágunk ki steril dugófüró segítségével, lamináris boxban UV fénynél. A korongokat 90 mm átmérőjű Petri-csészébe előkészített táptalajra helyeztük micéliumos felületükkel lefelé. A vizsgálatokat minden izolátum és koncentráció esetében két ismétlésben végeztük. A Petri-csészéket szobahőmérsékleten (20 °C-on), sötétben inkubáltuk. Egy tenyészet telepátmérőjének megállapításához mindig két érték (a legkisebb és a legnagyobb) átlagát vettük. A micéliumok növekedését 48 és 72 óras korban határoztuk meg.

PCR vizsgálatnál a citokrom b 143. pozíciójú nukleotid G-ről A-ra történő cseréjét kívántuk bizonyítani a rezisztencia megállapításához. A vizsgálatához Petri-csészén növesztett tenyészet micéliumából nyertük ki a DNS-t. A feltárás apró kerámia golyókat alkalmazó, nagy teljesítményű, mechanikus sejteltérő készülék segítségével (MagNaLyser, Roche) történt. Az extrakcióhoz kereskedelmi forgalomban kapható kit-et (QuiaGene „Plant DNA Purification Kit”) használtunk, a gyártó leírása szerint.

A PCR reakcióban használt primereket az Integrated DNA Technologies Inc. (Coralville, USA) szintetizálta és a Bio-Science Kft. szállította le. A reakciókat MWG Primus Thermal Cyclor-ben végeztük. A reakciókban felszaporodott termékeket 1,5 %-os, etidium-bromidot tartalmazó agaróz gélben, TAE pufferben (40 mM TRIS, 1mM EDTA, pH=8,0 jéccettel beállítva) futtattuk. A futtatást a szokásos körülmények között végeztük (Sambrook és mtsai, 1989). A 143 (G143A) kodoncserét okozó pontmutáció kimutatását Grasso et al., (2006) módszerével, allél specifikus PCR reakció segítségével végeztük. A DNS szekvenciák meghatározást az Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Németország) végezte.

EREDMÉNYEK

A begyűjtött *Botrytis cinerea* izolátumok micéliumának növekedését az 1. ábra szemlélteti. A kontroll táptalajon minden izolátum esetében nagyobb volt a micélium növekedése, mint az azoxistrobin hatóanyaggal mérgezett táptalajon, viszont az egyes izolátumok között jelentős különbségek voltak a növekedés mértékét tekintve (1. ábra). Ez azt bizonyítja, hogy a vizsgált mintákon belül nagy volt a változékonyság. Jól látható, hogy az Újfehértón körte gyümölcsről izolált *Botrytis* populáció (K100401, K100402, K100501, K100502) növekedése jelentősen kisebb, mint a Nagyréde térségében repcéről izolált populáció (8001, 8002, 8003, 8004, 8005, 8006) növekedése. Természetesen ez nem meglepő, hiszen szakirodalmi adatok arról is beszámolnak, hogy egy ültetvényen belül, sőt egy gyümölcsről izolált *Botrytis cinerea* törzsek között is nagy variabilitás tapasztalható (Váczy et al., 2008).

A 8007 és a 8031 jelzésű minta nagyon érzékeny volt az azoxistrobin hatóanyagra (1. ábra). Mindkét izolátum átlagosan fejlődött a kontroll táptalajon, viszont az azoxistrobin már a 0,5 mg/l koncentrációnál is teljesen blokkolta a gomba növekedését. Ezzel ellentétben több vizsgált mintánál a 100 mg/l koncentrációjú azoxistrobin hatóanyag ugyan kifejtett bizonyos mértékű gátlást a micélium növekedésére, de teljesen nem tudta azt gátolni. Ezen minták esetében (8001, 8002, 8020, 8021, 8022) jó okunk van feltételezni rezisztencia kialakulását.

A vizsgálat kezdetén a szakirodalomban leírtaknak megfelelően a táptalajhoz szalicil-hidroxám savat (SHAM) adtunk annak érdekében, hogy gátoljuk az alternatív légzési útvonalat a gomba számára. A második és harmadik kísérlet alkalmával bővítettük a méréseket és kísérletet állítottunk be a szalicil-hidroxám sav hatásának a vizsgálatára is.

A különböző hatóanyag koncentrációknak a gomba növekedésére gyakorolt gátló hatását a következő képlet segítségével számítottuk:

$$G=100-(S/K)*100$$

G – gátlás mértéke [%]

S – a gomba növekedése 72 óra alatt azoxistrobinnal kezelt táptalajon [mm]

K – gomba növekedése 72 óra alatt kontroll táptalajon [mm]

A vizsgált *Botrytis cinerea* törzsek eltérő módon reagáltak az alternatív légzési utat blokkoló szalicil-hidroxám sav (SHAM) jelenlétére. Két törzs (8049, 8061) esetében a kontroll táptalajon mért növekedést összehasonlítva, SHAM jelenlétében fokozódott a gomba szilárd táptalajon mért *in vitro* növekedése (2.-3. ábra). A többi izolátum esetében SHAM jelenlétében különböző mértékben gátlódott a növekedés.

1. ábra. Az egyes *Botrytis cinerea* izolátumok növekedése (mm) burgonya dextróz (PDA) táptalajon, valamint 0,5 mg/l és 100 mg/l azoxistrobint tartalmazó PDA táptalajokon szalicil-hidroxám sav (SHAM) jelenlétében.

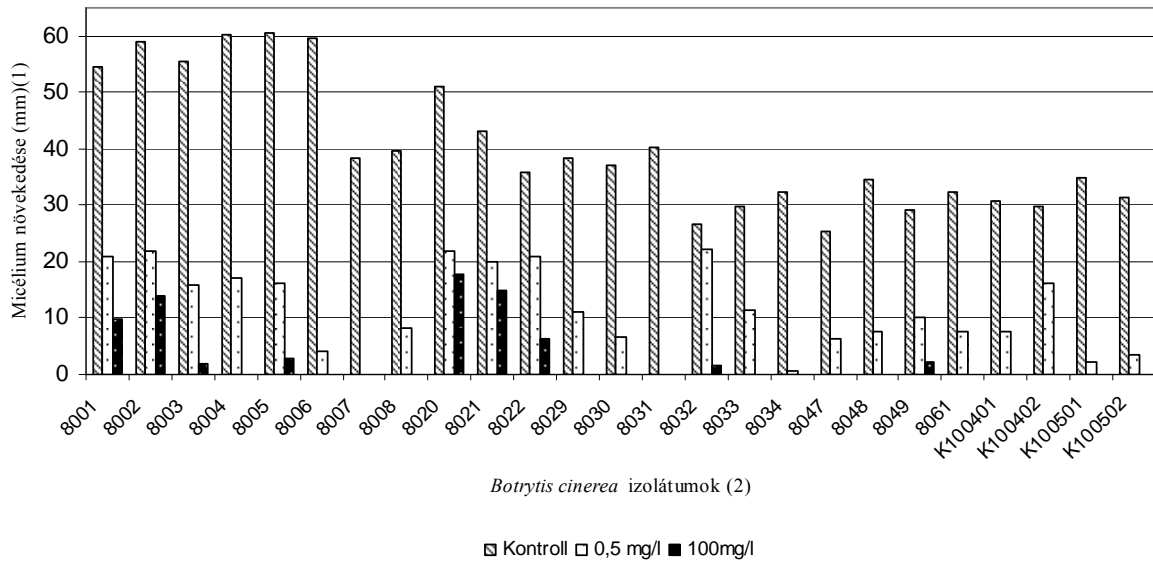


Figure 1: Micelial growth of fungal strains on PDA amended SHAM and different concentration of azoxystrobin
 Micelial growth (1), Fungal strains (2), 0 mg/l azoxystorbin, 0.5 mg/l azoxystorbin, 100 mg/l azoxystorbin, respectively

SHAM-ot nem tartalmazó táptalajon a gombának lehetősége van a légzési láncban az alternatív légzési út használatára. Az azoxistrobint hatáshelye a mitokondriumban, a citokrom b-n van. Az alternatív légzési út ezt a helyet kerüli ki. Ezt bizonyítja az elvégzett kísérletünk eredménye is. A SHAM-ot nem tartalmazó táptalajon az azoxistrobint kevésbé fogta vissza a növekedést (3. ábra). A 100mg/l azoxistrobint koncentráció esetében 18-89%-kal kevésbé gátlódott a miceliális növekedés, mint az alternatív légzési utat blokkolva, SHAM jelenlétében. A 0,5 mg/l azoxistrobint tartalmazó táptalajon pedig esetenként még a SHAM-al kiegészített, de azoxistrobint nem tartalmazó kontroll táptalajon mért növekedést is meghaladta SHAM hiányában a gomba növekedése, ami egyértelműen bizonyítja a SHAM növekedést gátló hatását.

2. ábra. *Botrytis cinerea* izolátumok növekedése szalicil-hidroxám savat (SHAM) tartalmazó burgonya dextróz (PDA) táptalajon (kontroll), valamint 0,5 és 100 mg/l azoxistrobint és SHAM-ot tartalmazó PDA táptalajokon.

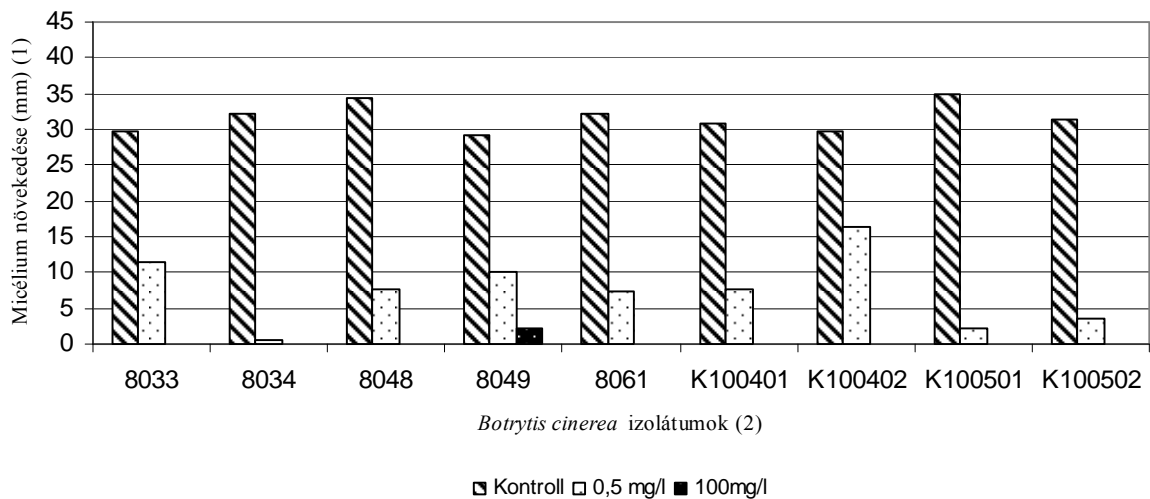


Figure 2: Micelial growth of fungal strains on PDA amended SHAM and different concentration of azoxystrobin
 Micelial growth (1), Fungal strains (2), 0 mg/l azoxystorbin, 0.5 mg/l azoxystorbin, 100 mg/l azoxystorbin, respectively

3. ábra. *Botrytis cinerea* izolátumok növekedése burgonya dextróz (PDA) táptalajon (kontroll), valamint 0,5 és 100 mg/l azoxistrobint tartalmazó PDA táptalajokon

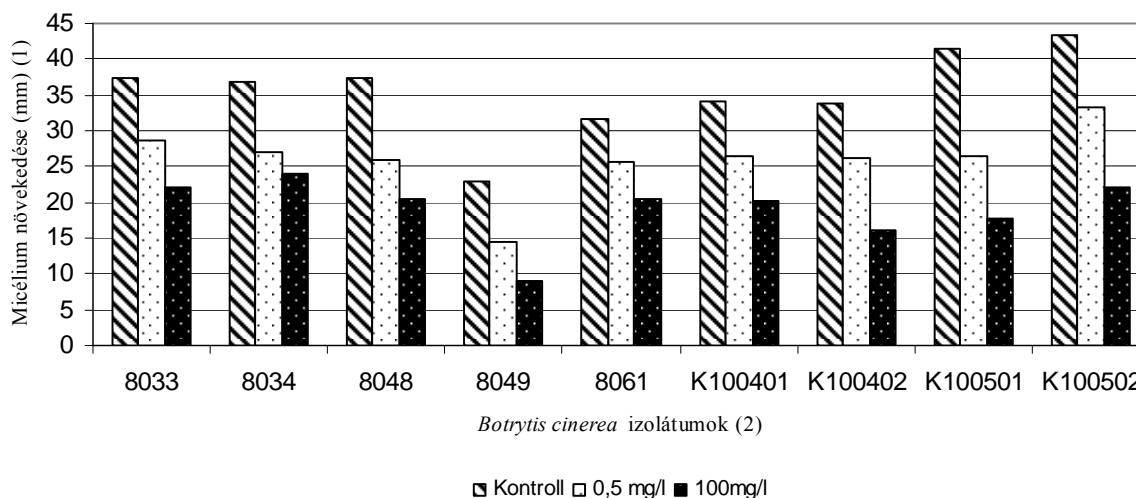


Figure 3: Micelial growth of fungal strains on PDA amended different concentration of azoxystrobin
 Micelial growth (1), Fungal strains (2), 0 mg/l azoxystrobin, 0,5 mg/l azoxystrobin, 100 mg/l azoxystrobin, respectively

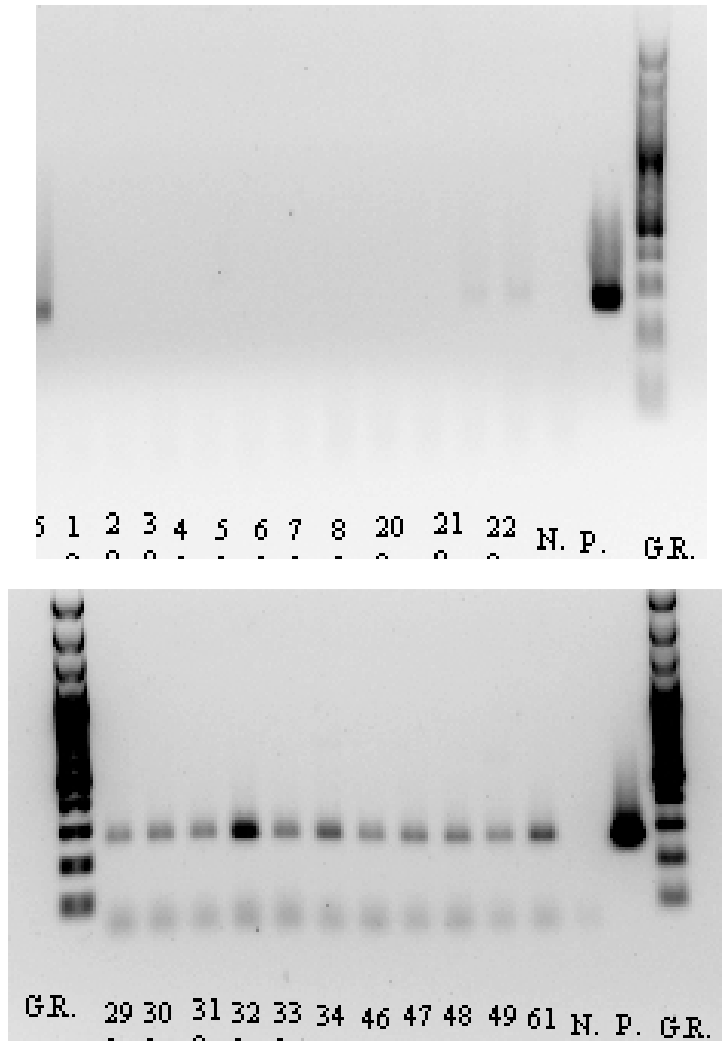
A vizsgált törzsek között voltak azoxistrobinnal rezisztens izolátumok (8001, 8002, 8020, 8021, 8022, 8032, K100402). Ezeknél kimutatható volt a *citokróm b* 143. pozíciójú nukleotidjának G-ról A-ra történő cseréje a mutációt kimutató helyspecifikus primerek segítségével (3. táblázat), ami az irodalom szerint leggyakoribb oka a rezisztencia kialakulásának.

A PCR reakció azonban olyan izolátumoknál is a rezisztenciát okozó mutáció jelenlétére utalt, ahol a micélium gátlási eredmények érzékenységet mutattak. Ennek két magyarázata lehetséges: (i) a mutációt kimutató primerek specifikitása nem megfelelő, (ii) a mitokondriális genom nem egységes (heterogén), és a PCR reakció a kis arányú rezisztenciát okozó mutáció jelenlétét is kimutatta, ami azonban a fenotípusban még nem jelent meg. Ennek eldöntésére további vizsgálatok elvégzésére van szükség.

Az általunk vizsgált izolátumokban különbözőképpen változott a micéliális növekedés SHAM jelenlétében, vagyis az alternatív oxidázon keresztüli légzési útvonal gátlásával. Az azoxistrobinnal történő gátlásának mértéke minden esetben jelentősen csökkent SHAM hiányában, amikor a gombának lehetősége volt kikerülni az alternatív oxidázon keresztül a gátló citokróm *bcl*-en keresztül elektrontranszport utat. A gátlás csökkenésének mértéke azonban jelentősen különbözött az egyes törzsekben. Ez arra hívja fel a figyelmet, hogy nem szabad egyetlen törzsről korlátozni a rezisztencia, és az AOX szerepének vizsgálatát.

A különböző izolátumok növekedésében, azoxistrobinnal szembeni érzékenységében mutatkozó változékonyság a magyarországi *Botrytis cinerea* populációk nagy változékonyságára utalnak. Ezt erősítették meg a SHAM hatását vizsgáló eredményeink is, egyetértésben Váczy *et al.* (2008) korábbi eredményeivel.

4. ábra. A citokróm b 143. pozíciójú nukleotid G-ról A-ra történő cseréjét kimutató PCR reakciót követő agaróz gélelektroforézis képe



G.R. : molekula marker (Fermentas: O'Gene ruler 100bp pus),

N: negatív kontroll, P: pozitív kontroll.

A felső sor 1- 22 számai a 8001-8022, az alsó kép 29-61 számai a 8029-8031 izolátumokat jelölik.

Figure 4: Agarose gel electrophoresis following the specific PCR for G143A detection

G.R. : molecular marker (Fermentas: O'Gene ruler 100bp pus),

N: negative control, P: positive controls

The numbers of the upper row show strains from 8001 to 8022, the numbers on the second picture (29-61) show strains from 8029 to 8031

KÖVETKEZTETÉSEK

A *Botrytis cinerea* elleni védekezés legfőbb módját napjainkban is a kemikáliák használata jelenti, ezért a védekezési eljárások ésszerű tervezése szükségessé teszi a megfelelő megértését a fungicid-rezisztencia megjelenésének a kórokozók szabadföldi populációiban.

A vizsgálataink eredményei alapján megállapíthatjuk, hogy az egyes törzsek növekedése nagy eltérést mutatott *in vitro* körülmények között, ami a magyarországi populációk nagyfokú változékonyságára utal. A nagyfokú diverzitásra utal az egyes izolátumok eltérő fogékonysága az azoxistrobin hatóanyagra. A kísérletben szereplő 25 különböző helyről és növényről begyűjtött *Botrytis cinerea* izolátum közül 7 esetben mutattunk ki magas fokú rezisztenciát és 8 mintánál pedig alacsony fokú rezisztenciát az azoxistrobin hatóanyagra.

Kísérletünkben sikerült bizonyítanunk, hogy a *Botrytis cinerea* gomba képes kikerülni azt a pontot a mitokondriális elektrontranszportban, ahol az azoxistrobin hatáshelye van, és egy alternatív légzési útvonalat használva a szer hatásának nagymértékben ellenáll.

A gomba alternatív légzési útvonalát gátló szalicil-hidroxám sav (SHAM) eltérően befolyásolta a különböző izolátumok növekedését, és a fungicid gátlásának mértékét. Az alternatív légzési út aránya tehát szintén eltérő volt a vizsgált törzseknél, ami szintén az izolátumok nagyfokú diverzitására utal. Logikusnak tűnik, hogy nagy diverzitású populációban nagyobb valószínűséggel találhatóak meg fungicid rezisztenciát hordozó egyedek, ezért

a védekezési eljárások kidolgozásánál szigorúan be kell tartani az anti-rezisztens stratégiákat, mint például a szerrotáció, „multi-site inhibitorok” és szerkombinációk használata.

3. táblázat.

A vizsgált *Botrytis cinerea* izolátumok azoxistrobin rezisztenciája

Izolátum (1)	Növekedés gátlása (%)* (2)		Becsült EC ₅₀ (3)	Érzékenység** (4)	PCR*** (5)
	0,5 mg/l	100mg/l			G143A
8001	61,47	82,11	< 0,5	HR	+
8002	63,14	76,27	< 0,5	HR	+
8003	71,17	96,85	< 0,5	LR	+
8020	57,35	65,20	< 0,5	HR	+
8021	53,49	65,70	< 0,5	HR	+
8022	41,26	81,82	> 0,5	HR	+
8004	71,78	100,00	< 0,5	LR	+
8005	73,14	95,45	< 0,5	LR	+
8006	93,28	100,00	< 0,5	S	+
8007	100,00	100,00	< 0,5	S	+
8008	79,25	100,00	< 0,5	S	+
8029	70,78	100,00	< 0,5	LR	+
8030	81,88	100,00	< 0,5	S	+
8031	100,00	100,00	< 0,5	S	+
8032	16,82	94,39	> 0,5	HR	+
8047	74,26	100,00	< 0,5	LR	+
8033	61,34	100	< 0,5	LR	+
8034	98,45	100	< 0,5	S	+
8048	77,54	100	< 0,5	S	+
8049	65,81	92,31	< 0,5	LR	+
8061	76,74	100	< 0,5	S	+
K100401	74,8	100	< 0,5	LR	+
K100402	45,38	100	>0,5	HR	+
K100501	93,57	100	< 0,5	S	-
K100502	88,8	100	< 0,5	S	-

* Növekedés gátlása 100 és 0,5 mg/l tartalmazó táptalajon az azoxistrobin nem tartalmazó táptalajhoz viszonyítva.

S: (érzékeny) növekedés gátlás > 90% a 100 mg/l vagy növekedés gátlás > 75% a 0,5 mg/l **azoxistrobin tartalmazó táptalajon.

LR: (alacsony rezisztencia) 75% > növekedés gátlás > 50% a 0,5mg/l **azoxistrobin** tartalmazó táptalajon.

HR: (magas rezisztencia) 90% > növekedés gátlás 100 mg/l vagy 50% > növekedés gátlás 0,5mg/l **azoxistrobin** tartalmazó táptalajon.

***A citokrom b 143. pozíciójú nukleotid G-ról A-ra történő cseréjét kimutató PCR reakció eredménye: -: negatív; +: gyenge pozitív, ++: erős pozitív

Table 3: Azoxystrobin resistance of different *Botrytis cinerea* strains

Fungal strains (1), Inhibition of mycelial growth(2), Estimated EC₅₀ (3), Sensitivity (4), PCR of G143A (5)

* Inhibition rate of mycelial growth on minimal media containing 100 and 0,5 mg/l azoxystrobin

**S: (sensitive) inhibition > 90% on 100 mg/l azoxystrobin or inhibition > 75% on 0,5 mg/l azoxystrobin

LR: (low resistance) 75% > inhibition > 50% a 0,5mg/l azoxystrobin

HR: (high resistance) 90% > inhibition 100 mg/l or 50% > inhibition 0,5mg/l azoxystrobin

***Detection of cytochrome b G143A mutation with selective PCR primers: -: negative; +: slight positive, ++: strong positive

Eredményeink alapján az alternatív légzési útvonal gátlása nélkül minden esetben kisebb volt a fungicid gátlás mértéke. A SHAM jelenlétében *in vitro* körülmények között az azoxistrobin hatóanyag megfelelő mértékben blokkolta a gomba növekedését, míg a SHAM hiányában bizonyítottan gyengébb hatást ért el, ami az alternatív légzési útvonallal magyarázható. Jogosan merül fel a kérdés, hogy szabadföldi körülmények között, ahol az azoxistrobin hatóanyag önmagában kerül kipermetezésre, az *in vivo* hatás bizonytalan, mivel AOX-on keresztül a gomba ki tudja kerülni a gátlóhelyet. Ezen okok miatt javasolt minden esetben egy eltérő hatásmechanizmusú kontakt készítménnyel történő kombináció alkalmazása.

Vizsgálatunkban kimutathatók voltak az azoxistrobinnal szemben rezisztens izolátumok. Ennek bizonyítását allél specifikus PCR reakció segítségével végeztük el, és bizonyítottuk a *citokrom b* 143. pozíciójú nukleotidjának G-ról A-ra történő cseréjét, ami az irodalom szerint a leggyakoribb oka a rezisztencia kialakulásának.

A nagy genetikai variabilitás magyarázat lehet arra, hogy miért alakul ki olyan gyorsan és könnyen rezisztencia a különböző, *Botrytis cinerea* ellen alkalmazott fungicidekre. A megfelelő növényvédelmi technológia kifejlesztéséhez – a populáció strukturájának alapos megismerése mellett – nélkülözhetetlen információt gyűjteni az aktuális fungicid-rezisztencia állapotokról az egyes gyümölcsstermő területeken. Az

egyoldalú és okszerűtlen szerhasználat következtében ugyanis mindenképpen számítani kell rezisztens törzsek megjelenésére és elterjedésére. Vizsgálataink ezt megerősítették, illetve ugyanilyen tendencia kialakulását mutatták a *Botrytis cinerea* ellen jelenleg elterjedten használt azoxistrobin hatóanyag esetében is. Mivel a gomba nagy genetikai változatossággal van jelen Magyarországon, a különböző szercsoportok rotációs használata javasolt egy vegetációs időszakon belül.

A *Botrytis cinerea* populációk megismerése révén sikeresebbé válhat a védekezés a különböző genetikai tulajdonsággal és eltérő növényvédőszer érzékenységgel rendelkező törzsek ellen. Ezen felül csökkenhet a növényvédőszer felhasználás, és így nagyobb költséghatékonyság mellett lényegesen kevesebb vegyszer felhasználásával növelhető a termésbiztonság. Ily módon kisebb lesz a környezetre nehezedő növényvédőszer terhelés, valamint kevesebb vegyszermaradékot tartalmazó termék állítható elő.

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

A projekt az NKTH A2-2006-0017 számú pályázat támogatásával valósult meg.

IRODALOM

- Anke T. (1995): The antifungal strobilurins and their possible ecological role. *Can. J. Bot.*, 73(S1): 940-945.
- Anke T.-Oberwinkler F.-Steglich W.-Schram, G. (1977): The strobilurins New antifungal antibiotics from the basidiomycete *Strobilurus tenacellus*. *J. Antibiot.*, 30: 806-810.
- Grasso V.-Palermo S.-Sierotzki H.-Garibaldi A.-Gisi U. (2006): Cytochrome b gene structure and consequences for resistance to Qo inhibitor fungicides in plant pathogens. *Pest Manag. Sci.*, 62: 465-472.
- Jarvis W. R. (1977): *Botryotinia and Botrytis Species: Taxonomy, Physiology and Pathogenicity*. Research Branch, Canada Department of Agriculture, Ottawa, Canada
- Sambrook J.-Fritsch E.-Maniatis T. (1989): *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Taksonyi P.-Füzi I.-Kocsis L. (2009): A szőlő egyes kórokozóinak QoI- fungicidekkel szembeni rezisztenciájának kialakulása Magyarországon. *Növényvédelem*, 45 (7): 361-366.
- Váczy, K.-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.