

Magyarországi *Botrytis cinerea* izolátumok citokróm b génjének diverzitása

Mojtaba Asadollahi^{1,2} - Fekete Éva¹ - Fekete Erzsébet¹ - Karaffa Levente¹ – Irinyi László² – Sándor Erzsébet*²

¹Department of Genetics and Applied Microbiology, Faculty of Science and Technology, University of Debrecen, Debrecen, Hungary

²Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Debrecen, Debrecen, Hungary

*karaffa@agr.unideb.hu

ÖSSZEFOGLALÁS

A citokróm b az eukarióták mitokondriumának belső membránjában található III. légzési komplex része, a kódoló gén (CYTB) pedig a mitokondriális genomban található. A QoI csoportba tartozó fungicidek a Qo (külső kinol-oxidációs) helyhez kötődve gátolják a III. légzési komplexet, és így a mitokondriális légzést. A QoI fungicideket (köztük az azoxystrobin) bevezetésük óta széles körben használják, mivel hatékonyak számos, gazdaságilag jelentős növényt megbetegítő gomba, köztük a szürkerothadás kórokozója ellen. A QoI hatású szerekkel szembeni rezisztencia elsősorban a citokróm b fungicid kötő helyén kialakuló változásokhoz köthető. A szürkerothadás elleni védekezésben jelentős szerepet kapnak a különböző kemikáliák, ezért a hatékony védekezés megtervezéséhez elengedhetetlen a kórokozó populáció reisztenciájában szerepet játszó gének diverzitásának megismerése.

Munkánk során különböző gazdanövényekről 2008-2009 években gyűjtött magyarországi *B. cinerea* egyspórás izolátumokat vizsgáltunk. A minták csaknem felében kimutatható volt a egy nagy intron jelenléte a CYTB génben, melyet PCR fragment analízis segítségével határoztunk meg. A CYTB specifikus PCR reakciója, valamint a CYTB fragmentum szekvencia vizsgálata alapján az izolátumok egy részénél kimutatható volt a 143. helyen a G143A kodoncsere okozó, és azoxystrobin rezisztenciát okozó pontmutáció. Hazánkban is számolnunk kell tehát is az azoxystrobinnal szemben rezisztens *B. cinerea* populációk jelenlétével. A magyarországi *B. cinerea* izolátumok mitokondriális genomjában található CYTB viszonylag kevés minta vizsgálata alapján is nagyfokú diverzitást mutatott, hasonlóan a korábban vizsgált sejtmagban kódoló szekvenciákhoz, ami a QoI hatású fungicidek körütekintő felhasználására int.

SUMMARY

In the mitochondrion of eukaryotes, cytochrome b is a component of respiratory chain complex III. Cytochrome b is encoded by the cytochrome b (CYTB) gene located in the mitochondrial genome. The fungicidal activity of QoIs relies on their ability to inhibit mitochondrial respiration by binding at the so-called Qo site (the outer quinol-oxidation site) of the complex III. Since their introduction, QoIs (like azoxystrobin) have become essential components of plant disease control programs because of their wide-ranging efficacy against many agriculturally important fungal diseases like grey mould on various crops. QoI resistance primarily arises from a target-site-based mechanism involving mutations in the mitochondrial CYTB. As the management of grey mould is often dependent on chemicals, the rational design of control programs requires the information about the diversity of genes connected with resistance in field populations of the pathogen.

Monospore *B. cinerea* field isolates has been collected during 2008-2009 from different hosts in Hungary. PCR fragment length analysis indicated the high frequency presence of type large intron in the isolates while in a few strains G143A substitution could also be detected. These results indicated the heterogeneity of CYTB in the Hungarian *B. cinerea* populations, which possibly involve the heteroplasmy of this mitochondrial gene, moreover indicates the existence of azoxystrobin resistant populations in Hungary.

This work was supported by NKFP-A2-2006/0017 grant. Erzsébet Fekete is a grantee of the János Bolyai Scholarship (BO/00519/09/8).

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

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

BEVEZETÉS

A mitokondriális légzést a citokróm bc1 enzimkomplex ubiquinon oxidációs centrumában (Qo helyen) gátló QoI fungicidek csoportja egyike a mezőgazdaságban használt legfontosabb gomba ellenes szereknek (McDougall, 2006). Több mint 30 kórokozó fajban, például lisztharmatokban, peronoszpórákban, az alfafa varasodásánál, illetve a szürkerothadás kórokozójában mutattak ki eddig QoI fungicidekkel szembeni rezisztenciát (Ischii, 2010). A QoI rezisztencia molekuláris mechanizmusát tanulmányozva bebizonyították, hogy a citokróm b gén (CYTB) egyetlen pontmutációja hatására létrejövő egyetlen aminosav csere kiválthatja a rezisztenciát az enzimen. Különösen a 143. aminosav glicinről alaninra cserélődése gyakori, ami nagymértékű azoxystrobin rezisztenciát okoz (Fernández-Ortuño et al., 2008).

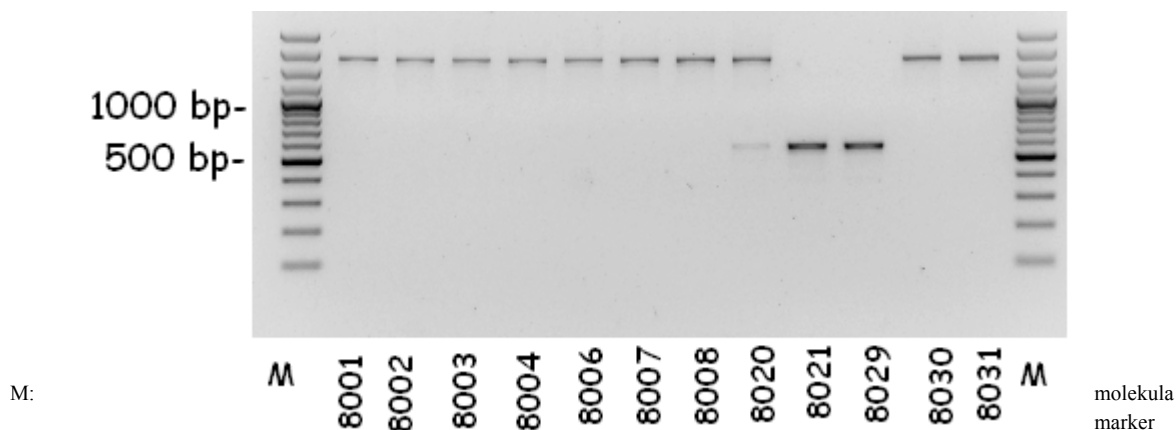
A szürkepenész kórokozója, a *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. (teleomorph *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel) gomba számos fontos gyümölcs, zöldség és dísznövénykultúra rendszeres és jelentős károsítója. A szürkerothadás elleni vegyszeres védekezést megnehezíti, hogy a populációkban könnyen kialakulhat fungicid rezisztencia (FRAC). Számos QoI csoportba tartozó fungicid (azoxystrobin, pyacostrobin, metominostrobin) használható hatékonyan a *B. cinerea*-val szembeni védekezésben (Leroux et al., 2002). Kaliforniából és Kínából

származó *B. cinerea* izolátumokban már mutattak ki azoxystrobinnal szemben rezisztenciát *B. cinerea* szabadföldi izolátumokban (Jiang et al., 2009). A szürkepenész elleni eredményes kémiai védekezéshez fontos a kórokozó populáció rezisztenciájában szerepet játszó gének diverzitásának megismerése.

ANYAG ÉS MÓDSZER

A vizsgálatban szereplő *Botrytis cinerea* mintákat 2007-2009 között, fertőzött növényi részekről izoláltuk. Az egyspórás tenyészetekből a genom vizsgálatához szükséges DNS-t Petri csészén növesztett tenyészet micéliumából nyertük ki (Váczy et al., 2009). Az I. intron előfordulását a *CYTb* génben PCR fragment analízis segítségével határoztuk meg Jiang et al. (2009) leírása alapján. A 143 (G143A) kodoncseret 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.

1. ábra: Különböző *Botrytis cinerea* izolátumokból *cytb*-BcF és *cytb*-BcR primerekkel felszaporított *CYTb* fragmentumok agaróz gélelektroforézises futatási képe



(*O'GeneRuler*TM 100 bp *Plus* DNA Ladder, Fermentas)

8001-8031: *B. cinerea* izolátumok száma

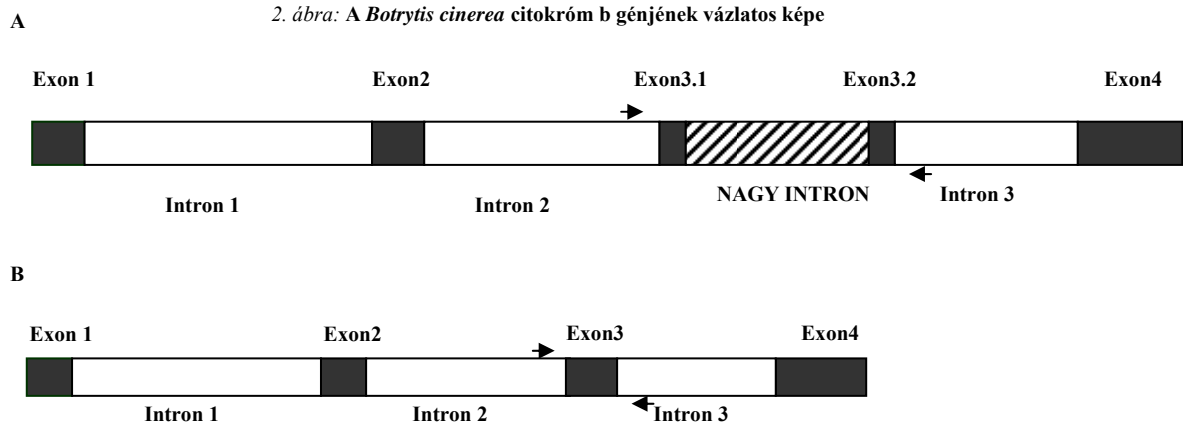
Figure 1: PCR results of Cytochrome *b* amplified with *cytb*-BcF and *cytb*-BcR primers.

GR: molecular marker marker (*O'GeneRuler*TM 100 bp *Plus* DNA Ladder, Fermentas), 8001-8031: *B. cinerea* isolates

EREDMÉNYEK

A *cytb*-BcF és *cytb*-BcR primerpár segítségével két különböző, egy 1768 bp és egy 564 bp nagyságú fragmentum szaporodott fel a *B. cinerea* izolátumokból (1. ábra). A nagyobb (1768 bp) fragmentum esetén a 143-as pozíciójú kodon után, a 3. exonba ékelődve egy 1205 bp hosszú nagy intron (Jiang et al., 2009) is található a *CYTb* szekvenciában az 1-3 intronok mellett (2. ábra). Néhány mintában (pl.: 8020), egyaránt kimutatható volt a gén a nagy intront tartalmazó, illetve a nagy intron nélküli forma (1. ábra).

A *CYTb* fragmentum szekvencia vizsgálata alapján az izolátumok egy részénél kimutatható volt a 143. helyen a GGT kodon GCT kodonra változása (3. ábra). Előbbi glicint, míg utóbbi alanint kódol.



A: A *CYTB* nagy intront tartalmazó formája, B: A *CYTB* nagy intron nélküli formája

A nyilak a *cytb*-BcF és *cytb*-BcR primerek bekötődési helyét jelölik.

Figure 2: Schematic diagram of *CYTB* of *Botrytis cinerea*

A: *CYTB* with large intron B: *CYTB* without large intron

NAGY INTRON: large intron

Arrows indicate the anellation syts of *cytb*-BcF and *cytb*-BcR primers.

3. ábra: Magyarországi *Botrytis cinerea* izolátumok citokróm b szekvenciájának részlete

```

9001 : TATTCTAGCTTATTCTCTGCCCTACGGGCAAATGTCACCTGTGAGCTGCTACAGTTATTACAAATCTTATGAGTGCTGTACCATGAATT
9002 : TATTCTAGCTTATTCTCTGCCCTACGGGCAAATGTCACCTGTGAGCTGCTACAGTTATTACAAATCTTATGAGTGCTGTACCATGAATT
9003 : TATTCTAGCTTATTCTCTGCCCTACGGGCAAATGTCACCTGTGAGCTGCTACAGTTATTACAAATCTTATGAGTGCTGTACCATGAATT
9004 : TATTCTAGCTTATTCTCTGCCCTACGGGCAAATGTCACCTGTGAGCTGCTACAGTTATTACAAATCTTATGAGTGCTGTACCATGAATT
9010 : TATTCTAGCTTATTCTCTGCCCTACGGGCAAATGTCACCTGTGAGCTGCTACAGTTATTACAAATCTTATGAGTGCTGTACCATGAATT
9011 : TATTCTAGCTTATTCTCTGCCCTACGGGCAAATGTCACCTGTGAGCTGCTACAGTTATTACAAATCTTATGAGTGCTGTACCATGAATT
9012 : TATTCTAGCTTATTCTCTGCCCTACGGGCAAATGTCACCTGTGAGCTGCTACAGTTATTACAAATCTTATGAGTGCTGTACCATGAATT
9019 : TATTCTAGCTTATTCTCTGCCCTACGGGCAAATGTCACCTGTGAGCTGCTACAGTTATTACAAATCTTATGAGTGCTGTACCATGAATT
9020 : TATTCTAGCTTATTCTCTGCCCTACGGGCAAATGTCACCTGTGAGCTGCTACAGTTATTACAAATCTTATGAGTGCTGTACCATGAATT
    
```

9001-9020: *Botrytis cinerea* izolátumok száma

Figure 3: Partial sequences of *CYTB* in Hungarian *Botrytis cinerea*

9001-9020: strain numbers of *B. cinerea*.

KÖVETKEZTETÉSEK

A magyarországi *B. cinerea* egyspórás izolátumok mitokondriális genomja viszonylag kevés minta vizsgálata alapján is nagyfokú diverzitást mutatott, hasonlóan a korábban vizsgált sejtmagban kódoló szekvenciákhoz (Váczy et al., 2008). A minták egy részében előfordult a 143-as pozíciójú kodon után, a 3. exonba ékelődő, I. típusú, nagy intron, ami gyakran megtalálható a mitokondriális genom elektrontranszport rendszerét, továbbá a riboszómális RNS-t kódoló génekben (Foury et al., 1998). Az intron jelenléte esetén nem volt kimutatható azoxystrobin rezisztencia az eddigi eredmények alapján (Banno et al., 2009; Jiang et al., 2009). Ennek valószínű magyarázata, hogy az azoxystrobin rezisztenciához kapcsolódó G143A mutáció jelentősen befolyásolná az 143. kodon után beépülő nagy intron kivágódását az mRNS érése folyamán. A nagy intronnal rendelkező mintákban mi sem tudtuk kimutatni egyetlen esetben sem a G143A mutációt. Ugyanakkor ez, a 143. helyen a G143A kodoncsereét okozó pontmutáció a vizsgált magyarországi *B. cinerea* izolátumok csaknem felében kimutatható volt. Eredményeink alapján hazánkban is számolnunk kell tehát is az azoxystrobinnal szemben rezisztens *B. cinerea* populációk jelenlétével.

Magyarországi *Botrytis cinerea* izolátumok citokrómb b génjének diverzitása

Izolátum száma (1)	G143A mutáció (2)	CYTB amplikon nagysága (3)
8001	-	1768 bp
8002	-	1768 bp
8003	-	1768 bp
8004	-	1768 bp
8006	-	1768 bp
8007	-	1768 bp
8008	-	1768 bp
8020	-	1768 bp 564 bp
8021	+	564 bp
8022	+	564 bp
8029	+	1768 bp
9001	+	564 bp
9002	+	564 bp
9003	+	564 bp
9004	+	564 bp
9010	+	564 bp
9011	+	564 bp
9012	+	564 bp
9019	+	564 bp
9020	+	564 bp

-: a vad típust jelölő, eredménytelen PCR, +: a mutációt jelző, eredményes PCR

Table 1: Genetic diversity of CYTB in Hungarian *B. cinerea* strains

Strain number (1), G143A mutation (2), length of amplified CYTB fragment (3)

-: no PCR amplification indicating the wild type sequence, +: successful PCR amplification, indicating the presence of mutation

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A projektet a (NKTH; A2-2006-0017) pályázat támogatta. Fekete Erzsébet az MTA Bólyai János Kutatói Ösztöndíjasa (BO/00519/09/8).

IRODALOM

- Banno, S. - Yamashita, K. - Fukumori, F - Okada, K. - Uekusa, H. - Takagaki, M. - Kimura, M. – Fujimura, M. (2009): Characterization of QoI resistance in *Botrytis cinerea* and identification of two types of mitochondrial cytochrome b gene. *Plant Pathol* 58:120–129.
- 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.
- FRAC: Pathogen risk list (http://www.frac.info/frac/publication/ahang/FRAC_Pathogen_risk%20list.pdf)
- 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.
- Ishii, H. (2010): QoI Fungicide Resistance: Current Status and the Problems Associated with DNA-Based Monitoring. In U. Gisi et al. (eds.), *Recent Developments in Management of Plant Diseases, 37 Plant Pathology in the 21st Century 1*, Springer Science and Business Media B.V. 2010.
- 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.
- Leroux, P. - Fritz, R. -Debieu, D. - Albertini, C. - Lanen, C. - Bach, J. - Gredt, M. - Chapeland, F. (2002). Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. *Pest Manag. Sci.* 58: 876-888.
- McDougall, P. (2006): Phillips McDougall agriservice report. Pathhead, Midlothian, Scotland, UK
- McGrath, M. T. (2001). Fungicide resistance in cucurbit powdery mildew: experiences and challenges. *Plant Dis* 85: 236-245.
- Váczy, K.Z. - Sándor, E. - Karaffa, L. - Fekete, E. - Fekete, É. - Árnási, 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.