

A NÖVÉNYKÓROKOZÓ GOMBÁK DMI-FUNGICIDEKSEL SZEMBENI REZISZTENCIÁJÁNAK MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI HÁTTERE

Molnár Orsolya¹, Németh Z. Márk¹, Horváth N. Áron¹, Matolcsi Fruzsina¹, Kovács M. Gábor^{1,2} és Pintye Alexandra¹

¹ATK Növényvédelmi Intézet, 1525 Budapest, Pf. 102

²ELTE Biológiai Intézet, Növény-szervezettani Tanszék, 1117 Budapest, Pázmány Péter sétány 1/C.
E-mail: molnar.orsolya@agrar.mta.hu

A demetiláz inhibitor (DMI) típusú fungicideket számos gazdaságilag jelentős kórokozó gomba ellen alkalmazzák a növényvédelemben. Az elmúlt évek intenzív DMI-fungicides kezeléseinek hatására fokozatos hatáscsökkenés tapasztalható, melynek hátterében több gén megváltozása állhat. A szemle cikkben áttekinjtük a különböző kórokozó gombákban már kimutatott rezisztencia-mechanizmusokat és az érzékenység-eltolódás lehetséges okait.

Részletesen bemutatjuk a rezisztenciához köthető, a DMI-fungicidek célfehérjéjét kódoló génben található pontmutációkat, a fungicidek gomba sejtéből való eltávolítását befolyásoló gének túlműködését, és a növényvédőszer enzimatikus lebontásának lehetőségét.

Kulcsszavak: DMI-fungicidek, CYP51 gén, túltermelés, pontmutáció

A növényvédelmi gyakorlatban fungicid rezisztenciáról akkor beszélünk, ha egy gombaölő szer szabályos használata (megfelelő dózis, kijuttatási idő és mód) ellenére hatástalannak bizonyul, és ez bizonyíthatóan annak a következménye, hogy elterjednek az adott hatóanyaggal szemben rezisztenciát biztosító mutációt hordozó, azaz a hatóanyaggal szemben ellenálló törzsek. Magyarországon átfogóan vizsgálták például a strobilurinok hatáscsökkenésének molekuláris biológiai hátterét, több növénykórokozó gomba esetében is (Kiss és mtsai 2012). Az ún. egy hatáshelyű fungicidekkel szemben nagyobb eséllyel jelenhet meg a rezisztencia, hiszen itt akár egyetlen természetes eredetű mutációval kialakulhat ez a jelenség (Dula Bencéné 2009, Bán Rita 2017). A rezisztenciát okozó genotípus elterjedését az adott fungiciddel történő gyakori kezelések is nagy mértékben elősegíthetik.

A demetiláz inhibitor (DMI) típusú fungicidek is a fent említett egy hatáshelyű gombaölő szerek közé tartoznak, melyek az ún. SBI (Szterol Bioszintézis Inhibitor) vegyületek egyik csoportját alkotják. Kémiai szerkezet alapján több csoportba sorolhatóak, pl. pirimidinek, imidazolok, triazolok, melyekről az *1. táblázatban* nyújtunk tájékoztatást. Nevük a hatásukra utal: demetiláz inhibitorok, tehát egy demetiláz (CH₃ csoport eltávolítását végző) enzim gátlásán keresztül fejtik ki hatásukat. Ezen enzim a gombasejtmembrán egyik alapvető anyagának, a szterán vázas ergoszterolnak a bioszintézisében (*1.A ábra*) vesz részt (Lv és mtsai 2016). Az ergoszterol befolyásolja a magasabbrendű gombák sejtmembrán szerkezetét, és fontos szerepet játszik a mechanikai és oxidatív stresszhatások elleni védelemben (Dupont és mtsai 2012). A demetiláz enzim gátlása esetén más vegyületek képződnek (*1.B ábra*) és

1. táblázat

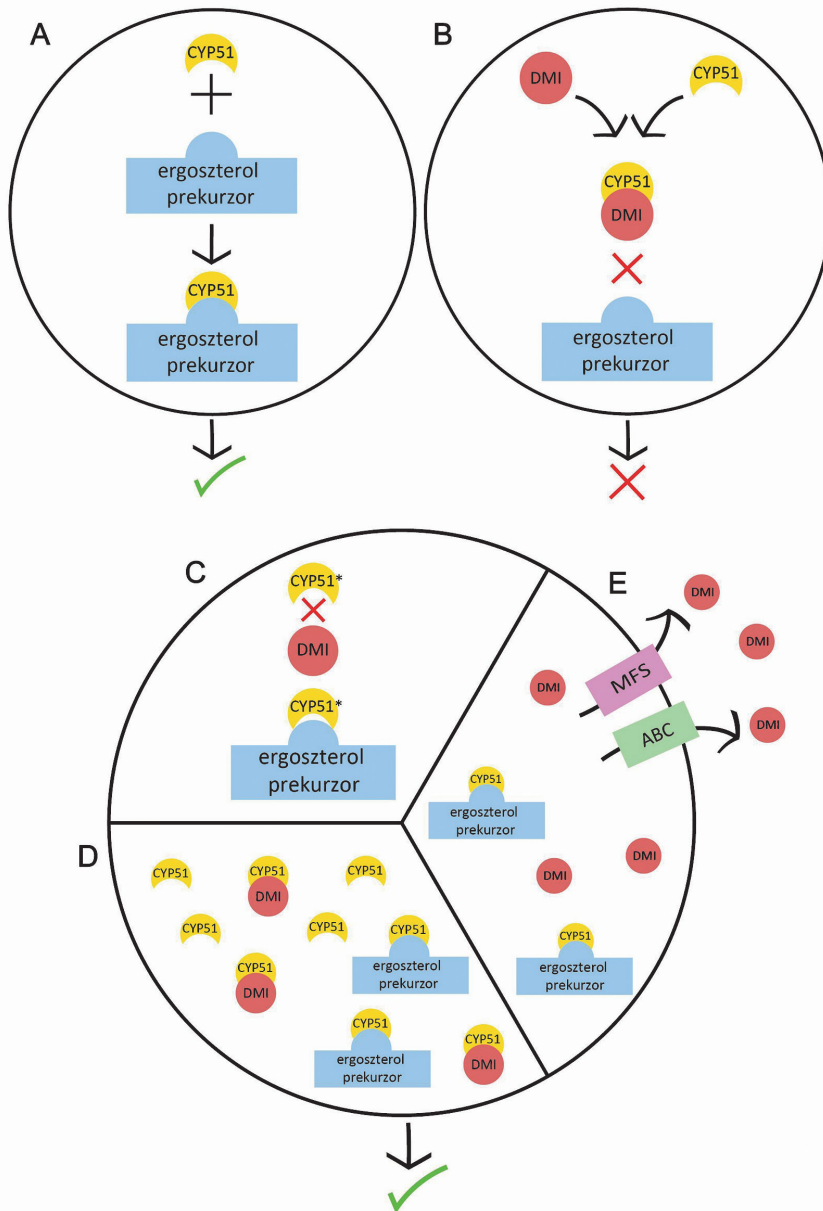
DMI-hatóanyagok a FRAC (Fungicide Resistance Action Committee) honlapja alapján

Piperazinok	Piridinek	Pirimidinek	Imidazolok	Triazolok	Triazolintionok
triforin	pirifenox	fenarimol	imazalil	azakonazol	protiokonazol
	pirisoxazol	nuarimol	oxpokonazol	bitertanol	
			pefurazoát	bromukonazol	
			prokloráz	ciprokonazol	
			triflumizol	difenokonazol	
				dinikonazol	
				epoxikonazol	
				etakonazol	
				fenbukonazol	
				fluquinkonazol	
				fluzilazol	
				flutriafol	
				hexakonazol	
				imibenkonazol	
				ipkonazol	
				metkonazol	
				miklobutanil	
				penkonazol	
				propikonazol	
				simekonazol	
				tebukonazol	
				tetrakonazol	
				triadimefon	
				triadimenol	
				tritikonazol	

épülnek be a membránba, ezért végső soron a gomba növekedése megáll (Dupont és mtsai 2011, Sgherri és mtsai 2014).

A citokróm P450 (CYP) fehérjék nevüket jellegzetes 450 nm-es hullámhosszon történő fényelnyelésükről kapták. A DMI-fungicidok által gátolt enzim, a szterol 14 α -demetiláz (CYP51, vagy más nevezéktan szerint ERG11) is ezek közé tartozik. Ez az egyetlen CYP enzim, mely a baktériumoktól a növényeken és a gombákon keresztül egészen az emlősökig minden szervezetben megtalálható (Song és mtsai 2018). Mint minden citokróm P450 fehérje, eukariótákban a CYP51 is az endoplazmatikus retikulum integráns membránfehérjéje. Bár az élővilágban az alapszerkezet és a működés

hasonló, a különböző organizmusok CYP51 enzimeinek aminosavsorrendje az evolúció során meglehetősen megváltozott (Lepesheva és Waterman 2004). Az eukarióták között mindössze 23 aminosav azonosságát mutatták ki, míg a gombák CYP51 enzimei között 37 aminosav bizonyult azonosnak (Lepesheva és Waterman 2011, Becher és Wirsal 2012). Egyes gombáknál akár egy izolátumon belül több enzimváltozat is működhet (Liu és mtsai 2011, Cools és mtsai 2013). Az enzimben egy vastartalmú kofaktor (hem) található, mely a katalizált reakcióban nélkülözhetetlen szerepet játszik. Röntgen-krisztallográfiás vizsgálatok és háromdimenziós modellek alapján megállapították, hogy a DMI-fungicidok a CYP51 enzim



1. ábra. Ergoszterol bioszintézis és a DMI-fungicidekkel szembeni rezisztencia lehetséges mechanizmusai
 A. Normál ergoszterol bioszintézis. A CYP51 demetilálja a prekursor molekulát.
 B. Elégtelen ergoszterol bioszintézis a DMI-fungicidek hatására. A hatóanyag kapcsolódik a CYP51 enzimhez, így az a prekursor demetilációja nem megy végbe.
 C-D-E. A növénypatogén gombáknál előforduló fő DMI-rezisztencia mechanizmusok:
 C. A CYP51 enzim mutációja (CYP51*) miatt a fungicidmolekula nem képes kötődni az enzimhez, ezért végbemehet a normál ergoszterol bioszintézis.
 D. Az efflux pumpák (MFS és ABC transzporterek) túltermelése miatt csökken a fungicid koncentráció az intracelluláris térben.
 E. A CYP51 túltermelése miatt magasabb az intracelluláris CYP51 koncentráció, nem minden CYP51 enzim gátolódik.

belsejében levő hem kofaktor vasához és egyes környező aminosavakhoz kötnek, ezzel megakadályozzák az átalakítandó molekula kötődését, és végső soron az ergoszterol képződését (Becher és Wirsal 2012).

1972-ben jelent meg kereskedelmi forgalomban az első DMI-fungicid, a triforin, amelyet öt éven keresztül sikerrel alkalmaztak többek között uborkalisztharmat ellen (Schepers 1983). Nem alakult ki ellene rezisztencia, mert a triforin vizes szuszpenzióban hamar lebomlik, ezért a kórokozókra gyakorolt szelekciós nyomása viszonylag alacsony (Schepers 1983). 1976-ban, az első triazol bevezetése idején már ismert volt, hogy kezelés hatására elterjedhetnek rezisztens törzsek (pl. *Aspergillus fumigatus*, *Ustilago maydis* esetében), viszont ezek csökkent sporuláló képessége és a spórák csökkent csírázóképesége miatt a mezőgazdaságban is jelentős DMI-rezisztencia megjelenését valószínűtlennek ítélték (Fuchs és Drandarevski 1976). A várakozással ellentétben mégis fokozatosan elterjedt a rezisztencia a DMI-fungicidekkel szemben. A sok éves, intenzív DMI-fungicid kezelés hatására lassú érzékenység-eltolódás tapasztalható a mezőgazdasági gyakorlatban (Kaptás és Enisz 1992, Dula Bencéné 2007). A rezisztencia mértéke általában alacsony, és tapasztalatok szerint, ha egy DMI-hatóanyaggal szemben a kórokozó érzékenysége csökken, nem jelenti feltétlenül azt, hogy a többi DMI-fungicid is veszít hatásából (Brent és Hollomon 2007, Leroux és Walter 2011). Úgy is mondhatjuk, hogy a DMI-fungicidek között a keresztrezisztencia csak részben alakul ki. Ezeket a jelenségeket több gén megváltozásának tulajdonítják (Josepovics 1991, Délye és mtsai 1997a), melyek különböző rezisztenciamechanizmusok köré csoportosíthatóak, és erősíthetik egymás hatását (Cools és mtsai 2013, Price és mtsai 2015).

A rezisztenciamechanizmusok közül a legismertebb, legerjedtebb és a legkönnyebben vizsgálható, a **CYP51 fehérjét kódoló gén kódoló szakaszának mutációja** (*1.C ábra*). A mutáció hatására megváltozik az enzim aminosavsorrendje, és ez által a háromdimenziós szerkezete is (Mullins és mtsai 2011).

Minden olyan mutáció rezisztenciához vezethet, amely megakadályozza a fungicidmolekula kötődését az enzimhez. Számos ilyen mutációt azonosítottak mind a humán- mind a növénypatogén gombák közt, mely mutációk egy része több gombacsoportban is megtalálható (ekvivalens mutációk), más részük viszont csak egy adott gombafajra jellemző (Cools és mtsai 2013). A legjelentősebb növénypatogén gombáknál azonosított mutációkat a *2. táblázat* foglalja össze.

A növénykórokozó gombák közül elsőként a szőlőlisztharmat kórokozója (*Erysiphe necator*) csökkent triadimenol-érzékenységű törzseiből mutatták ki a CYP51 enzim 136. aminosavának tirozinnál fenil-alaninra való cseréjét (Y136F) okozó A495T mutációt (Délye és mtsai 1997a). Ezt a pontmutációt azonosították európai (Délye és mtsai 1997a, Dufour és mtsai 2010), ázsiai (Délye és mtsai 1997a), észak- és dél-amerikai (Jones és mtsai 2014, Frenkel és mtsai 2015, Rallos és Baudoin 2016) DMI-rezisztens izolátumokban is. Az A495T jelű pontmutáció a DMI-rezisztencia egyik legismertebb molekuláris markere.

Az Y136F aminosavcserét okozó mutációt és annak ekvivalenseit találták meg leggyakrabban a csökkent érzékenységű gombaizolátumokban mind a humángyógyászati, mind a növényvédelmi kutatások során (ld. *2. táblázat*, Cools és mtsai 2013, Price és mtsai 2015, Pereira és mtsai 2016). Az Y136F aminosavcsere eltérő módon befolyásolja a gombák érzékenységét az egyes DMI-fungicidekre. Ennek oka a DMI szerek különböző szerkezete, és ennek folytán különböző kötődésük a CYP51 enzimhez. Ezt a jelenséget a búza szeptóriás levélfoltosságának kórokozója, a *Zyloseptoria tritici* CYP51 enzimének modellvizsgálatával bizonyították (Mullins és mtsai 2011, Cools és mtsai 2013). Az enzim háromdimenziós szerkezete az Y137F aminosavcsere (az Y136F aminosavcsérének felel meg a *Z. tritici* esetében) következtében úgy változott meg, hogy specifikusan gátolta a triadimenol kötődését, míg az epoxinazolét nem. Rallos és Baudoin (2016) mérései szerint az Y136F aminosavcserét hordozó *E. necator* izolátumok különböző mértékben voltak

A DMI-rezisztenciával összefüggésbe hozható aminosavcserék a CYP51 fehérjében

Kórokozó	Gazdanövény/ betegség	Aminosavcsere	Szakirodalom
<i>Zymoseptoria tritici</i>	búza/szeptóriás levélfoltosság	L50S, D107V, D134G, V136A, V136C, V136G, Y137F, M145L, N178S, S188N, S208T, N284H, H303Y, A311G, G312A, A379G, I381V, A410T, G412A, Y459C, Y459D, Y459N, Y459P, Y459S, G460D, Y461D, Y461H, ΔY459 vagy ΔG460, ΔY459/G460, Y461S, V490L, G510C, N513K, S524T	Cools és Fraaije 2013
<i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>tritici</i>	búza/búzalisztharmat	Y136F	Yan és mtsai 2009
<i>Puccinia triticina</i>	búza/vöröszrozsda	Y134F	Stammler és mtsai 2009
<i>Parastagonospora nodorum</i>	búza/pelyvafoltosság	Y144F, Y144H	Pereira és mtsai 2017
<i>Oculimacula acuformis</i>	búza/szemfoltos szártőbetegség, szártörő gomba	A29P, V37A, Q167H, Y486H, S505Q	Albertini és mtsai 2003
<i>Oculimacula yallundae</i>	búza/ szemfoltos szártőbetegség, szártörő gomba	S35T, Q43H, D78Y, E106K, N244S, S505Q	Albertini és mtsai 2003
<i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>hordei</i>	árpa/árpalisztharmat	Y136F, K147Q	Wyand és Brown 2015
<i>Ramularia collo-cygni</i>	árpa/ramuláriás levélfoltosság	I325T, I328L, Y403C/Y405H	FRAC SBI Working Group 2019
<i>Erysiphe necator</i>	szőlő/lisztharmat	Y136F	Délye és mtsai 1997a
<i>Pyrenopeziza brassicae</i>	repce/levélfoltosság	G460S, S508T	Carter és mtsai 2014
<i>Cercospora beticola</i>	takarmányrépa/ cerkospóras levélrágva	E297K, I330T, P384S	Nikou és mtsai 2009
<i>Phakopsora pachyrhizi</i>	szójabab/szójarozsda	Y131F, Y131H, K142R, F120L, I145F, I475T	Schmitz és mtsai 2013
<i>Pseudocercospora fijiensis</i>	banán/fekete Sigatoka betegség	Y136F, A313G, Y461D, Y463D, Y463H, Y463N, T18I, V106D	Cañas-Gutiérrez és mtsai 2009, Díaz-Trujillo és mtsai 2018
<i>Venturia nashicola</i>	japán körte/ventúriás varasodás	Y133	Cools és mtsai 2002
<i>Penicillium digitatum</i>	citrusfélék/zöld penész	V55A, Y136H, M144T, K253E, Q309H, E331A, T432, I440V, K449R, G459S, R462H, F506I, S507P, K508R, G511S	Wang és mtsai 2014

rezisztensek a három tesztelt DMI fungicidre, tebukonazolra, miklobutanilra és fenarimolra.

Az *E. necator*nak kétféle genotípusa ismert Európában, az ún. A és B genotípus (Gadoury és mtsai 2012). A szakirodalom szerint az A genotípus populációi gyakran az ún. zászlós hajtásokról (fertőzött rügyekből, tavasszal megjelenő lisztharmatos hajtások) mutathatóak ki (Délye és mtsai 1997b). Továbbá jellemző az A genotípusra a micélium formájában történő áttelelés mellett az alacsony genetikai változatosság és egyes szerzők véleménye szerint a szinte csak ivartalan módon, konídiumokkal történő szaporodás (pl. Délye és mtsai 1997b, Amrani és Corio-Costet 2006). Ezzel szemben a B genotípus populációira jellemző a nagy genetikai változatosság, és az ivaros termőtest formájában való áttelelés (pl. Délye és mtsai 1997b, Brewer és Milgroom 2010). Szakirodalmi adatok alapján a B genotípus Dél-Európában jellemzően a vegetációs időszak második felében terjed (Délye és mtsai 1999). Magyarországon elsősorban a súlyosabb járványokat okozó, ivaros termőtesttel áttelelő B genotípus okoz problémát (Dula és mtsai 2016). Az A és B genotípusok fungicidérzékenység tekintetében feltételezhetően eltérnek: a B genotípus populációiban gyakrabban mutatták ki a rezisztenciát jelző A495T pontmutációt; ezzel is magyarázható a két genotípus időbeli elkülönülése Európa déli részén (Miazzi és mtsai 2008, Dufour és mtsai 2011). Délye és mtsai (1999) olyan mutációkat írtak le a *CYP51* génben, melyek az egyes genotípusokra jellemzőek, ezért összefüggésben állhatnak a két genotípus DMI-rezisztenciájának eltéréseivel. A mutációk közül kettő aminosavcserét is okoz (G37V, I156T), míg egy harmadik (R493) hatására aminosavcsere nem következik be (Délye és mtsai 1999).

A búza- és az árpalisztharmat kórokozójának (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*, *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) DMI-rezisztenciájának hátterében elsősorban a már említett Y136F aminosavcserét találták csökkent triadimenol érzékenységu mintákat vizsgálva (Délye és mtsai 1998, Wyand és Brown 2005). A különböző érzékenységu izolátumok *CYP51* génjének

szekvenálása és összehasonlítása azonban megmutatta, hogy más rezisztenciamechanizmusok is állhatnak a háttérben. A jelentős mértékben csökkent érzékenységet mutató árpalisztharmat törzsekben az Y136F aminosavcserével kombinációban kimutattak egy további (K147Q) aminosavcserét is (Wyand és Brown 2005). Ezzel ekvivalens kombinációt azonosítottak Schmitz és mtsai 2013-ban a szójarozsdat okozó *Phakopsora pachyrhizi* azon izolátumaiban, melyeknél csökkent DMI-érzékenységet tapasztaltak.

A DMI-rezisztenciát okozó mutációk változásában érdekes dinamikát figyeltek meg a búza szeptóriás levélfoltoltosság kórokozójának (*Z. tritici*) vizsgálata során. Herbáriumi minták feldolgozásának tanúsága szerint a DMI-fungicid rezisztenciáért felelőssé tehető mutációk ÉNy-Európából eredtek, az aszkospórák a széllel kelet felé terjedtek, ahol az ivaros folyamatok során bekövetkező rekombináció után a fungicidre kevésbé érzékeny bevándorló genotípusok váltak dominánssá. Több mint harminc olyan aminosavcserét okozó mutációt írtak le a kórokozó *CYP51* génjében, amely befolyásolta a gomba DMI-érzékenységét. Ezek a mutációk fokozatosan egymásra épülve egyre több hatóanyaggal szemben alakítottak ki rezisztenciát (Cools és Fraaije 2013, Lucas és mtsai 2015). Jelenleg egyre inkább terjed a modern azolokkal (protriokonazol, epoxikonazol) szembeni rezisztencia, amely együtt járt egy új aminosavcsere (S524T) elterjedésével is (Cools és mtsai 2011, Lucas és mtsai 2015). A *Z. tritici*nél először 2001-ben azonosított I381V aminosavcsere, mely kapcsolatba hozható a kórokozó tebukonazol-rezisztenciájával, mára széles körben elterjedt a kórokozó európai populációiban. Az Y137F aminosavcserét hordozó törzsek viszont, melyek csökkent triadimenol-érzékenységet mutattak, ma már gyakorlatilag eltűntek a *Z. tritici* populációiból, ahogy a triadimenolt kiszorították a modernebb azolok (Lucas és mtsai 2015).

Úgyszintén a *Z. tritici* vizsgálata során tapasztalták, hogy bizonyos aminosavcserék, melyek szabadföldön kombinációban jelennek meg más aminosavcserékkel, önmagukban, mesterségesen létrehozott mutánsokban

letálasak lehetnek. Laboratóriumi vizsgálatok kimutatták, hogy az egyébként elterjedt I381V aminosavcsere funkcióképtelen enzimet eredményez; de az enzím működését részben helyreállíthatja egy további aminosavcsere (Y461H, Cools és mtsai 2010, Price és mtsai 2015). A szabadföldről izolált *Z. tritici* törzsekben az I381V aminosavcsere mindig együtt jár vagy egy kettős aminosavkieséssel ($\Delta Y459/G460$) vagy egy aminosavcserével a 459. vagy a 461. pozícióban (Cools és mtsai 2010, Cools és mtsai 2013, Lucas és mtsai 2015).

A CYP51 fehérje folyamatos túltermelődése (1.D ábra) is okozhatja a DMI-fungicidok hatáscsökkenését. Általában annak a DNS régióknak a megváltozása áll a jelenség hátterében, amely feltételezhetően a *CYP51* gén működését szabályozza. A *CYP51* gén túlműködésén alapuló rezisztencia független attól, hogy mely DMI-fungicid intenzív használatának hatására terjedt el, tehát teljes keresztrezisztenciát jelenthet ezen fungicidokkal szemben. A növénypatogének között elég gyakran felfedezhető ez a mechanizmus. Számos kórokozó esetében a *CYP51* gén szabályozó régiójába beépülő génszakaszok okozzák a túltermelődést. A jelenséget kimutatták például az alma ventúriás varasodását okozó *Venturia inaequalis* (Schnabel és Jones, 2001, Villani és mtsai 2016), a cseresznye blumeriellás betegségét okozó *Blumeriella jaapii* (Ma és mtsai 2006), a csonthéjasok moniliás betegségét okozó *Monilinia fructicola* (Luo és Schnabel, 2008), a búza szeptóriás levélfoltosságát okozó *Z. tritici* (Cools és mtsai 2012), a Nyugat-Európában a repce levélfoltosságát okozó *Pyrenopeziza brassicae* (Carter és mtsai 2014), és a banán fekete fekete Sígatoka betegségét okozó *Pseudocercospora fijiensis* (Diaz-Trujillo és mtsai 2018) egyes rezisztens izolátumaiban. A beépülő szakaszok különböző hosszúságúak lehetnek, gyakran visszavezethetőek ún. ugráló genetikai elemekre (transzpozonokra), és hatékony szabályozó régiókat tartalmazhatnak (Sun és mtsai 2013, Cools és mtsai 2013). Egyes kórokozó gombáknál azonban, például a takarmányrépa cercosporás levélrügyját okozó *Cercospora beticola* (Bolton és mtsai 2012) és

a búza vöröszrozdáját okozó *Puccinia triticina* (Stammler és mtsai 2009) esetében, a túltermelés genetikai háttere nem ismert.

Frenkel és munkatársai (2015) Chile területén, Rallos és Baudoin (2016) pedig az USA-ban gyűjtött *E. necator* izolátumokban mutattak ki egy pontmutációt (A1119C) a *CYP51* génben, amely összefüggésbe hozható a fehérje túltermelődésével. Mivel ez a pontmutáció nem okoz változást a kódolt *CYP51* enzím aminosavsorrendjében, és az *E. necatorban* működő *CYP51* gén szabályozó régiójának izolálása egyelőre nem volt sikeres, csak feltételezések vannak, milyen módon lehet kapcsolatban ez a pontmutáció a túltermelődéssel (Frenkel és mtsai 2015, Rallos és Baudoin 2016).

Rallos és Baudoin (2016) megfigyelték, hogy a DMI-fungicidokra kevésbé érzékeny *E. necator* izolátumok tartalmazzák mind a mutáns (A495T), mind pedig a vad típusú génváltozatot, és a mutáns génváltozatok hordozták a *CYP51* enzím folyamatos túltermelődésére utaló A1119C pontmutációt is. Álláspontjuk szerint a több génváltozat előnyös a gomba számára, mert a mutáns változat (esetleg több példányban) biztosítja a megfelelő enzím termelődését szelekciós nyomás, vagyis fungicidkezelés alatt, míg a vad típusú génváltozat gondoskodik az optimális ergoszterol bioszintézisről, amikor lehetséges.

2014-ben közzé tett munkájukban Jones és munkatársai kimutatták, hogy az egyes *E. necator* izolátumokban a **CYP51** gén **több kópiában** (2-14!) található meg (1.D ábra), és ez összefüggésbe hozható a gén túlműködésével, a túlműködés pedig a DMI-fungicidokkal szemben kialakult rezisztenciával. A többkópiás izolátumokban a génváltozatok jelentős része hordozta az A495T mutációt, ami a DMI-rezisztencia ismert markere (1d. mutáció a *CYP51* génen belül). Igazolták, hogy minél több másolatban tartalmazta a vizsgált törzs a *CYP51* gént, annál kevésbé volt hatással a növekedésre a tesztben alkalmazott DMI-fungicid. Jones és mtsai (2014) aktív, ugráló genetikai elemeket detektáltak az *E. necator* genomjában, melyek felelősek lehetnek például a *CYP51* gén sokszorozódásáért is. Véleményük szerint, ha

megjelenik az A495T mutáció, további szelekciós nyomás hatására a gomba számára előnyös ennek a génváltozatnak több kópiás jelenléte (Jones és mtsai 2014).

Aszójarozsdát okozó *Phakopsora pachyrhizi* vizsgálata során is hasonló rezisztenciamechanizmust fedeztek fel a *CYP51 gén pontmutációi mellett* (Schmitz és mtsai 2013). A *CYP51* fehérje folyamatos túltermelődése volt jellemző egyes izolátumokra, melyek minden tesztelt DMI-fungiciddal (epoxikonazol, metkonazol, tebukonazol) szemben közepes érzékenységet mutattak. Ezekben az izolátumokban a *CYP51 gén* pontmutációkat hordozó kópiája mellett a vad típusú kópiát is kimutatták (Schmitz és mtsai 2013).

Egyes gombáknál **több *CYP51* génváltozat működhet egy időben.** Ezek a paralóg génváltozatok a fonalas gombák kialakulásának idején génduplikáció, majd az azt követő divergens evolúció útján alakulhattak ki (Hawkins és mtsai 2014). Minden magasabbrendű gombában megtalálható a *CYP51B* változat, míg a *CYP51A* bizonyos gombacsoportokban idővel degradálódhatott. E két génváltozat mellett találtak egy a *Fusarium* nemzetségre jellemző harmadikat is, a *CYP51C*-t. Bár a paralóg gének funkciója átfed egymással (pl. a *Fusarium oxysporum* esetében, Zheng és mtsai 2018), a DMI-fungicidre rezisztens törzsek esetében általában a *CYP51A* mutációját vagy túlműködését mutatták ki. Ezt a jelenséget megfigyelték már *Fusarium graminearum* (Fan és mtsai 2013, Duan és mtsai 2018), *Aspergillus fumigatus* (Mellado és mtsai 2005), *Penicillium digitatum* (Sun és mtsai 2013) és *Magnaporthe oryzae* (Yan és mtsai 2011) esetében is.

Tanulságos esetet publikált egy angol kutatócsoport 2014-ben (Hawkins és mtsai 2014). Az árpa rinhospóriumos levélfoltosságát okozó *Rhynchosporium commune* DMI-rezisztenciáját vizsgálták herbáriumi árpalevelek (1892–2008) és új minták feldolgozásával. Vizsgálatukba négy triazolot vettek be, a propikonazolt, a tebukonazolt, az epoxikonazolt és a protiokonazolt. Azt tapasztalták, hogy a minták döntő többsége a *CYP51B* mellett 1985-ig nem tartalmazta a *CYP51A*

paralógot, ez után viszont gyorsan emelkedett a *CYP51A* paralógot tartalmazó minták száma. Nem találtak a csökkent azol-érzékenységgel összefüggésbe hozható mutációt a génekben, de a kevésbé azol-érzékeny izolátumokban a *CYP51A* gén két változatát, egy működőképes *CYP51A* gént és mellette egy működésképtelen ún. pszeudogént (*CYP51A-p*) találtak. Ezzel szemben az azol-érzékeny törzsekben csak a *CYP51A-p* volt kimutatható. Filogenetikai vizsgálatokkal igazolták, hogy az ősi *CYP51A* paralóg, mely a régi mintákban csaknem elveszett, az új fungicidek kihívásának megfelelően „új életre kelt”. Ez tehát példa arra, hogyan alkalmazkodik egy faj az új környezeti feltételek kihívásához a populációkban már meglévő genetikai változatosság kihasználásával.

A DMI-fungicidekkel szembeni rezisztencia egyik további lehetséges mechanizmusa **olyan gének túlműködése, melyek a fungicidek gomba sejtéből való eltávolítását (I.E ábra) befolyásolják** (Cools és mtsai 2013). A jelenség több, különböző hatóanyagcsoportba tartozó fungicid elleni rezisztenciát (multi drug resistance, MDR) is eredményezhet, amely például a humán gyógyászatban komoly problémát jelent. A növénykórokozó gombák körében is kimutatták ezeknek a géneknek a működésbe lépését azol kezelés hatására laboratóriumi körülmények között (pl. de Waard és mtsai 2006, Becher és mtsai 2011, Cools és mtsai 2013, Ammar és mtsai 2013). Eddigi ismereteink alapján csak a szürkepenész kórokozója (*Botrytis cinerea*) (Leroux és mtsai 1999, Kretschmer és mtsai 2009, Cools és mtsai 2013) és a gyepen dollárfoltot okozó *Sclerotinia homoeocarpa* (Hulvey és mtsai 2012) esetében mutatták ki, hogy ez a mechanizmus hatással volt a fungicidek hatékonyságára szabadföldi körülmények között.

A növényvédő szerek hatóanyagainak enzimatis lebonthatása gyakori védekezési mechanizmus a gyomok és a rovarkártevők körében (Lucas és mtsai 2015) – a gombáknál viszont ritkán fordul elő jelenlegi ismereteink alapján. A DMI fungicidekkel kapcsolatban egy *Fusarium fujikuroi* (a rizs szártőkorhadásának („bakane” betegsége) kórokozója) izolátum

esetében azt találták, hogy a prokloráz csökkent hatékonyságát elsősorban a hatóanyag enzimátikus bontása okozta a célszervezetben (Kim és mtsai 2010).

A legújabb kutatások szerint **egyéb, eddig ismeretlen gének és/vagy mechanizmusok** is szerepet játszhatnak a DMI-rezisztencia kialakulásában. Li és munkatársai (2016) a kabakosok didimellás betegségét okozó tebukonazolra rezisztens *Stagonosporopsis caricae* izolátumok vizsgálata során sem a CYP51 fehérje kódoló szekvenciájában, sem a szabályozó régióban nem találtak eltérést. Több kópiás *CYP51* génre vagy a fungicidek eltávolításában szerepet játszó gének túlműködésére sem találtak bizonyítékot. Lendemann és munkatársai (2015) QTL-analízist (quantitative trait locus=QTL, az a régió a kromoszómákon belül, ahol egyes mennyiségi tulajdonságok kialakításában részt vevő gének helyezkednek el) végeztek *Z. tritici* izolátumokkal. A vizsgálatok során három QTL-t találtak, mely az azol-érzékenységgel volt összfüggésbe hozható. Ezek a QTL-ek legalább 18 különböző gént tartalmaztak, melyek közül három ismert gén emelhető ki: a már ismertetett *CYP51* gén, az *ERG6* gén, amely az ergosterol bioszintézisének egy másik enzimjét kódolja, és a *PKS1* gén. Ez utóbbiról úgy tűnik, növeli a *Z. tritici* melanizáltságát, míg csökkenti a növekedési sebességét és az érzékenységet propikonazollal szemben. Bolton és munkatársai (2016) igazolták több, a *CYP51* gén működésének szabályozásában szerepet játszó transzkripciós faktor bekapcsolását fungicid hatására terakonazol-rezisztens *Cercospora beticola* törzsekben.

Az ismertetett mechanizmusokat külön-külön érdemes értékelni a mezőgazdaságilag is érzékelhető mértékű rezisztencia tekintetében. A *Z. tritici* *CYP51* mutánsainak fent ismertetett dinamikája szépen mutatja a kezelt területeken használt DMI hatóanyagok történetét. Mivel az enzim megváltozása általában hatóanyag-specifikus, az egyes mutációk csak egymásra épülve okoznak teljes rezisztenciát. A hatóanyag használatának felfüggesztésével pedig visszaállítható lehet a kórokozók érzékenysége. Ez a rezisztenciamechanizmus nyitva

hagyja annak a lehetőségét, hogy a gyártók által kifejlesztett új DMI-szerekre hagyatkozzunk, és/vagy az egyes hatóanyagokat váltotassuk egymással a rezisztencia elterjedésének elkerülése érdekében.

Teljesen más a helyzet a CYP51 enzim túltermelését okozó változásokkal, mivel ezek teljes keresztrezisztenciát okoznak a DMI-fungicidekkel szemben. Míg a szabadföldről gyűjtött izolátumokban 2013-ban még ritkának számítottak az ilyen fajta rezisztenciát okozó mutációk (Cools és mtsai 2013), azóta több kórokozóban is felfedezték jelentőségüket (*E. necator*, Jones és mtsai 2014, Frenkel és mtsai 2015, Rallos és Baudoin 2016; *Pyrenopeziza brassicae*, Carter és mtsai 2014; *Rhynchosporium commune*, Hawkins és mtsai 2014; *Venturia inaequalis*, Villani és mtsai 2016; *Fusarium oxysporum* Zheng és mtsai 2018; *Fusarium graminearum*, Fan és mtsai 2013, Duan és mtsai 2018). A rezisztencia mértéke azonban általában alacsonyabb, mint az enzim aktív helyét érintő mutációk során kialakult rezisztenciákban, ezért nagyobb dózisban alkalmazott fungicid kezelés vagy hatékonyabb DMI szerek használata a CYP51-túltermelő törzsek ellen is hatásos lehet (Cools és mtsai 2013).

Komolyabb veszélyt jelentene a fungicidek gomba sejtéből való eltávolításában szerepet játszó gének túlműködése, mert ez nemcsak a DMI hatóanyagcsoporton belül jelentene teljes keresztrezisztenciát, hanem a rezisztencia más hatóanyagú fungicidekre is kiterjedhetne (MDR). De Waard és munkatársai (2006) elemzése szerint az MDR mechanizmus elterjedését elősegíti a különböző hatóanyagú fungicidekkel történő szimultán kezelés.

Az egyéb mechanizmusok jelentőségét egyelőre még nehéz felmérni. Mindenesetre az egyes kórokozó gombák genomjának elemzése, az egyes fungicidek hatására bekapcsolódó gének vizsgálata elősegíti, hogy megértsük a fungicidek hatását, és hogy megakadályozzuk a rezisztencia további terjedését.

A nemzetközi szinten működő FRAC (Fungicide Resistance Action Committee) helyzetjelentése szerint 2018-ban a DMI-fungicidek

szabadföldi hatékonysága megfelelő volt – amennyiben a kezelések a gyártó és a FRAC ajánlásai szerint történtek – a hazai, jelentősebb, gombák okozta növénybetegségek esetében. Ilyen például a búza szeptóriás levélfoltossága, a búza- és árpalisztharmat, a búza vörös és sárga rozsdája, a búza szemfoltos szártörőbetegsége, az árpa hálózatos levélfoltossága, az alma ventúriás varasodása és az almalisztharmat (FRAC SBI Working Group 2019). Az árpa ramuláriás levélfoltossága esetében Európában már léteznek olyan populációk, amelyek rezisztensek a különböző hatásmechanizmusú fungicidekre, ezért több hatáshelyű fungicidek használatát javasolják. A szőlőlisztharmat populációinak érzékenysége változó volt az egyes években és helyszíneken. A tapasztalatok szerint a *CYP51* gén egyes mutációinak gyakorisága nem ad megfelelő képet arról, hogy az *E. necator* populációinak DMI-fungicidekkel szembeni rezisztenciája hogyan alakul.

A FRAC ajánlásai a kezeléseket illetően 2016 óta nem változtak. Ezeket magyarul kimerítően tárgyalják Bán Rita és munkatársai (2017). Röviden összefoglalva: ajánlott a különböző hatásmechanizmussal és hatáshellyel rendelkező fungicidek együttes alkalmazása és/vagy váltogatása. Ajánlott a preventív használat, kerülni kell a kuratív használatot. A rezisztencia kézben tartásához elengedhetetlenül szükséges a FRAC és a gyártók ajánlásainak követése mind a dózis, mind a kezelések időzítése tekintetében. Az engedélyokiratban ajánlott dózist célszerű használni akkor is, ha a megbetegedés mértéke alacsony vagy a DMI-fungicidet más növényvédő szerekkel együtt, keverékben használjuk. A különböző hatásmechanizmussal és hatáshellyel rendelkező fungicidek ajánlott dózisz keveréke biztosítja a még kielégítőbb kezelést és a rezisztencia kézben tartását is.

Mivel a DMI-fungicidek helyett csekély mennyiségű forgalomban lévő alternatív készítmény áll rendelkezésre, a különböző típusú rezisztenciák háttérben álló mechanizmusok megértése egyre inkább sürgető feladat. A már ismert, DMI-rezisztenciához köthető

molekuláris markerek monitorozása, az elterjedés feltérképezése, és termőhely-specifikus előrejelzések készítése mind hozzájárulhatnak egy hatékonyabb és korszerűbb peszticid-felhasználáshoz.

Köszönetnyilvánítás

A szemle cikk a „Szőlő-bor kutatás-fejlesztési kiválósági központ létrehozása” című GINOP-2.3.2-15-2016-00061 projekt keretében készült. Támogatást nyújtott az Emberi Erőforrások Minisztériuma ELTE Felsőoktatási Intézményi Kiválósági Programja ((1783-3/2018/FEKUTSRAT).

FELHASZNÁLT SZAKIRODALOM

- Albertini, C., Gredt, M. and Leroux, P.** (2003): Polymorphism of 14 α -demethylase gene (*CYP51*) in the cereal eyespot fungi *Tapesia acuformis* and *Tapesia yallundae*. Eur. J. Plant Pathol., 109: 117–128.
- Ammar, G. A., Tryono, R., Döll, K., Karlovsky, P., Deising, H. B. and Wirsal, S. G.** (2013): Identification of ABC transporter genes of *Fusarium graminearum* with roles in azole tolerance and/or virulence. PLoS One, 8: e79042.
- Bán R., Turóczy Gy., Perczel M., Kiss J., Égei M., Zsíros N. és Körösi K.** (2017): Fungicid-rezisztencia: a kémiai védelem kritikus pontja. Agroforum, 28: 42–46.
- Becher, R. and Wirsal, S. G. R.** (2012): Fungal cytochrome P450 sterol 14 α -demethylase (CYP51) and azole resistance in plant and human pathogens. Appl. Microbiol. Biotechnol., 95: 825–840.
- Brent, K. J. and Hollomon, D. W.** (2007): Fungicide resistance: the assessment of risk. FRAC monograph.
- Bolton, M. D., Birla, K., Rivera-Varas, V., Rudolph, K. and Secor, G. A.** (2012): Characterization of CbCyp51 from field isolates of *Cercospora beticola*. Phytopathology, 102: 298–305.
- Bolton, M. D., Ebert, M. K., Faino, L., Rivera-Varas, V., de Jonge, R., Van de Peer, Y., Thomma, B. P. H. J. and Seco, G. A.** (2016): rRNA-sequencing of *Cercospora beticola* DMI-sensitive and –resistant isolates after treatment with tetraconazole identifies common and contrasting pathway induction. Fungal Genet. Biol., 92: 1–13.
- Carter, H. E., Fraaije, B. A., West, J. S., Kelly, S. L., Mehl, A., Shaw, M. W. and Cools, H. J.** (2014): Alterations in the predicted regulatory and coding regions of the sterol 14 α -demethylase gene

- (*CYP51*) confer decreased azole sensitivity in the oilseed rape pathogen *Pyrenopeziza brassicae*. *Mol. Plant Pathol.*, 15: 513–522.
- Cañas-Gutiérrez, G. P., Angarita-Velásquez, M. J., Restrepo-Floréz, J. M., Rodríguez, P., Moreno, C. X. and Arango, R.** (2009): Analysis of the *CYP51* gene and encoded protein in propiconazole-resistant isolates of *Mycosphaerella fijiensis*. *Pest Manag. Sci.*, 65: 892–899.
- Chong, P., Arango, R., Stergiopoulos, I., Guzmán, M., Crous, P. W., da Silva, G. F., de Wit, P. J. G. M. and Kema, G. H. J.** (2011): Analysis of azole fungicide resistance in *Mycosphaerella fijiensis*, causal agent of Black Sigatoka. In: Dehne HW, Deising HB, Gisi U, Kuck KH, Russell PE, Lyr H, eds. *Modern Fungicides and Antifungal Compounds VI: Proceedings of the 16th International Reinhardtsbrunn Symposium on Modern Fungicides and Antifungal Compounds*, 2011. Braunschweig, Germany: Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft, 217–222.
- Cools, H. J., Ishii, H., Butters, J. A. and Hollomon, D. W.** (2002): Cloning and sequence analysis of the eburicol 14 α -demethylase encoding gene (*CYP51*) from the Japanese pear scab fungus *Venturia nashicola*. *J. Phytopathol.*, 150: 444–450.
- Cools, H. J., Mullins, J. G. L., Fraaije, B. A., Parker, J. E., Kelly, D. E., Lucas, J. A. and Kelly, S. L.** (2011): Impact of recently emerged Sterol 14 alpha-Demethylase (*CYP51*) variants of *Mycosphaerella graminicola* on azole fungicide sensitivity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77: 3830–3837.
- Cools, H. J., Bayon, C., Atkins, S., Lucas, J. A. and Fraaije, B. A.** (2012): Overexpression of the sterol 14 α -demethylase gene (*MgCYP51*) in *Mycosphaerella graminicola* isolates confers a novel azole fungicide sensitivity phenotype. *Pest Manag. Sci.*, 68: 1034–1040.
- Cools, H. J. and Fraaije, B. A.** (2013): Update on mechanisms of azole resistance in *Mycosphaerella graminicola* and implications for future control. *Pest Manag. Sci.*, 69: 150–155.
- Cools, H. J., Hawkins, N. J. and Fraaije, B. A.** (2013): Constraints on the evolution of azole resistance in plant pathogenic fungi. *Plant Pathology*, 62: 36–42.
- Délye, C., Laigret, F. and Corio-Costet, M.-F.** (1997a): A mutation in the 14 α -demethylase gene of *Uncinula necator* that correlates with resistance to a sterol biosynthesis inhibitor. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 2966–2970.
- Délye, C., Laigret, F. and Corio-Costet, M.-F.** (1997b): RAPD analysis provides insight into the biology and epidemiology of *Uncinula necator*. *Phytopathol.*, 87: 670–677.
- Délye, C., Bousset, L. and Corio-Costet, M. F.** (1998): PCR cloning and detection of point mutations in the eburicol 14 α -demethylase (*CYP51*) gene from *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*, a ‘recalcitrant’ fungus. *Curr. Genet.*, 34: 399–403.
- Délye, C., Ronchi, V., Laigret, F. and Corio-Costet, M.-F.** (1999): Nested allele-specific PCR primers distinguish genetic groups of *Uncinula necator*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 3950–3954.
- Díaz-Trujillo, C., Chong, P., Stergiopoulos, I., Cordovez, V., Guzman, M., De Wit, P. J. G. M., Meijer, H. J. G., Scalliet, G., Sierotzki, H., Peralta, E. L., Isaza, R. E. A. and Kema, G. H. J.** (2018) A new mechanism for reduced sensitivity to demethylation-inhibitor fungicides in the fungal banana black Sigatoka pathogen *Pseudocercospora fijiensis*. *Molec. Plant Pathol.*, 19: 1491–1503.
- Duan, Y., Li, M., Zhao, H., Lu, F., Wang, J. and Zhou, M.** (2018) Molecular and biological characteristics of laboratory metconazole-resistant mutants in *Fusarium graminearum*. *Pesticide Biochem. and Physiol.*, 152: 55–61.
- Dufour, M.-C., Fontaine, S., Josselin Montarrya, J. and Corio-Costet, M.-C.** (2011): Assessment of fungicide resistance and pathogen diversity in *Erysiphe necator* using quantitative real-time PCR assays. *Pest Manag. Sci.*, 67: 60–69.
- Dula B.-né** (2007): A fungicidrezisztencia kérdésköre, különös tekintettel a lisztharmatgombákra. *Növényvédelem*, 43: 253–260.
- Dula B.-né** (2009): Fungicid-rezisztencia helyzet Magyarországon. *Agro Napló*, 13: 73. o.
- Dula B.-né, Lázár J. és Kölber M.** (2016): A szőlő növényvédelme II: betegségek. *Növényvédelem*, 52: 221–262.
- Dupont, S., Beney, L., Thierry, Ferreira T. and Gervais, P.** (2011): Nature of sterols affects plasma membrane behavior and yeast survival during dehydration. *Biochim. Biophys. Acta*, 1808: 1520–1528.
- Fan, J., Urban, M., Parker, J. E., Brewer, H. C., Kelly, S. L., Hammond-Kosack, K. E., Fraaije, B. A., Liu, X. and Cools, H. J.** (2013): Characterization of the sterol 14 α -demethylase of *Fusarium graminearum* identifies a novel genus-specific *CYP51* function. *New Phytol.* 198: 821–835.
- Frenkel, O., Cadle-Davidson, L., Wilcox, W. F. and Milgroom, M. G.** (2015): Mechanisms of resistance to an azole fungicide in the grapevine powdery mildew fungus, *Erysiphe necator*. *Phytopathology*, 105: 370–377.
- Fuchs, A. and Drandarevski, C. A.** (1976): The likelihood of development of resistance to systemic fungicides which inhibit ergosterol biosynthesis. *Neth. J. Plant Pathol.*, 82: 85–87.
- Fungicide Resistance Action Committee (FRAC) Sterol Biosynthesis Inhibitor (SBI) working group** (2019): Protocol of the discussions and recommendations of the SBI working group of the

- Fungicide Resistance Action Committee (FRAC). <https://www.frac.info/docs/default-source/sbi-wg/sbi-wg---current/minutes-of-the-2018-sbi-telco-meeting-recommendations-for-2019-6th-of-june-2019.pdf>. Elérés: 2019. szeptember 23.
- Gadoury, D. M., Cadle-Davidson, L., Wilcox, W. F., Dry, I. B., Seem, R. C. and Milgroom, M. G.** (2012): Grapevine powdery mildew (*Erysiphe necator*): a fascinating system for the study of the biology, ecology and epidemiology of an obligate biotroph. *Molec. Plant Pathol.*, 13: 1–16.
- Hawkins, N. J., Cools, H. J., Sierotzki, H., Shaw, M. W., Knogge, W., Kelly, S. L., Kelly, D. E. and Fraaije, B. A.** (2014): Paralogue re-emergence: a novel, historically contingent mechanism in the evolution of antimicrobial resistance. *Mol. Biol. Evol.*, 31: 1793–1802.
- Hulvey, J., Popko, J. T., Sang, H., Berg, A. and Jung, G.** (2012): Overexpression of ShCYP51B and ShatrD in *Sclerotinia homoeocarpa* isolates exhibiting practical field resistance to a demethylation inhibitor fungicide. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78: 6674–6682.
- Jones, L., Riaz, S., Morales-Cruz, A., Amrine, K. C., McGuire, B., Gubler, W. D., Walker, M. A. and Cantu, D.** (2014): Adaptive genomic structural variation in the grape powdery mildew pathogen, *Erysiphe necator*. *BMC Genomics*, 15: 1081.
- Josepovits Gy.** (1991): Növénybetegségek – fungicid rezisztencia. *Növényvédelem*, 27: 337–343.
- Kaptás T. és Enisz J.** (1992): A lisztharmat gombák elleni fungicidok védekezés lehetőségei és korlátai (fungicid rezisztencia). *Növényvédelem*, 28: 226.
- Kiss L., Berczky Zs., Kassainé Jáger E., Kovács M. G., Batta Gy., Deák T., Fekete E., Fekete É., Váczy Zs., Váczy K. Z., Bisztray Gy. D., Boróczy G., Csikászné Krizsics, A., Holb I. J., Kaptás T., Karaffa L., Kocsis M., Ifj. Kozma P., Mukli D., Schmidt Á., Sipiczki M. és Téglá Zs.** (2012): A strobilurin-rezisztencia molekuláris markere széles körben elterjedt a hazai szőlő-, alma- és paprikalisztharmat-populációkban. *Növényvédelem*, 48: 489–499.
- Kretschmer, M., Leroch, M., Mosbach, A., Walker, A. S., Fillingner, S., Mernke, D., Schoonbeek, H. J., Pradier, J. M., Leroux, P., De Waard, M. A. and Hahn, M.** (2009): Fungicide-driven evolution and molecular basis of multidrug resistance in field populations of the grey mould fungus *Botrytis cinerea*. *PLoS Pathog.*, 5: e1000696.
- Lendenmann, M. H., Croll, D. and McDonald, B. A.** (2015): QTL mapping of fungicide sensitivity reveals novel genes and pleiotropy with melanization in the pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Fungal Genet. Biol.*, 80: 53–67.
- Leroux, P., Chapeland, F., Desbrosses, D. and Gredt, M.** (1999) Patterns of cross-resistance to fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) isolates from French vineyards. *Crop Prot.*, 18: 687–697.
- Leroux, P. and Walter, A.-S.** (2011): Multiple mechanisms account for resistance to sterol 14 α -demethylation inhibitors in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Manag. Sci.*, 67: 44–59.
- Li, H.-X., Stevenson, K. L. and Brewer, M. T.** (2016): Differences in sensitivity to a triazole fungicide among *Stagonosporopsis* species causing gummy stem blight of cucurbits. *Plant Dis.*, 100: 2106–2112.
- Liu, X., Yu, F., Schnabel, G., Wu, J., Wang, Z. and Ma, Z.** (2011): Paralogue cyp51 genes in *Fusarium graminearum* mediate differential sensitivity to sterol demethylation inhibitors. *Fungal Genet. Biol.*, 48: 113–123.
- Lucas, J. A., Hawkins, N. J. and Fraaije, B. A.** (2015): The evolution of fungicide resistance. *Adv. Appl. Microbiol.*, 90: 29–92.
- Luo, C. X. and Schnabel, G.** (2008): The cytochrome p450 lanosterol 14 α -demethylase gene is a demethylation inhibitor fungicide resistance determinant in *Monilinia fructicola* field isolates from Georgia. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74: 359–366.
- Lv, Q.-Z., Yan, L. and Jiang, Y.-Y.** (2016): The synthesis, regulation, and functions of sterols in *Candida albicans*: well-known but still lots to learn. *Virulence*, 7: 649–659.
- Ma, Z. H., Proffer, T. J., Jacobs, J. L. and Sundin, G. W.** (2006): Overexpression of the 14 α -demethylase target gene (*CYP51*) mediates fungicide resistance in *Blumeriella jaapii*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72: 2581–2585.
- Miazi M., Hajjeh, H. and Faretra, F.** (2008): Occurrence and distribution of two distinct genetic groups in populations of *Erysiphe necator* Schw. in southern Italy. *J. Plant Pathol.*, 90: 563–573.
- Mullins, J. G. L., Parker, J. E., Cools, H. J., Togawa, R. C., Lucas, J. A., Fraaije, B. A., Kelly, D. E. and Kelly, S. L.** (2011): Molecular modelling of the emergence of azole resistance in *Mycosphaerella graminicola*. *PLoS One* 6, e20973.
- Nikou, D., Malandrakis, A., Konstantakaki, M., Vontas, J., Markoglou, A. and Ziogas, B.** (2009): Molecular characterization and detection of overexpressed C-14 alpha-demethylase-based DMI resistance in *Cercospora beticola* field isolates. *Pest Biochem. Physiol.*, 95: 18–27.
- Pereira, D. A., McDonald, B. A. and Brunner, P. C.** (2017) Mutations in the CYP51 gene reduce DMI sensitivity in *Parastagonospora nodorum* populations in Europe and China. *Pest Manag. Sci.*, 73: 1503–1510.
- Price, C. L., Parker, J. E., Warrilow, A. G., Kelly, D. E. and Kelly, S. L.** (2015): Azole fungicides – understanding resistance mechanisms in

- agricultural fungal pathogens. *Pest Manag. Sci.*, 71: 1054–1058.
- Qian, H. W., Duan, M. L., Sun, X. M., Chi, M. Y., Zhao, Y., Liang, W. X., Du, J., Huang, J. and Li, B.** (2018): The binding mechanism between azoles and FgCYP51B, sterol 14 α -demethylase of *Fusarium graminearum*. *Pest Manag. Sci.*, 74: 126–134.
- Rallos, L. E. E. and Baudoin, A. B.** (2016): Co-occurrence of two allelic variants of CYP51 in *Erysiphe necator* and their correlation with over-expression for DMI resistance. *PLoS One*. 11: e0148025.
- Schepers, H. T. A. M.** (1983): Decreased sensitivity of *Sphaerotheca fuliginea* to fungicides which inhibit ergosterol biosynthesis. *Neth. J. Plant Pathol.*, 89: 185–187.
- Schmitz, H. K., Medeiros, C. A., Craig, I. R. and Stammler, G.** (2013): Sensitivity of *Phakopsora pachyrhizi* towards Qo inhibitors and demethylation inhibitors, and corresponding resistance mechanisms. *Pest Manag. Sci.*, 70: 378–388.
- Schnabel, G. and Jones, A. L.** (2001): The 14 α -demethylase (CYP51A1) gene is overexpressed in *Venturia inaequalis* strains resistant to myclobutanil. *Phytopathology*, 91: 102–110.
- Sgherri, C., Porta, A., Castellano, S., Pinzino, C., Quartacci, M. F. and Calucci, L.** (2014): Effects of azole treatments on the physical properties of *Candida albicans* plasma membrane: a spin probe EPR study. *Biochim. Biophys. Acta*, 1838: 465–473.
- Song, J., Zhang, S. and Lu, L.** (2018): Fungal cytochrome P450 protein Cyp51: what we can learn from its evolution, regulons and Cyp51-based azole resistance. *Fungal Biol. Rev.*, 32: 131–142.
- Stammler, G., Cordero, J., Koch, A., Semar, M. and Schlenhuber, S.** (2009): Role of the Y134F mutation in cyp51 and overexpression of cyp51 in the sensitivity response of *Puccinia triticina* to epoxiconazole. *Crop Prot.*, 28: 891–897.
- Sun, X., Xu, Q., Ruan, R., Zhang, T., Zhu, C. and Li, H.** (2013): PdMLE1, a specific and active transposon acts as a promoter and confers *Penicillium digitatum* with DMI resistance. *Environ. Microbiol. Reports*, 5: 135–142.
- de Waard, M. A., Andrade, A. C., Hayashi, K., Schoonbeek, H. J., Stergiopoulos, I. and Zwiers, L. H.** (2006): Impact of fungal drug transporters on fungicide sensitivity, multidrug resistance and virulence. *Pest Manag. Sci.*, 62: 195–207.
- Wang, J., Yu, J., Liu, J., Yuan, Y., Li, N., He, M., Qi, T., Hui, G., Xiong, L. and Liu, D.** (2014): Novel mutations in *CYP51B* from *Penicillium digitatum* involved in prochloraz resistance. *J. Microbiol.*, 52: 762–770.
- Wyand, R. A. and Brown, J. K. M.** (2005): Sequence variation in the *CYP51* gene of *Blumeria graminis* associated with resistance to sterol demethylase inhibiting fungicides. *Fungal Genet. Biol.*, 42: 726–735.
- Yan, X., Ma, W. B., Li, Y., Wang, H., Que, Y. W., Ma, Z. H., Talbot, N. J. and Wang, Z. Y.** (2011): A sterol 14 α -demethylase is required for conidiation, virulence and for mediating sensitivity to sterol demethylation inhibitors by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Fungal Genet. Biol.*, 48: 144–153.

THE MOLECULAR BIOLOGICAL BACKGROUND OF DMI FUNGICIDE RESISTANCE IN PLANT PATHOGENIC FUNGI

O. Molnár¹, M. Z. Németh¹, Á. N. Horváth¹, F. Matolcsi¹, G. M. Kovács^{1,2} and A. Pintye¹

¹ Plant Protection Institute, Centre for Agricultural Research, Budapest, Hungary

² Department of Plant Anatomy, Eötvös Loránd University, Budapest, Hungary

E-mail: molnar.orsolya@agrar.mta.hu

DMI fungicides are widely used in controlling agriculturally important fungal pathogens. Intensive fungicide usage often leads to reduced sensitivity or resistance to fungicides in plant pathogenic fungi. In the background there may be alterations of more genes of fungal pathogens.

We present the already revealed molecular mechanisms, such as point mutations in the coding region of the *CYP51* gene or overexpression of the CYP51 enzyme. Furthermore we discuss other possible reasons for the decreased sensibility of plant pathogens, such as overexpression of genes encoding efflux pump proteins or the possibility of enzymatic degradation of plant protection products.

Keywords: DMI fungicides, *CYP51* gene, overexpression, point mutation

Érkezett: 2019. szeptember 30.