

Sensitivität von *Zymoseptoria tritici* gegenüber Demethylierungsinhibitoren – Studien zu Resistenzmechanismen und ihre Verbreitung in Europa

Anna Huf^{1,2}, Rosie Bryson², Gerd Stammler², Ralf T. Voegelé¹

¹Universität Hohenheim, Fakultät Agrarwissenschaften, Institut für Phytomedizin, Fachgebiet Phytopathologie, 70599 Stuttgart, Deutschland. ²BASF SE, Agrarzentrum, 67117 Limburgerhof, Deutschland

Zymoseptoria tritici (syn. *Septoria tritici*) verursacht die Septoria-Blattdürre an Weizen, eine der wichtigsten Krankheiten im Weizenanbau. Neben ackerbaulichen Maßnahmen und dem Anbau von Weizensorten mit geringerer Anfälligkeit gegenüber *Z. tritici*, beruht die Kontrolle dieses Pathogens hauptsächlich auf der Anwendung von Fungiziden mit unterschiedlichen Wirkmechanismen. In den letzten Jahrzehnten waren insbesondere die Azole, genannt Demethylierungsinhibitoren (DMIs) effektive Fungizide. Auch die „Quinone outside“ Inhibitoren (QoI, Strobilurine) waren für einige Jahre (ca. 1996-2003) hocheffektiv, aber in den meisten intensiven Weizenanbaugebieten in Europa verbreitete sich die QoI-Resistenz sehr rasch, sodass sie für die Kontrolle dieses Pathogens in vielen Regionen keine Rolle mehr spielen. Aufgrund dessen, und auch weil Chlorothalonil als effektiver Wirkstoff nicht mehr zugelassen ist, kommt den DMIs eine zentrale Rolle in der Septoria-Bekämpfung zu.

DMIs oder Azole inhibieren ein wichtiges Enzym in der Ergosterolbiosynthese, die Sterol 14 α -Demethylase, welche durch das Gen *CYP51* kodiert wird. Die langanhaltende und intensive Nutzung der DMIs hat zu einem kontinuierlichen Sensitivitätsverlust von *Z. tritici* gegenüber DMIs geführt. Gründe für solche Sensitivitätsverluste sind meistens Änderungen („Mutationen“) im Zielprotein aber auch eine vermehrte Produktion („Überexpression“) des Zielproteins sowie die Fähigkeit der pilzlichen Zelle, für sie toxische Substanzen (z.B. DMIs) besser aus der Zelle heraus zu transportieren („erhöhter Efflux/Export“).

Während sich *Z. tritici* gegenüber den QoIs mit einer einzigen Mutation im Zielprotein (G143A) volle Resistenz erwarb, gelingt *Z. tritici* das gegenüber den DMIs nicht. *Z. tritici* hat daher verschiedene Mutationen im *CYP51* entwickelt, die für sich alleine nur zu geringen Sensitivitätsverlusten führen. Mit der Zeit traten auch Kombinationen von Mutationen auf, sodass mittlerweile über 100 Variationen von *CYP51* zu finden sind. In jedem Isolat tritt aber nur eine auf. Innerhalb eines Feldes sind jedoch Isolate mit unterschiedlichen *CYP51* Variationen vorhanden, d.h. die Populationen sind sehr heterogen. Ziel der Arbeit war es, die in Europa vorkommenden *CYP51* Gene (Varianten) zu identifizieren, in den Populationen zu quantifizieren und vor allem ihre reduzierende Wirkung auf die Effektivität relevanter DMIs (vor allem Prothioconazol, Epoxiconazol, Mefentrifluconazol u.a.) zu charakterisieren. Von den zahlreichen *CYP51* Varianten stellen 13 ca. 90% aller Variationen der untersuchten Isolate dar (Tabelle 1). Um diesen komplizierten Sachverhalt einfacher und einheitlicher handhaben zu

können, wurde eine Nomenklatur eingeführt, die in einem Artikel detailliert beschrieben wurde (Huf et al. 2018). Innerhalb der häufigsten *CYP51* Varianten zeigen manche Isolate eine noch recht hohe Sensitivität (Varianten C8, G1, F3) gegenüber Epoxiconazol, gefolgt von den Varianten mit moderater Anpassung. Wieder andere Varianten (F4, E3, D13, E5, F8, H4, H6) zeigen die höchste Anpassung gegenüber Epoxiconazol. Die Verbreitung solcher *CYP51*-Varianten ist in Europa sehr unterschiedlich. In den intensiven Anbaugeländern sind eher angepasste Typen zu finden, während in Zentral- und Osteuropa die sensitiveren Haplotypen gefunden werden (Abbildung 1). Sensitivitätsstudien im Labor und Gewächshaus ergaben, dass nur eine begrenzte Kreuzresistenz zwischen Epoxiconazol sowie Prothioconazol im Vergleich zu Mefentrifluconazol besteht. Dies wird durch Selektionsstudien im Feld gestützt. Prothioconazol selektiert im Vergleich zu Mefentrifluconazol überwiegend unterschiedliche Varianten, d.h.: damit überleben unterschiedliche Varianten besser und tolerieren das jeweilige DMI besser.

Tabelle 1: Die 13 häufigsten *CYP51* Varianten in *Z. tritici* in 2016 und 2017 und ihre *CYP51* Mutationen in Europa.

| Wildtyp Aminosäure | CYP51 Haplotyp | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------|----------------|----|-----|----|----|----|-----|-----|----|----|-----|-----|-----|
| | WT | C8 | D13 | E3 | E4 | E5 | F2 | F3 | F4 | F8 | G1 | H4 | H6 |
| L50 | - | S | - | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| D134 | - | - | - | - | G | - | - | - | - | G | - | - | - |
| V136 | - | - | C | A | A | A | - | C | C | A | - | A | C |
| S188 | - | - | - | - | - | - | N | N | N | - | N | N | N |
| A379 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | G | G | G |
| I381 | - | V | V | V | V | V | V | - | V | V | V | V | V |
| Y459 | - | - | - | - | - | - | Del | Del | - | - | Del | Del | Del |
| G460 | - | - | - | - | - | - | Del | Del | - | - | Del | Del | Del |
| Y461 | - | H | H | S | H | H | - | - | H | H | - | - | - |
| N513 | - | - | - | - | - | - | K | K | - | - | K | - | - |
| S524 | - | - | T | T | - | T | - | - | T | T | - | T | T |

Die Zielprotein-Überexpression (vermehrte Anreicherung) trägt ebenfalls als zusätzlicher Resistenzmechanismus in manchen Isolaten zu einem weiteren Sensitivitätsverlust bei. Mithilfe eines genetischen Markers haben wir einen Test entwickelt, mit dem wir eine Überexpression des Zielproteins schnell und sicher nachweisen können. Wir konnten zeigen, dass eine Überexpression als Resistenzmechanismus nicht sehr häufig ist (Abbildung 1), aber der Vergleich mehrerer Jahre darauf hinweist, dass er leicht ansteigt.

Die Fähigkeit eines Isolates zum erhöhten Export von DMIs wird durch Veränderungen in der Promotorregion getriggert. Auch hierfür konnten wir ein zuverlässiges molekulargenetisches Testsystem anwenden. Die Häufigkeit dieses Resistenzmechanismus ist allerdings bislang auf niedrigem Niveau (Abbildung 1).

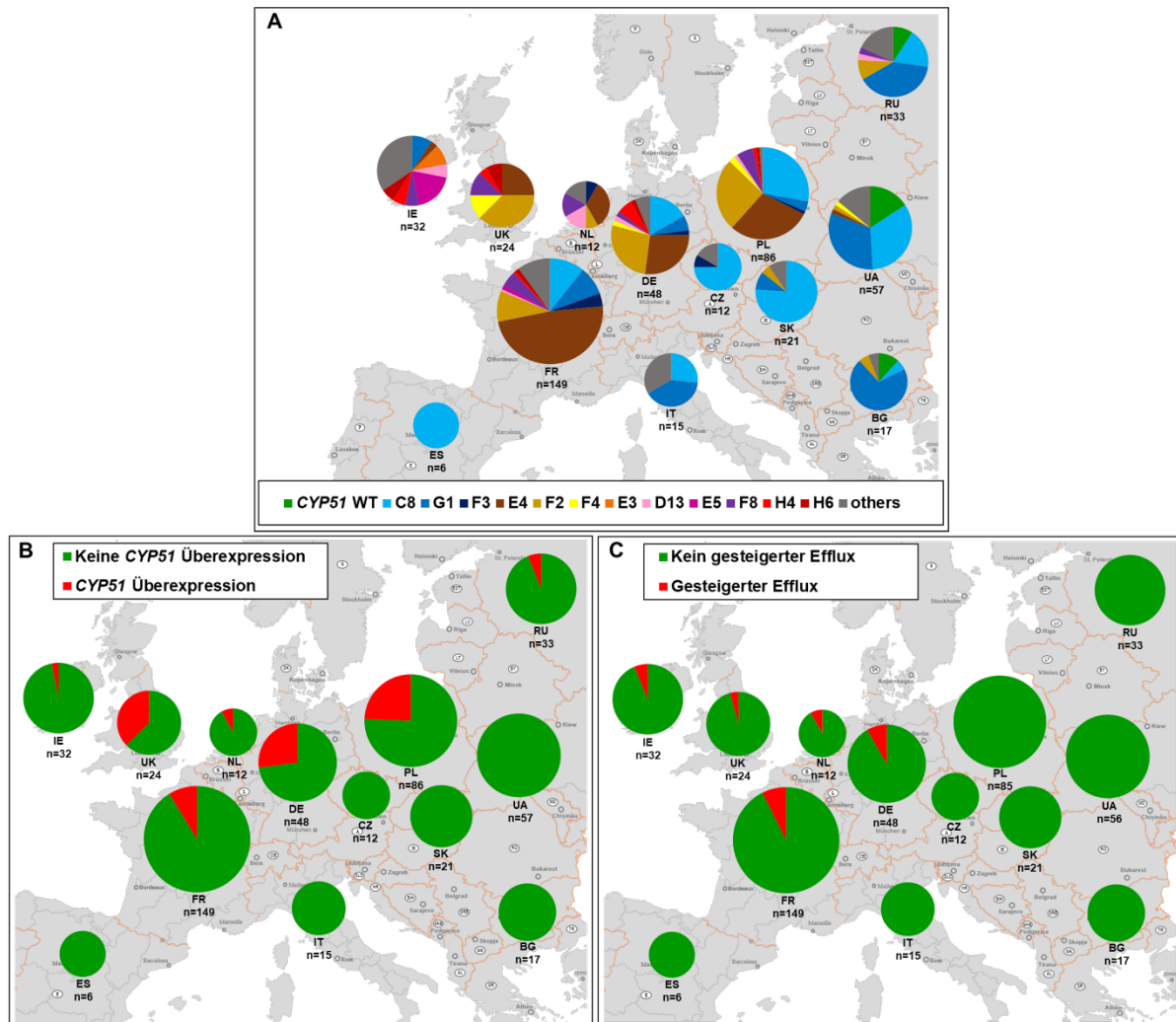


Abbildung 1: Häufigkeit und Verbreitung verschiedener DMI Resistenzmechanismen in *Z. tritici* in 2017. A: Häufigkeit und Verbreitung der 13 häufigsten *CYP51* Varianten (Haplotypen). **B:** Häufigkeit und Verbreitung von *CYP51* Überexpression (Anreicherung), basierend auf einem 120 bp Promotorinsert (*CYP51* Gen) mit relevantem Effekt. **C:** Häufigkeit und Verbreitung von gesteigertem Efflux/Export, basierend auf einem 519 bp Promotorinsert (Transportergen *MFS1*) mit relevantem Effekt.

Z. tritici Mutationen stellen im Zielprotein in Europa den häufigsten und wichtigsten Resistenzmechanismus gegenüber DMIs dar. Im Vergleich zu früheren Studien wurde ein leichter Anstieg in der Häufigkeit der *CYP51* Überexpression beobachtet. Weniger häufig ist der Mechanismus einer gesteigerten Efflux/Export-Aktivität. Verschiedene Studien im Gewächshaus und Feld zeigen, dass Azole noch immer sehr wirksam die Septoria-Blattdürre bekämpfen können, auch wenn in der Population Isolate mit angepassten *CYP51* Varianten und/oder *CYP51* Überexpression sowie einer gesteigerten Export-Aktivität präsent sind. Um eine weitere Verbreitung von immer stärker angepassten *CYP51* Varianten und zusätzlichen DMI-Resistenzmechanismen zu verhindern, sollten Antiresistenz-Strategien in der Anwendung von DMIs eine große Bedeutung zukommen. Solche Strategien könnten auf der begrenzten Kreuzresistenz verschiedener DMIs beruhen, aber vor allem auch auf der Anwendung von Fungiziden mit anderen Wirkmechanismen in Spritzprogrammen im Wechsel

oder in Mischung mit DMIs. Hier bedarf es Strategien des integrierten Pflanzenschutzes, um den Krankheitsdruck gering zu halten, die Anzahl der Fungizid-Applikationen zu reduzieren und damit den Selektionsdruck hin zu weniger angepassten Isolaten zu verringern.

Huf, A., Rehfus, A., Lorenz, K. H., Bryson, R., Voegele, R. T., & Stammler, G. (2018). Proposal for a new nomenclature for *CYP51* haplotypes in *Zymoseptoria tritici* and analysis of their distribution in Europe. *Plant Pathology*, 67: 1706-1712.