

**Einsporisolate des Erregers des Asiatischen
Sojabohnenrostes (*Phakopsora pachyrhizi*) zur
Charakterisierung der Resistenz gegenüber
Demethylierungsinhibitoren**

Dissertation

zur Erlangung des Grades

Doktorin der Agrarwissenschaften (Dr. agr.)

der Landwirtschaftlichen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

von

Sarah Anne Stilgenbauer (M.Sc.)

aus Worms

Bonn, 2022

Referentin: PD Dr. Ulrike Steiner

Korreferent: Prof. Dr. Gabriel Schaaf

Korreferent: Prof. Dr. Ralf Vögele

Tag der mündlichen Prüfung: 23.11.2022

Angefertigt mit Genehmigung der Landwirtschaftlichen Fakultät der Universität Bonn. Diese Arbeit wurde unterstützt und finanziert durch die BASF SE, Unternehmensbereich Pflanzenschutz, Forschung Fungizide, Limburgerhof.

Kurzfassung

Der pflanzenpathogene Pilz *Phakopsora pachyrhizi* verursacht den Asiatischen Sojabohnenrost (ASR) und stellt insbesondere in Südamerika eine große wirtschaftliche Bedrohung dar. Hier wurden nach erstmaligem Auftreten im Jahr 2001, ohne entsprechende Bekämpfungsmaßnahmen, Ertragsverluste von > 80 % dokumentiert. Infolgedessen wurden verstärkt Fungizide eingesetzt, welche bis heute, neben Anbaupraktiken und resistenten Sojasorten, die wichtigste Bekämpfungsstrategie darstellen. Zur Kontrolle des Pilzes werden vor allem Single-Site Fungizide aus den Klassen der Chinon-Outside-Inhibitoren, Succinat-Dehydrogenase-Inhibitoren sowie der Demethylierungsinhibitoren (DMI) eingesetzt. DMI hemmen die Sterol 14 α -Demethylase, ein wesentliches Enzym des Ergosterol-Biosynthesewegs, welches durch das *CYP51*-Gen des Pilzes kodiert wird. Der starke Selektionsdruck, verursacht durch die intensive Anwendung der DMI, führte zu einer kontinuierlichen Anpassung der Population von *P. pachyrhizi* unter Feldbedingungen, hin zu einer geringeren Empfindlichkeit gegenüber DMI (Shifting). Diese kontinuierliche negative Verschiebung der Empfindlichkeit (Resistenz) wurde in erster Linie auf die Akkumulation von Mutationen im *CYP51*-Gen zurückgeführt. Ziel der vorliegenden Studie war es, erstmals mithilfe von Einsporisolaten des biotrophen Pilzes *P. pachyrhizi*, die Resistenz gegenüber DMI sowie die beteiligten Resistenzmechanismen (v. a. Punktmutationen) zu charakterisieren. Sequenzanalysen des *CYP51* konnten drei neue Mutationen (V130A, I145V, F154Y) bestätigen, die auf einem DNA-Strang in Kombination mit bereits beschriebenen Mutationen auftreten. Deren Lage im Enzym wurde mithilfe einer Proteinmodellierung aufgezeigt. Nach derzeitigem Kenntnisstand wurden neun Mutationen im *CYP51* von *P. pachyrhizi* beschrieben (F120L, V130A, Y131F/H, K142R, I145V/F, F154Y, I475T), welche sich durch die auftretenden Mutationskombinationen in sieben unterschiedliche, adaptierte Haplotypen einteilen lassen. Die in dieser Studie neu identifizierten *CYP51*-Haplotypen F120L + V130A + Y131F, F120L + Y131H + I145V und F120L + Y131H + F154Y konnten mit unterschiedlichen Sensitivitäten gegenüber DMI in Verbindung gebracht werden. Im Zuge dieser Sensitivitätsstudien wurde erstmals eine unvollständige Kreuzresistenz der Haplotypen F120L + V130A + Y131F und F120L + Y131H gegenüber DMI mit unterschiedlichen chemischen Strukturen nachgewiesen. Des Weiteren wurden in adaptierten Einsporisolaten sechs *CYP51*-Kopien bestätigt, welche drei unterschiedlichen *CYP51*-Allelen zugeordnet werden konnten. Diese Allele sind in den Einsporisolaten in unterschiedlichen Verhältnissen vorhanden. Nach bisherigem Kenntnisstand wird hierbei aufgrund möglicher Fitnessnachteile die Anzahl von drei mutierten *CYP51*-Kopien und somit 50 % Mutationshäufigkeit nicht überschritten. Bei den Einsporisolaten wurde außerdem eine signifikante Überexpression des *CYP51* festgestellt.

Abstract

The plant pathogenic fungus *Phakopsora pachyrhizi* causes Asian soybean rust (ASR) and poses a major economic threat, especially in South America. After the first appearance of the fungus on the continent (2001), yield losses of > 80% were recorded without being subject to control measures. As a result, fungicides were increasingly used, which, besides cultivation practices and resistant soybean varieties, are still the most important control strategy to date. Single-site fungicides from the classes of quinone outside inhibitors, succinate dehydrogenase inhibitors and demethylation inhibitors (DMIs) are mainly used to control the fungus. DMIs inhibit the sterol 14 α -demethylase, an essential enzyme of the ergosterol biosynthetic pathway, which is encoded by the fungal *CYP51* gene. The strong selection pressure caused by the extensive use of DMIs led to a continuous adaptation of the population of *P. pachyrhizi* under field conditions towards a lower sensitivity against DMIs (shifting). This continuous negative shift in sensitivity (resistance) was primarily attributed to the accumulation of mutations in the *CYP51* gene. The objective of the present study was to characterize the resistance of *P. pachyrhizi* to DMIs and the mechanisms involved (especially point mutations) using single spore isolates for the first time. Sequence analyses of *CYP51* confirmed three new mutations (V130A, I145V, F154Y), which occur on one DNA strand in combination with previously described mutations. Their location in the enzyme was shown using protein modelling. According to current knowledge, nine mutations have been described in *CYP51* of *P. pachyrhizi* (F120L, V130A, Y131F/H, K142R, I145V/F, F154Y, I475T), which can be divided into seven adapted *CYP51*-haplotypes by the occurring mutation combinations. The newly identified haplotypes F120L + V130A + Y131F, F120L + Y131H + I145V, and F120L + Y131H + F154Y in this study could be associated with different sensitivities to DMIs. During these sensitivity studies, incomplete cross-resistance of the haplotypes F120L + V130A + Y131F and F120L + Y131H to DMI with different chemical structures was demonstrated for the first time. Furthermore, six *CYP51* copies were confirmed in adapted single spore isolates, which could be assigned to three different *CYP51* alleles. These alleles occur in the single spore isolates in different ratios. According to current knowledge, the number of three mutated *CYP51* copies and thus 50 % mutation frequency is not exceeded due to possible fitness disadvantages. Significant overexpression of *CYP51* was also detected in the single spore isolates.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|------------|
| Abkürzungsverzeichnis | V |
| Abbildungsverzeichnis | VII |
| Tabellenverzeichnis..... | IX |
| | |
| 1 Einleitung..... | 1 |
| 1.1 Sojabohne als Nutzpflanze..... | 1 |
| 1.2 <i>Phakopsora pachyrhizi</i>, der Erreger des Asiatischen Sojabohnenrostes | 3 |
| 1.2.1 Globale Ausbreitung und wirtschaftliche Bedeutung..... | 3 |
| 1.2.2 Symptome, Lebenszyklus und Epidemiologie..... | 5 |
| 1.3 Kontrollmöglichkeiten von <i>P. pachyrhizi</i> | 7 |
| 1.3.1 Resistente Sojasorten | 8 |
| 1.3.2 Fungizide | 10 |
| 1.3.2.1 Demethylierungsinhibitoren (DMI) | 13 |
| 1.4 Fungizidresistenz..... | 14 |
| 1.4.1 Fungizidresistenzen gegenüber DMI..... | 18 |
| 1.4.2 Fungizidresistenzen von <i>P. pachyrhizi</i> | 20 |
| 1.5 Zielsetzung | 22 |
| 2 Material und Methoden | 24 |
| 2.1 Technische Geräte | 24 |
| 2.2 Verbrauchsmaterialien und Chemikalien | 25 |
| 2.3 Bakterien, Enzyme und Kits | 27 |
| 2.4 Puffer, Lösungen, Medien | 28 |
| 2.5 Oligonukleotide..... | 29 |
| 2.6 Fungizide | 32 |
| 2.7 Versuchsorganismen..... | 34 |
| 2.8 Kultivierung der Sojapflanzen..... | 34 |

| | |
|---|-----------|
| 2.9 Herstellung und Vermehrung von Einsporisolate von <i>P. pachyrhizi</i> | 35 |
| 2.9.1 Haltung der Isolate von <i>P. pachyrhizi</i> | 37 |
| 2.10 Molekularbiologische Methoden zur genetischen Charakterisierung von <i>P. pachyrhizi</i> | 38 |
| 2.10.1 Isolierung der genomischen DNA..... | 38 |
| 2.10.2 Isolierung der RNA | 38 |
| 2.10.2.1 Reverse Transkription der RNA in cDNA | 39 |
| 2.10.3 Polymerasenkettenreaktion (PCR)..... | 39 |
| 2.10.4 Quantitative Real-time PCR (qPCR) | 40 |
| 2.10.4.1 Expressionsmessung des <i>CYP51</i> | 42 |
| 2.10.5 Klonierung von PCR-Produkten | 43 |
| 2.10.5.1 Ligation | 44 |
| 2.10.5.2 Transformation in <i>Escherichia coli</i> | 44 |
| 2.10.5.3 Überprüfung der Transformation und Plasmidpräparation | 45 |
| 2.10.6 Agarose-Gelelektrophorese | 45 |
| 2.10.7 Sequenzierung | 45 |
| 2.10.8 Pyrosequenzierung..... | 46 |
| 2.11 Detached Leaf Tests zum Nachweis der Sensitivität der Einsporisolate von <i>P. pachyrhizi</i> gegenüber DMI | 48 |
| 2.11.1 Fungizidapplikation..... | 48 |
| 2.11.2 Inokulation | 48 |
| 2.11.3 Evaluierung..... | 49 |
| 2.11.4 Mutationsselektion durch Fungizidanwendung | 49 |
| 2.11.4.1 Überprüfung der Einsporisolate auf genetische Identität | 49 |
| 2.11.4.2 Mutationsselektion durch Demethylierungsinhibitoren | 50 |
| 2.12 Proteinmodellierung des CYP51 | 51 |
| 2.13 Software und bioinformatische Analysen | 51 |
| 3 Ergebnisse | 53 |

| | |
|--|-----------|
| 3.1 Überprüfung und Nachweis der genetischen Identität der verschiedenen Einsporisolate von <i>P. pachyrhizi</i> | 54 |
| 3.2 Sequenzanalysen des <i>CYP51</i> der Einsporisolate von <i>P. pachyrhizi</i> | 56 |
| 3.2.1 Detektion neuer Mutationen im <i>CYP51</i> | 56 |
| 3.2.1.1 Mutationshäufigkeiten in der gDNA der Einsporisolate | 58 |
| 3.2.1.2 Mutationshäufigkeiten in der cDNA der Einsporisolate | 60 |
| 3.2.2 Bestimmung der <i>CYP51</i> -Allelanzahl | 61 |
| 3.2.3 Vergleich von <i>CYP51</i> -Sequenzen unterschiedlicher Pilze | 66 |
| 3.2.4 Proteinmodellierung des <i>CYP51</i> unter Berücksichtigung der bekannten Mutationen in <i>P. pachyrhizi</i> | 69 |
| 3.3 Überexpressionsanalysen des <i>CYP51</i> der Einsporisolate von <i>P. pachyrhizi</i> | 71 |
| 3.4 DMI-Sensitivität der Einsporisolate von <i>P. pachyrhizi</i> | 74 |
| 3.4.1 Inhibitionskurven..... | 76 |
| 3.4.2 Inhibition bei 10/30/100 mg/l | 79 |
| 3.4.3 ED ₅₀ -Werte, Resistenzfaktor und Kreuzresistenz | 81 |
| 3.5 Mutationsselektion im <i>CYP51</i> von <i>P. pachyrhizi</i> nach Anwendung unterschiedlicher DMI | 87 |
| 4 Diskussion | 91 |
| 4.1 Bestätigung der genetischen Identität der Einsporisolate von <i>P. pachyrhizi</i> durch konsistente Mutationswerte nach DMI-Behandlung | 93 |
| 4.2 Sequenzanalysen des <i>CYP51</i> der Einsporisolate von <i>P. pachyrhizi</i> zur Identifikation neuer Punktmutationen (V130A, I145V, F154Y)..... | 94 |
| 4.3 Sequenzanalysen der Einsporisolate zur Ermittlung der <i>CYP51</i> -Kopienzahl im Genom von <i>P. pachyrhizi</i> | 97 |
| 4.4 <i>CYP51</i> -Haplotypen in <i>P. pachyrhizi</i> | 102 |
| 4.5 Überexpression des <i>CYP51</i> in Einsporisolaten von <i>P. pachyrhizi</i> mit Fokus auf mutierte <i>CYP51</i> -Kopien im Transkriptom..... | 105 |
| 4.6 Auswirkungen der unterschiedlichen <i>CYP51</i> -Haplotypen in Einsporisolaten von <i>P. pachyrhizi</i> auf die Sensitivität gegenüber DMI | 109 |
| 4.7 Unvollständige Kreuzresistenz von <i>P. pachyrhizi</i> gegenüber DMI..... | 112 |

| | |
|---|-----|
| 4.8 Ausblick zur DMI-Resistenzentwicklung in <i>P. pachyrhizi</i> | 114 |
| 5 Zusammenfassung | 117 |
| 6 Literaturverzeichnis | 120 |
| 7 Anhang..... | 141 |
| Danksagung | 157 |

Abkürzungsverzeichnis

Gebräuchliche Abkürzungen und SI-Einheiten sind nicht aufgeführt. Abkürzungen, die nur einmal verwendet werden, werden im Text erklärt und Abkürzungen für verschiedene Länder wurden gemäß der Norm ISO 3166 verwendet.

| | |
|--------------|--|
| ASR | Asiatischer Sojabohnenrost |
| BBCH | Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Bundessortenamt und Chemische Industrie (BBCH-Code) |
| bp | Basenpaar |
| <i>CYP51</i> | Sterol 14 α -Demethylase Cytochrome P450 (Gen) |
| CYP51 | Sterol 14 α -Demethylase Cytochrome P450 (Enzym) |
| <i>CYTb</i> | Cytochrom b (Gen) |
| DLT | Detached Leaf Test |
| DMI | Demethylierungsinhibitoren |
| dNTP | Desoxyribonukleosidtriphosphate |
| fw | vorwärts (forward) |
| kb | Kilobase |
| LWA | Leitungswasseragar |
| MDR | Multidrug-Resistenz |
| MoA | Mode of Action (Wirkort) |
| NCBI | National Center for Biotechnology Information |
| NTC | Negativkontrolle (no template control) |
| PCR | Polymerasenkettenreaktion |
| QoI | Chinon-Outside-Inhibitoren |
| qPCR | quantitative Polymerasenkettenreaktion |
| rpm | Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute) |
| rv | rückwärts (reverse) |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------|--|
| SBI | Sterol-Biosynthese-Inhibitoren |
| SDH | Succinat-Dehydrogenase (Enzym) |
| <i>SDHc</i> | Succinat-Dehydrogenase Untereinheit c (Gen) |
| SDHI | Succinat-Dehydrogenase-Inhibitoren |
| SE | Standardfehler |
| SNP | Punktmutationen (single nucleotide polymorphism) |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA Puffer |
| T_m | Annealingtemperatur |
| VE | demineralisiertes/vollentstanztes Wasser |
| WT | Wildtyp |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Entwicklung der Sojabohnenproduktion (Mio. Tonnen) der wichtigsten Produktionsländer | 2 |
| Abbildung 2: Globale Ausbreitung des Erregers des Asiatischen Sojabohnenrostes (<i>Phakopsora pachyrhizi</i>) | 4 |
| Abbildung 3: Schadsymptome an Sojapflanze, verursacht durch <i>Phakopsora pachyrhizi</i> sowie die mikroskopische Darstellung seiner Uredien und Uredosporen | 5 |
| Abbildung 4: Sojablatt in Petrischale auf 0,4 %igen Wasseragar mit punktuellen Infektionsstellen von <i>Phakopsora pachyrhizi</i> | 35 |
| Abbildung 5: Übertragung der Sporen von <i>Phakopsora pachyrhizi</i> mit Hilfe eines Inokulationstunnels | 37 |
| Abbildung 6: DNA-Sequenz des <i>CYP51</i> -Gens von <i>Phakopsora pachyrhizi</i> am Beispiel des Wildtypeinsporisolates | 58 |
| Abbildung 7: 100 <i>CYP51</i> -Sequenzen des Einsporisolates MS1-261/18P von <i>Phakopsora pachyrhizi</i> | 62 |
| Abbildung 8: Verkürzte Darstellung von 100 <i>CYP51</i> -Sequenzen der Einsporisolate MS1-259/18P (A), MS3-259/18P (B) und MS4-259/18P (C) von <i>Phakopsora pachyrhizi</i> | 64 |
| Abbildung 9: Verkürzte Darstellung von 100 <i>CYP51</i> -Sequenzen der Einsporisolate MS1-256/18P (A), MS2-261/18P (B), MS3-261/18P (C) und MS5-259/18P (D) von <i>Phakopsora pachyrhizi</i> | 65 |
| Abbildung 10: Vergleich eines Ausschnitts der <i>CYP51</i> -Nukleotid- und Aminosäuresequenz von <i>Phakopsora pachyrhizi</i> und weiteren Pilzen | 67 |
| Abbildung 11: Homologiemodell des Sterol-14- α -Demethylase-Enzyms (<i>CYP51</i>) von <i>Phakopsora pachyrhizi</i> mit Darstellung der Lage der Aminosäuren des Wildtyps (gelb), die als Position der bekannten Mutationsstellen identifiziert wurden..... | 70 |
| Abbildung 12: Relative Expression des <i>CYP51</i> der Einsporisolate von <i>Phakopsora pachyrhizi</i> | 72 |
| Abbildung 13: Vergleich der Inhibitionskurven der Einsporisolate von <i>Phakopsora pachyrhizi</i> durch Prothioconazol | 77 |
| Abbildung 14: Vergleich der Inhibitionskurven der Einsporisolate von <i>Phakopsora pachyrhizi</i> durch Metconazol | 78 |

| | |
|---|-----|
| Abbildung 15: Inhibition (%) der Einsporisolate von <i>Phakopsora pachyrhizi</i> durch unterschiedliche Demethylierungsinhibitoren, dargestellt bei 10 mg/l (A), 30 mg/l (B) und 100 mg/l (C)..... | 81 |
| Abbildung 16: Sensitivität der Einsporisolate von <i>Phakopsora pachyrhizi</i> gegenüber Demethylierungsinhibitoren | 83 |
| Abbildung 17: Korrelation der ED ₅₀ -Werte für Prothioconazol und Epoxiconazol (A), Cyproconazol (B), Tetraconazol (C), Tebuconazol (D), Metconazol (E) ebenso wie für Tebuconazol und Metconazol (F) bei Einsporisolaten von <i>Phakopsora pachyrhizi</i> | 87 |
| Abbildung 18: CYP51-Mutationswerte (%) von <i>Phakopsora pachyrhizi</i> nach Anwendung unterschiedlicher Demethylierungsinhibitoren..... | 88 |
| Abbildung 19: Schematische Darstellung der CYP51-Kopienanzahl in <i>Phakopsora pachyrhizi</i> | 100 |
| Abbildung 20: CYP51-Haplotypen in <i>Phakopsora pachyrhizi</i> | 105 |

Anhang

| | |
|--|-----|
| Abbildung A21: Unterschiedliche Wildtypsequenzen des CYP51 in Einsporisolaten von <i>Phakopsora pachyrhizi</i> | 148 |
| Abbildung A22: Vergleich der Inhibitionskurven der Einsporisolate von <i>Phakopsora pachyrhizi</i> durch Epoxiconazol | 152 |
| Abbildung A23: Vergleich der Inhibitionskurven der Einsporisolate von <i>Phakopsora pachyrhizi</i> durch Cyproconazol..... | 153 |
| Abbildung A24: Vergleich der Inhibitionskurven der Einsporisolate von <i>Phakopsora pachyrhizi</i> durch Tetraconazol..... | 153 |
| Abbildung A25: Vergleich der Inhibitionskurven der Einsporisolate von <i>Phakopsora pachyrhizi</i> durch Difenconazol..... | 154 |
| Abbildung A26: Vergleich der Inhibitionskurven der Einsporisolate von <i>Phakopsora pachyrhizi</i> durch Tebuconazol..... | 155 |
| Abbildung A27: Korrelation der ED ₅₀ -Werte für Tebuconazol und Cyproconazol (A), Epoxiconazol und Cyproconazol (B), Difenconazol und Prothioconazol (C) ebenso wie für Tebuconazol und Epoxiconazol (D) bei Einsporisolaten von <i>Phakopsora pachyrhizi</i> | 156 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: Verwendete technische Ausrüstung und elektrische Geräte | 24 |
| Tabelle 2: Verwendete Chemikalien und Verbrauchsmaterialien | 26 |
| Tabelle 3: Verwendete Bakterien, Enzyme und Kits | 27 |
| Tabelle 4: Verwendete Puffer, Lösungen und Medien | 28 |
| Tabelle 5: Verwendete Oligonukleotide | 30 |
| Tabelle 6: Verwendete Fungizide | 32 |
| Tabelle 7: Bestandteile einer PCR-Reaktion..... | 39 |
| Tabelle 8: Schematischer Ablauf einer PCR-Reaktion..... | 40 |
| Tabelle 9: Bestandteile einer qPCR-Reaktion..... | 41 |
| Tabelle 10: qPCR-Programme | 42 |
| Tabelle 11: Reaktionsansatz einer Ligation | 44 |
| Tabelle 12: Reaktionsansätze für Pyrosequenzierung | 47 |
| Tabelle 13: Boniturschema eines Detached Leaf Tests mit <i>Phakopsora pachyrhizi</i> | 49 |
| Tabelle 14: Verwendete Einsporisolate für den Isolatmix zum Nachweis der Mutationsselektionen durch Demethylierungsinhibitoren | 51 |
| Tabelle 15: Verwendete Software..... | 52 |
| Tabelle 16: Nachweis der genetischen Identität der Einsporisolate von <i>Phakopsora pachyrhizi</i> durch Bestimmung der quantitativen Mutationsanteile (%) nach Anwendung unterschiedlicher Demethylierungsinhibitoren im Detached Leaf Test | 55 |
| Tabelle 17: Mutationen im <i>CYP51</i> von <i>Phakopsora pachyrhizi</i> | 57 |
| Tabelle 18: Mutationshäufigkeiten (%) in der gDNA der Einsporisolate von <i>Phakopsora pachyrhizi</i> | 59 |
| Tabelle 19: Häufigkeit der Mutationen F120L, V130A, Y131F/H, I145V und F154Y im <i>CYP51</i> der Einsporisolate von <i>Phakopsora pachyrhizi</i> in gDNA und cDNA | 61 |
| Tabelle 20: Relative Expression des <i>CYP51</i> der Einsporisolate von <i>Phakopsora pachyrhizi</i> nach Anwendung unterschiedlicher Demethylierungsinhibitoren im Detached Leaf Test..... | 73 |
| Tabelle 21: Auszug eines Detached Leaf Tests mit <i>Phakopsora pachyrhizi</i> | 75 |
| Tabelle 22: Resistenzfaktoren (RF) der Einsporisolate von <i>Phakopsora pachyrhizi</i> für unterschiedliche Demethylierungsinhibitoren | 85 |

Anhang

Tabelle A23: Nachweis der genetischen Identität der Einsporisolate von *Phakopsora pachyrhizi* durch Bestimmung der quantitativen Mutationsanteile (%) nach Anwendung unterschiedlicher Demethylierungsinhibitoren im Detached Leaf Test..... 141

Tabelle A24: Relative Expression des *CYP51* der Einsporisolate von *Phakopsora pachyrhizi* nach Anwendung unterschiedlicher Demethylierungsinhibitoren im Detached Leaf Test..... 149

1 Einleitung

1.1 Sojabohne als Nutzpflanze

Die Sojabohne (*Glycine max* (L.) MERR.) ist botanisch der Ordnung der Fabales (Schmetterlingsblütenartige), der Familie der Fabaceae (Hülsenfrüchtler), der Unterfamilie der Faboideae (Schmetterlingsblütler) und der Gattung der *Glycine* zuzuordnen (EPPO, 2022). Der Ursprung der Wildform *Glycine soja* Sieb. et Zucc. wird im Tal des Gelben Flusses in Nordchina vermutet und die Domestikation fand bereits im 10–11. Jh. v. Chr. statt (Burton, 1997). Ab dem 18. Jh. wurde sie, neben den asiatischen Ländern, erstmals auch in Europa und den Vereinigten Staaten (USA) dokumentiert. Anfang des 20. Jh. fand die Sojapflanze, welche zunächst ausschließlich als Eiweiß- und Ölpflanze zu Nahrungszwecken diente, zusätzlich als Tierfutter Verwendung. Diese Entwicklung führte zu einem starken Wachstum sowohl der Sojaanbaufläche als auch der sojaverarbeitenden Industrie. Eine Ausweitung des Sojabohnenanbaus nach Brasilien und Argentinien war die Folge dieses Wachstums (Hartman et al., 2011).

Heute gehört die Sojabohne zu den wichtigsten Leguminosenarten weltweit, welche auf ca. 6 % der globalen Ackerfläche angebaut wird und im Jahr 2018 einen Anteil von 61 % an der weltweiten Ölsaatzproduktion einnahm (Shea et al., 2020). In den Jahren 2010–2019 betrug der Anstieg der globalen Sojabohnenanbaufläche 18 %. Im Jahr 2020 wurde eine weltweite Produktionsmenge von ca. 360 Mio. t auf 127 Mio. ha Anbaufläche erreicht und bis 2029 wird ein weiterer Zuwachs von 18 % Anbaufläche erwartet (Barrett, 2020). Aktuell dominieren Brasilien, USA und Argentinien den Weltmarkt, mit einem Anteil von über 80 % an der Sojabohnenproduktion. Im Jahr 2020 produzierten Brasilien 133 Mio. t, die USA 113 Mio. t und Argentinien 48 Mio. t Sojabohnen (Abbildung 1), gefolgt von China mit 20 Mio. t und Indien mit 11 Mio. t (Barrett, 2020; FAO, 2022). Die weltweite Sojabohnenproduktion ist in den letzten zehn Jahren um 27 % gewachsen und Prognosen zufolge ist ein weiterer Anstieg von 27 % für das kommende Jahrzehnt zu erwarten. Da Südamerika über das höchste Potential für die Erweiterung der Anbauflächen verfügt, ist insbesondere in Brasilien eine steigende Anbaufläche zu erwarten (Barrett, 2020).

Von der weltweiten Sojaproduktion wird der größte Anteil (98 %) zu Tierfutter in Form von Sojaschrot verarbeitet und lediglich ca. 2 % zur Nahrungsmittelproduktion verwendet. Der Samen der Sojabohnen weist einen hohen Proteingehalt von 40 % auf und findet somit in der Nahrungsmittelproduktion unter anderem als Ersatz für tierisches Protein seine Verwendung. Das in der Produktion anfallende Öl wird aufgrund des hohen ernährungsphysiologischen Wertes überwiegend als Speiseöl genutzt (Hartman et al., 2011; Shea et al., 2020).

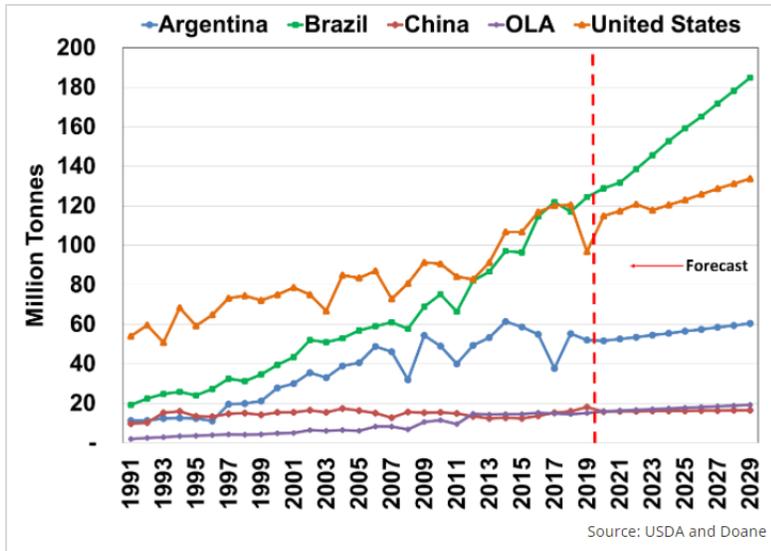


Abbildung 1: Entwicklung der Sojabohnenproduktion (Mio. Tonnen) der wichtigsten Produktionsländer. Die Grafik zeigt den Zeitraum von 1991–2019 mit einer zusätzlichen Vorhersage für die Jahre 2020–2029. Es sind die wichtigsten Sojabohnenproduzenten weltweit aufgeführt. OLA kennzeichnet „other Latin America“ und fasst alle südamerikanischen Länder mit Ausnahme von Argentinien und Brasilien (z. B. Bolivien und Paraguay) (Barrett, 2020).

Sojabohnen werden in den gemäßigten Zonen angebaut, wobei die Aussaat in der nördlichen Hemisphäre meist im Mai und in der südlichen Hemisphäre im November erfolgt. Die Geschwindigkeit der Auskeimung wird durch Bodentemperatur, Bodenfeuchte und Bodenverdichtung bestimmt. Es ist eine Bodentemperatur von mindestens 10 °C erforderlich, ausreichend Wasser sollte zur Verfügung stehen und zudem sollte ein Augenmerk auf verdichtete Böden gelegt werden, welche den Austrieb verhindern können (Burton, 1997; Bachteler, 2017). Die Blühperiode umfasst ca. drei bis vier Wochen und mit Beginn der Samenfüllung ist die maximale Pflanzenhöhe bzw. Blattfläche erreicht. Diese Phase der Ertragsbildung dauert ca. 30–40 Tage und Wasserstress sollte in dieser Zeit vermieden werden, da dieser einen direkten Einfluss auf den Kornertrag ausübt (Bachteler, 2017). Trockenheit ist einer der wichtigsten abiotischen Faktoren, welcher sich negativ sowohl auf das vegetative Wachstum als auch auf die Reifung ausübt. Auch Überschwemmungen sind problematisch, da die Sojapflanze viel Energie für die Erneuerung der abgestorbenen Wurzeln aufbringen muss. Zusätzlich sind Sojabohnen frostempfindlich und ein hoher Salzgehalt im Boden hat eine negative Auswirkung auf die Wurzelentwicklung (Hartman et al., 2011).

Neben den abiotischen Faktoren spielen biotische Faktoren wie Krankheiten, die durch Pilze und Bakterien verursacht werden, sowie tierische Schaderreger und Unkräuter eine maßgebliche Rolle bei der Ertragsentwicklung. Je nach Region können Pilze wie *Phakopsora pachyrhizi* (Asiatischer Sojabohnenrost), *Sclerotinia sclerotiorum* (Weißstängeligkeit), *Colletotrichum*

truncatum (Anthraknose), *Septoria glycines* (Blattfleckenkrankheit), *Rhizoctonia solani* (Krautfäule), *Fusarium* spp. (Wurzelfäule), *Cercospora flagellaris* und *Cercospora kikuchii* (Blattfäule) auftreten und für entsprechende Ertragseinbußen verantwortlich sein. Neben den Pilzen können Schaderreger wie bspw. *Heterodera glycines* (Sojabohnenzystennematode) oder Bakterien wie bspw. *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* (Bakterienfäule) den Ertrag der Sojabohnenernte reduzieren. Darüber hinaus können Unkräuter, insbesondere in den frühen BBCH-Stadien der Keimung und Vegetationsphase, die Photosyntheserate und das Wachstum direkt (z. B. durch Beschattung) oder indirekt (z. B. Konkurrenz um Wasser) negativ beeinflussen (Hartman et al., 2011; Bachteler, 2017; Bandara et al., 2020; Shea et al., 2020).

1.2 *Phakopsora pachyrhizi*, der Erreger des Asiatischen Sojabohnenrostes

1.2.1 Globale Ausbreitung und wirtschaftliche Bedeutung

Die globale Ausbreitung des phytopathogenen Pilzes *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd., dem Erreger des Asiatischen Sojabohnenrostes (ASR), ist in Abbildung 2 dargestellt. Er wurde erstmals im Jahr 1902 in Asien als *Uredo sojae* identifiziert und breitete sich im Laufe des 20. Jahrhundert im asiatischen Raum aus (Bromfield, 1984). Im Jahr 1994 wurde *P. pachyrhizi* erstmals in Hawaii beschrieben (Killgore & Heu, 1994). Ebenfalls in den späten 1990er–2000er Jahren breitete er sich, möglicherweise durch von Indien kommende Monsunwinde, auf dem afrikanischen Kontinent aus. Hier sorgte er für Ertragsverluste in den Sojaanbaugebieten von Zentral-, West- und Südafrika wie bspw. Uganda, Nigeria oder Simbabwe (Akinsanmi et al., 2001; Pretorius et al., 2001; Levy, 2005; Murithi et al., 2016). Im Jahr 2001 wurden erstmals Berichte über das Auftreten von *P. pachyrhizi* auf dem südamerikanischen Kontinent öffentlich (Yorinori et al., 2005). Im Gegensatz zur geringen wirtschaftlichen Bedeutung des verwandten Pilzes *Phakopsora meibomiaae* (Arthur) Arthur (syn. *Uredo vignae*), welcher bereits seit den 1970er Jahren in Südamerika vorkommt und als Erreger des Amerikanischen Sojabohnenrostes gilt, entwickelte sich der durch *P. pachyrhizi* verursachte ASR zu einer Sojabohnenkrankheit mit erheblicher wirtschaftlicher Bedeutung (Ono et al., 1992; Hartman et al., 2004b). Die zwei verwandten Arten *P. pachyrhizi* und *P. meibomiaae* lassen sich anhand der morphologischen Merkmale ihrer Telien oder durch eine molekularbiologische Differenzierung unterscheiden, da die internal transcribed spacer-Region (ITS) der beider Arten lediglich 80 % Übereinstimmung aufweist (Frederick et al., 2002). Nach dem erstmaligen Auftreten von *P. pachyrhizi* in Pirapó (Paraguay) and Paraná (Brasilien) in der Saison 2001–2002, wurden in Brasilien bereits in der folgenden Saison 60 % der Sojaanbaufläche durch den phytopathogenen Pilz befallen und Ertragsverluste von 30–75 % verursacht (Yorinori et al., 2005). Nachdem der Pilz sich großflächig

in Brasilien ausbreitete, wurden in der Saison 2003–2004, bedingt durch derzeit fehlende Kontrollmöglichkeiten, bis zu 90 % Ertragsausfall mit Ernteverlusten von 4,6 Mio. t und einem Gegenwert von 2 Mrd. US \$ geschätzt (Godoy et al., 2016). Nach seiner Verbreitung auf dem südamerikanischen Kontinent sowohl in den großen Sojaanbaugebieten von Argentinien als auch Kolumbien, Bolivien und Uruguay (Ivancovich, 2005; Stewart et al., 2005; Yorinori et al., 2005; Tapiero-Ortiz et al., 2021) wurde der Pilz im Jahr 2004 erstmals auch auf dem nordamerikanischen Kontinent nachgewiesen (Schneider et al., 2005). Da die USA neben Brasilien und Argentinien zu den größten Sojaanbaugebieten weltweit zählen, ist auch hier das Vorkommen von *P. pachyrhizi* mit wirtschaftlichen Einbußen verbunden. Im Gegensatz zu Südamerika ist das Vorkommen des Pilzes in den meisten Sojaanbauregionen des nordamerikanischen Kontinents klimatisch bedingt nicht ganzjährig möglich. Somit hängt der jeweilige Ertragsausfall von der jährlichen Sporenverbreitung, bspw. durch Winde, ab und schwankt deutlicher als bei den Ländern der Südhalbkugel. Hier kann *P. pachyrhizi* in Gegenwart geeigneter Wirte ganzjährig überleben (Livingston et al., 2004).

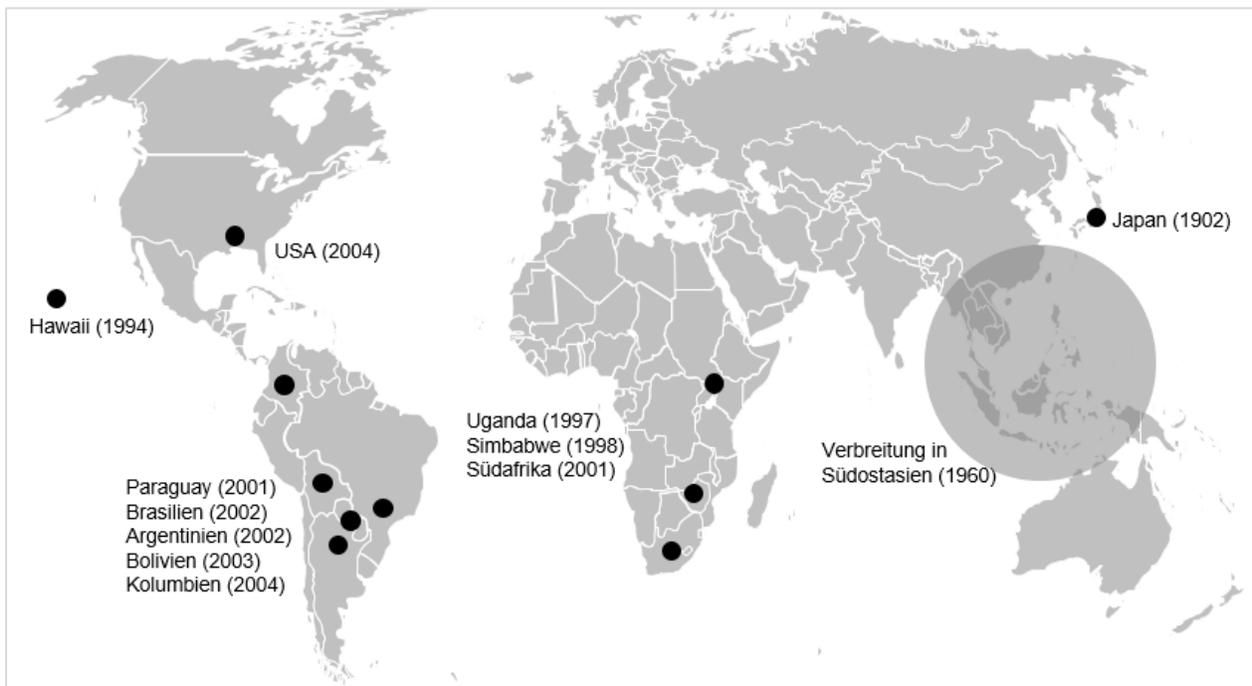


Abbildung 2: Globale Ausbreitung des Erregers des Asiatischen Sojabohnenrostes (*Phakopsora pachyrhizi*). Die Jahresdaten wurden aus unterschiedlichen Quellen entnommen und eingefügt (Bromfield, 1984; Killgore & Heu, 1994; Akisanmi et al., 2001; Pretorius et al., 2001; Ivancovich, 2005; Levy, 2005; Schneider et al., 2005; Stewart et al., 2005; Yorinori et al., 2005; Tapiero-Ortiz et al., 2021).

1.2.2 Symptome, Lebenszyklus und Epidemiologie

Im Reich der Echten Pilze gehört *P. pachyrhizi* der Abteilung der Basidiomycota (Ständerpilze) an und ist hierbei der Klasse der Pucciniomycetes, der Ordnung der Pucciniales (Rostpilze), der Familie der Phakopsoraceae und der Gattung Phakopsora zuzuordnen (Goellner et al., 2010). Der obligat biotrophe Basidiomycet kann seinen Hauptwirt, die Sojabohne, in allen grünen Wachstumsstadien befallen. Zumeist finden sich die ersten Symptome in den unteren Blattetagen kurz vor Blühbeginn, da die Rostentwicklung mit dem physiologischen Alter der Pflanze zusammenhängt (Hartman et al., 2004a). Beginnende Symptome sind kleine, hellgelbe, blasse Läsionen, welche durch Blattadern begrenzt sind und sich im weiteren Verlauf ausbreiten und hellbraun färben. Die Läsionen sind vorrangig auf der abaxialen Blattoberfläche zu finden, wo sie massenhaft Uredosporen freilassen (Abbildung 3, A–C). Sobald diese Läsionen auftreten, kommt es zu einer frühzeitigen Vergilbung und Entlaubung der Blätter. Dies hat einen verminderten Hülsenansatz mit verringertem Samengewicht und reduzierter Samenzahl zur Folge und somit ist der Ernteertrag negativ beeinflusst. Die infizierten, verfärbten Pflanzen treten häufig vorerst in Hotspots im Feld auf, bevor eine großflächige Ausbreitung stattfindet (Abbildung 3, A). Ein Ende der Infektionszyklen wird, aufgrund der biotrophen Lebensweise des Pilzes, allgemein durch die Gelbfärbung des Laubes und durch die folgende Entblätterung der Pflanze bestimmt (Bromfield, 1984; Ivancovich, 2005; Sconyers et al., 2006; Murithi et al., 2016).

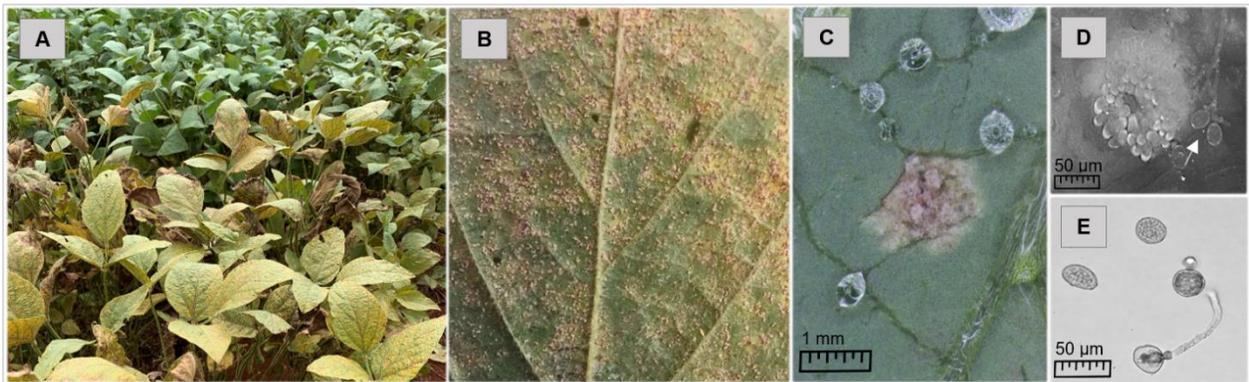


Abbildung 3: Schadsymptome an Sojapflanze, verursacht durch *Phakopsora pachyrhizi* sowie die mikroskopische Darstellung seiner Uredien und Uredosporen. Sojabohnenfeld mit Befall von *P. pachyrhizi* (Hotspot) (A). Nahaufnahme der abaxialen Sojablattoberfläche mit freigelassenen Uredosporen von *P. pachyrhizi* (B). Nahaufnahme einer einzelnen, hellgelben Läsion verursacht durch *P. pachyrhizi*. Die Läsion wird in ihrer Ausdehnung durch Blattadern begrenzt (C). Mikroskopische Aufnahme einer durch *P. pachyrhizi* verursachten Uredie mit freigelassenen Uredosporen (D). Mikroskopisch aufgenommene, gekeimte und nicht gekeimte Uredosporen in Wasseragar. Die aufgezeigten Sporen sind ca. 20–30 µm groß und weisen eine runde–ovale Form auf (E).

Rostpilze weisen für gewöhnlich einen komplexen Lebenszyklus mit bis zu fünf verschiedenen Sporenstadien, Veränderungen in ihren Kernphasen, Generations- und Wirtswechsel auf. Hierin unterscheidet sich *P. pachyrhizi* sowohl mit einem reduzierten als auch mit einem asexuellen Lebenszyklus. Die Verbreitung basiert nach heutigem Kenntnisstand ausschließlich auf der ungeschlechtlichen Vermehrung der dikaryotischen Uredosporen, welche zugleich auch für die Infektion verantwortlich sind (Ono et al., 1992; Goellner et al., 2010). Neben den Uredosporen wurden auch Teleutosporen nachgewiesen, deren Keimung bisher nur im Labor beobachtet wurde und deren Bedeutung bislang unbekannt ist (Saksirirat & Hoppe, 1991). Die Uredosporen des Pilzes weisen eine kugelförmige oder ovale Form und eine hellgelb-braune Färbung auf. Die Größe der Sporen ist variabel und liegt im Bereich 18–45 x 13–28 µm (Koch et al., 1983) (Abbildung 3, D–E) und sie können durch Wind und Regen über weite Strecken verbreitet werden (Isard et al., 2005). Die auf der Pflanzenoberfläche auftreffenden Uredosporen keimen nach 2–4 h mit einem Keimschlauch aus und bilden an dessen Ende ein kugelförmiges Appressorium. Darauf folgt die Entstehung eines Appressorien-Kegels im Inneren des Appressorium und der Ausbildung einer Penetrationshyph, welche direkt in das Pflanzengewebe eindringen kann (Koch et al., 1983; Edwards & Bonde, 2011). Bei diesem Vorgang der Penetration von *P. pachyrhizi* stirbt die Epidermiszelle der Wirtspflanze ab (Goellner et al., 2010). Die direkte Penetration der Kutikula und Epidermis unterscheidet *P. pachyrhizi* von den meisten anderen Rostpilzen, die normalerweise die Spaltöffnungen zur Infektion nutzen. Diese Fähigkeit erklärt möglicherweise auch das sehr große Wirtsspektrum des Pilzes, welches bei anderen Rostpilzen nicht zu beobachtet ist (Goellner et al., 2010; Edwards & Bonde, 2011; Loehrer, 2016). In den folgenden Tagen kolonisiert der Pilz seinen Wirt, indem er in den Zellen der Sojabohne Hyphenstrukturen (Haustorien) ausbildet. Diese Strukturen sind für den biotrophen Pilz entscheidend für die Nährstoffaufnahme, Stoffwechselprozesse und die Abgabe von Effektorproteinen, die das Immunsystem der Sojapflanze manipulieren und somit Abwehrmechanismen der Pflanze unterdrücken (Voegelé & Mendgen, 2011; Link et al., 2014). 5–8 Tage nach der Infektion sind auf der Blattunterseite die erste Uredien (Pusteln) sichtbar, welche ca. 9–12 Tage nach der Infektion erstmalig Uredosporen entlassen (Abbildung 3, B–C) (Goellner et al., 2010). In diesem Stadium ist der Lebenszyklus von *P. pachyrhizi* abgeschlossen. Eine Uredie kann für ca. drei Wochen Sporen produzieren und neben anderen Pflanzen auch dieselbe Pflanze erneut infizieren. Diese Sekundärinfektionen resultieren in einem schnellen Infektionsverlauf und einer schnellen Ausbreitung des Pilzes. Des Weiteren können innerhalb einer Saison 6–8 Infektionszyklen auftreten (Marchetti et al., 1975; Goellner et al., 2010). Obwohl keine sexuelle Vermehrung erfolgt, sind die Populationen des Pilzes genetisch sehr vielfältig (Twizeyimana et al., 2011b; Zhang et al., 2012; Jorge et al., 2015; Darben et al., 2020). Diese Vielfalt kann unter anderem durch

parasexuelle Kernrekombinationen zwischen verschiedenen Isolaten, Keimschlauchfusionen oder Hyphenanastomosen verursacht werden (Vittal et al., 2012) und durch die dikaryotischen Uredosporen und den kurzen Reproduktionszyklus von *P. pachyrhizi* zusätzlich verstärkt werden.

Das Wirtsspektrum von *P. pachyrhizi* ist im Vergleich zu anderen Rostpilzen sehr breit. Neben der Sojapflanze kann der Pilz unter natürlichen Bedingungen 31 Arten in 17 Leguminosengattungen infizieren und unter Laborbedingungen wurden zusätzlich 60 Arten in 26 Gattungen beschrieben (Ono et al., 1992). Auch eine Infektion der Nebenwirte kann eine Zunahme des wirtschaftlichen Schadens für die Sojaernte bedeuten. Der Pilz nutzt zahlreiche Leguminosen wie bspw. Kudzu (*Pueraria lobata*) als Überdauerungs- bzw. Überwinterungswirt in frostfreien Gebieten, sodass ab Beginn der folgenden Saison ausreichend Inokulationsmaterial für die Infektion der Sojabohnen zur Verfügung steht. Diese Möglichkeit kommt vor allem in Regionen zum Tragen, in denen die Sojabohne als Wirt für *P. pachyrhizi* nicht ganzjährig zur Verfügung steht, wie z. B. in den USA (Hartman et al., 2004a; Christiano & Scherm, 2007; Pretorius et al., 2007).

Sowohl die Temperatur als auch die Luftfeuchtigkeit und Feuchteperioden haben einen starken Einfluss auf die Ausprägung einer Infektion mit *P. pachyrhizi*. Im Labor wurden optimale Bedingungen von 21–24 °C und > 80 % Luftfeuchtigkeit bei Feuchteperioden bis zu 16 h ermittelt. Hierbei wurde deutlich, dass bei Feuchteperioden unter 6 h und bei Temperaturen unter 9 °C und über 29 °C keine erfolgreiche Infektion stattfinden konnte. Die Infektion konnte zusätzlich verstärkt werden, wenn die Feuchteperiode auf bis zu 16 h ausgeweitet wurde (Marchetti et al., 1976; Melching et al., 1989; Nunkumar et al., 2009).

1.3 Kontrollmöglichkeiten von *P. pachyrhizi*

ASR verursacht durch *P. pachyrhizi* gehört zu den Pilzkrankheiten an der Sojabohne, welche den Ertrag am stärksten limitieren kann. Ohne Kontrollmöglichkeiten und unter günstigen Umweltbedingungen, wurden Ertragsverluste von bis zu 80 % dokumentiert (Levy, 2005; Godoy et al., 2016). Hierbei ist vor allem die frühzeitige Entlaubung und die damit verbundene geringere Photosyntheseleistung für einen Rückgang des Korngewichts und der Kornqualität verantwortlich. Zu den wichtigsten Kontrollmöglichkeiten gehören spezifische Anbaupraktiken, die Verwendung von resistenten Sojasorten und vor allem die Anwendung von Fungiziden.

Anbaupraktiken können das Auftreten von *P. pachyrhizi* nicht gänzlich vermeiden. Sie sind allerdings, insbesondere im Hinblick auf einen integrierten Pflanzenschutz, unter zusätzlicher Verwendung von resistenten Sorten und Fungizide geeignet, einen entsprechenden Beitrag zur Kontrolle des Pilzes zu leisten. Da das Auftreten von *P. pachyrhizi* abhängig von Temperatur und

Feuchtigkeit ist (Kapitel 1.2.2), bietet es sich unter anderem an, den Aussaattermin je nach Region und Witterungsbedingungen entsprechend anzupassen (Marchetti et al., 1976; Melching et al., 1989; Del Ponte & Esker, 2008). Hierbei ist zu beachten, dass eine zu späte Aussaat ebenfalls geringere Ernteerträge aufweist (Hu & Wiatrak, 2012). Die richtige Sortenauswahl ist ein weiterer Faktor zur Reduzierung des Infektionsdrucks, denn frühreifende Sojabohnensorten verringern die Zeit, welche dem Pilz zur Infektion zur Verfügung steht. Zusätzlich können Sojabohnensorten mit einer kurzen Schotenfüllungsphase verwendet werden und die Auswahl der Pflanzstandorte mit einer ausreichenden Entfernung zu möglichen Zwischenwirten angepasst werden. Dem Pilz sollte in Phasen ohne Sojaanbau möglichst keine Überdauerungs- oder Überwinterungsoption zur Verfügung stehen (Corrêa da Silva et al., 2011; Twizeyimana et al., 2011a). Neben den Praktiken, welche der Landwirt selbstentscheidend anwenden kann, greift in Brasilien die Regierung ein, um den vorherrschenden starken Befallsdruck von *P. pachyrhizi* zu regulieren. Im Gegensatz zu den anderen Hauptsojaproduzenten USA und Argentinien, weist Brasilien ganzjährig ein geeignetes Klima zum Anbau von Sojabohnen und somit zur Ausbreitung des ASR auf (Del Ponte & Esker, 2008; Godoy et al., 2016). Aufgrund dieses andauernden, ganzjährigen Befallsdrucks in Brasilien wurde im Jahr 2006 die „free host period“ beschlossen. In dieser 60–90-tägigen Periode dürfen von Juni bis September keine Sojapflanzen angebaut werden. Durch diese Restriktion soll der Infektionszyklus von *P. pachyrhizi* unterbrochen und der Start der Infektionen in der kommenden Saison hinausgezögert werden (Godoy, 2012; Godoy et al., 2016).

Neben den Anbaupraktiken ist eine frühzeitige Erkennung und Bewertung des ASR-Risikos bedeutend, um die entsprechenden Kontrollmöglichkeiten möglichst optimal auszunutzen und somit einen angepassten, integrierten Pflanzenschutz zu betreiben (Karlekar & Seal, 2020). Bei der Erstellung solcher Monitoringmodelle spielt vor allem das genaue Verständnis der Epidemiologie der Krankheit eine Rolle. Somit basieren sie zumeist auf meteorologischen Daten, denn die Entwicklung bzw. Verbreitung des Pilzes wird maßgeblich durch Wind, Regen und Temperatur bestimmt. Durch Vorhersagen möglicher Epidemien kann der Einsatz von Fungiziden und andere Kontrollmöglichkeiten präzisiert werden (Del Ponte & Esker, 2008; Corrêa da Silva et al., 2011).

1.3.1 Resistente Sojasorten

Als weitere Kontrollmöglichkeit von *P. pachyrhizi* gilt die Verwendung weniger anfälliger bzw. resistenter Sojabohnensorten, auf denen eine Vermehrung des Pathogens gestoppt bzw. vermindert wird. Diese Wirtsresistenz wurde bei mehreren Landrassen der Sojabohne (Bromfield, 1984), Kudzu (Jordan et al., 2010) und anderen Wirten beobachtet (Slaminko et al., 2008). Die Infektion einer anfälligen Sojasorte mit *P. pachyrhizi* resultiert in einer gelb–hellbraunen Läsion

(Abbildung 3, C) mit 2–5 Uredia pro Läsion und einer starken Sporenbildung. Diese anfällige Reaktion wird als „TAN“ („hellbraun“) bezeichnet. Bei den Resistenzreaktionen wird zwischen der „immune (IM)“ und der „red brown (RB)“ („rotbraun“) Reaktion unterschieden. Bei der RB-Reaktion werden rot-braune Läsionen gebildet mit lediglich 0–2 Uredia pro Läsion. Im Vergleich zu den anfälligen Sorten kommt es zu keiner oder geringeren Sporulation. Bei dieser Reaktion spricht man von einer unvollständigen Resistenz, da der Erreger z. T. weiterhin, jedoch in begrenztem Maß, wachsen und sich reproduzieren kann. Im Laufe einer Infektion vergrößern sich die Läsionen und die Anzahl der Uredien nimmt zu. Hierbei ist allerdings die Zunahme der Größe und Anzahl der Läsionen und Uredien bei der anfälligen TAN-Reaktion deutlich stärker als bei der RB-Reaktion. Bei der IM-Reaktion sind lediglich kleine Nekrosen zu erkennen. Die Bildung von Uredien und Urediosporen und die damit verbundene Verbreitung von *P. pachyrhizi* bleibt aus (Bromfield, 1984; Hartman et al., 2005; Bonde et al., 2006; Miles et al., 2011).

Bis heute wurden sieben Resistenzgene der Sojapflanze *G. max* gegenüber *P. pachyrhizi* identifiziert, welche mit *Rpp1-7* (Resistenz gegenüber *P. pachyrhizi*) gekennzeichnet werden (Childs et al., 2018a). Des Weiteren wurden sechs weitere Allele identifiziert, die unterschiedliche Genwirkungen aufzeigen, sich allerdings den bereits beschriebenen Loci zuordnen lassen (z. B. *Rpp1-b*) (Chakraborty et al., 2009). *Rpp1*, *Rpp2*, *Rpp3*, *Rpp4*, *Rpp5*, *Rpp6* und *Rpp7* wurden nacheinander identifiziert (Bromfield & Hartwig, 1980; McLean & Byth, 1980; Hartwig & Bromfield, 1983; Hartwig, 1986; Garcia et al., 2008; Li et al., 2012; Childs et al., 2018b) und demzufolge sind die Resistenzgene *Rpp1* und *Rpp2* derzeit am weitesten erforscht (Meira et al., 2020). Die Wirkung der Resistenzgene auf *P. pachyrhizi* ist im Wesentlichen abhängig von der Genetik der lokal vorherrschenden Pilzpopulationen. Bereits 1980 konnte bestätigt werden, dass die Resistenzgene *Rpp1–3* in verschiedenen Rostisolaten aus unterschiedlichen Regionen unterschiedliche Resistenzreaktionen hervorriefen (Bromfield & Hartwig, 1980). *P. pachyrhizi* weist eine hohe genetische Vielfalt auf und die Virulenz von Feldpopulationen kann je nach Standort erheblich variieren (Bonde et al., 2006; Walker et al., 2011; Twizeyimana & Hartman, 2012; García-Rodríguez et al., 2021). Aktuell zeigt kein Resistenzgen eine Resistenz gegenüber allen Pathotypen des Pilzes (Langenbach et al., 2016; Childs et al., 2018b). In Studien konnte allerdings gezeigt werden, dass die Kombination (Stapelung) mehrerer *Rpp*-Gene genutzt werden kann, um eine breitere Resistenz zu erzielen und somit eine schnelle Resistenzüberwindung des Pilzes zu unterdrücken bzw. zu verlangsamen (Yamanaka et al., 2013; Kato & Soares, 2021; Meira et al., 2022).

1.3.2 Fungizide

Optimierte Anbaupraktiken und die Verwendung resistenter Sojasorten sind nach derzeitigem Forschungsstand nicht ausreichend, um den Ernteertrag in Regionen in denen ASR vorkommt zu sichern. Insbesondere die genetische Variabilität von *P. pachyrhizi* sowie seine rasche Reproduktion, die weite Verbreitung der Sporen und das breite Wirtsspektrum sorgen dafür, dass der Pilz genetische Resistenzgene schnell überwinden kann und die weiter oben genannten Anbaupraktiken lediglich einen begrenzten Einfluss auf die Kontrolle ausüben. Aus diesem Grund gilt als derzeit effektivste Bekämpfungsstrategie gegenüber *P. pachyrhizi* der Einsatz von Fungiziden (Miles et al., 2003; Goellner et al., 2010; Godoy, 2012; Akamatsu et al., 2013).

Fungizide werden bereits seit über 200 Jahren zum Schutz der Pflanzen vor Pilzbefall verwendet. Nach dem Zweiten Weltkrieg hat sich die Zahl der zu behandelten Kulturen, der Pflanzenkrankheiten und der verfügbaren Chemikalien sowie die Fläche und die Häufigkeit des Fungizideinsatzes rapide gesteigert (Brent & Hollomon, 2007a). Fungizide sind in der Lage durch die Kontrolle von Pilzkrankheiten die Pflanzenproduktion und die damit verbundenen Ernteerträge zu stabilisieren. Sie sind somit ein wichtiges Element zum Schutz sowohl des Ernteertrags als auch der Erntequalität. Dies ist besonders wichtig in Anbetracht der steigenden Nachfrage nach Nahrungsmitteln aufgrund des stetigen Anstiegs der Weltbevölkerung (Oerke, 2006; Oliver & Hewitt, 2014).

Eine Charakterisierung unterschiedlicher Fungizide erfolgt hinsichtlich ihrer chemischen Struktur, ihres Wirkortes (Mode of Action (MoA)) und ihrer Eignung für entsprechende Kulturen. Eine detaillierte Auflistung der über 200 verfügbaren Wirkstoffe, gruppiert nach ihrem jeweiligen MoA, ist auf der Webseite des Fungicide Resistance Action Committee (FRAC) aufgeführt (FRAC, 2021a). Grundsätzlich lassen sich Fungizide in Single-Site- oder Multi-Site-Inhibitoren gruppieren. Hierbei wirken Single-Site-Inhibitoren an einem bestimmten Ort im pilzlichen Stoffwechsel gegen ein Enzym oder Protein, welches das Überleben des Pilzes beeinträchtigt. Multi-Site-Inhibitoren hingegen wirken meist unspezifisch auf eine Vielzahl von Stoffwechselprozessen im pilzlichen Organismus. Häufig sind Single-Site-Inhibitoren weniger pflanzentoxisch und können systemische Eigenschaften aufweisen, wohingegen Multi-Site-Inhibitoren als Kontaktfungizide wirken und in der Regel nicht systemisch sind. Neben der Unterscheidung Single-/Multi-Site und systemisch/nicht systemisch kann zwischen protektiven, kurativen und eradikativen Fungiziden unterschieden werden (Mueller, 2006; Oliver & Hewitt, 2014). Ein nicht systemisches Kontaktfungizid wirkt ausschließlich protektiv und schützt hierbei lediglich die behandelten Pflanzenteile. Systemische Fungizide dringen in das Pflanzengewebe ein und können daher auch unbehandelte Pflanzenteile (z. B. Neuzuwachs) vor einer Infektion schützen und werden zudem

weniger durch Niederschläge abgewaschen. Somit sind systemisch wirkende Fungizide, welche seit Ende der 1960er Jahre entwickelt wurden, deutlich flexibler in ihrer Anwendung (Edgington et al., 1980; Oerke, 2006; Oliver & Hewitt, 2014).

Eine Vielzahl an Fungiziden aus unterschiedlichen chemischen Klassen und mit unterschiedlichen MoA dienen der Kontrolle des ASR. Bereits in den 1990er Jahren konnten im asiatischen Raum protektive Wirkungen mit Multi-Site-Inhibitoren wie z. B. Mancozeb und Chlorothalonil sowie ersten Triazolen wie z. B. Hexaconazol, Propiconazol und Difenconazol erzielt werden (Patil & Anahosur, 1998; Godoy, 2012). Mit der Ausbreitung des ASR in Afrika und Südamerika, weitete sich das Portfolio an verwendeten Triazolen (Demethylierungsinhibitoren (DMI)) ebenso wie die Anwendung von Strobilurinen (Chinon-Outside-Inhibitoren (QoI)) aus (Miles et al., 2003; Miles et al., 2007). Verwendet wurden DMI wie z. B. Epoxiconazol, Propiconazol, Tebuconazol und Tetraconazol sowie die QoI Azoxystrobin, Picoxystrobin, Pyraclostrobin und Trifloxystrobin, welche eine höhere Wirksamkeit zeigten als die Multi-Site-Inhibitoren, die mehrere präventive Anwendungen erfordern, um eine ausreichende Wirksamkeit zu erzielen. Insbesondere DMI-QoI-Mischungen wie z. B. Epoxiconazol und Pyraclostrobin erzielten gute Ergebnisse in der Kontrolle des ASR (Miles et al., 2003; Miles et al., 2007; Scherm et al., 2009). Hierbei konnte bestätigt werden, dass der Zeitpunkt des Einsatzes von Fungiziden gegenüber ASR eine entscheidende Rolle spielt. Eine Verzögerung der Fungizidanwendung bis nach dem Auftreten der Krankheit (kurative Anwendung) führte zu erheblichen Ertragseinbußen und somit ist eine protektive Anwendung von zwei bis drei Applikationen wirkungsvoller (Miles et al., 2003; Yorinori, 2004; Miles et al., 2007). Nachdem der Pilz 2001 erstmals auf dem südamerikanischen Kontinent identifiziert wurde, stieg die Anzahl der gelisteten Fungizide (Soloformulierungen und Mischungen) zur Bekämpfung des ASR in Brasilien von fünf im Jahr 2002 auf 117 im Jahr 2015 (Godoy et al., 2016).

Heute werden zur Kontrolle des ASR insbesondere vier Fungizidklassen verwendet: Multi-Site-Inhibitoren wie z. B. Kupfer, Mancozeb oder Chlorothalonil sowie Single-Site-Inhibitoren aus der Klasse der DMI, QoI sowie der Succinat-Dehydrogenase-Inhibitoren (SDHI).

Die SDHI, welche im Jahr 2013 dem Portfolio zur Bekämpfung des ASR hinzugefügt wurden, gehören hierbei zu der neuesten Wirkstoffklasse. Dieser MoA hemmt die Succinat-Dehydrogenase (SDH), auch als Komplex II oder Succinat-Ubichinon-Oxidoreduktase bezeichnet, in der mitochondrialen Atmungskette. Die SDH-Enzymeinheit ist ein mitochondriales Heterotetramer, welches aus vier kernkodierten Untereinheiten besteht (SDHa–d). Im Gegensatz zu anderen Dehydrogenasen der Tricarbonsäurezyklus (TCA), überträgt das SDH die aus Succinat gewonnenen Elektronen direkt auf den Ubichinon-Pool (Q-Pool) der Atmungskette. Die

SDHI binden an der Q-Bindungsstelle des SDH-Komplexes und unterbrechen die Reduktion von Ubichinon zu Ubichinol. Nach der Bindung blockieren sie den Zugang zum Substrat, was folglich weitere Zyklen der Succinatoxidation verhindert. Die neusten SDHI-Fungizide besitzen ein hohes Maß an Aktivität gegen viele wichtige Pflanzenpathogene wie auch *P. pachyrhizi* (Xiong et al., 2015; Zambolim et al., 2021).

Strobilurine oder QoI hemmen die mitochondriale Atmung durch Bindung an die Chinoloxidationsstelle (Qo) des Cytochrom b (CYTb) im Cytochrom-bc1-Komplex, innerhalb der Mitochondrien. QoI behindern den Elektronentransfer zwischen CYTb und Cytochrom c (CYTc). Hierbei wird die Oxidation von reduziertem Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NADH) und die Synthese von Adenosintriphosphat (ATP) verhindert und somit ist die Energieproduktion des Pilzes blockiert (Bartlett et al., 2002; Grasso et al., 2006).

Die DMI gehören zur Fungizidklasse der Sterol-Biosynthese-Inhibitoren (SBI). Die SBI Fungizidklasse besteht aus vier Untergruppen, die unterschiedliche Zielenzyme im Sterol-Biosyntheseweg hemmen. Diese Untergruppen werden durch die DMI, die Amine, die Keto-Reduktase-Inhibitoren und die Squalenepoxidase-Inhibitoren gebildet. Hierbei werden die Squalenepoxidase-Inhibitoren als einzige Ausnahme nicht kommerziell in der Landwirtschaft verwendet. Die DMI-Gruppe weist die größte Anzahl von fungiziden Verbindungen und das breiteste Wirkungsspektrum der SBI-Gruppen auf (FRAC, 2021a). DMI sind mit den QoI die Fungizide, welche in der Vergangenheit am häufigsten bei der Bekämpfung des ASR angewandt wurden. Hierbei wurde festgestellt, dass die DMI (Soloformulierung) meist eine bessere Wirksamkeit aufwiesen als QoI (Soloformulierung) (Godoy et al., 2016). Da die Wirksamkeit unterschiedlicher DMI auf *P. pachyrhizi* in der vorliegenden Arbeit näher untersucht wurde, ist diese Wirkstoffklasse im nachfolgenden Kapitel näher erläutert.

Derzeit werden in Regionen mit starkem ASR-Vorkommen, wie bspw. Brasilien, sowohl Zweier- als auch Dreierfungizidmischungen mit DMI, QoI und SDHI verwendet. Aufgrund der auftretenden Resistenzen von *P. pachyrhizi* gegenüber den spezifisch wirkenden Fungiziden (Kapitel 1.4.2), wurden in den letzten Jahren auch Multi-Site-Inhibitoren wie z. B. Mancozeb oder Kupfer in Dreiermischungen mit z. B. DMI und SDHI getestet und deren positive Wirkung sowohl auf das Resistenzmanagement als auch auf die ASR-Kontrolle wurde bestätigt (Netto et al., 2020; Reis et al., 2021a; Reis et al., 2021b; Zambolim et al., 2021). Die Anzahl und der Zeitpunkt der Fungizidapplikationen hängt von der Dauer und der Schwere der ASR-Epidemie und von der Länge der vegetativen und generativen Phase der spezifischen Sojasorte ab. Die wirksamste Anwendung ist zu Beginn der generativen Phase und grundsätzlich werden ca. 2–4 Applikationen, je nach Krankheitsdruck und verwendeter Sojasorte, angewendet. Eine frühe Applikation in der

vegetativen Phase kann die Krankheitsschwere verringern, hat sich allerdings nicht als ertragssichernd erwiesen (Miles et al., 2003; Godoy, 2012). Nach den durch FRAC (2021b) zusammengefassten Leitlinien für ein effektives Resistenzmanagement sollten maximal zwei SDHI-Anwendungen pro Saison erfolgen, immer in Mischungen mit anderen Wirkstoffklassen und wenn möglich präventiv. DMI und QoI sollten ebenfalls in Mischungen mit Fungiziden einer anderen Wirkstoffklasse und möglichst präventiv angewendet werden.

1.3.2.1 Demethylierungsinhibitoren (DMI)

DMI werden der Klasse der SBI zugeordnet und wurden bereits in den 1970er Jahren eingeführt (Fromtling, 1988). Sie zählen innerhalb der SBI zur am weitesten erforschten Wirkstoffgruppe und umfasst aktuell 36 chemische Verbindungen. Diese werden in folgende sechs Gruppen gegliedert: Piperazine, Pyridine, Pyrimidine, Imidazole, Triazole und Triazolinthione. Hierbei bilden die Triazole (Azole) die größte Gruppe mit 26 Verbindungen, welche die für die Landwirtschaft bedeutendsten Fungizidverbindungen beinhaltet (Oliver & Hewitt, 2014; FRAC, 2021a). Eine Wirkung auf den ASR konnten bspw. für die Triazole Epoxiconazol (BASF SE), Cyproconazol (Syngenta AG), Tebuconazol (Bayer CropScience AG), Difenconazol (Syngenta AG), Metconazol (BASF SE), ebenso wie das Triazolinthion Prothioconazol (Bayer CropScience AG) belegt werden (Ivancovich, 2005; Levy, 2005; Miles et al., 2007; Blum & Reis, 2013; Reis et al., 2015).

Die Wirkung der DMI basiert auf der Hemmung der Ergosterol-Biosynthese in Pilzen. Da die Ergosterol-Biosynthese in fast allen Pilzen stattfindet, zeigen die DMI ein sehr breites Wirtsspektrum gegenüber einer Vielzahl wichtiger pflanzenpathogener Ascomyceten und Basidiomyceten auf. Somit gehören die DMI-Fungizide mit ihren vielfältigen chemischen Strukturen zu einer der wichtigsten Klasse zur Bekämpfung von Pilzen (Becher & Wirsal, 2012; Ziogas & Malandrakis, 2015; FRAC, 2021a). Das Zielenzym der DMI ist die Lanosterol-14a-Demethylase (CYP51 oder ERG11), eine Cytochrom-P450-Monooxygenase. Das Enzym befindet sich in der äußeren Membran des endoplasmatischen Retikulums und katalysiert die Entfernung der Methylgruppe am 14a-Kohlenstoff des Sterolvorläufers Lanosterol. Die DMI hemmen diese Demethylierung am 14a-Kohlenstoff oder 24-Methylen-Dihydrolanosterol (Eburicol), indem ein Elektronenpaar des Stickstoffs am Azolring an das Eisenatom in der prosthetischen Hämgruppe des CYP51 bindet. Die Spezifität von Azolverbindungen hängt von der Wechselwirkung zwischen dem Azol und dem CYP51 ab (Vanden Bossche, 1985; Vanden Bossche et al., 1987; Gisi et al., 2000; Parker et al., 2014). Die Bindung der DMI führt zur Akkumulation von Vorläufersterolen (14-methylierte Sterole) und zu einer verminderten Ergosterolsynthese. Ergosterol zählt zu den wichtigsten Sterolen, welches für die Membranfluidität und -stabilität verantwortlich ist und

zusätzlich die Aktivität von weiteren Membranproteinen beeinflusst. Somit führt die Abwesenheit von Ergosterol zu Störungen in den Membranfunktionen des Pilzes, welche sich z. B. in durchlässigen Membranen und abnormalem Wachstum äußert. Zusätzlich führt die Akkumulation von 14-methylierten Sterolen unter anderem in *Candida albicans* zu weiteren Störungen in der Zellmembran (Siegel, 1981; Vanden Bossche, 1985; Becher & Wirsal, 2012; Parker et al., 2014; Cheng et al., 2015).

Es konnte bestätigt werden, dass die Anzahl von CYP51-Enzymen innerhalb eines Zellkerns bei verschiedenen Pilzarten differiert. Phylogenetische Analysen der Proteinsequenzen ergaben, dass die Anzahl der CYP51-Enzyme zwischen einem bis drei variieren kann und diese in drei Kladen mit den Namen CYP51A, CYP51B und CYP51C eingeteilt werden können (Becher et al., 2011; Becher & Wirsal, 2012). Becher et al. (2011) untersuchte die Anzahl der CYP51 für insgesamt 38 Pezizomycotina-Arten und konnte für 17 Arten ein CYP51, für 14 Arten zwei CYP51 und für fünf Arten drei CYP51 nachweisen. Zu den Arten in denen drei CYP51 aufgezeigt werden konnten, zählen *Fusarium graminearum*, *Fusarium solani*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus flavus* und *Aspergillus oryzae*. CYP51A und CYP51B wurden z. B. in *Magnaporthe*, *Pyrenophora* und *Penicillium* identifiziert. Des Weiteren konnten in einigen Arten Duplikate von CYP51A oder CYP51B nachgewiesen werden (Becher et al., 2011; Becher & Wirsal, 2012). Für *P. pachyrhizi* konnte bislang die genaue Anzahl der vorhandenen CYP51 im Genom noch nicht bestätigt werden. Es werden allerdings bis zu drei CYP51 pro Zellkern vermutet (Schmitz, 2013; Schmitz et al., 2014).

1.4 Fungizidresistenz

Das stetige Bevölkerungswachstum und die damit verbundene Nachfrage nach Lebensmitteln hat zu Entwicklungen in der modernen Landwirtschaft geführt, welche das Auftreten von Pflanzenkrankheiten begünstigen. Hierzu zählen bspw. Monokulturen, die Verwendung anfälliger, aber ertragreicher Sorten und der Einsatz von Stickstoffdüngern. Die Bekämpfung der auftretenden Pilzkrankheiten erfolgt hierbei weitgehend durch die Anwendung von Fungiziden (Oerke, 2006; Deising et al., 2008). Die eingesetzten Fungizide üben einen Selektionsdruck aus, sodass Pilze aus evolutionärer Sicht gezwungen sind, die negativen Auswirkungen der Fungizidbehandlungen zu überwinden, um ihr Überleben zu sichern. Pilze verändern, wie andere Organismen auch, stetig ihr Genom. Diese Veränderungen können sowohl mit Vor- als auch mit Nachteilen für das Überleben des Individuums verbunden sein. Als Fungizidresistenz bezeichnet man die genetisch erworbene, stabile und vererbare Veränderung des Pilzgenoms zur Überwindung der Wirkung eines Fungizids (Deising et al., 2008; Hollomon & Brent, 2009).

Bei Pilzen wurden insbesondere vier Mechanismen definiert, welche zu einer Fungizidresistenz gegenüber Single-Site-Inhibitoren führen können. Hierzu zählen, die Veränderung des Zielproteins durch Mutationen im codierten Gen, die Überexpression des Zielproteins durch Hochregulierung des codierten Gens, der Ausschluss (Efflux) des Fungizids aus der Zelle durch bspw. ABC-Transporter, ebenso wie der Abbau bzw. die Entgiftung des Fungizids (Ma & Michailides, 2005; Cools et al., 2013).

Die Veränderung des Zielenzym des Fungizids stellt den häufigsten Resistenzmechanismus in phytopathogenen Pilzen dar (Brent & Hollomon, 2007a). Hierbei kommt es zu einer oder mehreren Mutationen im Zielgen, welche eine Wirksamkeit des angewandten Fungizids beeinträchtigen oder komplett unterdrücken können. Unter andauernder Fungizidanwendung kommt es zu einer Vermehrung eines angepassten Individuums mit Resistenzmutationen und zu einem Rückgang der sensitiven Individuen. Somit entsteht schrittweise eine resistente bzw. angepasste Pilzpopulation (Brent & Hollomon, 2007a; Deising et al., 2008). Bei fehlender Fungizidanwendung wird das Fortbestehen der Pilzpopulationen jedoch durch deren Fitness bestimmt. Die angepasste Pilzpopulation, die durch den Einsatz von Fungiziden selektiert wurde, verfügt aufgrund ihrer genetischen Veränderungen häufig über eine geringere Enzymeffizienz. Aus diesem Grund können nach Aussetzen von Fungizidbehandlungen die Anzahl der angepassten Individuen in einer Pilzpopulation abnehmen und die sensitiven Individuen zunehmen. Somit konkurrieren einerseits der Fitnessvorteil der sensitiven Individuen unter natürlichen Bedingungen und andererseits der Vorteil der angepassten Individuen bei erhöhtem Fungizideinsatz miteinander. (Ma & Michailides, 2005). Durch Punktmutationen hervorgerufene Veränderungen im Zielenzym, führen häufig zu einer Kreuzresistenz zwischen Fungiziden der gleichen Wirkstoffgruppe. Hierbei werden häufig alle Fungizide mit demselben MoA durch die resultierenden Mutationen negativ beeinflusst, während die Wirkung von Fungiziden mit anderen MoAs nicht beeinträchtigt ist (Brent & Hollomon, 2007b; Genet & Jaworska, 2009). Das gegenteilige Phänomen wird als negative Kreuzresistenz bezeichnet. Hierbei wirkt sich die erworbene Resistenz gegenüber einem Fungizid, mit einer Erhöhung der Sensitivität gegenüber einem anderen Fungizid aus. Eine negative Kreuzresistenz ist bei phytopathogenen Pilzen eher selten und in starker Ausprägung auf Tubulin-Inhibitoren beschränkt (Brent & Hollomon, 2007a).

Ein weiterer Resistenzmechanismus in phytopathogenen Pilzen ist die Überexpression des Zielproteins des Fungizids. Dieser Mechanismus beruht auf einer Hochregulierung des codierten Gens, welches das Ziel des angewandten Fungizids darstellt (Ma & Michailides, 2005). Mit einer erhöhten Menge des Zielproteins können bis zu einem gewissen Grad die Stoffwechselprozesse des Pilzes trotz der Fungizidanwendung stattfinden. Höhere Dosen des Fungizids können hierbei

den Verlust der Sensitivität ausgleichen, sind aber insbesondere aus regulatorischen Gründen häufig nicht praktikabel. Die Überexpression ist im Gegensatz zu den Punktmutationen weniger weit verbreitet in der Resistenzentwicklung der phytopathogenen Pilze. Dennoch wurde eine Überexpression in einigen Pilzen wie bspw. *Zymoseptoria tritici*, *Venturia inaequalis* und auch *P. pachyrhizi* nachgewiesen (Cools & Fraaije, 2013; Schmitz et al., 2014; Villani et al., 2016).

Ein zusätzlicher Resistenzmechanismus beschreibt die aktive Ausschleusung von Fungiziden aus der Zelle durch Efflux-Pumpen. Dieser Vorgang wird auch als Multidrug-Resistenz (MDR) bezeichnet und wurde unter anderem bei phytopathogenen Pilzen wie *Z. tritici* und *Botrytis cinerea* beschrieben (De Waard et al., 2006; Kretschmer et al., 2009; Hahn & Leroux, 2015; Omrane et al., 2015). Zwei Familien von Efflux-Transportern, welche in der Plasmamembran lokalisiert sind, sind am aktiven Transport von Toxinen aus der Zelle beteiligt. Bei der MDR kommt es zu einer Überexpression dieser ABC- und MFS-Transporter und somit zu einer erhöhten Effluxaktivität (De Waard, 1997; Deising et al., 2008). Die MDR ist vor allem bei Bakterien und menschlichen Krebszellen beschrieben (Bassetti et al., 2013; Wu et al., 2014), wohingegen deren praktische Relevanz bei phytopathogenen Pilzen und deren Auswirkungen auf die Fungizidanwendung kontrovers diskutiert wird (Del Sorbo et al., 2000; De Waard et al., 2006; Kretschmer et al., 2009).

Ein weiterer Resistenzmechanismus beruht auf dem Abbau und der damit verbundenen Entgiftung der Fungizide. Hierbei kommt es z. B. durch eine erhöhte Enzymaktivität von Hydrolasen, Esterasen, Glutathion-S-Transferasen oder Cytochrom-P450-Monooxygenasen zu einer enzymatischen Entgiftung von Toxinen (z. B. Fungizide) (Leroux et al., 2002; Ma & Michailides, 2005). Die Metabolisierung von Fungiziden bei Pilzen wurde bislang lediglich vereinzelt nachgewiesen. Beispiele hierfür bilden die Benzimidazolresistenz bei *Fusarium graminearum* (Sevastos et al., 2017), die Fenhexamidresistenz bei *B. cinerea* oder die Kresoxim-Methylresistenz bei *V. inaequalis* (Leroux et al., 2002). Sowohl bei der Herbizidresistenz als auch bei der Insektizidresistenz ist dieser Resistenzmechanismus häufiger beschrieben (Li et al., 2007; Yu & Powles, 2014).

Vor 1970 wurden zur Bekämpfung der phytopathogenen Pilze insbesondere Multi-Site-Inhibitoren, welche an mehreren Stellen im pilzlichen Stoffwechsel angreifen, verwendet. Fungizidresistenzen spielen hier keine Rolle, da der Pilz mehrere Resistenzmechanismen entwickeln muss, um die Wirksamkeit des Fungizids zu reduzieren. Erst der vermehrte Einsatz von spezifisch wirkenden Single-Site-Inhibitoren ab den späten 1960er Jahren führte zu einer vermehrten Resistenzentwicklung der Pilzpopulationen gegenüber mehreren Wirkstoffklassen (Ma & Michailides, 2005; Hollomon & Brent, 2009). Der Grund dafür liegt im einseitigen Angriffspunkt

der Fungizide im pilzlichen Stoffwechsel und der damit verbundenen Möglichkeit der Resistenzentwicklung durch geringfügige Veränderungen im Zielprotein (Brent & Hollomon, 2007a; Deising et al., 2008).

Resistenzen, die mit einem plötzlichen und deutlichen Verlust der Fungizidwirksamkeit einhergehen, werden als qualitative, einstufige, diskrete, disruptive oder diskontinuierliche Resistenz bezeichnet. Diese Resistenz, die häufig durch Punktmutationen hervorgerufen wird, lässt sich durch resistente Pilzsubpopulationen charakterisieren, welche ihre erworbene Resistenz über viele Jahre hinweg behalten können (Brent & Hollomon, 2007a; Deising et al., 2008). Ein Beispiel hierfür bildet die G143A-Mutation im *CYTb*, dem Zielgen der Strobilurin-Fungizide. Die Mutation ist in mehreren phytopathogenen Pilzen beschrieben und sorgt für einen starken Wirksamkeitsverlust der QoI-Fungizide (Ma & Michailides, 2005; Deising et al., 2008; Sierotzki & Stammler, 2019).

Resistenzen, die sich allmählich und weniger plötzlich entwickeln und dessen Auftreten unterschiedliche Ausmaße annehmen kann, werden als quantitative, mehrstufige, kontinuierliche, direktionale oder progressive Resistenz bezeichnet. Hierbei kommt es zu einer allmählichen Verschiebung einer sensitiven Pilzpopulation hin zu einer angepassten Population, welche eine verringerte Fungizidempfindlichkeit aufweist (Shifting). Diese Form der Resistenz wird häufig durch mehrere Resistenzmechanismen verursacht, da eine einzige Mutation im Gegensatz zur qualitativen Resistenz nicht ausreicht, um einen signifikanten Verlust der Fungizidwirksamkeit zu bewirken (Brent & Hollomon, 2007a; Deising et al., 2008). Ein Beispiel für die quantitative Resistenz ist die schrittweise Anpassung der Populationen von *P. pachyrhizi* an DMI-Fungiziden, die durch mehrere Punktmutationen im Zielgen (*CYP51*) über mehrere Jahre hinweg verursacht wurde (Godoy, 2012; Schmitz et al., 2014; Godoy et al., 2016).

Das Risiko, dass phyto gene Pilze eine Resistenz gegenüber Fungiziden entwickeln, hängt von mehreren Faktoren ab. Hierzu zählt das Fungizid bzw. der Wirkmechanismus, die Biologie des Erregers sowie das Anbausystem oder die Anwendung der Fungizide. Ein erhöhtes Potential zur Entwicklung von Resistenzen bieten Erreger, welche einen kurzen Lebenszyklus, eine starke Sporenbildung und eine rasche, weite Verbreitung der Sporen aufweisen (Brent & Hollomon, 2007a). Das Risiko einer Resistenzentwicklung im Zusammenhang mit den Wirkstoffen wird in erster Linie durch die chemische Klasse und ihre Wirkungsweise im pilzlichen Stoffwechsel bestimmt. Nach FRAC (2019) wird das individuelle Risiko sowohl auf der Erreger- als auch auf der Wirkstoffseite für die Entwicklung von Resistenzen von niedrig bis hoch eingestuft und zusätzlich in Relation zueinander gesetzt. Neben der Genetik des Erregers und der Wirkung des Fungizids kann auch das von Region zu Region unterschiedliche Anbausystem einen Einfluss auf

die Entwicklung von Resistenzen haben. Hierbei wird zwischen Umweltfaktoren und einer Reihe von Faktoren unterschieden, die vom Landwirt individuell bestimmt werden. Zu letzteren zählen die Auswahl der Fungizide, die Häufigkeit und Dosierung der Anwendung, die Fruchtfolge, die Wahl der Sorte und deren Infektionsanfälligkeit sowie die Anwendung von Hygienemaßnahmen (Brent & Hollomon, 2007a).

1.4.1 Fungizidresistenzen gegenüber DMI

DMI werden seit den 1970er Jahren zur Bekämpfung zahlreicher phytopathogener Pilze an unterschiedlichen Wirtspflanzen und weltweit eingesetzt. Inzwischen existieren mehr als 30 Wirkstoffe, wobei die wichtigsten Fungizide innerhalb der DMI der Klasse der Azole (Imidazole, Triazole, Triazolinthione) zugeordnet werden können (Brent, 2012; FRAC, 2021a). Im Gegensatz zu anderen Single-Site-Inhibitoren ist ein vollständiger Wirkungsausfall im Feld, trotz ihrer weit verbreiteten Langzeitanwendung, seltener zu beobachten. Wenn eine Resistenz auftritt, ist sie oft begrenzt und die Kreuzresistenz zwischen Mitgliedern der Azolklasse teilweise unvollständig (Cools et al., 2013). Erste Sensitivitätsverluste wurden 5 bis 10 Jahre nach Markteinführung der Azole bspw. bei *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (Walmsley-Woodward et al., 1979) und *V. inaequalis* (Stanis & Jones, 1985) identifiziert. Hierbei wird von einer quantitativen Resistenzentwicklung gegenüber DMI gesprochen, welche sich schrittweise entwickelt (Kapitel 1.4).

Die auftretenden Resistenzen gegenüber Azolen werden hauptsächlich durch drei Mechanismen ausgelöst. Hierzu zählen Mutationen im *CYP51*-Gen, die zu einer verringerten Affinität des Proteins für Inhibitoren führen, eine Überexpression des *CYP51*-Gens und ein erhöhter Efflux durch die Überexpression von Genen, die für Membrantransporter codieren (Cools et al., 2013). Diese Mechanismen können teilweise, wie z. B. bei *Z. tritici*, auch kombiniert vorkommen und somit höhere Resistenzfaktoren hervorrufen (Leroux & Walker, 2011; Stammler & Semar, 2011; Cools & Fraaije, 2013; Huf, 2021). Die durch Mutationen hervorgerufene Veränderung des Zielenzym (CYP51) ist der bisher häufigste Resistenzmechanismus, der für zahlreiche Krankheitserreger nachgewiesen werden konnte (Stammler et al., 2009; Schmitz et al., 2014; Frenkel et al., 2015; Price et al., 2015; Wieczorek et al., 2015; Huf et al., 2018; Rehfus et al., 2019; Hoffmeister et al., 2021). Hier konnten Mutationen an homologen Positionen in verschiedenen Human- und Pflanzenpathogenen identifiziert werden. Hierzu zählt die Mutation Y136F, welche bspw. in *Z. tritici*, *Erysiphe necator*, *B. graminis* f. sp. *hordei/tritici* und *Mycosphaerella fijiensis* für eine Verringerung der Sensitivität gegenüber Azolen verantwortlich ist (Cools et al., 2013; Price et al., 2015). Des Weiteren wurde diese Mutation homolog in *V. inaequalis* unter Y133F

(Hoffmeister et al., 2021), in *P. pachyrhizi* unter Y131F (Schmitz et al., 2014) und in *Puccinia triticina* unter Y134F (Stammler et al., 2009) identifiziert. Häufig führt eine Mutation im *CYP51* lediglich zu geringeren Sensitivitätsverlusten, wohingegen eine Kombination aus mehreren Mutationen im *CYP51* häufig höhere Resistenzfaktoren hervorruft (Wyand & Brown, 2005; Rehus et al., 2019). Die hohe Anzahl der beschriebenen Substitutionen und auch die teilweise Akkumulation von Substitutionen innerhalb der Isolate spiegelt die Flexibilität der *CYP51*-Proteinstruktur wider, Veränderungen anzunehmen, ohne ihre enzymatische Funktion zu verlieren (Becher & Wirsel, 2012).

Neben den Punktmutationen ist die Überexpression des *CYP51* ein weiterer Resistenzmechanismus gegenüber DMI. Dieser Mechanismus wurde bei mehreren phytopathogenen Pilzen wie bspw. *Z. tritici* (Leroux & Walker, 2011), *V. inaequalis* (Schnabel & Jones, 2001), *P. triticina* (Stammler et al., 2009) ebenso wie bei *P. pachyrhizi* (Schmitz et al., 2014) identifiziert. Die Überexpression wird häufig mit Veränderungen (Insertionen) in der Promoterregion des *CYP51* in Verbindung gebracht (Schnabel & Jones, 2001; Cools et al., 2013). In den meisten Fällen verursacht die Überexpression eine geringere Resistenz als Mutationen im *CYP51*, aber dennoch trägt sie, insbesondere in Kombination mit Mutationen, kumulativ zu einer geringeren Sensitivität gegenüber DMI bei (Cools et al., 2013; Huf et al., 2020).

Ein weiterer bekannter Resistenzmechanismus phytopathogener Pilze gegenüber DMI sind überexprimierte Effluxtransporter, die DMI aktiv aus der Zelle schleusen können. Die genaue Bedeutung für Feldisolate ist aufgrund der Komplexität der beteiligten Prozesse bislang schwer zu definieren (De Waard et al., 2006). Die MDR ruft im Vergleich zu Resistenzmutationen im *CYP51* eher geringe Resistenzniveaus hervor. Bislang wurde der Resistenzmechanismus bei *B. cinerea* (Kretschmer et al., 2009), *Oculimacula yallundae* (Leroux et al., 2013) und *Z. tritici* (Stammler & Semar, 2011; Huf et al., 2020) identifiziert. Hierbei konnte lediglich für *B. cinerea* ein genetischer Mechanismus charakterisiert werden, der einen verstärkten Efflux für mehrere Fungizide bewirkt (Kretschmer et al., 2009; Cools et al., 2013; Omrane et al., 2015).

Wie bereits in Kapitel 1.3.2.1 ausgeführt, konnte bestätigt werden, dass die Anzahl der *CYP51*-Subtypen bei verschiedenen Pilzarten differiert. Proteinsequenzanalysen ergaben, dass die Anzahl der *CYP51*-Enzyme in unterschiedlichen Pathogenen, zwischen einem bis drei *CYP51* variieren kann (Becher et al., 2011; Becher & Wirsel, 2012). Bislang gibt es wenige Studien, die die Funktion der multiplen *CYP51* näher untersuchen und der Zusammenhang der *CYP51*-Anzahl und einer erhöhten Resistenzwirkung gegenüber DMI konnte nicht bestätigt werden. Allerdings könnte das Vorhandensein zusätzlicher *CYP51* einen Vorteil bei der Selektion durch DMI bieten, da alle Kompromisse, die mit Mutationen eines Paralogs verbunden sind, durch das

Vorhandensein eines unveränderten Wildtyp-CYP51 umgangen werden können (Cools et al., 2013).

1.4.2 Fungizidresistenzen von *P. pachyrhizi*

Das pathogenbedingte Risiko für die Entwicklung einer Fungizidresistenz wurde für *P. pachyrhizi* durch FRAC (2019) kürzlich von niedrig auf mittel angehoben. Hierbei hebt sich der Pilz in seinem Risiko zur Resistenzentwicklung von den meisten anderen Rostpilzen ab, welche häufig ein niedriges Risiko zur Resistenzentwicklung aufweisen (FRAC, 2019). Für alle drei Single-Site Fungizidklassen, welche hauptsächlich zur Bekämpfung des ASR eingesetzt werden (QoI, SDHI, DMI), konnten resistente Isolate im Feld nachgewiesen werden (Schmitz et al., 2014; Reis et al., 2015; Godoy et al., 2016; Klosowski et al., 2016a; Klosowski et al., 2016b; Simões et al., 2017; Müller et al., 2021).

Der Sensitivitätsverlust gegenüber QoI-Fungiziden (Strobilurine) bei *P. pachyrhizi* wurde in Brasilien erstmals im Jahr 2013 berichtet (Godoy & Meyer, 2020). Die entstandene Resistenz kann durch eine Punktmutation (F129L) im Zielenzym *CYTb* erklärt werden (Klosowski et al., 2016b). Es wurden bislang drei Punktmutationen (F129L, G143A und G137R) im *CYTb* nachgewiesen, welche zu einer geringeren Empfindlichkeit unterschiedlicher phytopathogenen Erreger gegenüber QoI-Fungiziden führen. Hierbei verursacht die Mutation G143A die höchsten Resistenzfaktoren (RF), wohingegen die Mutationen F129L und G137R niedrige bis mittlere RF hervorrufen. *P. pachyrhizi* sowie andere Krankheitserreger (z. B. *Alternaria solani*) entwickelten die vergleichsweise weniger effiziente Mutation (F129L), da diese Erreger eine Intronsequenz direkt hinter Codon 143 besitzen. Der Wechsel von G zu A an der Aminosäureposition 143 der *CYTb*-Sequenz (G143A Mutation) verhindert das Spleißen des Introns und ist für diese Erreger tödlich. Lediglich Pathogene welche dieses Intron nicht aufweisen, sind in der Lage die effiziente Punktmutation G143A und hierdurch eine starke Resistenz gegenüber Strobilurinen zu entwickeln (Grasso et al., 2006; Godoy, 2012). Im Gegensatz zu anderen Zielenzymen der Fungizide, wird das *CYTb* als Ziel von mitochondrialer und nicht von nuklearer DNA kodiert (Gisi et al., 2000). Somit haben die zwei Zellkerne von *P. pachyrhizi* keinen Einfluss auf die Mutationshäufigkeit der F129L Mutation. Eine Analyse von monouredinialen Isolaten von *P. pachyrhizi* konnte bestätigen, dass die Mutationshäufigkeit der F129L Mutation entweder 0 % oder 100 % beträgt. In einer Population in der bspw. 60 % F129L identifiziert werden, enthalten 40 % der Population das Wildtyp-Gen (F129) und 60 % das mutierte Gen (L129) (Klosowski et al., 2016b).

Anders verhält es sich bei der I86F Mutation, welche in Brasilien erstmals 2016 in Populationen von *P. pachyrhizi* detektiert wurde und für eine geringere Sensitivität gegenüber den SDHI-

Fungiziden verantwortlich ist (Simões et al., 2017; Godoy & Meyer, 2020; Müller et al., 2021). Der höchste nachgewiesene Prozentwert der Mutation I86F im *SDHc*-Gen beträgt bislang etwa 50 %. Es wird derzeit angenommen, dass ein Zellkern das Wildtyp *SDHc*-Gen (I86) und der zweite Zellkern das mutierte *SDHc*-Gen enthält (I86F) (Simões et al., 2017). 100 % I86F Mutation in *P. pachyrhizi* konnten bislang nicht nachgewiesen werden. Daraus wurde geschlossen, dass die Resistenzmutation I86F mit einem Fitnessnachteil verbunden ist und dass der Pilz die mit der Mutation verbundenen enzymatischen Nachteile durch das Vorhandensein eines unveränderten Wildtyp-*SDHc* umgehen kann (Simões et al., 2017). Monitoringstudien bestätigten, dass die Häufigkeit der I86F Mutation in Brasilien innerhalb von vier Jahren nach ihrem erstmaligen Auftreten deutlich zunahm. In der Saison 2015/16 trat die Mutation I86F in 7 % der analysierten Proben auf, in 2018/19 in 90 %. Die mutierten Populationen waren hierbei über alle Sojaanbauregionen in Brasilien verteilt (Mello et al., 2021; BASF interne Studien).

Erste Sensitivitätsverluste gegenüber DMI traten in Brasilien ca. fünf Jahre nach erstmaligem Einsatz ab der Saison 2007/08 auf (Godoy, 2012). Bis 2007 wurden aufgrund der hohen Wirksamkeit der DMI und der niedrigen Kosten der Azolverbindungen die Anwendung in aufeinanderfolgenden Spritzungen und unter kurativen Bedingungen empfohlen. Dieser auf die vorherrschende Pilzpopulation ausgeübte Selektionsdruck führte zu einer kontinuierlichen Sensitivitätsverschiebung hin zu einer angepassten Pilzpopulation (Godoy, 2012). Molekularbiologische Untersuchungen sensitiver und adaptierter Isolate konnten sechs Mutationen im *CYP51* sowie eine *CYP51*-Überexpression nachweisen, welche zu einer verringerten Sensitivität gegenüber DMI führen (Schmitz et al., 2014). Als Resistenzmutationen wurden hierbei die F120L, Y131F, Y131H, K142R, I145F und I475T identifiziert. Hierbei wurde festgestellt, dass einige Populationen Kombinationen aus zwei der genannten Mutationen vorzuweisen haben. Es wurden die Mutationskombinationen F120L + Y131H, Y131F + K142R und Y131F + I475T beschrieben, wobei nicht bestätigt werden konnte, ob diese Mutationen immer in Kombination oder auch einzeln auftreten können (Schmitz et al., 2014). Wie bereits bei der I86F Mutation im *SDHc*, wurde auch für die jeweiligen Mutationen im *CYP51* eine maximale Mutationshäufigkeit von 50 % detektiert. Daraus kann geschlossen werden, dass die Resistenzmutationen mit einem Fitnessnachteil verbunden sind und der Pilz durch das Vorhandensein von Wildtyp-*CYP51* diesen Nachteil umgehen kann. Eine weitere Besonderheit der ermittelten prozentualen Mutationswerte in Isolaten, deutet auf die Anwesenheit mehrerer *CYP51*-Allele in *P. pachyrhizi* hin. In Isolaten und Populationen wurden Prozentwerte von ca. 30 % ermittelt, welche nicht durch die diploiden Zellen des Pilzes belegt werden können (Schmitz, 2013). Aufgrund dessen wurde vermutet, dass, wie schon für andere phytopathogene Pilze

bestätigt (Kapitel 1.3.2.1) (Cools et al., 2013), auch in *P. pachyrhizi* mehrere *CYP51*-Allele vorhanden sein könnten, welche einen zusätzlichen Einfluss auf die Resistenzentwicklung haben. Die genaue Anzahl an *CYP51*-Kopien innerhalb eines Zellkerns konnte bislang nicht bestätigt werden (Schmitz, 2013; Schmitz et al., 2014). Neben den Punktmutationen wurde in einigen Isolaten eine drei- bis zehnfache Überexpression des *CYP51* nachgewiesen. Hierbei führte die Kombination aus Mutationen im *CYP51* und Überexpression des *CYP51* in einzelnen Isolaten nicht zwangsweise zu den größten Sensitivitätsverlusten der DMI. Aus diesem Grund wurde geschlossen, dass beide Resistenzmechanismen unabhängig voneinander agieren und eine Überexpression nicht mit bestimmten Mutationen oder Mutationskombinationen einhergeht (Schmitz, 2013).

1.5 Zielsetzung

Die Bewertung der Fungizidresistenzen und die Etablierung eines angepassten Resistenzmanagements ist ein elementarer Bestandteil des integrierten Pflanzenschutzes. Zur Entwicklung wirksamer Strategien müssen die einzelnen Resistenzmechanismen, welche zu einem Sensitivitätsverlust unterschiedlicher Wirkstoffe führen, untersucht und bewertet werden. Die Erzeugung von Einsporisolaten phytopathogener Pilze ist ein wichtiger Ansatz zur Charakterisierung der jeweiligen Resistenzmechanismen gegenüber Fungiziden. Die Isolierung von Einsporisolaten ist für Pilzarten mit saprophytischem Wachstum (z. B. *Z. tritici*) in den meisten Fällen problemlos durchzuführen und wird häufig verwendet, um bspw. den Einfluss von Resistenzmutationen zu bewerten. Da *P. pachyrhizi* ein biotropher Erreger ist, der zum Überleben lebendes Pflanzenmaterial benötigt, ist die Isolierung von Einsporisolaten schwieriger und zeitaufwändiger.

Ziel dieser Arbeit war es, Einsporisolate von *P. pachyrhizi* zu erzeugen, um den individuellen Einfluss einzelner Resistenzmechanismen (insbesondere Mutationen) auf den Sensitivitätsverlust gegenüber Demethylierungsinhibitoren zu bewerten. Das Augenmerk lag auf DMI, da die quantitative Resistenzentwicklung von *P. pachyrhizi* gegenüber dieser Wirkstoffklasse auf einem Zusammenspiel mehrerer Mechanismen beruht. Neben mehreren *CYP51*-Mutationen sowie unterschiedlichen Mutationskombinationen wurde zusätzlich eine Überexpression des *CYP51* ermittelt. Ferner besteht die Vermutung, dass mehrere *CYP51*-Allele existieren. Aufgrund der unterschiedlichen Mechanismen und des Vorhandenseins von zwei haploiden Zellkernen in jeder Uredospore des Pilzes werden Einsporisolate benötigt, um den Einfluss einzelner Resistenzmechanismen zu charakterisieren.

In der vorliegenden Arbeit wurden mithilfe der Einsporisolate von *P. pachyrhizi* folgende Punkte bearbeitet:

- *CYP51*-Sequenzanalysen von Einsporisolaten:
 - zur Identifizierung neuer Mutationen
 - zur Identifizierung unterschiedlicher *CYP51*-Allele und somit Rückschluss auf *CYP51*-Kopienanzahl in *P. pachyrhizi*
 - zum Nachweis, ob Mutationen verknüpft auf einem DNA-Strang auftreten und somit Rückschluss auf unterschiedliche *CYP51*-Haplotypen in *P. pachyrhizi*
- Untersuchung der *CYP51*-Überexpression in Einsporisolaten
- Auswirkungen der unterschiedlichen *CYP51*-Haplotypen in *P. pachyrhizi* auf die Sensitivität gegenüber DMI
- Analyse der Kreuzresistenz zwischen unterschiedlichen DMI

2 Material und Methoden

2.1 Technische Geräte

In Tabelle 1 sind die in der vorliegenden Studie verwendeten technischen Geräte aufgeführt. In Laboren üblicherweise verwendete Geräte wie Zentrifugen, Inkubatoren, Thermomixer, Pipetten, Kühl- und Gefrierschränke sind nicht enthalten.

Tabelle 1: Verwendete technische Ausrüstung und elektrische Geräte.

| Gerät | Hersteller |
|--|--|
| Airbrush, 0,3 mm Düse | Efbe Friedrich Boldt GmbH, Laatzen, Deutschland (DE) |
| Analysenwaage, Cubis® | Sartorius AG, Göttingen, DE |
| Blaulicht Transilluminator, UVT-28 L | Herolab GmbH Laborgeräte, Wiesloch, DE |
| Drigalskispatel | RSG Rostfrei-Schneidwerkzeuge GmbH, Solingen, DE |
| Dunkelhaube, RH-5 | Herolab GmbH Laborgeräte, Wiesloch, DE |
| Elektrophorese-Netzgerät, PowerPac™ | Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA |
| Exsikkator | Duran Group GmbH, Mainz, DE |
| Gel-Dokumentationssystem, EasyDoc plus | Herolab GmbH Laborgeräte, Wiesloch, DE |
| Gelelektrophorese, Peqlab, Perfect Blue Midi S | VWR International GmbH, Darmstadt, DE |
| Glaszerstäuber | VWR International GmbH, Darmstadt, DE |
| Inkubationshaube, CERTOMAT®H | Sartorius AG, Göttingen, DE |
| Inokulationstunnel | Schachtner, Ludwigsburg, DE |
| Kamera, Canon EOS 600D | Canon Deutschland GmbH, Krefeld, DE |
| Kleinschüttler, Vortex 4 Basic | IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, DE |
| Laminarbank, Herasafe KS | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA |
| Laminarbank, Holten LaminAir | Heto-Holten A/S, Allerød, Dänemark (DK) |
| Laminarbank, Holten PCR Mini | Heto-Holten A/S, Allerød, DK |
| Magnetrührer, IKA-RO 15 | IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, DE |
| Mikroplattenschüttler, Variomag | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA |

| Gerät | Hersteller |
|--|---|
| Mikroskop, Leica DMLB | Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE |
| Mikroskop, Rebel | Echo, San Diego, USA |
| Mikrowelle, R-941 INW | Sharp Electronics GmbH, Hamburg, DE |
| PCR Maschine, Mastercycler X50a | Eppendorf AG, Hamburg, DE |
| PCR Maschine, MJ Research PTC-200 | Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA |
| PCR Maschine, peqSTAR 96X Universal Gradient | VWR International GmbH, Darmstadt, DE |
| Pyrosequencer, PyroMark® Q96 | Qiagen, Hilden, DE |
| Qubit Flex Fluorometer, Invitrogen | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA |
| Real-Time PCR Thermocycler, q-Tower ³ | Analytik Jena AG, Jena, DE |
| Reinstwasser-Entnahmeeinheit, Q-POD® Milli-Q | Merck KGaA, Darmstadt, DE |
| Schwingmühle, Mixer Mill MM200 | Retsch GmbH, Haan, DE |
| Spektralphotometer, NanoDrop™ 2000 | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA |
| Spritzkabine, SK06 (1000 l/ha) | BASF SE, Limburgerhof, DE |
| Stereomikroskop | Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE |
| Tisch-Plattformschüttler, New Brunswick™ Innova® 2000 | Eppendorf AG, Hamburg, DE |
| Vakuumpumpe, KNF Laboport® | KNF Neuberger GmbH, Freiburg, DE |
| Vakuumregulator und -verteiler, Macherey-Nagel™ NucleoVac 96 | Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, DE |
| Vakuumstation, PyroMark® Q96 | Qiagen, Hilden, DE |
| Wasserbad, Typ WB10 | P-D Industriegesellschaft GmbH, Dresden, DE |

2.2 Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

Die zur Erstellung dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.

| Chemikalien/Verbrauchsmaterialien | Hersteller |
|--|--|
| Aceton | Bernd Kraft GmbH, Duisburg, DE |
| Ampicillin Natriumsalz | Sigma Aldrich, St. Louis, USA |
| Biozym LE Agarose | Biozym Biotech Trading GmbH, Wien, Österreich (AT) |
| D-(+)-Glucose | Sigma Aldrich, St. Louis, USA |
| Deionisiertes Wasser, Milli-Q | Merck KGaA, Darmstadt, DE |
| DEPC-behandeltes Wasser | Ambion Inc., Austin, USA |
| Difco™ Agar, granuliert | Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA |
| DNA/RNA-Farbstoff, peqGREEN | VWR, Darmstadt, DE |
| Ethanol | Sigma Aldrich, St. Louis, USA |
| Flächendesinfektionsmittel, Meliseptol® | B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE |
| Hefeextrakt | Merk KGaA, Darmstadt, DE |
| Kaliumchlorid | Merk KGaA, Darmstadt, DE |
| Kryoröhrchen | Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, DE |
| LB Bouillon, Miller | VWR, Darmstadt, DE |
| Low-Plate, 96-Well | Qiagen, Hilden, DE |
| Magnesiumchlorid | Merk KGaA, Darmstadt, DE |
| Magnesiumsulfat | Merk KGaA, Darmstadt, DE |
| Natriumchlorid | Sigma Aldrich, St. Louis, USA |
| Natriumhydroxid | Merk KGaA, Darmstadt, DE |
| O'GeneRuler, 1 kb DNA-Leiter | Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, DE |
| Orange DNA-Ladefarbstoff (6x) | Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, DE |
| Parafilm | Bemis Company, Inc., Neenah, USA |
| PCR-Gefäßstreifen, mit Deckeln (0,2 ml) | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA |
| PCR-Platte, 96-Well | 4titude® Ltd., Wotton, Vereinigtes Königreich (GB) |

| Chemikalien/Verbrauchsmaterialien | Hersteller |
|---|---|
| Petrischale, 94 mm | Greiner Bio-One International GmbH, Frickenhausen, DE |
| Pflanztopf, 8 cm | Pöppelmann GmbH und Co. KG, Lohe, DE |
| Pipettenspitzen, Combitips Advanced™ | Eppendorf AG, Hamburg, DE |
| Pipettenspitzen, TipOne® | Starlab GmbH, Ahrensburg, DE |
| Polypropylen Röhren | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE |
| PyroMark, Annealingpuffer | Qiagen, Hilden, DE |
| PyroMark, Bindepuffer | Qiagen, Hilden, DE |
| Reaktionsgefäße, Eppendorf Safe-Lock | Eppendorf AG, Hamburg, DE |
| RNase Away® | Molecular Bio-Products Inc., San Diego, USA |
| Schraubröhre, Falcon | Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, DE |
| Streptavidin Sepharose™, High Performance | GE Healthcare, Buckinghamshire, GB |
| Streptomycin-sulfat (Salz) | Sigma Aldrich, St. Louis, USA |
| Tris Base, Molekularbiologie | Merck KGaA, Darmstadt, DE |
| Trypton | Sigma Aldrich, St. Louis, USA |
| Tween® 80 | Merck KGaA, Darmstadt, DE |
| UltraPure™ TAE-Puffer, 50x | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA |
| Versiegelungsfolie, PCR-Platten | 4titude® Ltd., Wotton, GB |
| Zählkammer, C-Chip | NanoEnTek Inc., Seoul, Südkorea (KR) |

2.3 Bakterien, Enzyme und Kits

Die in der vorliegenden Studie verwendeten Bakterien, Enzyme und Kits sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Verwendete Bakterien, Enzyme und Kits.

| Bakterien, Enzyme und Kits | Hersteller |
|-----------------------------------|---|
| CloneJET PCR Klonierungskit | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA |

| Bakterien, Enzyme und Kits | Hersteller |
|---|---|
| DreamTaq™ Hot Start, 2x PCR Master Mix | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA |
| Kompetente Zellen, XL1 Blue | Agilent Technologies, Santa Clara, USA |
| NucleoSpin Plasmid | Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, DE |
| NucleoSpin® 96 Plant II | Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, DE |
| NucleoSpin® Plant II | Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, DE |
| On-Column DNase Digest Set | Sigma Aldrich, St. Louis, USA |
| Phusion™ Hot Start, High-Fidelity DNA Polymerase Master Mix | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA |
| PyroMark Gold Q96 Reagenzien | Qiagen, Hilden, DE |
| Qubit™ dsDNA HS Assay Kit | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA |
| Qubit™ RNA HS Assay Kit | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA |
| RNase A | Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, DE |
| RNeasy Plant Mini | Qiagen, Hilden, DE |
| Takyon™ No ROX Probe, 2x MasterMix dTTP | Eurogentec, Seraing, Belgien (BE) |
| Verso cDNA Kit | Thermo Scientific Inc, Waltham, USA |

2.4 Puffer, Lösungen, Medien

In Tabelle 4 werden die in dieser Studie verwendeten Puffer, Lösungen und Medien aufgelistet. Neben der Zusammensetzung gibt die Tabelle Auskunft über den Herstellungsprozess.

Tabelle 4: Verwendete Puffer, Lösungen und Medien.

| Puffer, Lösungen, Medien | Zusammensetzung | Anmerkung |
|---------------------------------|-----------------------------|---|
| 0,4 % Leitungswasseragar (LWA) | 4 g Agar | Wasser und Agar autoklavieren bei 121 °C und 2 bar für 15 min |
| | 30 mg Streptomycin Sulfat | |
| | 0,2 ml Kinetin | Abkühlen auf 43 °C |
| | 1000 ml Leitungswasser | Zugabe von Streptomycin und Kinetin |
| 70 % Ethanol | 700 ml Ethanol | |
| | 300 ml deionisiertes Wasser | |

Material und Methoden

| Puffer, Lösungen, Medien | Zusammensetzung | Anmerkung |
|------------------------------------|--|---|
| Inokulationsmedium, Tweenwasser | 0,02 g Tween 80 100 ml Leitungswasser, steril | |
| LB-Agar | 25 g LB Bouillon nach Miller 20 g Agar 1000 ml deionisiertes Wasser | Autoklavieren bei 121 °C und 2 bar für 15 min Abkühlen auf 60 °C Zugabe von 100 mg/l Ampicillin |
| LB-Medium | 25 g LB Bouillon nach Miller 1000 ml deionisiertes Wasser | Autoklavieren bei 121 °C und 2 bar für 15 min Abkühlen auf 60 °C Zugabe von 100 mg/l Ampicillin |
| Natriumhydroxid (2 M) | 80 g/L NaOH 1000 ml deionisiertes Wasser | Verdünnung der 10x Lösung um 1:10 mit deionisiertem Wasser auf eine 1x Endkonzentration (0,2 M) |
| SOC-Medium | 20 g Trypton 5 g Hefeextrakt 0,58 g NaCl 0,18 g KCl 0,95 g MgCl ₂ 1,2 g MgSO ₄ 3,6 g Glukose 1000 ml deionisiertes Wasser | pH 7,0 einstellen mit NaOH Autoklavieren bei 121 °C und 2 bar für 15 min |
| TAE-Puffer (1x) | UltraPure™ TAE-Puffer (50x) | Verdünnung der Stocklösung auf 1x Arbeitslösung mit demineralisiertem Wasser (VE) |
| Waschpuffer (10x) | 12,1 g Tris Base 1000 ml deionisiertes Wasser | pH 7,6 einstellen mit 4 M Eisessig Verdünnung der Stocklösung auf 1x Arbeitslösung mit deionisiertem Wasser |

2.5 Oligonukleotide

In Tabelle 5 sind die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide gelistet, die als Primer für PCR-Reaktionen und zur Sanger-Sequenzierung verwendet wurden. Neben der Sequenz ist die Annealingtemperatur (T_m), das Zielgen und die spezifische Verwendung angegeben. Die

Oligonukleotide wurden intern bei der BASF SE synthetisiert und die Sonde Pp-sdhc-86 wurde bei Eurogentec hergestellt.

Tabelle 5: Verwendete Oligonukleotide. Die Sequenz ist in 5' → 3' Orientierung angegeben und sowohl die Annealingtemperatur (T_m), das Zielgen als auch der Verwendungszweck wurden aufgelistet.

| Bezeichnung | Sequenz (5' → 3') | T_m (°C) | Gen (Mutation) | Anmerkung |
|----------------------------|---|---------------------|---------------------------|--|
| KES 1098 (fw) ¹ | ATGTCTTCCAGCGTTATA ATCG | 55 (Phusion: 65) | <i>CYP51</i> | Amplifikation |
| KES 1133 (rv) ¹ | TCGAGGGAAAGGAGTTG ATC | 57 (Phusion: 63) | <i>CYP51</i> | |
| KES 1595 (fw) ¹ | AGGAAGCATGGAAATGT GTTTAC | 55 | <i>CYP51</i> | PCR Primer für Pyrosequenzierung (F120L) |
| KES 1596 (rv) ¹ | 5'Biotin- TCCTTACCAAAGACAGG TGTAGC | 59 | <i>CYP51</i> | |
| KES 1594 (fw) ¹ | GAAGAAGCTTACACCCA T | 51 | <i>CYP51</i> (F120L) | Sequenzierungsprimer |
| KES 2544 (fw) | TTTTAACTTTTTGATGGC CTGAA | 50 | <i>CYP51</i> | PCR Primer für Pyrosequenzierung (V130A) |
| KES 2545 (rv) | 5'Biotin- GCATTAGGATCGAGTTG GGTACA | 60 | <i>CYP51</i> | |
| KES 2546 (fw) | TGTCTTTGGTAAGGATGT AG | 52 | <i>CYP51</i> (V130A) | Sequenzierungsprimer |
| KES 1493 (rv) ¹ | CTGCTGCATTAGGATCG AGTTG | 59 | <i>CYP51</i> | PCR Primer für Pyrosequenzierung (Y131F/H) |
| KES 1496 (fw) ¹ | 5'Biotin- GTTTTAACTTTTTGATGG CCTGAA | 53 | <i>CYP51</i> | |
| KES 1494 (rv) ¹ | CGAGTTGGGTACATCR | 50 | <i>CYP51</i> (Y131F/H) | Sequenzierungsprimer |
| KES 1755 (fw) | GCAGCGGAGCCAATTCG | 60 | <i>CYP51</i> | PCR Primer für Pyrosequenzierung (I475T) |
| KES 1757 (rv) | 5'Biotin- CCAACTGGATGTACGCA AACTG | 59 | <i>CYP51</i> | |
| KES 1764 (fw) | CTGGTCGACATCGGT | 53 | <i>CYP51</i> (I475T) | Sequenzierungsprimer |

Material und Methoden

| Bezeichnung | Sequenz (5' → 3') | T _m (°C) | Gen (Mutation) | Anmerkung |
|----------------------------|--|---------------------|---------------------------|---|
| KES 2373 (fw) | 5' Biotin- ACACCTGTCTTTGGTAAG GATGTAGTCTA | 61 | <i>CYP51</i> | PCR Primer für Pyrosequenzierung (K142R) |
| KES 2374 (rv) | TCCCCACATATTTCTTAA ATTTCTCAGTA | 55 | <i>CYP51</i> | |
| KES 2375 (rv) | CAGCCTTGATGAACTTT | 47 | <i>CYP51</i> (K142R) | Sequenzierungsprimer |
| KES 2370 (fw) | ATGTACCCAACTCGATC CTAATGC | 59 | <i>CYP51</i> | PCR Primer für Pyrosequenzierung (I145F/V, F154Y) |
| KES 2371 (rv) | 5' Biotin- GAATAAATGATCTTCCAG GTAACCTGTTGT | 57 | <i>CYP51</i> | |
| KES 2372 (fw) | CTAATGCAGCAGAAAAA G | 48 | <i>CYP51</i> (I145F/V) | Sequenzierungsprimer |
| KES 2540 (fw) | GCTGGCCTTACTACTGA | 53 | <i>CYP51</i> (F154Y) | Sequenzierungsprimer |
| KES 498 (fw) ¹ | GGACACTAGTATGGGCG ATTG | 59 | <i>CYTb</i> | PCR Primer für Pyrosequenzierung (F129L) |
| KES 499 (rv) ¹ | 5' Biotin- CATGTGAGGCGGTCTCA TT | 57 | <i>CYTb</i> | |
| KES 500 (fw) ¹ | TTGTAATAATAGCGACAG C | 49 | <i>CYTb</i> (F129L) | Sequenzierungsprimer |
| KES 2153 (rv) ² | AAACCACCGTAGATCAC TGATGT | 57 | <i>SDHc</i> | |
| KES 2155 (fw) ² | AACAGCTAACTTGGTATT CCAGGA | 57 | <i>SDHc</i> (I86) | qPCR Primer (I86F) |
| KES 2156 (fw) ² | AACAGCTAACTTGGTATT CCAGGT | 57 | <i>SDHc</i> (86F) | |
| Pp-sdhc-86 ² | 5' FAM- AACGGGTTGCGCTCTTA CAGGAGGTATTC | 69 | <i>SDHc</i> | Sonde qPCR (I86F) |
| KES 1216 (fw) ¹ | TGATAGACTGAGGCGTG AACAGG | 62 | <i>CYP51</i> | Genexpression (qPCR) |
| KES 1178 (rv) ¹ | AATAGAGGTGTTTGGAG TCGATCGTAATC | 61 | <i>CYP51</i> | |

| Bezeichnung | Sequenz (5' → 3') | T _m (°C) | Gen (Mutation) | Anmerkung |
|----------------------------|--------------------------------|---------------------|------------------|--------------------------------------|
| KES 1416 (fw) ¹ | ACAGTTTCACCACAACC GCC | 59 | <i>AKTIN</i> | Genexpression (qPCR) |
| KES 1462 (rv) ¹ | TGACCGTCGGGAAGTTC G | 60 | <i>AKTIN</i> | |
| KES 1465 (fw) ¹ | GGTATGGCTTTCCGAGT TCCA | 59 | <i>GAPDH</i> | Genexpression (qPCR) |
| KES 1466 (rv) ¹ | TCAGTTGATACCAAATCA TCCTCAG | 57 | <i>GAPDH</i> | |
| KES 1463 (fw) ¹ | CTGCGAACAACACTATGCT CGTG | 59 | <i>α-TUBULIN</i> | Genexpression (qPCR) |
| KES 1464 (rv) ¹ | CACGAAGAAGCCTTGGA GTCC | 62 | <i>α-TUBULIN</i> | |
| pJet1.2 (fw) ³ | CCGACTCACTATAGGGA GAGCGGC | 74 | | Sequenzierungsprimer (Klonierung) |
| pJet1.2 (rv) ³ | CAAGGAACATCGATTTTC CATGGCAG | 68 | | |

¹ Schmitz (2013).

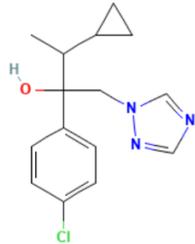
² Simões et al. (2017)

³ Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA.

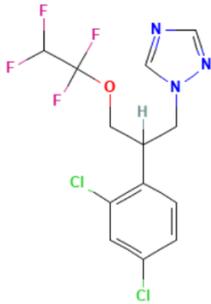
2.6 Fungizide

Zur Durchführung der Sensitivitätsstudien wurden handelsübliche Wirkstoffformulierungen aus der Klasse der DMI verwendet. Diese sind in Tabelle 6 gelistet.

Tabelle 6: Verwendete Fungizide. Es wurden ausschließlich Fungizide der Klasse der Demethylierungsinhibitoren (DMI) getestet.

| Wirkstoff (Handelsname) | Unternehmen (Markteinführung) | Strukturformel ¹ |
|----------------------------|--|---|
| Cyproconazol (Alto®) | Syngenta Agro GmbH, Basel, Schweiz (CH) (1989) |  |

| Wirkstoff (Handelsname) | Unternehmen (Markteinführung) | Strukturformel ¹ |
|------------------------------|---|-----------------------------|
| Difenoconazol (Score®) | Syngenta Agro GmbH, Basel, CH (2011) | |
| Epoxiconazol (Opus®) | BASF SE, Ludwigshafen, DE (1993) | |
| Metconazol (Caramba®) | BASF SE, Ludwigshafen, DE (1994) | |
| Prothioconazol (Proline®) | Bayer Crop Science AG, Monheim, DE (2004) | |
| Tebuconazol (Folicur®) | Bayer Crop Science AG, Monheim, DE (1988) | |

| Wirkstoff (Handelsname) | Unternehmen (Markteinführung) | Strukturformel ¹ |
|----------------------------|----------------------------------|---|
| Tetraconazol (Eminent®) | Isagro, Mailand, IT (2008) |  |

¹PubChem (2022).

2.7 Versuchsorganismen

Sojabohnen (*Glycine max* (L.) MERR.) der Sorte ES Mentor (Saatbau Linz, Leonding, AT) wurden sowohl für die Sensitivitätsversuche als auch für die Vermehrung und Haltung der Isolate von *P. pachyrhizi* verwendet.

Weiterhin wurden Einsporisolate des obligat biotrophen Basidiomyceten *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd. isoliert, der als Erreger des Asiatischen Sojabohnenrostes gilt. Die Grundlage für die Isolierung dieser Einsporisolate bildeten infizierte Blattproben aus Südamerika (u. a. Paraguay) aus dem Jahr 2018. Die auf den Blattproben vorhandenen Pilzpopulationen hatten bereits eine Evolution in der Fungizidanpassung gegenüber SDHI, QoI und insbesondere DMI durchlaufen, sodass mit hoher Wahrscheinlichkeit hoch angepasste Einsporisolate mit entsprechenden Resistenzmutationen gewonnen werden konnten. Darüber hinaus dienten 1400 mit *P. pachyrhizi* befallene Blattproben von verschiedenen Standorten in Südamerika von 2017-2021 als Basis für ein Monitoringprogramm zur Bestimmung des Vorkommens unterschiedlicher *CYP51*-Haplotypen von *P. pachyrhizi*.

2.8 Kultivierung der Sojapflanzen

Die Samen der Sojasorte ES Mentor wurden 7 Tage zur Auskeimung bei 22 °C und 14 h Belichtungszeit in einer Aussaatkiste gelagert. Im Anschluss wurde je ein Keimling in einen Pflanztopf gesetzt und für weitere 7 Tagen bei 22 °C im Gewächshaus kultiviert. Nach vollständiger Entfaltung des ersten Laubblattpaares (BBCH 11), wurden die Pflanzen sowohl für die Sensitivitätstests als auch zur Isolatvermehrung verwendet.

2.9 Herstellung und Vermehrung von Einsporisolaten von *P. pachyrhizi*

Die auf infizierten, getrockneten Blättern befindlichen Sporen von *P. pachyrhizi* wurden mithilfe einer Pipette in einen Tweenwassertropfen (0,03 % und 20 µl) überführt, indem der Tropfen auf einer Uredie auf- und abpipettiert wurde. Im Anschluss wurde der Tropfen mit den darin enthaltenen Sporen auf zwei Wochen alte, unbehandelte Sojablätter überführt (Anzucht Sojapflanzen, Kapitel 2.8). Dieser Vorgang erfolgte mithilfe eines Stereomikroskops und wurde so oft wiederholt, bis sich mehrere Tropfen auf der abaxialen Seite der Blätter, die auf 0,4 %igen Wasseragar mit 30 mg/l Streptomycin und 0,0002 ml/l Kinetinlösung lagen, befanden. Nach diesem Schritt wurden die inokulierten Blätter ca. 24 h in einer feuchten Box gelagert, bevor sie im Anschluss für 14 Tage in einem Klimaschrank (22 °C) mit 12/12 h Licht/Dunkelheit gelagert wurden. Die Tröpfchenübertragung wurde wiederholt, bis die Sporenbildung stark genug war (Abbildung 4), um eine Sporensuspension (ca. 1×10^4 Sporen/ml) für die Isolierung der Einsporisolate von *P. pachyrhizi* zu erzeugen.

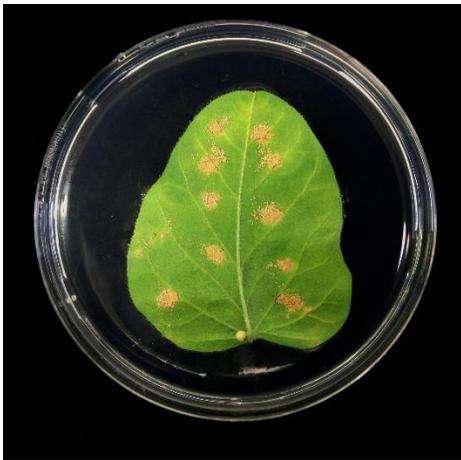


Abbildung 4: Sojablatt in Petrischale auf 0,4 %igen Wasseragar mit punktuellen Infektionsstellen von *Phakopsora pachyrhizi*. Die vorhandene Infektion wurde durch Tröpfchenübertragung generiert und ist somit nicht homogen, sondern punktuell. Diese Art der Übertragung wurde verwendet, wenn wenig Sporen zur Verfügung standen.

Für die Gewinnung der Einsporisolate wurde zunächst eine Sporensuspension aus den zuvor erzeugten Populationen hergestellt. Hierzu wurde vorerst eine geöffnete Petrischale mit einem infizierten Blatt (Abbildung 4) auf ein DIN-A4-Blatt gestülpt und durch leichtes Klopfen auf die Rückseite der Petrischale wurden die Sporen abgelöst und fielen auf das DIN-A4-Blatt. Die Sporen wurden im Anschluss in ein Reaktionsgefäß gegeben, mit Wasser versetzt und mit einem Drigalskispatel auf mehrere Wasseragarplatten verteilt (0,5 ml Suspension/Platte). Nach 2–4 h waren die ersten Sporen gekeimt und konnten auf Sojabohnenblätter übertragen werden. Mit Hilfe eines Stereomikroskops und einer Inokulationsnadel wurde eine einzelne, gekeimte Spore aus

dem Wasseragar entnommen und in einen 10 µl Tweenwassertropfen gegeben, welcher zuvor auf die abaxiale Oberfläche eines Sojabohnenblattes pipettiert wurde. Um Kontaminationen oder Vermischungen der entstehenden Einsporisolate zu vermeiden, wurde jeweils nur eine Spore pro Blatt eingesetzt. Die Inkubation erfolgte wie oben beschrieben. Nach zwei Wochen war ein Uredium unter dem Stereomikroskop erkennbar, welches die Entstehung eines Einsporisolates repräsentiert. Die Übertragung auf ein neues Sojabohnenblatt konnte mit einer Pipette vorgenommen werden. Hierfür wurde, wie bereits zuvor im Kapitel beschrieben, ein Tropfen Tweenwasser (10–20 µl) auf den Uredien auf- und abpipettiert und auf einem neuen Blatt auf mehrere Stellen verteilt. Dieser Vorgang wurde wiederholt, bis alle erkennbaren Sporen der einzelnen Uredie aufgenommen werden konnten. Zusätzlich wurde das erhaltene Einsporisolat mit der Abkürzung MS1 (monosporic isolat 1) vor der spezifischen Isolatnummer gekennzeichnet. Wenn aus einer Population mehrere Einsporisolate generiert werden konnten, wurde die Nummer entsprechend MS2-, MS3- usw. erweitert (z. B. MS1-259/18P, MS2-259/18P...).

Nach mehreren Transferzyklen konnten ausreichend Sporen erzeugt werden, um die Inokulationsmethode anzupassen und so eine homogene Infektion zu erzeugen. Zu diesem Zweck wurden vorerst Sojabohnenblätter auf einer Petrischale mit Hilfe eines Glaszerstäuber mit sterilem Wasser leicht angefeuchtet. Anschließend wurde eine geöffnete Platte mit angefeuchtetem Blatt unter einen Inokulationstunnel gestellt, der bis auf eine kleine Öffnung an der Oberseite vollständig geschlossen war (Abbildung 5, A). Die Sporen, der 14 Tage zuvor mit der Tröpfchenmethode inokulierten Blättern (Abbildung 4), wurden mit einer M4-Repetierpipette (5 ml Spitze) aufgesammelt, indem von einer sporulierenden Uredie zur anderen die Pipette langsam nach oben gezogen und somit die Sporen aufgesaugt wurden. Anschließend wurde die Pipettenspitze in die kleine Öffnung des Inokulationstunnels eingeführt und mit einer ruckartigen Bewegung wurden die Sporen freigesetzt und verteilten sich gleichmäßig auf dem angefeuchteten Sojablatt (Abbildung 5, B). Mit dieser Methode konnte eine gleichmäßige Infektion erzeugt und mögliche Kontaminationen durch die selektive Aufnahme der Sporen reduziert werden. Im Vergleich zur Tröpfchenmethode wurden allerdings mehr Sporen benötigt, um eine flächige Infektion zu erhalten. Die Übertragung der Sporen erfolgte in einem zweiwöchigen Rhythmus.

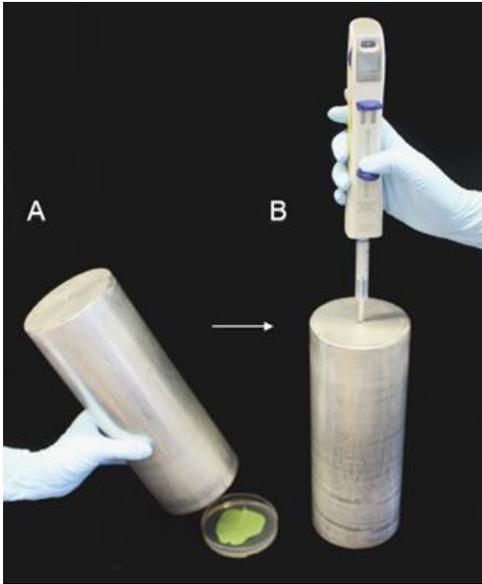


Abbildung 5: Übertragung der Sporen von *Phakopsora pachyrhizi* mit Hilfe eines Inokulationstunnels. Nachdem ein angefeuchtetes Sojabohnenblatt unter den Turm gelegt wurde (A), wurden die zuvor gesammelten Sporen mit einer ruckartigen Bewegung aus der Pipette freigesetzt und somit gleichmäßig auf dem Blatt verteilt (B). Im Gegensatz zur Tröpfchenübertragung wurde ein homogenes Befallsbild generiert und zusätzlich durch die selektierte Aufnahme der Sporen durch die Pipette Kontaminationen geringgehalten.

2.9.1 Haltung der Isolate von *P. pachyrhizi*

Wie bereits durch Schmitz und Stammler (2012) beschrieben, besteht die Möglichkeit einer längerfristigen Lagerung der Sporen von *P. pachyrhizi*. Hierzu wurden die gewonnenen Sporen der Einsporisolate von den infizierten Blättern abgeklopft (Kapitel 2.9) und in ein Kryoröhrchen gegeben (max. 0,5 ml Sporen/Kryoröhrchen). Im Anschluss wurden sie für 24 h in einem Exsikkator dehydriert, bevor sie bei -80 °C eingefroren werden konnten. Für die Reaktivierung wurden die Sporen in Tweenwasser (0,03 %) überführt und mit einer Airbrush (0,3 mm Düse) auf die abaxiale Seite der Sojablätter gesprüht, die wie bereits beschrieben, auf 0,4 %igen Wasseragar mit 30 mg/l Streptomycin und 0,0002 ml/l Kinetinlösung aufgelegt wurden. Aus eigenen Untersuchungen ging hervor, dass die Sporen ihre Infektiosität für mindestens zwei Jahre behalten. Somit ist diese Methode für die längerfristige Lagerung der Einsporisolate geeignet und neue Fragestellungen können jederzeit untersucht werden, ohne eine durchgehende Haltung der Isolate gewährleisten zu müssen.

2.10 Molekularbiologische Methoden zur genetischen Charakterisierung von *P. pachyrhizi*

2.10.1 Isolierung der genomischen DNA

Für die Extraktion der gDNA wurden die durch *P. pachyrhizi* verursachten Befallsstellen (ca. 15 Stück) aus den Sojablättern herausgeschnitten und in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben. Nach der Zugabe eines sterilen Metallkügelchens (3 mm) wurden die Proben für 30 min auf Trockeneis gefroren, bevor sie im Anschluss mithilfe einer Schwingmühle für 1 min bei 20 Hz homogenisiert wurden. Die DNA-Extraktion erfolgte, je nach Probenanzahl, mit dem NucleoSpin® Plant II Kit (Einzelsäulenextraktion) oder dem NucleoSpin® 96 Plant II Kit (96-Well Vakuum Extraktion) gemäß dem Herstellerprotokoll für die Extraktion aus Pflanzenmaterial unter Verwendung des Lysepuffers PL1. Falls erforderlich, wurde die Konzentrationsmessung der DNA mit dem Qubit Flex Fluorometer unter Anwendung des Qubit™ dsDNA HS Assay Kits gemäß der Herstellerangaben durchgeführt. Die Lagerung der DNA erfolgte kurzfristig bei 4 °C und langfristig bei -20 °C.

2.10.2 Isolierung der RNA

Die durch *P. pachyrhizi* verursachten Befallsstellen wurden aus den Sojablättern herausgeschnitten und in ein steriles 2 ml Reaktionsgefäß mit Metallkügelchen (3 mm) gegeben, welches unverzüglich auf Trockeneis gestellt wurde. Nach 30 min auf Trockeneis wurden die Proben mithilfe einer Schwingmühle für 1 min bei 20 Hz homogenisiert. Zusätzlich wurden vor Beginn der Extraktion alle Arbeitsflächen und Pipetten mit dem RNase Away® Spray gereinigt. Im Anschluss wurde die RNA gemäß den Herstellerangaben mit dem RNeasy Plant Mini, inklusive DNase-Verdau mit dem On-Column DNase Digest Set, extrahiert. Die Konzentrationsmessung der RNA erfolgte mit dem Qubit Flex Fluorometer unter Anwendung des Qubit™ RNA HS Assay Kits gemäß der Herstellerangaben. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -20 °C.

Für die Extraktion der RNA wurden in dieser Arbeit die Befallsstellen verwendet, die nach einem Sensitivitätstest in den jeweils höchsten Konzentrationen vorhanden waren. Für den Test wurden die in Tabelle 6 gelisteten Fungizide in sieben Konzentrationen (0/0,03/1/3/10/30/100 mg/l) appliziert und mit den Einsporisolaten inokuliert. Der Test wurde in Form eines Detached Leaf Tests (DLTs) wie in Kapitel 2.11 beschrieben durchgeführt. Je Wirkstoff und Isolat wurden die Befallsstellen aus 0 mg/l (Kontrolle) und der höchstmöglichen Konzentration, in welcher noch ausreichend Befall für die Extraktion vorhanden war, verwendet. Je nach Wirksamkeit des Wirkstoffs und Isolat konnte dies bedeuten, dass die infizierten Bereiche aus unterschiedlichen Konzentrationen herausgeschnitten wurden. Durch dieses Vorgehen wurde gewährleistet, dass

die für die Analyse verwendeten Sporen diejenigen waren, die den höchsten Selektionsdruck überwunden hatten.

2.10.2.1 Reverse Transkription der RNA in cDNA

Die Reverse Transkription der RNA in cDNA wurde mit dem Verso cDNA Kit nach Herstellerangaben durchgeführt. Als Template dienten jeweils 50 ng RNA. Die kurzzeitige Lagerung erfolgte bei 4 °C, die langfristige Lagerung bei -20 °C.

2.10.3 Polymerasenkettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation gewünschter DNA-Sequenzen wurde eine Polymerasenkettenreaktion (PCR) durchgeführt. Die Bestandteile einer PCR-Reaktion mit einem Endvolumen von 25 µl sind in Tabelle 7 aufgelistet und die pathogenspezifischen Oligonukleotide (Primer) sind in Tabelle 5 genannt. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurde der PCR-Ansatz unter einer Laminarbank (Holten PCR Mini) angesetzt und eine Probe mit DEPC-Wasser anstelle des DNA-Template als Negativkontrolle (NTC) mitgeführt. Nach dem Ansatz wurden die Reaktionsansätze mit einer Tischzentrifuge abzentrifugiert.

Tabelle 7: Bestandteile einer PCR-Reaktion.

| Bestandteile | Volumen (µl) |
|---------------------------------|--------------|
| 2x Mastermix (DreamTaq/Phusion) | 12,50 |
| DEPC-H ₂ O | 7,50 |
| Primer (fw) (10 pmol/µl) | 1,25 |
| Primer (rv) (10 pmol/µl) | 1,25 |
| DNA | 2,50 |

Der schematische Ablauf einer PCR-Reaktion zur Amplifikation von DNA-Fragmenten ist Tabelle 8 zu entnehmen. Je nach Zweck des Experiments wurden unterschiedliche Polymerasen verwendet. Die Phusion™ HighFidelity-Polymerase, welche zusätzlich eine Proofreading-Aktivität aufweist, wurde zur Amplifikation des *CYP51* verwendet, wohingegen die DreamTaq™ Hot Start Taq-Polymerase für die Amplifikation von Inserts in *CYP51* und *CYTb*, unter anderem für die Pyrosequenzierung, verwendet wurde.

Tabelle 8: Schematischer Ablauf einer PCR-Reaktion. Die Pyrosequenzierung wurde mit DreamTaq™ Hot Start Polymerase durchgeführt und die Genamplifikation mit der Phusion™ Hot Start High-Fidelity Polymerase. Annealing Temperatur und Elongationszeit wurden je nach Oligonukleotidpaar und gewünschtem DNA-Fragment angepasst.

| Funktion | Temperatur (°C) | Zeit (s) | Zyklen (n) |
|------------------------|------------------|---------------------|------------|
| | DreamTaq/Phusion | DreamTaq/Phusion | |
| Initiale Denaturierung | 95/98 | 240/15 | 1 |
| Denaturierung | 95/98 | 15/5 | |
| Annealing | 50–72 | 30/5 | 35–39 |
| Elongation | 72 | 60 per kb/15 per kb | |
| Finale Elongation | 72 | 300 | 1 |
| Kühlung | 8 | bis zur Entnahme | 1 |

2.10.4 Quantitative Real-time PCR (qPCR)

Die Methode der qPCR ermöglicht die Quantifizierung von PCR-Produkten in Echtzeit. In dieser Forschung wurde diese Methode sowohl zum Nachweis der I86F Mutation im *SDHc* als auch zu Expressionsanalysen des *CYP51* von *P. pachyrhizi* verwendet. Alle qPCR-Reaktionen wurden an einer Laminarbank, bei Raumtemperatur und unter reduzierten Lichtbedingungen durchgeführt. Die Lichtreduzierung erfolgte sowohl aufgrund der lichtempfindlichen Sonde als auch des lichtempfindlichen SYBR® Green Farbstoffs im Mastermix, welcher für die Expressionsmessung verwendet wurde.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine allelspezifische qPCR durchgeführt, um die relative Häufigkeit der Mutation I86F im *SDHc* Gen der Einsporisolate von *P. pachyrhizi* zu bestimmen. Die Bestandteile eines 25 µl Reaktionsansatzes mit TaqMan-Sonde sind in Tabelle 9 (Quantitativer Nachweis der I86F) aufgelistet. Für den Reaktionsansatz zur Quantifizierung des sensitiven Allels (I86) wurden die Oligonukleotide KES 2153 und KES 2155 verwendet, wohingegen die Oligonukleotide KES 2153 und KES 2156 im Reaktionsansatz zur Quantifizierung des resistenten Allels (86F) genutzt wurde (Oligonukleotide, Tabelle 5) (Simões et al., 2017).

Jeder Ansatz wurde als Duplikat mitgeführt und je qPCR-Durchlauf wurden sowohl eine NTC, eine Positivkontrolle (100 % Mutation), eine Negativkontrolle (0 % Mutation) und eine 50:50 Kontrolle (50 % Mutation bzw. keine Mutation) verwendet. Alle qPCR-Läufe wurden mit dem q-Tower³ von Qiagen mit dem jeweiligen schematischen Ablauf (Tabelle 10, Quantitativer Nachweis der I86F)

durchgeführt. Der sogenannte „threshold cycle“ (Ct) beschreibt den qPCR-Zyklus, ab dem die Fluoreszenz den Schwellenwert des Hintergrundrauschens überschreitet. Die Fluoreszenz wurde am Ende der Elongation nach jedem Zyklus gemessen und die Ct-Werte mit der Software qPCRsoft® 3.4 bestimmt. Die Berechnung der Häufigkeiten des resistenten und sensitiven Allels erfolgte nach Germer et al. (2000):

Häufigkeit Allel₁ = $1 / (2^{\Delta Ct} + 1)$, $\Delta Ct = (Ct \text{ Allel}_1 - \text{spezifische PCR}) - (Ct \text{ Allel}_2 - \text{spezifische PCR})$

Tabelle 9: Bestandteile einer qPCR-Reaktion. Es wird sowohl der Reaktionsansatz mit dem Takyon™ No ROX Probe MasterMix dTTP (2x) mit einer TaqMan Sonde als auch der Reaktionsansatz mit dem Takyon™ No ROX SYBR MasterMix dTTP (2x) aufgezeigt.

| Bestandteile | Volumen (µl) in 25 µl Reaktionsansatz | Anmerkung |
|--|---------------------------------------|--|
| Takyon™ No ROX Probe MasterMix dTTP (2x) | 12,50 | |
| DEPC-H ₂ O | 6,75 | |
| Primer (fw) (10 pmol/µl) (KES 2155 + 2156) | 1,50 | Quantitativer Nachweis der I86F (SDHc) |
| Primer (rv) (10 pmol/µl) (KES 2153) | 1,50 | |
| TaqMan-Sonde (10 pmol/µl) (Pp-sdhc-86) | 0,25 | |
| DNA-Template | 2,50 | |
| Takyon™ No ROX SYBR MasterMix dTTP (2x) | 12,50 | |
| DEPC-H ₂ O | 7,50 | |
| Primer (fw) (10 pmol/µl) | 1,25 | Expressionsmessung |
| Primer (rv) (10 pmol/µl) | 1,25 | |
| cDNA-Template | 2,50 | |

Tabelle 10: qPCR-Programme.

| Funktion | Temperatur (°C) | Zeit (s) | Zyklen (n) | Anmerkung |
|------------------------|-----------------|----------|------------|--|
| Initiale Denaturierung | 95 | 300 | 1 | Quantitativer Nachweis der I86F (SDHc) |
| Denaturierung | 95 | 10 | 40 | |
| Annealing & Elongation | 60 | 45 | | |
| Initiale Denaturierung | 95 | 300 | 1 | Expressionsmessung |
| Denaturierung | 95 | 15 | | |
| Annealing | 60 | 20 | 40 | |
| Elongation | 72 | 20 | | |
| | Schmelzkurve | 15 | | |

2.10.4.1 Expressionsmessung des *CYP51*

Durch Schmitz et al. (2014) konnte bestätigt werden, dass neben den SNPs eine Überexpression des *CYP51* in *P. pachyrhizi* vorliegen kann. Diese Forschung diente als Grundlage, um die Expressionsmessungen des *CYP51* mit den in dieser Arbeit gewonnenen Einsporisolate von *P. pachyrhizi* durchzuführen. Hierbei wurde sowohl ermittelt, ob die Einsporisolate eine Überexpression des *CYP51* aufzeigen und zum anderen, ob eine DMI-Applikation eine direkte Auswirkung auf die relative Expression des *CYP51* der jeweiligen Isolate hat.

Für die Expressionsanalysen wurde die cDNA der Einsporisolate von *P. pachyrhizi* verwendet. Zur Klärung, ob eine DMI-Applikation eine direkte Auswirkung auf die relative Expression des *CYP51* hat, wurde die RNA jedes Isolates nach einem durchgeführten DLT (Fungizide, Tabelle 6) extrahiert (Kapitel 2.10.2). Die Durchführung eines DLTs wird in Kapitel 2.11 näher erläutert. Je Wirkstoff und Einsporisolate wurden die Befallsstellen aus 0 mg/l (Kontrolle) und der höchstmöglichen Konzentration, in der noch ausreichend Befall für die Extraktion vorhanden war, verwendet. Durch dieses Vorgehen wurde sichergestellt, dass die für die Analyse verwendeten Sporen den höchsten Selektionsdruck überwunden hatten. Nach der RNA-Extraktion erfolgte die reverse Transkription der RNA in cDNA (Kapitel 2.10.2.1). Alle Bestandteile des 25 µl Reaktionsansatzes der qPCR sind in Tabelle 9 (Expressionsmessung) aufgelistet.

Der Vergleich des Ct-Wertes des *CYP51* mit Referenzgenen führt zu einem ΔCt -Wert mit dem relativ quantifiziert werden kann, wie häufig das *CYP51* im Vergleich zu einem Referenzgen in der DNA vorkommt. Als Referenzgen wurden α -*Tubulin* (Haushaltsgen) genutzt, da hier die

Schmelzkurve in den Evaluierungsversuchen nahezu identisch verlief mit der des *CYP51*. Des Weiteren wurde die cDNA eines sensitives Referenzisolates verwendet, welches im Rahmen der Dissertation von Schmitz (2013) durch eine geringe Expression des *CYP51* auffiel. Die relativen Expressionswerte einzelner Isolate aus dieser Arbeit konnten erneut bestätigt werden (sensitive und überexprimierte) und das sensitive Isolat 8 wurde in der hier vorliegenden Arbeit in jedem qPCR-Lauf als Referenzisolat einbezogen (relative Expression = 1).

Je qPCR-Durchlauf wurden eine Doppelbestimmung für sowohl den Nachweis des *CYP51* als auch des *α -Tubulin* angesetzt. Die entsprechenden Oligonukleotide sind in Tabelle 5 gelistet. Zusätzlich wurde zur Normalisierung das Referenzisolat 8 in jedem Durchlauf mitgeführt. Alle Durchläufe wurden mindestens zweimal wiederholt. Das entsprechende qPCR-Programm ist in Tabelle 10 (Expressionsmessung) aufgeführt. Die Fluoreszenz wurde in jedem Zyklus während des Elongationsschrittes bei 72 °C gemessen und die Ct-Werte wurden mit der Software qPCRsoft® 3.4 bestimmt. Nach der letzten Elongation wurde eine Schmelzkurve durchgeführt, um die spezifische Amplifikation der PCR-Produkte zu kontrollieren. Dabei wurde, ausgehend von 72 °C, die Temperatur in 1 °C Schritten über 15 s auf 95 °C erhöht. Die Berechnung der relativen Expression erfolgte durch die $\Delta\Delta$ Ct Methode:

$$\text{Expressionsunterschied} = 2^{\Delta\text{CtB} - \Delta\text{CtK}}$$

Wobei bei den unbehandelten Einsporisolaten galt:

$$\Delta\text{CtK} = \text{Ct Referenzisolat (CYP51)} - \text{Ct Referenzisolat (}\alpha\text{-Tubulin)}$$

$$\Delta\text{CtB} = \text{Ct Kontrolle (unbehandelt) (CYP51)} - \text{Ct Kontrolle (unbehandelt) (}\alpha\text{-Tubulin)}$$

Wobei bei den behandelten Einsporisolaten galt:

$$\Delta\text{CtK} = \text{Ct Kontrolle (unbehandelt) (CYP51)} - \text{Ct Kontrolle (unbehandelt) (}\alpha\text{-Tubulin)}$$

$$\Delta\text{CtB} = \text{Ct Behandlung (CYP51)} - \text{Ct Behandlung (}\alpha\text{-Tubulin)}$$

2.10.5 Klonierung von PCR-Produkten

Aufgrund der Annahme, dass *P. pachyrhizi* mehrere *CYP51*-Allele besitzt, wurde in dieser Forschung mit Hilfe der Einsporisolate die exakte Anzahl der Allele ermittelt. Zur Klärung dieser Fragestellung, wurde das *CYP51* jedes Einsporisolates in einer hohen Anzahl von Klonen (100 Klone) sequenziert. Die Sequenzen sollten zum einen Auskunft darüber geben, ob die Mutationen gepaart auf einem Stang vorliegen und somit Mutationskombinationen bestehen und zum anderen, wie viele *CYP51*-Allele existieren. Zusätzlich konnten mit den Klonsequenzen neue Mutationen bzw. Mutationskombinationen im *CYP51* von *P. pachyrhizi* detektiert werden.

Aufgrund der Tatsache, dass *P. pachyrhizi* zwei Zellkerne und mehrere *CYP51*-Allele besitzt, konnte die Sequenzierung des *CYP51* der Einsporisolate nicht wie üblich durch die Sequenzierung von PCR-Produkten erfolgen. Somit musste vor der Sequenzierung des *CYP51* eine Transformation eines einzelnen *CYP51*-Strangs in *E. coli* erfolgen. Die Vorgehensweise der Klonierung wird in den nachfolgenden Kapiteln beschrieben.

2.10.5.1 Ligation

Nach einer Amplifikation des *CYP51* mit den Oligonukleotiden KES 1098 und KES 1133 gemäß den in Kapitel 2.10.3 beschriebenen PCR-Bedingungen ($T_M = 65\text{ °C}$ und Elongationszeit = 40 s), wurden die erhaltenen PCR-Produkte entsprechend den Angaben des CloneJET PCR-Klonierungskits in den pJet 1.2/blunt Klonierungsvektor ligiert. In dieser Arbeit wurde die Phusion™ Hot Start High-Fidelity Polymerase zur Amplifikation und somit das Blunt-End Klonierungsprotokoll verwendet. Die Bestandteile der Ligation mit einem Endvolumen von 20 μl sind in Tabelle 11 aufgeführt. Der Reaktionsansatz wurde im Anschluss abzentrifugiert und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Tabelle 11: Reaktionsansatz einer Ligation.

| Bestandteile | Volumen (μl) |
|---|---------------------------|
| 2x Reaktionspuffer | 10 |
| PCR-Produkt | 8 |
| pJet 1.2/blunt Klonierungsvektor | 1 |
| T ₄ DNA-Ligase (in Kälteblock) | 1 |

2.10.5.2 Transformation in *Escherichia coli*

Der Ligationsansatz wurde in kompetente Zellen von *E. coli* (XL1 Blue) transformiert. Hierzu wurden die kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und je 50 μl in vorgekühlte 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Nach der Hinzugabe von 0,85 μl β -Mercaptoethanol wurden die Zellen unter mehrmaligem Schwenken für 10 min auf Eis inkubiert. Nach der anschließenden Hinzugabe von 2 μl des jeweiligen Ligationsansatzes, wurden die Zellen für weitere 30 min auf Eis inkubiert. Für den folgenden Hitzeschock wurde die Suspension im Wasserbad für 45 s bei 42 °C erhitzt und nachfolgend für 2 min auf Eis abgekühlt. Im Anschluss wurden 450 μl vorgewärmtes SOC-Medium (42 °C) je Reaktionsgefäß hinzugefügt. Der Transformationsansatz wurde bei 37 °C für 1 h bei 250 rpm auf einem Thermoblock inkubiert. Anschließend wurden je

100 µl der Suspension auf einer LB-Agarplatte, welche zusätzlich 100 mg/l Ampicillin enthielt, ausplattiert. Die Platten wurden ca. 16–20 h bei 37 °C unter einer Inkubationshaube inkubiert.

2.10.5.3 Überprüfung der Transformation und Plasmidpräparation

Die auf der Agarplatte entstandenen Kolonien der transformierten Zellen wurden einzeln mit je einer sterilen Pipettenspitze unter der Laminarbank entnommen und vorerst in einen Kontroll-PCR Ansatz getaucht (Tabelle 5, KES 1098 und KES 1133). Die Pipettenspitze wurde im Anschluss in einem 15 ml Polypropylenröhrchen mit 2 ml LB-Medium mit 100 mg/l Ampicillin platziert. Der PCR-Ansatz diente der Überprüfung, ob das gewünschte DNA-Fragment (*CYP51*) in die Plasmid-DNA transformiert wurde. Nach der PCR-Reaktion, die entsprechend Tabelle 8 (DreamTaq™ Polymerase) durchgeführt wurde, erfolgte die gelelektrophoretische Auftrennung in einem 1 %igen TAE-Agarosegel (Kapitel 2.10.6). Zeigte sich eine Bande bei ca. 2 kb, wurde das DNA-Fragment erfolgreich eingebaut und die Klone wurden für die Übernackkultur und die anschließende Sequenzierung verwendet. Die Polypropylenröhrchen (inkl. Pipettenspitze), die Kolonien mit dem *CYP51*-Fragment enthielten, wurden auf einem Tisch-Plattformschüttler bei 37 °C mit 250 rpm über Nacht (ca. 16–20 h) inkubiert. Die Isolation der Plasmid-DNA wurde mit dem NucleoSpin Plasmid Kit nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Lagerung der Plasmid-DNA erfolgte kurzfristig bei 4 °C und langfristig bei -20 °C.

2.10.6 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarosegel-Elektrophorese wurde zur Auftrennung amplifizierter DNA-Fragmente verwendet, um beispielsweise die Transformation bei der Klonierung zu überprüfen (Kapitel 2.10.5.3). Zur Herstellung eines einprozentigen Agarosegels wurden 2 g Agarose in 200 ml TAE-Puffer gelöst, indem es in einem Erlenmeyerkolben in der Mikrowelle erhitzt wurde. Nach kurzem Abkühlen und vor dem Gießen des Gels, wurden 15 µl DNA-Farbstoff (peqGREEN) hinzugefügt. Nach dem Gießen musste das Gel ca. 30 min aushärten, bevor es in die Peqlab-Gelkammer gelegt wurde. Je Probe bzw. PCR-Ansatz wurden 5 µl Orange DNA-Ladefarbstoff (6x) (Endkonzentration 1x) hinzugefügt und mit dem Ansatz vermischt, bevor die Geltasche beladen wurde. Die anschließende Auftrennung der Amplifikate lief bei 120 V für ca. 60 min. Als Größenstandard wurde der 1 kb O'GeneRuler verwendet. Die Ergebnisse wurden mit dem Gel-Dokumentationssystem EasyDoc plus dokumentiert.

2.10.7 Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde extern durch die Firma Microsynth Seqlab (Göttingen, DE) mit dem Kettenabbruchverfahren nach Sanger durchgeführt. Die Ergebnisse dienten sowohl der

Mutationsanalyse im *CYP51* als auch der Bestimmung der Allel-Anzahl des *CYP51* in *P. pachyrhizi*. Hierfür wurde die aufgereinigte Plasmid-DNA, welche die gesuchte *CYP51*-Sequenz enthielt (Kapitel 2.10.5), mit den Oligonukleotiden pJet1.2 (fw), pJet1.2 (rv) und einem zusätzlichen Sequenzierprimer (KES 1178) sequenziert (Oligonukleotide, Tabelle 5). Es wurden drei Sequenzierprimer verwendet, da die *CYP51*-Sequenz 2100 bp beinhaltet und somit eine einwandfreie Abdeckung der vollständigen Sequenz gewährleistet werden konnte. Die Sequenzanalyse wurde mit dem Programm Geneious Prime® von Biomatters durchgeführt. Je Einsporisolat wurden 100 einwandfreie Contigs (bestehend aus drei Sequenzen) erstellt und an die Wildtypsequenz von *P. pachyrhizi* angeglichen. Somit konnten SNPs im *CYP51* und folglich unterschiedliche *CYP51*-Haplotypen identifiziert werden und zusätzlich wurde durch die Häufigkeitsverteilung der unterschiedlichen Sequenzen ein Rückschluss auf die *CYP51*-Allelzahl in *P. pachyrhizi* möglich.

2.10.8 Pyrosequenzierung

Die Pyrosequenzierung ermöglicht eine Echtzeitsequenzierung von bis zu 30 bp während der DNA-Synthese und dient somit dem Nachweis bekannter Mutationen (SNPs) in einer Zielsequenz. Das System beruht darauf, dass neben einem Enzymmix (DNA-Polymerase, ATP-Sulfurylase, Luciferase, Apyrase) und einem Substratmix (Adenosinphosphosulfat (APS) und D-Luciferin), nacheinander eines der vier Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP (A, T, C, G)) zur Template-DNA hinzugegeben wird. Ein individueller Sequenzierprimer dient als Startpunkt für die DNA-Polymerase. Nacheinander wird eines der dNTPs dem System zugeführt. Erfolgt hierbei der Einbau eines zum DNA-Template komplementären dNTPs in den neu synthetisierten DNA-Strang, wird infolgedessen Pyrophosphat (PPi) abgespalten. Das freigewordene Pyrophosphat wird durch die ATP-Sulfurylase und des im System enthaltenen APS zu Adenosintriphosphat (ATP) umgebaut. Das ATP wird von der Luciferase als Substrat für die Erzeugung eines Lichtsignals verwendet, welches quantifizierbar ist, da es sich proportional zu den eingebauten dNTPs verhält. Nicht-eingebaute Nukleotide und überschüssiges ATP werden durch die Apyrase abgebaut (Ahmadian et al., 2000; Ahmadian et al., 2006).

Die Pyrosequenzierungsmethode wurde in dieser Arbeit verwendet, um sowohl die *CYP51*-Mutationen als auch die Mutation im *CYTb* (F129L) von *P. pachyrhizi* zu quantifizieren. Hierzu wurde zunächst eine PCR mit einem 5´Biotin-Oligonukletid, einem weiteren Oligonukleotid ohne Biotin, der zu untersuchenden gDNA/cDNA und der DreamTaq™ Polymerase durchgeführt (Oligonukleotide, Tabelle 5 und PCR-Reaktion, Tabelle 8). Im Anschluss wurden die PCR-Produkte an Streptavidin Sepharose Beads immobilisiert, indem diese mit Bindepuffer und Streptavidin Sepharose mindestens 15 min bei Raumtemperatur unter Schütteln (1400 rpm) auf

einem Mikroplatten-Schüttler inkubiert wurden. Der entsprechende Reaktionsansatz ist in Tabelle 12 unter „Immobilisierung des DNA-Templates bei der Pyrosequenzierung“ aufgeführt. Nachfolgend wurde die gDNA/cDNA mithilfe der PyroMark® Q96 Vakuumstation angesaugt, in Ethanol (70 %ig) gewaschen, mit NaOH (0,2 M) denaturiert und in Waschpuffer (1x) neutralisiert, sodass lediglich die einzelsträngigen DNA an den Streptavidin Sepharose Beads verblieb. Diese DNA wurde im Anschluss durch Abstellen des Vakuums in Low-Plates (96-Well) mit vorgelegtem Annealingpuffer und Sequenzierprimer (Tabelle 12 (Vorbereitung des DNA-Templates für die Pyrosequenzierung) und Oligonukleotide, Tabelle 5) überführt und zur Denaturierung für 3 min bei 80 °C auf einem Thermoblock inkubiert.

Tabelle 12: Reaktionsansätze für Pyrosequenzierung.

| Bestandteile | Volumen (µl) pro Reaktionsansatz | Anmerkung |
|------------------------|----------------------------------|---|
| PCR-Ansatz | 25 | |
| Bindepuffer | 37 | Immobilisierung des DNA-Templates bei der Pyrosequenzierung |
| Streptavidin Sepharose | 3 | |
| Annealingpuffer | 38,75 | Vorbereitung des DNA-Templates für die Pyrosequenzierung |
| Sequenzierprimer | 1,25 | |

Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die Templates im Pyrosequenzer sequenziert. Das Befüllen der Reagenzkartusche erfolgte mit den durch die PyroMark Q96 MA Software errechneten Volumina der Reagenzien (Enzymmix, Substratmix und dNTPs) nach Angaben des Herstellers. Die verschiedenen Assays zur Quantifizierung der *CYP51*-Mutationen wurden mit der Pyrosequencing Assay Design entwickelt. Zur Validierung der anlässlich für diese Arbeit neu entwickelten Assays wurden DNA-Mischungen hergestellt. Hierzu wurde Plasmid-DNA eines WT-Klons (100 % sensitiv) und eines mutierten Klons von *P. pachyrhizi* (100 % gefragte Mutation) auf eine Konzentration von 1 ng/µl mit DEPC-H₂O eingestellt. Anschließend wurde diese DNA in unterschiedlichen Verhältnissen (90/10, 75/25, 50/50, 25/75, 10/90) gemischt. Zusätzlich wurden zwei Positivkontrollen (100 % und 0 % Mutation) und eine NTC mitgeführt. Die Plasmidmischungen wurden lediglich zur Assay-Validierung, wohingegen die NTC und eine Positivkontrolle in jedem Durchlauf mitgeführt wurden. Sowohl für die Validierung als auch für die Messung der Isolate wurden alle Reaktionen als Duplikate angesetzt. Da die Nachweisgenauigkeit der Pyrosequenzierung ca. 5 % beträgt wurden alle Werte < 5 % unterhalb der Nachweisgrenze gesehen und alle Werte über 95 % können als 100 % interpretiert werden.

2.11 Detached Leaf Tests zum Nachweis der Sensitivität der Einsporisolate von *P. pachyrhizi* gegenüber DMI

Fungizidsensitivitätsversuche wurden durchgeführt, um die Wirksamkeit verschiedener DMI für die Einsporisolate von *P. pachyrhizi* und demzufolge für unterschiedliche *CYP51*-Haplotypen zu bewerten. Da es sich um einen biotrophen Erreger handelt und eine Vermischung der Isolate im Gewächshaus vermieden werden sollte, wurden diese Studien *in vivo* mit Detached Leaf Tests (DLTs) durchgeführt. In jedem DLT wurde zusätzlich zu drei Wiederholungen je Wirkstoff und Isolat sowohl der Wirkstoff Prothioconazol als auch das sensitive Einsporisolat MS2-256/18P (WT) einbezogen, um die Validität der Tests zu gewährleisten.

2.11.1 Fungizidapplikation

Die Fungizide wurden einen Tag vor Inokulation (ein Tag präventiv) in sieben Konzentrationen (0/0,03/1/3/10/30/100 mg/l) in Leitungswasser verdünnt und auf zwei Wochen alte Sojapflanzen (Sorte MS Mentor) in einer Spritzkammer (SK6) der BASF SE mit einem Volumen von 1000 l/ha appliziert. Die Kultivierung der Pflanzen erfolgte, wie in Kapitel 2.8 beschrieben und die Fungizide lagen in handelsüblichen Soloformulierungen vor (Fungizide, Tabelle 6). Verwendet wurden die DMI Prothioconazol (250 g/l), Epoxiconazol (125 g/l), Cyproconazol (240 g/l), Tetraconazol (100 g/l), Difenoconazol (250 g/l), Tebuconazol (250 g/l) und Metconazol (60 g/l). Insgesamt wurden 50 ml Fungizidlösung auf maximal sechs Pflanzentöpfe gleichzeitig ausgebracht und pro Behandlung/Konzentration und Isolat wurden drei Wiederholungen verwendet. Für jeden durchgeführten DLT wurde Prothioconazol als Referenz-Wirkstoff mitgeführt. Nach der Applikation wurden die behandelten Pflanzen in eine Gewächshauskammer (22 °C) gestellt, bevor die Blätter am Folgetag geerntet und auf 0,4 %igen Wasseragar, welcher 30 mg/l Streptomycin und 0,0002 ml/l Kinetinlösung beinhaltet, gelegt wurden.

2.11.2 Inokulation

Für die Inokulation wurde je verwendetem Einsporisolat von *P. pachyrhizi* eine Sporensuspension (8×10^4 Sporen/ml) hergestellt. Hierzu wurden die Sporen infizierter Blätter gesammelt, indem eine geöffnete Petrischale mit einem infizierten Blatt auf ein DIN-A4-Blatt gestülpt wurde. Durch leichtes Klopfen auf die Rückseite der Petrischale lösten sich die Sporen und fielen auf das DIN-A4-Blatt. Der Vorteil dieser Methode gegenüber dem Abwaschen der Blätter besteht darin, dass die infizierten Blätter mehrmals verwendet werden können, da sich erneut Sporen bilden. Im Anschluss wurden die Sporen in ein 50 ml-Falkenröhrchen oder eine Laborgewindeflasche in steriles Tweenwasser (0,03 %) überführt und die Sporendichte entsprechend angepasst. Mit einer Airbrush (0,3 mm Düse) wurden drei Blätter pro Wirkstoff und Konzentration mit ca. 0,5 ml

Sporensuspension pro Blatt inokuliert. Zwischen den Isolaten wurde sowohl die Airbrush als auch die Arbeitsfläche entsprechend desinfiziert, damit eine Vermischung der Isolate ausgeschlossen wurde. Für jeden durchgeführten DLT wurde das sensitive Einsporisolat MS2-256/18P (WT) als Referenzisolat mitgeführt. Nach der Inokulation wurde die Inkubation, wie zuvor in Kapitel 2.9 beschrieben, durchgeführt.

2.11.3 Evaluierung

Die befallene Blattfläche (%) wurde 14 Tage nach Inokulation visuell erfasst bzw. geschätzt. Ein Beispiel zur Auswertung eines DLT mit *P. pachyrhizi* ist in Tabelle 13 aufgeführt. Im Anschluss wurden mit der Software E-WorkBook Suite/Labbooq die ED₅₀-Werte ermittelt und zur Berechnung der Wirksamkeit der Fungizide wurde folgende Formel berücksichtigt:

$$\text{Wirksamkeit (\%)} = 1 - (\text{MW (Befall behandelt (\%))} / \text{MW (Befall unbehandelt (\%))}) \times 100$$

Tabelle 13: Boniturschema eines Detached Leaf Tests mit *Phakopsora pachyrhizi*. Die hier aufgeführte prozentuale Abstufung dient lediglich als Beispiel und wurde frei gewählt.

| Befall mit <i>Phakopsora pachyrhizi</i> (%) | | | | | | |
|---|---|---|---|--|---|---|
| 0 % | 10 % | 25 % | 50 % | 75 % | 85 % | 95% |
|  |  |  |  |  |  |  |

2.11.4 Mutationsselektion durch Fungizidanwendung

Neben der Evaluierung der Wirksamkeit von unterschiedlichen DMI gegenüber *P. pachyrhizi*, diente ebenso der Nachweis der spezifischen Mutationsselektionen zur weiteren Beurteilung der Fungizide. Durch eine Einschätzung der durch unterschiedliche Wirkstoffe hervorgerufene Mutationsselektionen können Rückschlüsse für ein entsprechendes Resistenzmanagement gezogen werden.

2.11.4.1 Überprüfung der Einsporisolate auf genetische Identität

Mithilfe von DLTs konnte neben einer Sensitivitätseinschätzung der *CYP51*-Haplotypen gegenüber DMI zusätzlich überprüft werden, ob es sich bei den gewonnenen Isolaten tatsächlich um Einsporisolate handelt, die aus einer Spore entstanden und somit genetisch identisch sind. Für diese Überprüfung wurde ein DLT mit den in Tabelle 6 gelisteten Fungiziden in sieben Konzentrationen (0/0,03/1/3/10/30/100 mg/l) durchgeführt (Applikation, Kapitel 2.11.1). Der DLT wurde neben den Einsporisolaten zusätzlich mit einer Referenzpopulation von *P. pachyrhizi*

inokuliert (Inokulation, Kapitel 2.11.2). Anhand dieser Population sollte verdeutlicht werden, dass die quantitativen Anteile der Mutationen im *CYP51* nach Behandlungen mit unterschiedlichen DMI variieren. Nach der Inokulation des DLT wurde das verwendete Inokulum hinsichtlich der vorhandenen Mutationen analysiert. Dieser Wert diente als Ausgangswert und veranschaulicht, wie sich durch die unterschiedlichen Behandlungen der quantitative Anteil der Mutationen verändert. Zu diesem Zweck wurde die zuvor verwendete Sporensuspension zentrifugiert, der Überstand entnommen und die verbliebenen Sporen zur DNA-Extraktion verwendet. Zwei Wochen nach der Inokulation wurde ebenfalls die DNA der Befallsstellen extrahiert (DNA-Extraktion, Kapitel 2.10.1). Im Anschluss erfolgte eine Überprüfung der Mutationen mittels Pyrosequenzierung und qPCR (Kapitel 2.10.4 und 2.10.8). Für diesen Vorgang wurden das Inokulum, die Befallsstellen der unbehandelten Kontrolle (0 mg/l) und die Befallsstellen die in den höchsten Konzentrationen der jeweiligen Behandlung vorzufinden waren, analysiert. Konnten bei den analysierten Befallsstellen keine Unterschiede hinsichtlich ihrer jeweiligen Mutationsanteile im Vergleich zum Ausgangsmaterial (Inokulum) ermittelt werden, handelte es sich um Einsporisolate. Hierbei musste ein Augenmerk auf die jeweiligen Mutationen im Zielgen gelegt werden, d. h. bei den in dieser Arbeit verwendeten DMI wurde somit auf Veränderungen im *CYP51* geprüft.

2.11.4.2 Mutationsselektion durch Demethylierungsinhibitoren

In dieser Studie sollte zusätzlich überprüft werden, inwieweit unterschiedliche DMI unterschiedliche Mutationen im Zielgen (*CYP51*) selektieren. Da Einsporisolate keine Mutationsselektion aufweisen (Kapitel 3.1), wurde eine Population (Isolatmix) bestehend aus Sporen von fünf Einsporisolaten hergestellt. Die gewählten Einsporisolate zeigten unterschiedliche *CYP51*-Haplotypen auf (Tabelle 14). Es wurde, wie in Kapitel 2.11 beschrieben, ein DLT mit sieben DMI (Tabelle 6) in sieben Konzentrationen (0/0,03/1/3/10/30/100 mg/l) durchgeführt. Die Sporen der fünf Einsporisolate wurden im gleichen Verhältnis zu einer Sporensuspension angesetzt (8×10^4 Sporen/ml) und der Test wurde einen Tag nach der Applikation inokuliert (Kapitel 2.11.2). Nach 14-tägiger Inkubationszeit erfolgte die Auswertung (Kapitel 2.11.3). Im Anschluss wurde die gDNA der Befallsstellen jedes DMIs aus allen Konzentrationen extrahiert (Kapitel 2.10.1) und hinsichtlich ihrer Mutationen im *CYP51* mittels Pyrosequenzierung überprüft (Kapitel 2.10.8). Durch diesen Versuch wurde verdeutlicht, welche hier gelisteten *CYP51*-Mutationen (Tabelle 14) durch die jeweilige DMI-Behandlung innerhalb der unterschiedlichen Konzentrationen selektiert wurden. Die Mutationen K142R, I145F und I475T konnten in diesem Versuchsaufbau nicht berücksichtigt werden, da keine Isolate mit diesen Mutationen vorhanden waren.

Tabelle 14: Verwendete Einsporisolate für den Isolatmix zum Nachweis der Mutationsselektionen durch Demethylierungsinhibitoren. Der Mix bestand aus Sporen von fünf Einsporisolaten von *Phakopsora pachyrhizi*, welche unterschiedliche Mutationskombinationen aufweisen. In der Tabelle sind die entsprechenden Mutationen im *CYP51* gelistet, sowie die resultierenden Haplotypen. Der Isolatmix wurde zur Untersuchung, der durch Demethylierungsinhibitoren (DMI) verursachten Mutationsselektion verwendet. Hierzu wurde ein Detached Leaf Test mit DMI durchgeführt, mit dem Isolatmix inokuliert und nach 14 Tagen mittels Pyrosequenzierung der quantitative Mutationsanteil im *CYP51* der Befallsstellen analysiert.

| Isolat | Mutationen im <i>CYP51</i> (%) | | | | | | <i>CYP51</i> -Haplotypen |
|-------------|--------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------------------------|
| | F120L | V130A | Y131F | Y131H | I145V | F154Y | |
| MS2-256/18P | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | WT |
| MS1-261/18P | 30 | 30 | 30 | 0 | 0 | 0 | F120L + V130A + Y131F |
| MS5-259/18P | 50 | 0 | 50 | 0 | 0 | 0 | F120L + Y131H |
| MS3-259/18P | 35 | 0 | 0 | 35 | 35 | 0 | F120L + Y131H + I145V |
| MS4-259/18P | 32 | 0 | 0 | 32 | 0 | 32 | F120L + Y131H + F154Y |

2.12 Proteinmodellierung des *CYP51*

Die Homologiemodellierung des *CYP51*-Proteins von *P. pachyrhizi* wurde mithilfe der Software Molecular Operating Environment (MOE) mit Standardeinstellungen für Homologiemodellierung durchgeführt. Da bisher keine Kristallstruktur des *CYP51* von *P. pachyrhizi* verfügbar ist, basiert das Modell auf einer experimentellen Struktur des *CYP51*-Proteins von *Aspergillus fumigatus* (PDB ID: 6CR2). Zur Veranschaulichung des aktiven Zentrums wurde eine DMI-Struktur in das Modell eingefügt, welche analog zu dem in Pharmazie-Studien verwendeten VNI ((N-1-(2,4-dichlorophenyl) 2-(1H-imidazol-1-yl)ethyl)-4-(5-phenyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)benzamide) ist.

2.13 Software und bioinformatische Analysen

Die in dieser Arbeit verwendete Software ist in Tabelle 15 aufgeführt. Für das Design und die Überprüfung von PCR-Oligonukleotide wurde Geneious Prime[®] und für das Design der Pyrosequenzierung-Oligonukleotide wurde zusätzlich die Software Pyrosequencing Assay Design genutzt. Geneious Prime[®] wurde außerdem für den Vergleich mehrerer Nukleotid- und Aminosäuresequenzen verwendet. Die qPCR wurde mit der Software qPCR Soft[®] 3.4 ausgewertet. Die in dieser Arbeit aufgelisteten ED₅₀-Werte wurden mithilfe der elektronischen Versuchsdokumentation Labbooq ermittelt und die Software RStudio wurde für die statistische Analyse und die Grafikgestaltung verwendet. Zur Ermittlung der *CYP51*-Sequenzen

unterschiedlicher Pathogene wurde die Datenbank National Center for Biotechnology Information (NCBI) hinzugezogen.

Tabelle 15: Verwendete Software.

| Name | Hersteller |
|--|--|
| E-WorkBook Suite/Labbooq | IDBS, Guildford, UK |
| Geneious Prime®, Version: 2021.1.1 | Biomatters, Auckland, Neuseeland (NZ) |
| Microsoft 365 Office | Microsoft, Redmond, US |
| Molecular Operating Environment (MOE) | Chemical Computing Group Inc., Montreal, Kanada (CA) |
| Pyrosequencing Assay Design, Version: 2.5.10 | Qiagen, Hilden, DE |
| qPCRsoft® 3.4 | Analytik Jena AG, Jena, DE |
| RStudio, Version: 4.1.2 | RStudio Inc., Boston, US |

3 Ergebnisse

Für ein wirkungsvolles Resistenzmanagement bei *P. pachyrhizi* ist es von besonderer Bedeutung, Isolate näher zu charakterisieren, welche einen Sensitivitätsverlust gegenüber Fungiziden aufzeigen. Hierzu gehört die Aufklärung der Resistenzmechanismen, das Ausmaß der erworbenen Resistenz und die Kenntnis über womöglich auftretende Fitnessnachteile, die mit einem resistenten Haplotypen verbunden sind. Diese Informationen sind hilfreich, um der Geschwindigkeit des Auftretens und der Ausbreitung resistenter Populationen von *P. pachyrhizi* im Feld mit einem entsprechenden Resistenzmanagement entgegenzuwirken. Eine Charakterisierung von Isolaten erfolgt im Labor häufig unter Verwendung von Einsporisolaten. Da diese Isolate aus einer Spore entstanden und somit genetisch identisch sind, können die Resistenzmechanismen unter konstanten Bedingungen (genetisches Ausgangsmaterial) mit unterschiedlichen Rahmenbedingungen überprüft werden.

In dieser Studie wurden erstmals Einsporisolate von *P. pachyrhizi* isoliert, welche einen elementaren Baustein für weitere Untersuchungen hinsichtlich der Resistenzforschung darstellen. Im Zuge der molekularen Analysen wurde das *CYP51*-Gen der neun generierten Einsporisolate kloniert und im Anschluss 100 Klone je Einsporisolat sequenziert. Diese Vorgehensweise diente zum einen der Identifikation neuer Mutationen und zum anderen konnte somit die Allelzahl des *CYP51* in *P. pachyrhizi* ermittelt werden. Durch diese Information können Rückschlüsse gezogen werden, wie viele unterschiedliche *CYP51*-Haplotypen von *P. pachyrhizi* existieren. Die in den Einsporisolaten auftretenden *CYP51*-Haplotypen wurden zusätzlich in Form von DLTs auf ihre Sensitivität gegenüber DMI untersucht. Zusätzlich wurde ermittelt, welche *CYP51*-Mutationen bzw. *CYP51*-Haplotypen durch die Anwendung unterschiedlicher DMI selektiert werden. Des Weiteren wurde ein Protein-Homologiemodell des *CYP51* verwendet, um die Auswirkungen der unterschiedlichen SNPs zu bewerten, die zu Aminosäureveränderungen im *CYP51*-Enzym führen. Durch diese Informationen konnten Vermutungen in Hinblick auf die DMI-Bindung im aktiven Zentrum des *CYP51*-Enzyms geäußert werden. Außerdem wurden die Einsporisolate hinsichtlich einer *CYP51*-Überexpression überprüft. Hierbei wurden sowohl allgemeine Überexpressionsunterschiede in Bezug auf die unterschiedlichen Einzelsporenisolate ermittelt als auch überprüft, ob die DMI-Anwendung einen direkten Einfluss auf die relative Expression des *CYP51* hat.

3.1 Überprüfung und Nachweis der genetischen Identität der verschiedenen Einsporisolate von *P. pachyrhizi*

Damit weitere Studien mit den gewonnenen Einsporisolaten durchgeführt werden konnten, musste bestätigt werden, dass diese Isolate genetisch identisch sind. Aus diesem Grund wurde ein DLT durchgeführt und im Anschluss die Mutationswerte der Einsporisolate analysiert. Konnten bei den analysierten Befallsstellen keine Unterschiede hinsichtlich ihrer jeweiligen Mutationsanteile im Vergleich zum Ausgangsmaterial (Inokulum) und zur unbehandelten Kontrolle festgestellt werden, handelte es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um Einsporisolate.

Nach der Applikation von sieben DMI und anschließender Mutationsanalyse mittels Pyrosequenzierung und qPCR konnten die in Tabelle 16 aufgeführten Mutationshäufigkeiten ermittelt werden. Zusätzlich zu den mit *P. pachyrhizi* infizierten Blättern (behandelt und unbehandelt) wurde das Inokulum (Sporensuspension) analysiert. In der Tabelle 16 sind zur Veranschaulichung lediglich zwei der sieben verwendeten DMI (Prothioconazol und Metconazol) sowie die Mutationen F120L, F131F/H (*CYP51*), F129L (*CYTb*) und die I86F (*SDHc*) gelistet. Zusätzlich sind lediglich vier der neun gewonnenen Einsporisolate aufgeführt. Die Daten zu den weiteren Fungiziden, Mutationen und Einsporisolaten sind im Anhang unter Tabelle A23 zu finden. Eine weitere Tabelle mit allen bekannten Mutationen der jeweiligen Einsporisolate ist in Kapitel 3.2.1.1 aufgeführt.

In der Tabelle 16 wird deutlich, dass die als Referenz getestete Population von *P. pachyrhizi* (P-18) Unterschiede in der *CYP51*-Mutationshäufigkeit nach den DMI-Behandlungen zeigt. Sowohl das analysierte Inokulum als auch die unbehandelte Kontrolle enthielten vor der Applikation keinen nachweisbaren Anteil der hier gelisteten *CYP51*-Mutationen. Nach der DMI-Anwendung stiegen die Werte deutlich an. Somit lag der Anteil der Mutation F120L nach beiden DMI-Behandlungen bei ca. 30 %. Nach der Anwendung von Prothioconazol stieg der Anteil der Mutation Y131F auf 16 % und der Anteil der Mutation Y131H auf 6 % an. Im Gegensatz dazu stieg der Anteil der Mutation Y131H nach der Anwendung von Metconazol auf 32 %, wohingegen der Anteil der Mutation Y131F weiterhin unterhalb der Nachweisgrenze von 5 % lag.

Im Vergleich zur Referenzpopulation (P-18) zeigen die vier gelisteten Einsporisolate sowie die weiteren fünf (Tabelle A23), keine Veränderungen in den Mutationshäufigkeiten nach der DMI-Anwendung. Hierbei ist hervorzuheben, dass das Einsporisolat MS2-256/18P keine der hier genannten Mutationen aufweist. Die weiteren drei Einsporisolate zeigen eine konstante Mutationshäufigkeit in der unbehandelten Kontrolle und nach den jeweiligen DMI-Anwendungen. Mit Ausnahme des Einsporisolates MS2-256/18P, weisen die weiteren Einsporisolate

Mutationshäufigkeiten von ca. 30–50 % auf. Hierbei ist zu vermerken, dass die Mutation F120L im *CYP51* in allen Einsporisolaten entweder in Kombination mit der Mutation Y131F oder der Mutation Y131H nachgewiesen werden konnte. Neben den *CYP51*-Mutationen wurden zur Vervollständigung ebenfalls die bekannten Mutationen im *SDHc*- und *CYTb*-Gen analysiert. Hier konnten weder in der Population noch in den Einsporisolaten Unterschiede in den Mutationshäufigkeiten festgestellt werden.

Tabelle 16: Nachweis der genetischen Identität der Einsporisolate von *Phakopsora pachyrhizi* durch Bestimmung der quantitativen Mutationsanteile (%) nach Anwendung unterschiedlicher Demethylierungsinhibitoren im Detached Leaf Test. gDNA aus mit *P. pachyrhizi* infizierten Bereichen von unbehandelten und behandelten Blättern wurde extrahiert und anschließend mittels Pyrosequenzierung und qPCR hinsichtlich ihrer Mutationswerte quantifiziert. Für die Analyse wurden die infizierten Bereiche verwendet, die in den höchsten Konzentrationen vorhanden waren (0,3/1/3/10/30/100 mg/l) sowie die Befallsstellen aus den Kontrollen (0 mg/l). Eine zusätzliche Analyse der für die Inokulation verwendeten Sporensuspension (Inokulum) wurde durchgeführt. Es wurden Prothioconazol, Expoxiconazol, Cyproconazol, Tetraconazol, Difenconazol, Tebuconazol und Metconazol überprüft. In dieser Tabelle sind stellvertretend die Werte von Prothioconazol und Metconazol aufgeführt. Zusätzlich sind neben der Referenzpopulation (P-18) zur Veranschaulichung vier der neun Einsporisolate aufgezeigt sowie drei der neun *CYP51*-Mutationen. Ferner sind die Konzentrationen gelistet, aus der die jeweiligen Befallsstellen analysiert wurden.

| Isolat | Behandlung | Konzentration (mg/l) | Mutationen (%) in gDNA | | | | |
|------------------------------------|----------------|----------------------|------------------------|-------|-------|-------------|-------------|
| | | | <i>CYP51</i> | | | <i>SDHc</i> | <i>CYTb</i> |
| | | | F120L | Y131F | Y131H | I86F | F129L |
| Population P-18^a | Inokulum | - ^b | udN ^d | udN | udN | 0 | 98 |
| | Kontrolle | 0 | udN | udN | udN | 0 | 96 |
| | Prothioconazol | 30 | 26 | 16 | 6 | 0 | 97 |
| | Metconazol | 100 | 31 | udN | 32 | 0 | 96 |
| MS2-256/18P^c | Inokulum | - ^b | udN | udN | udN | 0 | udN |
| | Kontrolle | 0 | udN | udN | udN | 0 | udN |
| | Prothioconazol | 1 | udN | udN | udN | 0 | udN |
| | Metconazol | 1 | udN | udN | udN | 0 | udN |
| MS1-259/18P^c | Inokulum | - ^b | 30 | udN | 30 | 0 | 98 |
| | Kontrolle | 0 | 28 | udN | 28 | 0 | 96 |
| | Prothioconazol | 10 | 28 | udN | 28 | 0 | 96 |
| | Metconazol | 100 | 29 | udN | 30 | 0 | 96 |

| Isolat | Behandlung | Konzentration (mg/l) | Mutationen (%) in gDNA | | | | |
|--------------------------------|----------------|-------------------------|------------------------|-------|-------|------|-------|
| | | | CYP51 | | | SDHc | CYTb |
| | | | F120L | Y131F | Y131H | I86F | F129L |
| MS5-259/18P^c | Inokulum | - ^b | 47 | udN | 47 | 46 | 97 |
| | Kontrolle | 0 | 48 | udN | 48 | 46 | 96 |
| | Prothioconazol | 10 | 47 | udN | 46 | 46 | 98 |
| | Metconazol | 100 | 50 | udN | 47 | 50 | 96 |
| MS1-261/18P^c | Inokulum | - ^b | 28 | 32 | udN | 0 | 96 |
| | Kontrolle | 0 | 31 | 31 | udN | 0 | 96 |
| | Prothioconazol | 30 | 28 | 28 | udN | 0 | 96 |
| | Metconazol | 30 | 29 | 28 | udN | 0 | 99 |

^a Referenzpopulation = zeigt auf, wie die Mutationswerte nach einer Behandlung mit unterschiedlichen Demethylierungsinhibitoren variieren.

^b Keine Werte bei Konzentration, da es sich um das verwendete Inokulum handelt.

^c MS = Einsporisolate (monosporic isolate)

^d Da die Nachweisgenauigkeit der Pyrosequenzierung 5 % beträgt, wurden alle Werte < 5 % „unterhalb der Nachweisgrenze“ (udN) gesehen und alle Werte über 95 % (F129L) können als 100 % interpretiert werden.

3.2 Sequenzanalysen des CYP51 der Einsporisolate von *P. pachyrhizi*

3.2.1 Detektion neuer Mutationen im CYP51

Zur Charakterisierung der Einsporisolate wurde zunächst eine Klonierung des CYP51 vorgenommen und im Anschluss je Isolat 20 Klone sequenziert. Die enthaltenen Sequenzen wurden an die Wildtypsequenz des Hausstamms angeglichen und somit konnten drei neue, bislang für *P. pachyrhizi* nicht beschriebene, Mutationen im CYP51 identifiziert werden. Alle derzeit bekannten Mutationen im CYP51 von *P. pachyrhizi* sind in Tabelle 17 gelistet. Hierbei ist sowohl das Wildtypcodon bzw. die codierte Aminosäure als auch das Codon bzw. die Aminosäure des Mutanten gelistet. Zusätzlich wurde vermerkt, welche Mutationen in dieser Arbeit neu identifiziert wurden (V130A, I145V, F154Y).

Es ist zu erkennen, dass neben den bereits bekannten Mutationen Y131F und Y131H, ebenso auf dem Codon 145 zwei SNPs entstehen können, die jeweils zu einem unterschiedlichen Aminosäureaustausch führen. Die Mutation I145F wurde bereits in vorherigen Arbeiten beschrieben (Schmitz et al., 2014), wohingegen die Mutation I145V in der hier vorliegenden Arbeit

erstmals bei *P. pachyrhizi* detektiert wurde. Des Weiteren wurden im Zuge dieser Arbeit die Mutation V130A und F154Y neu identifiziert.

Tabelle 17: Mutationen im *CYP51* von *Phakopsora pachyrhizi*. Es sind alle derzeit bekannten Mutationen im *CYP51* gelistet. Des Weiteren ist das jeweilige Wildtypcodon mit entsprechender Aminosäure aufgeführt, ebenso wie das veränderte Codon bzw. die Aminosäure des Mutanten. Mutationen, die bereits für *P. pachyrhizi* beschrieben wurden, sind als „vorhanden“ kategorisiert, wohingegen Mutationen, die im Rahmen dieser Arbeit erstmals beschrieben wurden, als „neu“ gekennzeichnet sind.

| Mutationen | Wildtyp | | Mutant | | Anmerkung (vorhanden/neu) |
|------------|---------|--------------|--------|--------------|------------------------------|
| | Codon | Aminosäure | Codon | Aminosäure | |
| F120L | TTC | Phenylalanin | TTA | Leucin | vorhanden |
| V130A | GTC | Valin | GCC | Alanin | neu |
| Y131F | TAC/TAT | Tyrosin | TTT | Phenylalanin | vorhanden |
| Y131H | TAC/TAT | Tyrosin | CAT | Histidin | vorhanden |
| K142R | AAA | Lysin | AGA | Arginin | vorhanden |
| I145F | ATC | Isoleucin | TTC | Phenylalanin | vorhanden |
| I145V | ATC | Isoleucin | GTC | Valin | neu |
| F154Y | TTT | Phenylalanin | TAT | Tyrosin | neu |
| I475T | ATC | Isoleucin | ACC | Threonin | vorhanden |

In der nachfolgenden Abbildung 6 ist die DNA-Sequenz des WT-Einsporisolates MS2-256/18 zu erkennen. Hierbei wurden sowohl die fünf Introns als auch alle bekannten Mutationsstellen (Tabelle 17) farblich markiert. Die Grafik kennzeichnet, an welcher Stelle der *CYP51*-Sequenz die potenziellen Mutationsstellen vorliegen. Es lässt sich erkennen, dass sieben der neun derzeit bekannten Mutationen zwischen dem Abschnitt 584–658 bp auftreten. Dieser Bereich befindet sich zwischen dem zweiten und dritten Intron der DNA-Sequenz. Die Mutationsstelle der F120L liegt unmittelbar vor dem zweiten Intron, wohingegen die Mutation I475T (1851–1853 bp) zwischen dem vierten und fünften Intron lokalisiert ist.

Ergebnisse

| | | | | | | | |
|-------------------|-------------|-------------|------------|-------------|------------|------|-----------------|
| MS2-256.18P (DNA) | ATGTCCTTCCA | GCGTTATAAT | CGATCAGCTC | TACTCATTCT | CAACTACCAG | 50 | |
| MS2-256.18P (DNA) | TCTCATCATC | ACATCGCTAA | CTTCCATCCT | CACAATCATC | GTCATCCTCA | 100 | |
| MS2-256.18P (DNA) | ATGTCACTAA | TCAGTTGGTG | AGTTACATCA | TCCATCATCT | GTCCTCACCT | 150 | |
| MS2-256.18P (DNA) | GCCAAGAAGG | AGACTAAATA | ACTAATCAAA | GCTTCTTTTT | CTTTTTAGTT | 200 | |
| MS2-256.18P (DNA) | GTTCAAGGAC | AGGAATACCC | CACCGCTAGT | CTTCCACATA | TTTCCGGTGC | 250 | |
| MS2-256.18P (DNA) | TCGGCTCTGT | GATAAGCTAT | GGCATGGATC | CGTACCAATT | CTTTGAGGAC | 300 | |
| MS2-256.18P (DNA) | TGTCGGAGGA | AGCATGGAAA | TGTGTTTACG | TTTGTGCTGT | TGAACAAGAA | 350 | |
| MS2-256.18P (DNA) | GGTCACCGTA | GCTCTCGGTC | CGGAGGGAAA | CACGTTGGTC | TTAAATGGAA | 400 | |
| MS2-256.18P (DNA) | AGCTCTCAGA | GGTCAATGCC | GAAGAAGCTT | ACACCCATTT | CAGTTGAGTC | 450 | F120L |
| MS2-256.18P (DNA) | ATAAATCAAG | TTTTAATTAT | AACTATCTTT | TTACCCTTTG | TTGATGAGAA | 500 | |
| MS2-256.18P (DNA) | GIGTCATTGA | ACTTAAATGT | TTTAACTTTT | TGATGGCCTG | AAICAAATTT | 550 | |
| MS2-256.18P (DNA) | TGTTTAGCTA | CACCTGTCTT | TGGTAAGGAT | GTAAGTCTACG | ATGTACCCAA | 600 | V130A + Y131F/H |
| MS2-256.18P (DNA) | CTCGATCCTA | ATGCAGCAGA | AAAAGTTCAT | C AAGGCTGGC | CTTACTACTG | 650 | K142R + I145F/V |
| MS2-256.18P (DNA) | AGAAAATTAA | GAAATAITGT | GGGATAATTG | TTAGAGAAAC | AACAAGTTAC | 700 | F154Y |
| MS2-256.18P (DNA) | CTGGAAGATC | ATTTATICTG | CTGTTCTGAT | AATATATAAA | AAGAGAAAAA | 750 | |
| MS2-256.18P (DNA) | GAAAAGGCTA | ACAAAGCTCA | AAGCTTAAAT | TCCGTCTAAT | TTTGTTTACT | 800 | |
| MS2-256.18P (DNA) | CGATTATTTA | TTTCTTCAAA | AATAAATATA | AACCCCCCCC | CGATTTAGCT | 850 | |
| MS2-256.18P (DNA) | CCAAATGTAA | AACTGTGCAC | TAAGGACGTC | CATGATATTA | CTTCTGAGAT | 900 | |
| MS2-256.18P (DNA) | AACGATTTGT | ACTGCAGCAG | CAACTCTACA | GGGAAAAGAA | GTGAGAGAA | 950 | |
| MS2-256.18P (DNA) | GGCTAGACAA | ATCCTTTGCT | AAACTCTATC | ACGACCTAGA | TGGTGGATT | 1000 | |
| MS2-256.18P (DNA) | ACACCGTTGA | ACITTTGTTTT | TCCGAACCTG | CCCTTACCCT | CCTACAGACG | 1050 | |
| MS2-256.18P (DNA) | TAGGGACAAG | GCACAGGTCT | CGATGACAAA | CTTTTATCTG | AACATTCTAA | 1100 | |
| MS2-256.18P (DNA) | AGAAAAGGAG | AGCCGAAAAC | AGGCAGGATG | AGTTCAATGA | CATGTTGGAT | 1150 | |
| MS2-256.18P (DNA) | GTCTTGCAGG | GCGCAGCTA | CAAGGACGGC | AGAGCTTTAT | CGGACAGGGA | 1200 | |
| MS2-256.18P (DNA) | AATTGCTCAC | ATAATGATTG | CCGTCCTTAT | GGCTGGTCAA | CACACTAGTG | 1250 | |
| MS2-256.18P (DNA) | CTGCGACCGG | CGCCTGGTTA | TTGACCCATC | TGGCTCATTG | CCCTGACTTG | 1300 | |
| MS2-256.18P (DNA) | GTTGATAGAC | TGAGGCGTGA | ACAGGCCGAG | GTCTTTGGTA | AGGGGGATGG | 1350 | |
| MS2-256.18P (DNA) | TAGTGGAGAG | TTGGAAGATC | TAGATTACGA | TCGACTCCAA | ACACCTCTAT | 1400 | |
| MS2-256.18P (DNA) | TAAATCTTG | TATCAAAGAG | GTCTTACGTC | TACACCCCTC | CATTCAATCA | 1450 | |
| MS2-256.18P (DNA) | ATCTTGCACA | AAGTAAGTCT | GCCGTATGCT | TGAATCAGAA | ATGCGTTCAA | 1500 | |
| MS2-256.18P (DNA) | ATTAATTTTA | TTCTAGCAAA | TTGGTTCAAT | ICTGATATCA | ACTGTATAAA | 1550 | |
| MS2-256.18P (DNA) | TTCAATTAAC | TTTATTAGGT | TAAGTCACCG | ATCCTTGTTT | CCAAAACACT | 1600 | |
| MS2-256.18P (DNA) | CTCCTCAATT | GACAAGAACA | ACCAATACAT | CATACCCTCT | TCCCCTACG | 1650 | |
| MS2-256.18P (DNA) | TCCTAGCCCG | ACCTGGCGTC | TCTCAGATG | ATCCATCGGT | TTGGGACCAT | 1700 | |
| MS2-256.18P (DNA) | CCAAAAGAGT | TCAGACCAGA | GAGATGGCTA | TCGAACCTTA | AGAAAGATAA | 1750 | |
| MS2-256.18P (DNA) | GCAAGAACAG | GAGGAGGAGA | TGGTTGACTA | CGGCTTTGGA | GCGATCAGCA | 1800 | |
| MS2-256.18P (DNA) | GCGGAGCCAA | TTCGCCCTAT | CTACCCTTTG | GGGCTGGTCG | ACATCGGTGT | 1850 | |
| MS2-256.18P (DNA) | ATCGGAGAGC | AGTTTGCGTA | CATCCAGTTG | GCCGCCGTTG | CTGTTGCTGT | 1900 | I475T |
| MS2-256.18P (DNA) | CATTAGGAAC | TGCGACCTCG | AGCTCGTCAG | AAAGGAGTTC | CCICTACCTG | 1950 | |
| MS2-256.18P (DNA) | ATTATACCGT | AGAACAACC | TCAATTCCT | TTTTTCATCA | TGATTTTTTT | 2000 | |
| MS2-256.18P (DNA) | TATTAACCTAT | TTAATTTTTA | TAATTGAATG | AATACTTGTA | TAAAAACCAG | 2050 | |
| MS2-256.18P (DNA) | ACGATGTTAG | TTGGACCCAG | GAAACCTACA | ACTGTGAAGT | TTACTAGAAG | 2100 | |
| MS2-256.18P (DNA) | AAATTA | | | | | 2107 | |

(mRNA 1587)

Abbildung 6: DNA-Sequenz des CYP51-Gens von *Phakopsora pachyrhizi* am Beispiel des Wildtypeinsporisolates. Die fünf Intronsequenzen wurden farblich markiert und die derzeit bekannten Mutationsstellen hervorgehoben und entsprechend beschriftet. Die DNA-Sequenz des CYP51 entspricht einer Länge von 2107 Basenpaaren (bp) und die Länge der mRNA-Sequenz 1587 bp.

3.2.1.1 Mutationshäufigkeiten in der gDNA der Einsporisolate

Für die im vorherigen Kapitel 3.2.1 genannten, neuen Mutationen im CYP51 von *P. pachyrhizi* wurden Pyrosequenzierungsassays erstellt. Diese Methode bietet eine effiziente Möglichkeit einen quantitativen Nachweis der Mutationen in Populationen von *P. pachyrhizi* zu erbringen. In Tabelle 18 sind alle neun generierten und geprüften (Kapitel 3.1) Einsporisolate von *P. pachyrhizi* aufgelistet. Der Tabelle lassen sich alle identifizierten Mutationen der jeweiligen Isolate mit ihrem

entsprechenden Mutationsanteil im *CYP51*-, *SDHc*- und *CYTb*-Gen entnehmen. Hierbei wurde der quantitative Anteil der *CYP51*-Mutationen vorerst durch Pyrosequenzierung ermittelt und im Anschluss durch die Sequenzierung von 100 Klonen je Einsporisolat (Kapitel 3.2.2) bestätigt. Die F129L-Werte wurden mittels Pyrosequenzierung erfasst und die I86F-Werte konnten mithilfe einer qPCR identifiziert werden. Die *CYP51*-Mutationen K142R, I145F und I475T kamen in keinem der Einsporisolate vor und wurden somit nicht in der Tabelle aufgeführt. Aufgrund der 5 %igen Abweichung der Pyrosequenzierungsmethode wurden alle Werte > 95 % der F129L auf 100 % angepasst.

Tabelle 18: Mutationshäufigkeiten (%) in der gDNA der Einsporisolate von *Phakopsora pachyrhizi*. In der Tabelle sind alle Mutationen aufgelistet, die in den Einsporisolaten vorhanden sind. Die Mutationen K142R, I145F und I475T (*CYP51*) sind aus diesem Grund nicht aufgezeigt. Die Werte der *CYP51*-Mutationen wurden, neben einer Pyrosequenzierung, durch die Sequenzierung von jeweils 100 Klonen bestimmt. Die I86F-Werte wurden mittels qPCR und die F129L-Werte durch Pyrosequenzierung ermittelt. Aufgrund der 5 %igen Abweichung der Pyrosequenzierungsmethode wurden alle Werte > 95 % auf 100 % angepasst.

| Isolat | Mutationen (%) in gDNA | | | | | | | |
|-------------|------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------|-------------|
| | <i>CYP51</i> | | | | | | <i>SDHc</i> | <i>CYTb</i> |
| | F120L | V130A | Y131F | Y131H | I145V | F154Y | I86F | F129L |
| MS2-256/18P | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| MS1-256/18P | 19 | 19 | 19 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 |
| MS1-261/18P | 31 | 31 | 31 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 |
| MS2-261/18P | 30 | 30 | 30 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 |
| MS3-261/18P | 32 | 32 | 32 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 |
| MS5-259/18P | 50 | 0 | 0 | 50 | 0 | 0 | 50 | 100 |
| MS1-259/18P | 33 | 0 | 0 | 33 | 33 | 0 | 0 | 100 |
| MS3-259/18P | 35 | 0 | 0 | 35 | 35 | 0 | 0 | 100 |
| MS4-259/18P | 32 | 0 | 0 | 32 | 0 | 32 | 0 | 100 |

Der Tabelle 18 ist zu entnehmen, dass es sich bei dem Einsporisolat MS2-256/18P um ein sensitives WT-Einsporisolat handelt, welches weder Mutationen im *CYP51* noch im *SDHc* oder *CYTb* aufweist. Dieses Isolat diente im weiteren Verlauf der Arbeit (Sensitivitätsversuche) als Referenzisolat.

Des Weiteren ist zu vermerken, dass alle acht weiteren Einsporisolate die F129L im *CYTb*-Gen aufweisen. Im Hinblick auf die *CYP51*-Mutationen zeigen sich unterschiedliche Mutationskombinationen. MS1-256/18P und die drei Einsporisolate MS1-, MS2- und MS3-261/18P zeigen eine Kombination der Mutationen F120L + V130A + Y131F. Hier ergibt sich allerdings ein Unterschied in der Häufigkeit des Mutationsvorkommens. Während bei dem Isolat MS1-256/18P die Mutationen lediglich zu 19 % vorliegen, ist ein Anteil von ca. 30 % bei den weiteren drei Isolaten zu vermerken. Das Isolat MS5-259/18P, welches als einziges die *SDHc*-Mutation I86F (50 %) vorzuweisen hat, zeigt im *CYP51* die Mutationskombination F120L + Y131H, ebenfalls zu 50 %. Die Isolate MS1- und MS3-259/18P sind beide mit der Mutationskombination F120L + Y131H + I145V ausgestattet. Diese Kombination liegt in den Isolaten zu 33 % bzw. 35 % vor. Das Einsporisolat MS4-259/18P ist ebenfalls mit einer Mutationskombination, bestehend aus den drei Mutationen F120L + Y131H + F154Y, ausgestattet.

3.2.1.2 Mutationshäufigkeiten in der cDNA der Einsporisolate

Zusätzlich zu den Mutationshäufigkeiten in der gDNA wurde der quantitative Anteil, der in den Einsporisolaten von *P. pachyrrhizi* auftretenden Mutationen, in der cDNA bestimmt. Hierzu wurde die RNA der Einsporisolate extrahiert und in cDNA transkribiert. Im Anschluss wurde eine Pyrosequenzierung durchgeführt und die cDNA hinsichtlich der bekannten Mutationen überprüft. In Tabelle 19 sind alle Mutationshäufigkeiten sowohl der gDNA als auch der cDNA aufgeführt. Hierbei sind lediglich die *CYP51*-Mutationen gelistet, die in den Einsporisolaten vorkommen. Die Mutationen K142R, I145F und I475T sind somit nicht in der Tabelle aufgeführt.

Der Tabelle 19 lässt sich entnehmen, dass das WT-Einsporisolat in der cDNA ebenfalls keine Mutationen vorzuweisen hat. Bei den verbleibenden acht Einsporisolaten lässt sich grundsätzlich ein deutlich höherer Mutationsanteil in der cDNA als in der gDNA feststellen. Die Einsporisolate, die ca. 30 % Mutationshäufigkeiten in der gDNA aufzeigen, zeigen in der cDNA, unter Berücksichtigung der Schwankung bedingt durch die Pyrosequenzierungsmethode, Mutationshäufigkeiten von ca. 80 % auf. Auch das Einsporisolat MS5-259/18P, welches in der gDNA 50 % Mutationshäufigkeit aufzeigt, liegt in der cDNA bei 80 %. Lediglich das Einsporisolat MS1-256/18, welches 19 % Mutationshäufigkeit in der gDNA aufzeigt, hat ebenfalls geringere Werte in der cDNA. Hier liegt die Mutationshäufigkeit bei ca. 65 %.

Tabelle 19: Häufigkeit der Mutationen F120L, V130A, Y131F/H, I145V und F154Y im CYP51 der Einsporisolate von *Phakopsora pachyrhizi* in gDNA und cDNA. Die quantitative Ermittlung der Mutationshäufigkeiten in der gDNA erfolgte durch die Sequenzierung von 100 Klonen des CYP51 jedes Einsporisolates. Die Mutationshäufigkeiten der cDNA wurden mittels Pyrosequenzierung erfasst. Hierbei liegt die Nachweisgenauigkeit bei ca. 5 %. Folglich müssen bei den Werten der cDNA Abweichungen von ± 5 % berücksichtigt werden.

| Isolat | Mutationen (%) in gDNA und cDNA (CYP51) | | | | | | | | | | | |
|-------------|---|------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|
| | F120L | | V130A | | Y131F | | Y131H | | I145V | | F154Y | |
| | gDNA | cDNA | gDNA | cDNA | gDNA | cDNA | gDNA | cDNA | gDNA | cDNA | gDNA | cDNA |
| MS2-256/18P | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| MS1-256/18P | 19 | 65 | 19 | 64 | 19 | 65 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| MS1-261/18P | 31 | 79 | 31 | 86 | 31 | 86 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| MS2-261/18P | 30 | 80 | 30 | 78 | 30 | 83 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| MS3-261/18P | 32 | 81 | 32 | 75 | 32 | 80 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| MS5-259/18P | 50 | 79 | 0 | 0 | 0 | 0 | 50 | 83 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| MS1-259/18P | 33 | 79 | 0 | 0 | 0 | 0 | 33 | 86 | 33 | 79 | 0 | 0 |
| MS3-259/18P | 35 | 79 | 0 | 0 | 0 | 0 | 35 | 83 | 35 | 84 | 0 | 0 |
| MS4-259/18P | 32 | 78 | 0 | 0 | 0 | 0 | 32 | 85 | 0 | 0 | 32 | 84 |

3.2.2 Bestimmung der CYP51-Allelanzahl

Zur Ermittlung der Allelanzahl des CYP51 in *P. pachyrhizi* wurde das CYP51-Gen jedes Einsporisolates amplifiziert, in *E. coli* transformiert und kloniert. Je 100 Klone pro Einsporisolat wurden im Anschluss sequenziert und die Sequenzen in Geneious an die Wildtypsequenz von *P. pachyrhizi* angeglichen.

In Abbildung 7 wurden die CYP51-Sequenzen von 100 Klonen am Beispiel des Einsporisolates MS1-261/18P dargestellt. Der hier aufgezeigte Sequenzausschnitt zeigt den Bereich der mRNA (Introns wurden entfernt), welcher Unterschiede zu der Wildtypsequenz vorzuweisen hatte. Dieser Bereich erstreckt sich von bp 350–400 (mRNA). Übereinstimmungen mit der Wildtypsequenz wurden mit Punkten dargestellt. Bei Abweichungen wurden die entsprechenden Nukleotide aufgelistet. Die Sequenzen wurden von 1–100 durchnummeriert und zusätzlich befindet sich

Ergebnisse

hinter der Isolatbezeichnung die jeweilige spezifische Nummer des sequenzierten Klonen (MS1-261/18P-(1–100)).

| <i>P. pachyrhizi</i> (CYP51), Isolat MS1-261/18P | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|-----------|-----------|------------|------------|---------------|------------|-----|--------------------|-----------|-----------|------------|------------|------------|------------|-----------|-----|
| Mutation F120L | | | | | V130A + Y131F | | | | | | | | | | | |
| Wildtypsequenz | CACCCAT | TTC | ACTACACCTG | TCTTTGGTAA | GGATGTAGTC | TACGATGTAC | 400 | Wildtypsequenz | CACCCAT | TTC | ACTACACCTG | TCTTTGGTAA | GGATGTAGTC | TACGATGTAC | 400 | |
| Aminosäure | F | | | | V | Y | | Aminosäure | F | | | | V | Y | | |
| 1 MS1-261/18P-5 | | A | | | C | . TT | 400 | 51 MS1-261/18P-61 | | | | | | T | 400 | |
| 2 MS1-261/18P-8 | | L | | | A | F | 400 | 52 MS1-261/18P-64 | | F | | | | V | Y | 400 |
| 3 MS1-261/18P-22 | | | | | | | 400 | 53 MS1-261/18P-72 | | | | | | | | 400 |
| 4 MS1-261/18P-24 | | | | | | | 400 | 54 MS1-261/18P-73 | | | | | | | | 400 |
| 5 MS1-261/18P-25 | | | | | | | 400 | 55 MS1-261/18P-77 | | | | | | | | 400 |
| 6 MS1-261/18P-27 | | | | | | | 400 | 56 MS1-261/18P-82 | | | | | | | | 400 |
| 7 MS1-261/18P-28 | | | | | | | 400 | 57 MS1-261/18P-83 | | | | | | | | 400 |
| 8 MS1-261/18P-29 | | | | | | | 400 | 58 MS1-261/18P-87 | | | | | | | | 400 |
| 9 MS1-261/18P-32 | | | | | | | 400 | 59 MS1-261/18P-91 | | | | | | | | 400 |
| 10 MS1-261/18P-33 | | | | | | | 400 | 60 MS1-261/18P-95 | | | | | | | | 400 |
| 11 MS1-261/18P-35 | | | | | | | 400 | 61 MS1-261/18P-97 | | | | | | | | 400 |
| 12 MS1-261/18P-41 | | | | | | | 400 | 62 MS1-261/18P-98 | | | | | | | | 400 |
| 13 MS1-261/18P-42 | | | | | | | 400 | 63 MS1-261/18P-100 | | | | | | | | 400 |
| 14 MS1-261/18P-43 | | | | | | | 400 | 64 MS1-261/18P-1 | | | | | | | | 400 |
| 15 MS1-261/18P-44 | | | | | | | 400 | 65 MS1-261/18P-2 | | | | | | | | 400 |
| 16 MS1-261/18P-47 | | | | | | | 400 | 66 MS1-261/18P-3 | | | | | | | | 400 |
| 17 MS1-261/18P-48 | | | | | | | 400 | 67 MS1-261/18P-6 | | | | | | | | 400 |
| 18 MS1-261/18P-58 | | | | | | | 400 | 68 MS1-261/18P-9 | | | | | | | | 400 |
| 19 MS1-261/18P-63 | | | | | | | 400 | 69 MS1-261/18P-10 | | | | | | | | 400 |
| 20 MS1-261/18P-65 | | | | | | | 400 | 70 MS1-261/18P-11 | | | | | | | | 400 |
| 21 MS1-261/18P-66 | | | | | | | 400 | 71 MS1-261/18P-12 | | | | | | | | 400 |
| 22 MS1-261/18P-68 | | | | | | | 400 | 72 MS1-261/18P-14 | | | | | | | | 400 |
| 23 MS1-261/18P-69 | | | | | | | 400 | 73 MS1-261/18P-15 | | | | | | | | 400 |
| 24 MS1-261/18P-71 | | | | | | | 400 | 74 MS1-261/18P-23 | | | | | | | | 400 |
| 25 MS1-261/18P-76 | | | | | | | 400 | 75 MS1-261/18P-26 | | | | | | | | 400 |
| 26 MS1-261/18P-80 | | | | | | | 400 | 76 MS1-261/18P-30 | | | | | | | | 400 |
| 27 MS1-261/18P-84 | | | | | | | 400 | 77 MS1-261/18P-37 | | | | | | | | 400 |
| 28 MS1-261/18P-85 | | | | | | | 400 | 78 MS1-261/18P-38 | | | | | | | | 400 |
| 29 MS1-261/18P-86 | | | | | | | 400 | 79 MS1-261/18P-40 | | | | | | | | 400 |
| 30 MS1-261/18P-89 | | | | | | | 400 | 80 MS1-261/18P-45 | | | | | | | | 400 |
| 31 MS1-261/18P-96 | | | | | | | 400 | 81 MS1-261/18P-46 | | | | | | | | 400 |
| 32 MS1-261/18P-4 | | | | | | | 400 | 82 MS1-261/18P-49 | | | | | | | | 400 |
| 33 MS1-261/18P-7 | | | | | | | 400 | 83 MS1-261/18P-51 | | | | | | | | 400 |
| 34 MS1-261/18P-13 | | | | | | | 400 | 84 MS1-261/18P-52 | | | | | | | | 400 |
| 35 MS1-261/18P-16 | | | | | | | 400 | 85 MS1-261/18P-53 | | | | | | | | 400 |
| 36 MS1-261/18P-17 | | | | | | | 400 | 86 MS1-261/18P-59 | | | | | | | | 400 |
| 37 MS1-261/18P-18 | | | | | | | 400 | 87 MS1-261/18P-62 | | | | | | | | 400 |
| 38 MS1-261/18P-19 | | | | | | | 400 | 88 MS1-261/18P-67 | | | | | | | | 400 |
| 39 MS1-261/18P-20 | | | | | | | 400 | 89 MS1-261/18P-70 | | | | | | | | 400 |
| 40 MS1-261/18P-21 | | | | | | | 400 | 90 MS1-261/18P-74 | | | | | | | | 400 |
| 41 MS1-261/18P-31 | | | | | | | 400 | 91 MS1-261/18P-75 | | | | | | | | 400 |
| 42 MS1-261/18P-34 | | | | | | | 400 | 92 MS1-261/18P-78 | | | | | | | | 400 |
| 43 MS1-261/18P-36 | | | | | | | 400 | 93 MS1-261/18P-79 | | | | | | | | 400 |
| 44 MS1-261/18P-39 | | | | | | | 400 | 94 MS1-261/18P-81 | | | | | | | | 400 |
| 45 MS1-261/18P-50 | | | | | | | 400 | 95 MS1-261/18P-88 | | | | | | | | 400 |
| 46 MS1-261/18P-54 | | | | | | | 400 | 96 MS1-261/18P-90 | | | | | | | | 400 |
| 47 MS1-261/18P-55 | | | | | | | 400 | 97 MS1-261/18P-92 | | | | | | | | 400 |
| 48 MS1-261/18P-56 | | | | | | | 400 | 98 MS1-261/18P-93 | | | | | | | | 400 |
| 49 MS1-261/18P-57 | | | | | | | 400 | 99 MS1-261/18P-94 | | | | | | | | 400 |
| 50 MS1-261/18P-60 | | | | | | | 400 | 100 MS1-261/18P-99 | | | | | | | | 400 |

Abbildung 7: 100 CYP51-Sequenzen des Einsporisolates MS1-261/18P von *Phakopsora pachyrhizi*. Das CYP51-Gen wurde amplifiziert, in *Escherichia coli* transformiert, kloniert und 100 Sequenzen ausgewertet. In dieser Abbildung ist ein Ausschnitt der CYP51-Sequenz (350–400 bp) mit den für dieses Einsporisolat relevanten Mutationsstellen aufgeführt. Übereinstimmungen mit der Wildtypsequenz werden mit Punkten dargestellt und bei Abweichungen sind die entsprechenden Nukleotide aufgelistet. Die Mutationskombination (F120L + V130A + Y131F) ist in diesem Isolat in 31 Klonen und somit zu 31 % vorhanden. Die Klone 32–63 enthalten an der Stelle 131 ein TAT wohingegen die Klone 64–100 an dieser Stelle ein TAC enthalten. In beiden Fällen wird die Aminosäure Tyrosin codiert.

Im Vergleich zur Referenzwildtypsequenz lässt sich erkennen, dass Isolat MS1-261/18P mit den Mutationen F120L + V130A + Y131F ausgestattet ist. Diese Mutationskombination lässt sich in 31 der 100 Sequenzen und somit zu 31 % nachweisen. In diesen Sequenzen liegen die Mutationen immer verknüpft auf einem DNA- bzw. mRNA-Strang vor. An Sequenz 1 wird beispielhaft verdeutlicht, zu welchen Aminosäureveränderungen die Mutationen F120L + V130A + Y131F jeweils führen. Eine detaillierte Auflistung der derzeit bekannten Mutationen im CYP51 von *P. pachyrhizi* ist zusätzlich in Tabelle 17 aufgeführt. In den Sequenzen

32–63 ist in Codon 131 ein weiterer Nukleotidaustausch zu vermerken. Hierbei handelt es sich um ein TAT und nicht, wie in der Referenzsequenz, um ein TAC. Diese stille Mutation an der dritten Stelle im Codon bewirkt allerdings keine Veränderung der codierten Aminosäure. Wie an Sequenz 51 stellvertretend aufgezeigt, wird in beiden Fällen die Aminosäure Tyrosin codiert. Die Sequenzen 64–100 zeigen keinerlei Unterschiede zu der Referenzsequenz und sind somit mit dem WT gleichzusetzen. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird zwischen Wildtyp 1 (WT1) und Wildtyp 2 (WT2) unterschieden. WT2 entspricht somit der Sequenz der Klone 32–63 mit der stillen Mutation in Codon 131. Da es hier lediglich zu einem Nukleotidaustausch (TAC → TAT) und nicht zu einer Veränderung der Aminosäureabfolge kommt, kann auch in diesem Fall von einer WT-Sequenz gesprochen werden. WT1 repräsentiert weiterhin die bereits zuvor als WT identifizierte Sequenz.

Wie an dem Einsporisolat MS1-261/18P beispielhaft aufgeführt, wurden auch die verbliebenen acht Einsporisolate sequenziert und ausgewertet. Mit Ausnahme des WT-Einsporisolates (MS2-256/18P), welches in allen 100 Sequenzen den WT1 aufzeigte, sind die Ergebnisse der verbleibenden sieben Einsporisolate sowohl in Abbildung 8 als auch Abbildung 9 in verkürzter Form dargestellt. Hierbei wurden die in Abbildung 7 beispielhaft aufgeführten, 100 Sequenzen hinsichtlich ihrer Nukleotidaustausche (Mutant, WT1, WT2) des jeweiligen Einsporisolates von *P. pachyrhizi* zusammengefasst. Somit lässt sich den Grafiken zum einen die Information entnehmen, welche die jeweils für dieses Einsporisolat relevanten Mutationsstellen sind und zum anderen ist der quantitative Anteil der jeweiligen Sequenzen (Mutant, WT1, WT2) verdeutlicht.

Das Einsporisolat MS1-259/18P (Abbildung 8, A) weist die Mutationskombination F120L + Y131H + I145V in 33 der 100 Sequenzen auf (33 %). Die drei Mutationen liegen hierbei immer verknüpft auf einem DNA-Strang vor. Die Sequenzen 34–76 entsprechen der WT2-Sequenzabfolge mit einer stummen Mutation in Codon 131 (TAT). Dies entspricht einem Anteil des WT2 von 34 %. Die Sequenzen 68–100 repräsentieren in diesem Isolat den WT1 und stellen einen Anteil von 33 % der Gesamtsequenzen dar. Einsporisolat MS3-259/18P (Abbildung 8, B) unterscheidet sich gering von Einsporisolat (A). Die Mutationskombination (F120L + Y131H + I145V) ist identisch und lediglich die Anzahl der einzelnen Sequenztypen unterscheidet sich. Somit liegt die Mutationshäufigkeit in diesem Isolat bei 35 % (Sequenz 1–35), der Anteil des WT2 bei 33 % (Sequenz 36–68) und der Anteil des WT1 bei 32 % (Sequenz 96–100). Das Einsporisolat MS4-259/18P (Abbildung 8, C) zeigt im Gegensatz hierzu eine andere Mutationskombination. Hier liegen die Mutationen F120L + Y131H + F154Y zu 32 % verknüpft auf einem DNA-Strang vor (Sequenz 1–32). Allerdings lässt sich auch hier sowohl WT2 (Sequenz

33–67 \cong 35 %) als auch WT1 (Sequenz 68–100 \cong 33 %) in einem nahezu gleichen Verhältnis identifizieren.

| | | |
|------------------|--|---|
| A | <i>P. pachyrhizi</i> (CYP51) Isolat MS1-259/18P | |
| | Mutation | F120L Y131H I145V |
| | Wildtypsequenz | CACCCATTTC ACTACACCTG TCTTTGGTAA GGATGTAGTC TACGATGTAC CCAACTOGAT CCTAATGCAG CAGAAAAAGT TCATCAAGGC 440 |
| | Aminosäure | F Y I |
| Sequenz 1 - 33 | MS1-259/18P |A.....C.T.....G.....440L.....H.....V..... |
| Sequenz 34 - 67 | MS1-259/18P |F.....T.....I.....440F.....Y.....I..... |
| Sequenz 68 - 100 | MS1-259/18P |F.....Y.....I.....440F.....Y.....I..... |
| B | <i>P. pachyrhizi</i> (CYP51) Isolat MS3-259/18P | |
| | Mutation | F120L Y131H I145V |
| | Wildtypsequenz | CACCCATTTC ACTACACCTG TCTTTGGTAA GGATGTAGTC TACGATGTAC CCAACTOGAT CCTAATGCAG CAGAAAAAGT TCATCAAGGC 440 |
| | Aminosäure | F Y I |
| Sequenz 1 - 35 | MS3-259/18P |A.....C.T.....G.....440L.....H.....V..... |
| Sequenz 36 - 68 | MS3-259/18P |F.....T.....I.....440F.....Y.....I..... |
| Sequenz 69 - 100 | MS3-259/18P |F.....Y.....I.....440F.....Y.....I..... |
| C | <i>P. pachyrhizi</i> (CYP51) Isolat MS4-259/18P | |
| | Mutation | F120L Y131H F154Y |
| | Wildtypsequenz | CACCCATTTC ACTACACCTG TCTTTGGTAA GGATGTAGTC TACGATGTAC CCAACTOGAT CCTAATGCAG CAGAAAAAGT TCATCAAGGC TGGCCTTACT ACTGAGAAAT TTAAGAAATA 470 |
| | Aminosäure | F Y I F |
| Sequenz 1 - 32 | MS4-259/18P |A.....C.T.....A.....470L.....H.....Y..... |
| Sequenz 33 - 67 | MS4-259/18P |F.....T.....F.....470F.....Y.....F..... |
| Sequenz 68 - 100 | MS4-259/18P |F.....Y.....F.....470F.....Y.....F..... |

Abbildung 8: Verkürzte Darstellung von 100 CYP51-Sequenzen der Einsporisolate MS1-259/18P (A), MS3-259/18P (B) und MS4-259/18P (C) von *Phakopsora pachyrhizi*. Das CYP51-Gen wurde amplifiziert, in *Escherichia coli* transformiert, kloniert und 100 Sequenzen je Isolat sequenziert. In dieser Abbildung ist jeweils der Ausschnitt der CYP51-Sequenz (350–400/470 bp) mit den für jedes der drei Einsporisolate relevanten Mutationsstellen aufgeführt. Übereinstimmungen mit der Wildtypsequenz werden mit Punkten dargestellt und bei Abweichungen werden die entsprechenden Nukleotide aufgelistet. In den Isolaten (A) + (B) ist jeweils die Mutationskombination F120L + Y131H + I145V vorhanden. Isolat (C) weist hingegen die Mutationskombination F120L + Y131H + F154Y auf. Der quantitative Anteil der jeweiligen Sequenzen (Mutant (Mutationskombination), WT1 (TAC an Codon 131), WT2 (TAT an Codon131)) lässt sich ebenfalls der Abbildung entnehmen.

In der nachfolgenden Abbildung 9 sind die verbleibenden vier Einsporisolate gelistet. Auch hier wurden die 100 einzeln aufgelisteten Sequenzen hinsichtlich ihrer Nukleotidaustausche (Mutant, WT1, WT2) zur besseren Übersicht zusammengefasst. Es ist der Bereich der mRNA von bp 350–400 abgebildet.

Sowohl die Einsporisolate MS1-256/18P (Abbildung 9, A) und MS2-261/18P (Abbildung 9, B) als auch das Einsporisolat MS3-261/18P (Abbildung 9, C) weisen die Mutationskombination F120L + V130A + Y131F auf, welche immer verknüpft auf einem DNA-Strang vorliegt. Lediglich in der jeweiligen Anzahl der mutierten Sequenzen unterscheiden sich die Einsporisolate. Während bei Isolat (B) und (C) je 30 % und 32 % der Sequenzen die Mutationskombination aufzeigt, sind es bei Isolat (A) lediglich 19 %. Dementsprechend ist in diesem Isolat ein höherer Anteil der WT-Sequenzen zu vermerken. WT2 ist mit einem Anteil von 32 % (Sequenz 20–51) vertreten,

wohingegen W1 einen Anteil von 49 % (Sequenz 52–100) der Sequenzen repräsentiert. Im direkten Vergleich zwischen (B) und (C) ist zu erkennen, dass zwar der Anteil der mutierten Sequenzen gleich ist, sich allerdings der jeweilige Anteil der WT1 und WT2 Sequenzen unterscheiden. Während in Isolat (B) 33 % WT2 und 37 % WT1 vorliegen, sind es bei Isolat (C) 48 % WT2 und lediglich 20 % WT1. Das Einsporisolat MS5-259/18P (Abbildung 9, D) enthält die Mutationskombination (F120L + Y131H). Hierbei sind 50 % der sequenzierten DNA-Stränge mit dieser Mutationskombination ausgestattet. Erneut liegen die Mutationen gepaart auf einem Strang vor (Sequenz 1–50). Auch in diesem Isolat existiert sowohl der WT2 (Sequenz 51–69 \cong 19 %) als auch WT1 (Sequenz 70–100 \cong 31 %).

| | | |
|------------------|------------------------------|--|
| A | <i>P. pachyrhizi</i> (CYP51) | |
| | Isolat MS1-256/18P | |
| | Mutation | F120L V130A + Y131F |
| | Wildtypsequenz | CACCCATTC ACTACACCTG TCITTTGGTAA GGATGTAGTC TACGATGTAC 400 |
| Aminosäure | F V Y | |
| Sequenz 1 - 19 | MS1-256/18P |A.....C..TT..... 400 |
| Sequenz 20 - 51 | MS1-256/18P |L.....A F.....T..... 400 |
| Sequenz 53 - 100 | MS1-256/18P |F.....V Y..... 400 |
| | |F.....V Y..... 400 |
| B | <i>P. pachyrhizi</i> (CYP51) | |
| | Isolat MS2-261/18P | |
| | Mutation | F120L V130A + Y131F |
| | Wildtypsequenz | CACCCATTC ACTACACCTG TCITTTGGTAA GGATGTAGTC TACGATGTAC 400 |
| Aminosäure | F V Y | |
| Sequenz 1 - 30 | MS2-261/18P |A.....C..TT..... 400 |
| Sequenz 31 - 63 | MS2-261/18P |L.....A F.....T..... 400 |
| Sequenz 64 - 100 | MS2-261/18P |F.....V Y..... 400 |
| | |F.....V Y..... 400 |
| C | <i>P. pachyrhizi</i> (CYP51) | |
| | Isolat MS3-261/18P | |
| | Mutation | F120L V130A + Y131F |
| | Wildtypsequenz | CACCCATTC ACTACACCTG TCITTTGGTAA GGATGTAGTC TACGATGTAC 400 |
| Aminosäure | F V Y | |
| Sequenz 1 - 32 | MS3-261/18P |A.....C..TT..... 400 |
| Sequenz 33 - 80 | MS3-261/18P |L.....A F.....T..... 400 |
| Sequenz 81 - 100 | MS3-261/18P |F.....V Y..... 400 |
| | |F.....V Y..... 400 |
| D | <i>P. pachyrhizi</i> (CYP51) | |
| | Isolat MS5-259/18P | |
| | Mutation | F120L Y131H |
| | Wildtypsequenz | CACCCATTC ACTACACCTG TCITTTGGTAA GGATGTAGTC TACGATGTAC 400 |
| Aminosäure | F Y | |
| Sequenz 1 - 50 | MS5-259/18P |A.....C.T..... 400 |
| Sequenz 51 - 69 | MS5-259/18P |L.....H.....T..... 400 |
| Sequenz 70 - 100 | MS5-259/18P |F.....Y..... 400 |
| | |F.....Y..... 400 |

Abbildung 9: Verkürzte Darstellung von 100 CYP51-Sequenzen der Einsporisolate MS1-256/18P (A), MS2-261/18P (B), MS3-261/18P (C) und MS5-259/18P (D) von *Phakopsora pachyrhizi*. Das CYP51-Gen wurde amplifiziert, in *Escherichia coli* transformiert, kloniert und 100 Sequenzen je Einsporisolat sequenziert. In dieser Abbildung ist jeweils der Ausschnitt der CYP51-Sequenz (350–400/470 bp) mit den relevanten Mutationsstellen aufgeführt. Übereinstimmungen mit der Wildtypsequenz werden mit Punkten dargestellt und bei Abweichungen werden die entsprechenden Nukleotide aufgelistet. In den Isolaten (A) + (B) + (C) ist jeweils die Mutationskombination F120L + V130A + Y131F vorhanden. Isolat (D) weist hingegen die Mutationskombination F120L + Y131H auf. Der quantitative Anteil der jeweiligen Sequenzen (Mutant (Mutationskombination), WT1 (TAC an Codon 131), WT2 (TAT an Codon131)) lässt sich ebenfalls der Abbildung entnehmen.

3.2.3 Vergleich von *CYP51*-Sequenzen unterschiedlicher Pilze

Die *CYP51*-Sequenzen verschiedener Pilze wurden hinsichtlich ihrer Unterschiede sowohl im Hinblick auf die Nukleotid- als auch Aminosäure-Sequenz bewertet. Hierzu wurde die WT-Sequenz (mRNA) von *P. pachyrrhizi* mit den *CYP51*-Sequenzen zwölf weiterer Pilze in Geneious Prime® unter Verwendung des Muscle-Alignment angeglichen. Die *CYP51*-Sequenz von *P. pachyrrhizi* diente als Referenzsequenz und anhand dieser wurde sich im folgenden Kapitel, z. B. im Hinblick auf die Aminosäuren-Nummerierung, gerichtet. Das entstandene Alignment ist Abbildung 10 zu entnehmen. Neben der vollständigen Benennung der Pathogene wurde in der Abbildung ebenfalls der EPPO-Code aufgeführt, welcher im weiteren Verlauf dieses Kapitels stellvertretend genannt wird. Alle Unterschiede in den Sequenzen der Pathogene im Vergleich zur PHAKPA-Sequenz wurden farblich hervorgehoben. Jedes Nukleotid und jede Aminosäure erhielten hierbei eine spezifische Farbe. Der in Abbildung 10 aufgezeigte Bereich der mRNA-Sequenz erstreckt sich von bp 350–470 sowie bp 1415–1435. Da PHAKPA als Referenz verwendet wurde, sind zusätzlich alle bekannten Mutationen von PHAKPA mit der jeweiligen Veränderung in der Nukleotidsequenz an der entsprechenden Position der Sequenz gekennzeichnet.

Bei den verwendeten Pathogensequenzen handelt es sich, mit Ausnahme von CANDAL, um phytopathogene Pilze. Hierbei zeigen PHAKPA und PUCCR, aufgrund ihrer gemeinsamen Ordnung der Rostpilze (Pucciniales) innerhalb des Stamms der Basidiomycota, den engsten Verwandtschaftsgrad auf. Die verbleibenden Pilze sind dem Stamm der Ascomycota zuzuordnen. SEPTTR, CERCBE, RAMUCC, PYRNTR, LEPTBG, PLEOAL und VENTIN sind hierbei in der Klasse der Dothideomycetes zu finden, während UNCINE, ERYSGT und BOTRCI der Klasse der Leotiomyces zugeordnet werden. CANDAL ist der Klasse der Saccharomycotina zugehörig und zählt somit zu den Hefepilzen (EPPO, 2022).

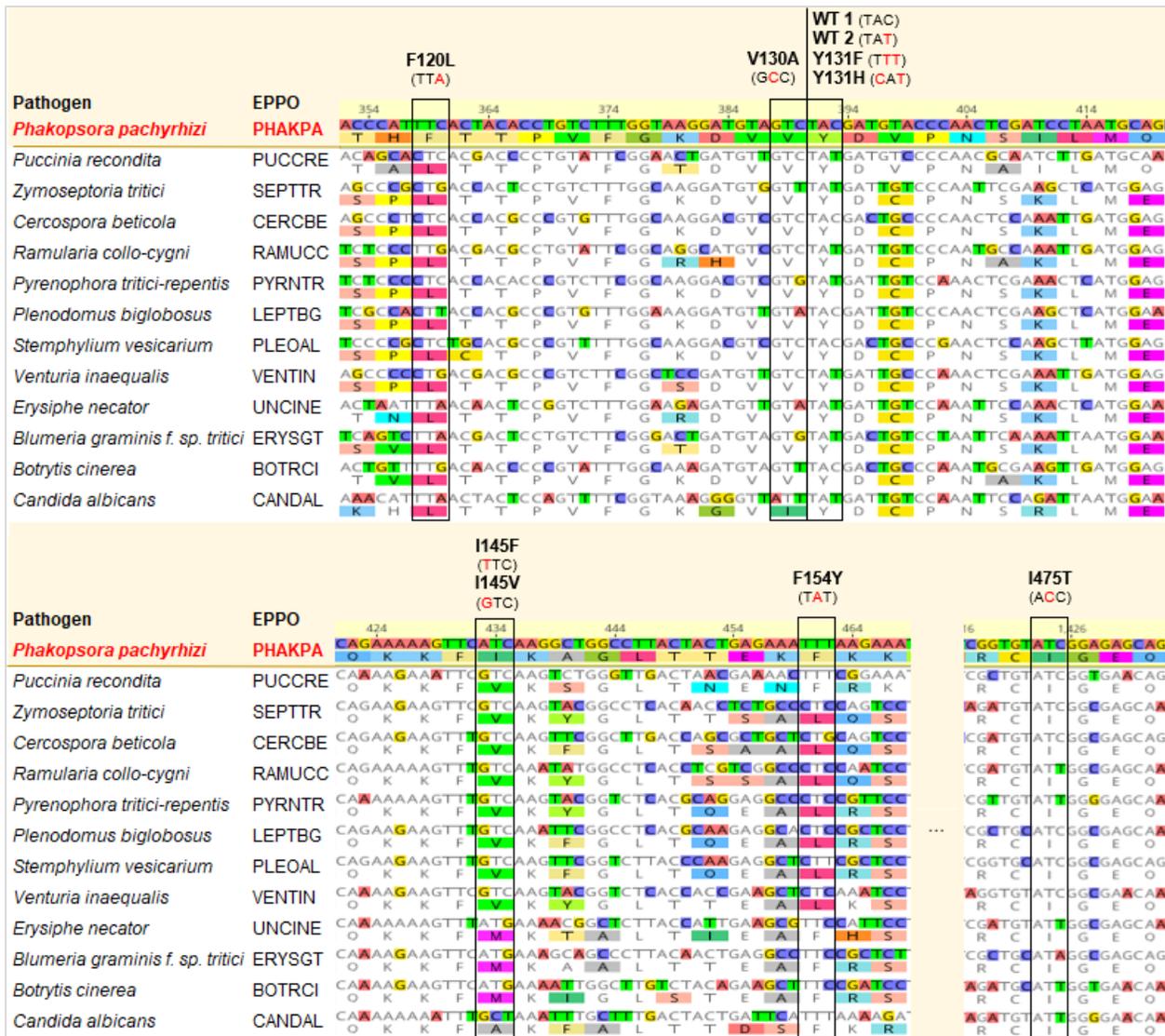


Abbildung 10: Vergleich eines Ausschnitts der CYP51-Nukleotid- und Aminosäuresequenz von *Phakopsora pachyrhizi* und weiteren Pilzen. Hierbei wurde die Wildtypsequenz der mRNA der unterschiedlichen Pilze verwendet. Die Nukleotide bzw. Aminosäuren, welche von der Wildtypsequenz von *P. pachyrhizi* abweichen, sind farblich hervorgehoben. Das Alignment wurden mit Geneious Prime® unter Verwendung des Muscle-Alignment erstellt. Zusätzlich wurden alle bekannten Mutationen in *P. pachyrhizi* mit der jeweiligen Veränderung in der Nukleotidsequenz an der entsprechenden Position der Sequenz markiert.

Der Abbildung 10 lässt sich entnehmen, dass an der Aminosäureposition 120, der PHAKPA WT-Sequenz, Phenylalanin (F) codiert wird, wohingegen in allen weiteren Pathogenen Leucin (L) vorliegt. Die weit verbreitete Mutation F120L (F → L) in PHAKPA codiert somit eine Aminosäure, welche in anderen Pilzen bereits im WT vorhanden ist.

Zwischen Aminosäure 120 und 133 liegt ein weitgehend konservierter Bereich vor. Nur in einzelnen Fällen (z. B. Position 127) werden unterschiedliche Aminosäuren codiert. In diesem

konservierten Bereich befinden sich die Positionen der Mutationen V130A, Y131F und Y131H von PHAKPA. Es lässt sich erkennen, dass in fast allen aufgeführten Pathogenen an Stelle 130 ein Valin (V) und an Stelle 131 ein Tyrosin (Y) gebildet wird (einzige Ausnahme ist CANDAL). An Position 131 kommt es in einigen Pathogenen, ebenso wie bei PHAKPA, durch eine Mutation zu einer Veränderung der codierten Aminosäure (Tyrosin → Phenylalanin). Hierbei handelt es sich z. B. um ERYSGT und ERYSGH (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*), welche beide die homologe Mutation Y136F ausbilden können (Frenkel et al., 2015; Price et al., 2015). Zusätzlich wurde die Mutation bei UNCINE (Y136F) (Price et al., 2015), VENTIN (Y133F) (Hoffmeister et al., 2021) und bei *P. triticina* (PUCCRT) (Y134F) identifiziert (Stammler et al., 2009; Price et al., 2015). Sowohl RAMUCC (V136A + Y137F) (Rehfus et al., 2019) als auch SEPTTR (V136A/C/G + Y137F) (Stammler et al., 2008; Price et al., 2015; Wieczorek et al., 2015; Huf et al., 2018) weisen an Position 130 und 131 homologe Mutationen zu PHAKPA auf. Des Weiteren lässt sich der Abbildung 10 entnehmen, dass bei allen gelisteten Pathogenen an Position 131 an der dritten Stelle im Triplet entweder ein C oder ein T vorzufinden ist. In beiden Fällen wird Tyrosin codiert. Wie in Kapitel 3.2.2 näher erläutert wurde, konnten in den PHAKPA Einsporisolaten, innerhalb eines Isolates beide Fälle, d. h. sowohl C als auch T, identifiziert werden (WT1 und WT2). Einzige Ausnahme bildet hierbei das sensitive WT-Einsporisolat, welches in 100 Klonsequenzen an dieser Position ausschließlich ein C (WT1) aufwies.

An Position 145 der Aminosäuresequenz ist in der PHAKPA WT-Sequenz ein Isoleucin (I) vorhanden, welches durch zwei unterschiedliche SNPs entweder zu einem Phenylalanin (F) oder zu einem Valin (V) codiert werden kann. In keinem anderen, hier aufgeführten Pathogen, befindet sich an dieser Position ein Isoleucin in der WT-Sequenz. Auffallend ist, dass in der WT-Sequenz von PUCCR, SEPTTR, CERCBE, RAMUCC, PYRNTR, LEPTBG, PLEOAL und VENTIN ein Valin mit derselben Nukleotidsequenz (GTC) wie bei der Mutation I145V in PHAKPA codiert wird.

Eine weitere, in dieser Arbeit neu identifizierte, Mutationsstelle ist an Position 154 vorzufinden. Hier wird im Falle des SNPs aus Phenylalanin (F) ein Tyrosin (Y). Ein Phenylalanin ist an dieser Position ebenso bei PUCCR, UNCINE, ERYSGT, BOTRCI und CANDAL in der WT-Sequenz zu finden. In allen weiteren hier aufgezeigten Pathogenen wird ein Leucin (L) codiert.

Die letzte in PHAKPA bekannte Mutation befindet sich an Position 475. Auch hier handelt es sich, wie bereits an Aminosäureposition 130 und 131, um einen konservierten Bereich. Somit wird neben PHAKPA in allen hier gelisteten Pathogenen an der Stelle 475 ein Isoleucin (I) codiert.

Grundsätzlich lässt sich der, zuvor in diesem Kapitel erwähnte, Verwandtschaftsgrad der Pathogene anhand ihrer Sequenzunterschiede in dem hier aufgezeigten Abschnitt ableiten. Somit

zeigen PHAKPA und PUCCR aufgrund ihrer gemeinsamen Ordnung der Rostpilze die meisten Ähnlichkeiten in dem hier gezeigten *CYP51*-Abschnitt auf. Eine weitere Gruppe bilden SEPTTR, CERCBE, RAMUCC, PYRNTR, LEPTBG, PLEOAL und VENTIN, die der Klasse der Dothideomycetes (Ascomycota) zuzuordnen sind. Auch UNCINE, ERYSGT und BOTRCI zeigen Gemeinsamkeiten (z. B. Position 145). CANDAL zeigt die meisten Unterschiede im Vergleich zur PHAKPA WT-Sequenz auf.

3.2.4 Proteinmodellierung des CYP51 unter Berücksichtigung der bekannten Mutationen in *P. pachyrhizi*

Zur besseren Einschätzung der Positionen, der in dieser Arbeit neu identifizierten, Resistenzmutationen V130A, I145V und F154Y in der CYP51-Proteinstruktur von *P. pachyrhizi*, wurde ein Homologiemodell mit Hilfe der Software Molecular Operating Environment (MOE) erstellt (Abbildung 11). Da bisher keine Kristallstruktur des CYP51 von *P. pachyrhizi* verfügbar ist, basiert das Modell auf einer experimentellen Struktur des CYP51-Proteins von *Aspergillus fumigatus* (PDB ID: 6CR2). Das CYP51-Protein (WT) wurde mithilfe von Dr. Ian Craig (BASF SE) modelliert und die Aminosäuren, die als Positionen der in *P. pachyrhizi* vorkommenden Mutationen identifiziert wurden, farblich (gelb) hervorgehoben und entsprechend gekennzeichnet. Zur Veranschaulichung des aktiven Zentrums wurde in das Modell eine DMI-Struktur (pink) hinzugefügt, welche analog zu dem in Pharmaziestudien verwendeten VNI ((N-1-(2,4-dichlorophenyl) 2-(1H-imidazol-1-yl)ethyl)-4-(5-phenyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)benzamide) ist. Abbildung 11 (A) zeigt das CYP51-Protein mit allen Positionen bereits bekannter und neu identifizierter Mutationen in *P. pachyrhizi*. Des Weiteren wird die Lage der Häm-Gruppe (türkis), des DMI (pink) und somit die Lage des aktiven Zentrums des Proteins verdeutlicht. In Abbildung 11 (B) wird das aktive Zentrum mit Häm-Gruppe, DMI und anliegenden Mutationen in einer vergrößerten Version dargestellt.

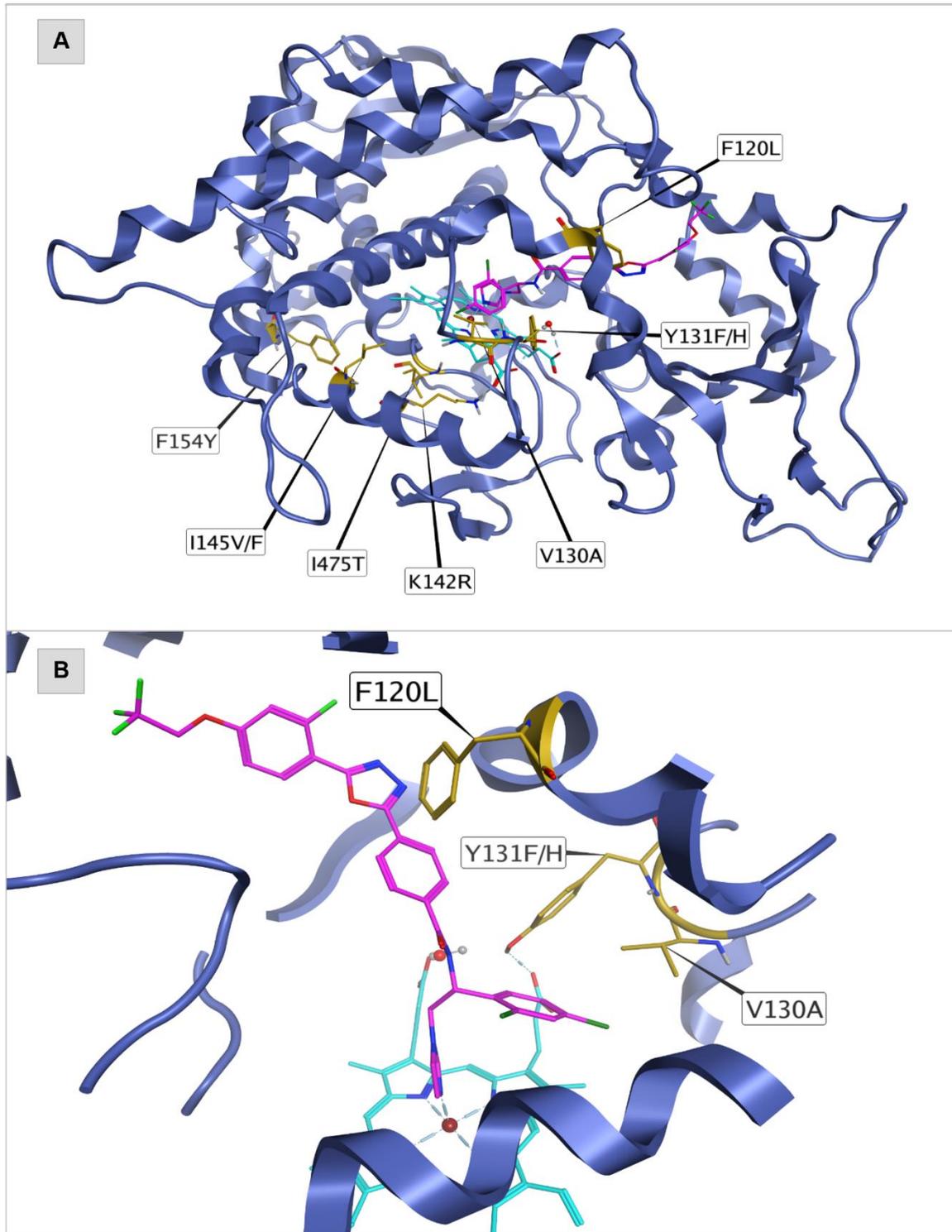


Abbildung 11: Homologiemodell des Sterol-14- α -Demethylase-Enzyms (CYP51) von *Phakopsora pachyrhizi* mit Darstellung der Lage der Aminosäuren des Wildtyps (gelb), die als Position der bekannten Mutationsstellen identifiziert wurden. Das Homologiemodell basiert auf der Röntgenstruktur des CYP51-Enzyms von *Aspergillus fumigatus* (PDB ID: 6CR2). Die Struktur des Enzyms ist in blau und die Häm-Gruppe in türkis (Strichmodell) dargestellt. Innerhalb des aktiven Zentrums des Enzyms, ist die Struktur eines DMI (VNI) (pink) abgebildet. (A) zeigt einen Überblick des kompletten Enzyms wohingegen (B) eine Nahaufnahme des aktiven Zentrums mit Häm-Gruppe und DMI darstellt.

Der Abbildung 11 (A) lässt sich entnehmen, dass sich die jeweiligen Mutationsstellen in *P. pachyrhizi* an unterschiedlichen Positionen befinden: Während die Aminosäuren an Position 120, 130 und 131 im aktiven Zentrum und somit in engerem Kontakt zum DMI liegen (Abbildung 11, B), befinden sich die Aminosäuren an Position 142, 145, 154 und 475 nicht in direkter Verbindung zum aktiven Zentrum des Enzyms. Die Aminosäuren K142, I145 und I475 stehen hingegen in engem Kontakt zu der Häm-Gruppe, wohingegen die Aminosäure F154 die weiteste Entfernung sowohl zu der Häm-Gruppe als auch zu der DMI-Bindungsstelle aufweist. Bei der neuen Mutation V130A ist durch die Lage innerhalb des aktiven Zentrums ein direkter Einfluss mittels Van-der-Waals-Kräfte auf die Bindung des DMI wahrscheinlich. Die neue Mutation I145V hingegen, übt möglicherweise einen indirekten Einfluss auf die Bindung des DMI aus, indem ungerichtete Van-der-Waals-Kräfte die Lage der Häm-Gruppe und somit die Bindung des DMIs beeinflussen könnten. Durch die exponierte Lage der neuen Mutation F154Y ist kein direkter oder indirekter Einfluss sowohl auf die Bindung des DMIs als auf die Lage des Häms ersichtlich. Wie bereits durch Schmitz et al. (2014) beschrieben, ist neben der Aminosäureposition I145 auch die Position I475 nah genug am Häm gelegen, um ungerichtete Van-der-Waals-Kräfte und damit einen Einfluss auf die Lage des Häms auszuüben. Die Position K142 hingegen ist durch ihre Position in der Lage, eine Salzbrücke mit einer der Carboxylgruppen des Häms zu bilden und somit einen direkten Einfluss auf die Bindung des Häms zu nehmen. Somit kann auch die Mutation K142R einen indirekten Einfluss auf die Bindung des DMIs ausüben.

3.3 Überexpressionsanalysen des *CYP51* der Einsporisolate von *P. pachyrhizi*

In bereits vorangegangenen Studien konnte durch Schmitz et al. (2014) bestätigt werden, dass neben SNPs eine Überexpression des *CYP51* in einzelnen Isolaten vorliegen kann. Aus diesem Grund wurde eine Expressionsmessung des *CYP51*, mit den in dieser Arbeit gewonnenen Einsporisolaten von *P. pachyrhizi*, durchgeführt. Hierbei wurde zum einen ermittelt, ob die Einsporisolate eine grundsätzliche Überexpression des *CYP51* aufzeigen und zum anderen, ob eine DMI-Applikation eine direkte Auswirkung auf die relative Expression des *CYP51* der Einsporisolate hat. Als Referenzgen wurden α -*Tubulin* genutzt und als sensitives Referenzisolat das Isolat 8 verwendet, welches im Rahmen der Dissertation von Schmitz (2013) durch seine geringe Expression des *CYP51* auffiel. Für die Analysen wurde die cDNA der Einsporisolate von *P. pachyrhizi* verwendet. Zur Ermittlung, ob eine DMI-Behandlung eine direkte Auswirkung auf die relative Expression des *CYP51* der jeweiligen Isolate hat, wurde die RNA jedes Einsporisolates aus einem DLT extrahiert und in cDNA transkribiert (Fungizide, Tabelle 6). Je Wirkstoff und Isolat

wurden die Befallsstellen aus 0 mg/l (Kontrolle) und der höchstmöglichen Konzentration, in welcher noch ausreichend Befall für die Extraktion vorhanden war, verwendet. In jedem qPCR-Durchlauf wurden Doppelbestimmungen sowohl für den Nachweis des *CYP51* als auch des α -*Tubulin* angesetzt. Alle Durchläufe wurden mindestens zweimal wiederholt. Die Ct-Werte wurden mit der Software qPCRsoft® 3.4 bestimmt und die Berechnung der relativen Expression erfolgte durch die $\Delta\Delta$ Ct-Methode. Die Ergebnisse der relativen Expression des *CYP51* der unbehandelten Einsporisolate sind Abbildung 12 zu entnehmen. Neben der relativen Expression wurde zusätzlich der Standardfehler (SE) zwischen den Wiederholungen berechnet und in der Grafik in Form von Fehlerbalken aufgeführt.

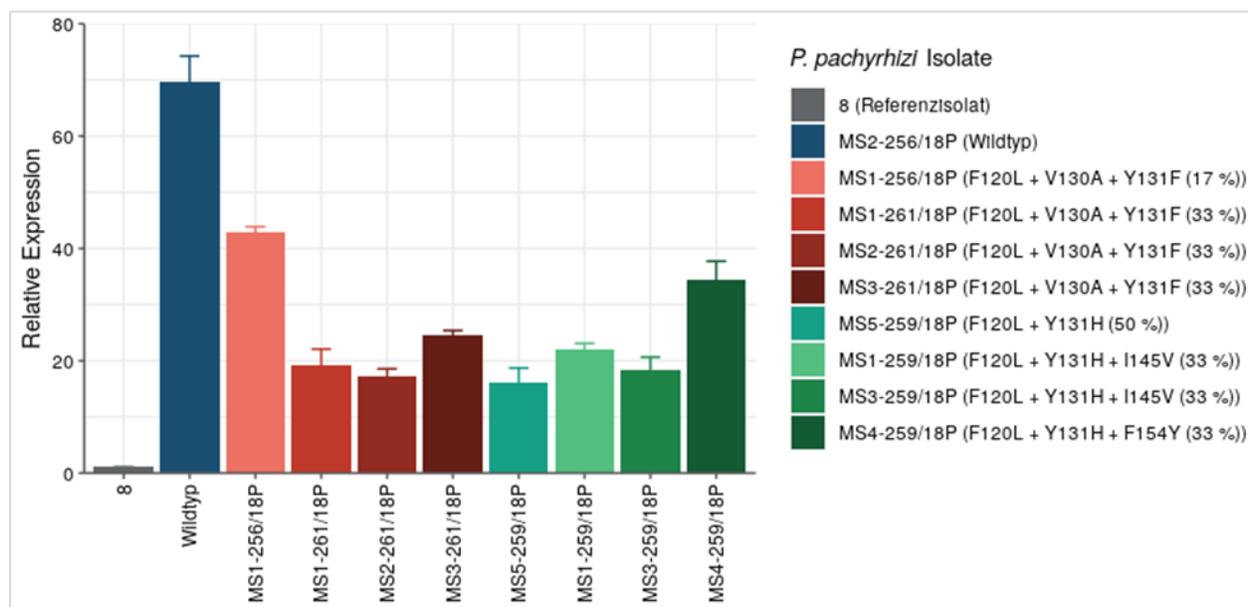


Abbildung 12: Relative Expression des *CYP51* der Einsporisolate von *Phakopsora pachyrhizi*. RNA wurde aus einem DLT aus den unbehandelten Kontrollen (0 mg/l) isoliert und in cDNA transkribiert. Zur Normalisierung wurde das Referenzgen α -*Tubulin* und als Referenzisolat das sensitive Isolat 8 aus Schmitz (2013) verwendet. Die Ct-Werte wurden mit der Software qPCRsoft® bestimmt und die Berechnung der relativen Expression erfolgte durch die $\Delta\Delta$ Ct-Methode. Zusätzlich wurde der Standardfehler (SE) zwischen den Wiederholungen berechnet und in der Grafik in Form von Fehlerbalken aufgeführt.

In Tabelle 20 wurde aufgeführt, inwiefern eine DMI-Applikation direkte Auswirkung auf die relative Expression des *CYP51* der jeweiligen Einsporisolate aufzeigt. Es wurden die Wirkstoffe Prothioconazol, Tebuconazol, Epoxiconazol, Difenoconazol, Cyproconazol, Metconazol und Tetraconazol in Form eines DLT appliziert und wie zuvor beschrieben, die RNA extrahiert, in cDNA transkribiert und eine qPCR durchgeführt. Als Referenzgen diente erneut α -*Tubulin* und als Referenzisolat wurde die cDNA der unbehandelten Kontrolle jedes Isolates verwendet. In der Tabelle 20 sind zwei der neun Einsporisolate aufgeführt. Eine Tabelle, welche die Daten der weiteren Einsporisolate auflistet, ist im Anhang gelistet (Tabelle A24).

Tabelle 20: Relative Expression des CYP51 der Einsporisolate von *Phakopsora pachyrhizi* nach Anwendung unterschiedlicher Demethylierungsinhibitoren im Detached Leaf Test. RNA wurde aus mit *P. pachyrhizi* infizierten Befallsstellen von unbehandelten und behandelten Blättern extrahiert und in cDNA transkribiert. Es wurden die infizierten Bereiche verwendet, die in den höchsten Konzentrationen vorhanden waren (0,3/1/3/10/30/100 mg/l) sowie die Befallsstellen aus den Kontrollen (0 mg/l). Die Wirkstoffe Prothioconazol, Tebuconazol, Epoxiconazol, Difenconazol, Cyproconazol, Metconazol und Tetraconazol wurden appliziert. In dieser Tabelle wurde der relative Expressionsunterschied zur jeweils unbehandelten Kontrolle, stellvertretend für zwei der neun Einsporisolate, aufgeführt. Zur Normalisierung wurde das Referenzgen α -Tubulin und als Referenzisolat wurde die unbehandelte Kontrolle jedes Einsporisolates verwendet. Die Ct-Werte wurden mit der Software qPCRsoft® bestimmt und die Berechnung der relativen Expression erfolgte durch die $\Delta\Delta$ Ct-Methode. Zusätzlich wurde der Standardfehler (SE) zwischen den Wiederholungen und die für die RNA-Extraktion verwendeten Konzentrationen gelistet.

| Isolat | Behandlung | Konzentration (mg/l) ^a | Expressionsunterschied zur unbehandelten Kontrolle (0 mg/l) | Standardfehler (SE) |
|-------------------------|----------------|-----------------------------------|---|---------------------|
| MS2-256/18 (Wildtyp) | Kontrolle | 0 | 1,0 | 0,0 |
| | Prothioconazol | 3 | 1,3 | 0,3 |
| | Tebuconazol | 3 | 1,1 | 0,2 |
| | Epoxiconazol | 1 | 0,9 | 0,0 |
| | Difenconazol | 30 | 0,9 | 0,1 |
| | Cyproconazol | 1 | 1,0 | 0,1 |
| | Metconazol | 1 | 1,1 | 0,2 |
| | Tetraconazol | 3 | 1,1 | 0,1 |
| MS1-259/18 | Kontrolle | 0 | 1,0 | 0,0 |
| | Prothioconazol | 10 | 1,1 | 0,3 |
| | Tebuconazol | 100 | 1,2 | 0,3 |
| | Epoxiconazol | 30 | 1,2 | 0,1 |
| | Difenconazol | 100 | 0,8 | 0,1 |
| | Cyproconazol | 30 | 0,7 | 0,0 |
| | Metconazol | 100 | 0,7 | 0,1 |
| | Tetraconazol | 30 | 1,1 | 0,3 |

^a Unterschiedliche Konzentrationen je nach Wirksamkeit des Wirkstoffs. Für die Analyse wurden die RNA aus den infizierten Bereichen isoliert, die in den höchsten Konzentrationen vorhanden waren (0,3/1/3/10/30/100 mg/l). Ebenfalls wurde als Referenz die RNA aus den Befallsstellen der unbehandelten Kontrollen (0 mg/l) extrahiert.

Der Tabelle 20 lässt sich entnehmen, dass eine Applikation unterschiedlicher DMI keine direkte Auswirkung auf die relative Expression des *CYP51* in den Einsporisolate aufweist. Sowohl die zwei hier gelisteten Einsporisolate (Tabelle 20) als auch die weiteren sieben (Tabelle A24), zeigen nach der Applikation keine Unterschiede in der Expression des *CYP51* im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle auf.

3.4 DMI-Sensitivität der Einsporisolate von *P. pachyrhizi*

Nach einer molekularbiologischen Analyse der für diese Arbeit generierten Einsporisolate von *P. pachyrhizi*, wurden die unterschiedlichen *CYP51*-Haplotypen hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber DMI überprüft. Diese Studien mussten aufgrund der biotrophen Lebensweise von *P. pachyrhizi* an lebendem Pflanzenmaterial durchgeführt werden. Da in Gewächshausversuchen eine Vermischung der unterschiedlichen Einsporisolate nicht ausgeschlossen werden konnte, wurden die Sensitivitätsuntersuchungen in Form von DLTs durchgeführt.

Für die Sensitivitätsstudien wurden die DMI Prothioconazol (Proline[®], 250 g/l), Epoxiconazol (Opus[®], 125 g/l), Cyproconazol (Alto[®], 240 g/l), Tetraconazol (Eminent[®], 100 g/l), Difenconazol (Score[®], 250 g/l), Tebuconazol (Folicur[®], 250 g/l) und Metconazol (Caramba[®], 60 g/l) als Soloformulierungen in sieben Konzentrationen (0,3/1/3/10/30/100 mg/l) ein Tag präventiv appliziert. Zur Inokulation wurden neun Einsporisolate von *P. pachyrhizi* mit unterschiedlichen *CYP51*-Haplotypen verwendet (Tabelle 3.2.1.1). Die Auswertung erfolgte 14 Tage nach der Inokulation, indem die befallene Blattfläche (%) visuell erfasst bzw. geschätzt wurde. In jedem Test wurden je Konzentration und Wirkstoff, für jedes Isolat drei Wiederholungen mitgeführt. Zusätzlich wurde das sensitive Einsporisolat MS2-256/18P (WT) als Referenzisolat und Prothioconazol als Referenzwirkstoff in jedem Test als zusätzliche Kontrolle verwendet. Jeder Haplotyp wurde mindestens in zwei unabhängigen Versuchen getestet.

In Tabelle 21 ist ein Auszug eines DLTs aufgeführt. Hierbei sind drei (Prothioconazol, Epoxiconazol, Tebuconazol) der sieben verwendeten DMI sowie zwei der neun Einsporisolate beispielhaft aufgelistet. Es wurde das WT-Einsporisolat gewählt, welches keine Mutationen im *CYP51* aufweist sowie das Isolat MS1-261/18P, welches unter anderem, mit der neu identifizierten Mutation V130A im *CYP51*, ausgestattet ist. Im Beispiel ist eine der insgesamt drei Wiederholungen je Wirkstoff und Konzentration aufgeführt.

Tabelle 21: Auszug eines Detached Leaf Tests mit *Phakopsora pachyrhizi*. Hierbei wurden drei der insgesamt sieben getesteten DMI (Prothioconazol, Epoxiconazol, Cyproconazol, Tetraconazol, Difenoconazol, Tebuconazol, Metconazol) beispielhaft aufgeführt sowie zwei der neun Einsporisolate von *P. pachyrhizi*. In der Darstellung wurde das sensitive Einsporisolat MS2-256/18P (WT) sowie das Einsporisolat MS1-261/18P, welches die Mutationskombination F120L + V130A + Y131F im *CYP51* aufweist, gewählt. Je Konzentration wurde eine der drei Wiederholungen aufgeführt und die Konzentrationen sind von links (0 mg/l, unbehandelte Kontrolle) nach rechts (100 mg/l, höchste Konzentration) aufsteigend angeordnet.

| Isolat (Mutationen im <i>CYP51</i>) | Wirkstoffe | Konzentration (mg/l) | | | | | | |
|--|----------------|----------------------|-----|---|---|----|----|-----|
| | | 0 | 0,3 | 1 | 3 | 10 | 30 | 100 |
| MS2-256/18P (WT, keine Mutation) | Prothioconazol | | | | | | | |
| | Epoxiconazol | | | | | | | |
| | Tebuconazol | | | | | | | |
| MS1-261/18P (F120L + V130A + Y131F) | Prothioconazol | | | | | | | |
| | Epoxiconazol | | | | | | | |
| | Tebuconazol | | | | | | | |

In der Tabelle 21 lässt sich zum einen der Unterschied in der Wirksamkeit der verschiedenen DMI bei einem Einsporisolat erkennen und zum anderen der Unterschied in der Wirksamkeit der DMI zwischen den zwei gelisteten Einsporisolaten. Bei dem WT-Einsporisolat lässt sich eine nahezu vollständige Hemmung bei bereits 3 mg/l beobachten, wohingegen das Wachstum des Isolates MS1-261/18P erst bei einer Applikationsrate von 100 mg/l Prothioconazol bzw. Tebuconazol vollständig kontrolliert wurde. Epoxiconazol zeigt auch bei 100 mg/l keine vollständige Inhibition.

Eine detaillierte Übersicht der Wirksamkeit der getesteten DMI gegenüber den unterschiedlichen *CYP51*-Haplotypen der Einsporisolate von *P. pachyrhizi* ist den nachfolgenden Unterkapiteln zu entnehmen.

3.4.1 Inhibitionskurven

In diesem Kapitel sind die Inhibitionskurven aufgeführt, welche sich durch die Ergebnisse der durchgeführten DLTs ergaben. Die Graphen wurden mit RStudio erstellt, unter Berücksichtigung folgender Formel zur Berechnung der Wirksamkeit der Fungizide:

$$\text{Inhibition (\%)} = 1 - (\text{MW (Befall behandelt (\%))} / \text{MW (Befall unbehandelt (\%))}) \times 100$$

Zusätzlich wurde der SE in Form von Fehlerbalken angegeben. Hier ist zu erwähnen, dass die Abweichungen zwischen den verschiedenen Versuchen lediglich gering waren, was höchstwahrscheinlich auf die Verwendung von Einsporisolaten zurückzuführen ist. Jedes Einsporisolat ist mit einer spezifischen Farbe gekennzeichnet. Zusätzlich wurden sowohl Farbbereiche als auch Symbole verwendet, welche eine Klassifizierung der unterschiedlichen *CYP51*-Haplotypen ermöglicht. Somit entspricht der WT einem Kreissymbol (blau), die Haplotypen, welche die Mutationskombination F120L + V130A + Y131F enthalten, einem Dreieck (Rottöne) und die Haplotypen welche mit den Mutationskombinationen F120L + Y131H (+ I145V/F154Y) enthalten, einem Viereck (Grüntöne). Bei der Beschreibung der Abbildungen in diesem und in folgenden Kapiteln (Kapitel 3.4.2 und 3.4.3), wird zur Simplifikation teilweise von grünen bzw. roten Haplotypen gesprochen.

In Abbildung 13 sind die Inhibitionskurven der Einsporisolate von Prothioconazol aufgezeigt und in Abbildung 14 jene von Metconazol. Die Inhibitionskurven der verbleibenden Wirkstoffe sind im Anhang (Abbildungen A22–A26) aufgeführt, werden in diesem Kapitel dennoch zusammengefasst.

Der nachfolgenden Abbildung 13 lässt sich entnehmen, dass das sensitive WT-Einsporisolat durch Prothioconazol bereits bei 3 mg/l zu 90 % und somit fast vollständig gehemmt wird. Die Einsporisolate, welche Mutationskombinationen im *CYP51* aufweisen, werden im Vergleich deutlich später kontrolliert. Das Wachstum der Haplotypen F120L + Y131H (+ I145V) wird durch Prothioconazol bei 30 mg/l vollständig gehemmt, wohingegen der Haplotyp F120L + Y131H + F154Y in dieser Konzentration zu 80 % kontrolliert werden konnte. Bei 100 mg/l werden alle Haplotypen, welche sich aus der Mutationskombination F120L + Y131H zusammensetzen, vollständig kontrolliert. Die Einsporisolate, welche über die Mutationskombination F120L + V130A + Y131F verfügen, werden bei 100 mg/l zu 80–90 % kontrolliert und somit konnte mit den hier verwendeten Konzentrationen keine vollständige Hemmung dieses Haplotypen durch Prothioconazol erreicht werden.

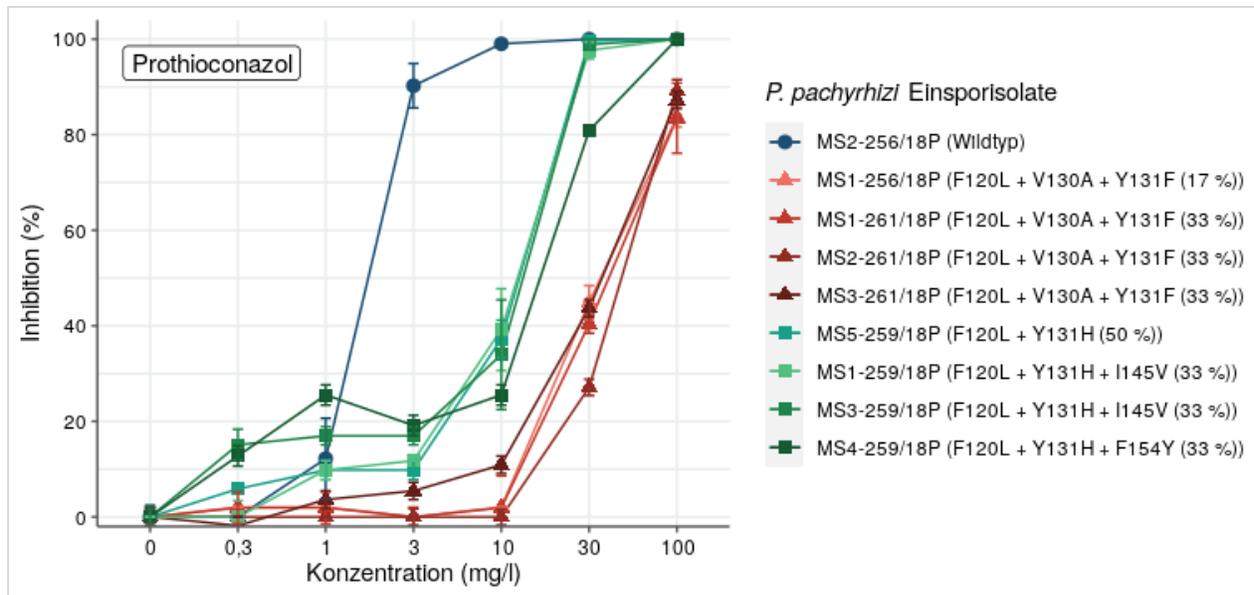


Abbildung 13: Vergleich der Inhibitionskurven der Einsporisolate von *Phakopsora pachyrhizi* durch Prothioconazol. Es ist die Inhibition (%) in sieben Konzentrationen (mg/l) für neun Einsporisolate aufgeführt. Jedes Einsporisolat wurde mit einer spezifischen Farbe gekennzeichnet und zusätzlich wurden Farbbereiche und Symbole verwendet, welche eine Klassifizierung der *CYP51*-Haplotypen ermöglichen (Wildtyp = Kreis (Blau), F120L + V130A + Y131F = Dreieck (Rottöne), F120L + Y131H (+ I145V/F154Y) = Viereck (Grüntöne)). Des Weiteren ist der Legende der jeweilige Mutationsanteil (%) innerhalb eines jeweiligen Einsporisolates zu entnehmen. Die Grafik wurde in RStudio erstellt und neben der Inhibition ist der Standardfehler (SE) in Form von Fehlerbalken dargestellt.

In der nachfolgenden Abbildung 14 wurden die Inhibitionskurven der Einsporisolate durch Metconazol dargestellt. Das WT-Isolat wurde bereits bei 3 mg/l nahezu vollständig kontrolliert. Der durch Rottöne hervorgehobene Haplotyp F120L + V130A + Y131F wurden in der höchsten Konzentration zu 70–80 % gehemmt. Die durch Grüntöne hervorgehobenen Haplotypen (F120L + Y131H (+ I145V/F154Y)) hingegen, konnten in der höchsten Konzentration durch Metconazol lediglich zu 15–25 % kontrolliert werden. Somit kann durch eine Applikation von Metconazol, in einem Konzentrationsbereich von bis zu 100 mg/l, lediglich der WT vollständig kontrolliert werden und es zeigen sich zusätzlich deutliche Unterschiede im Hinblick auf die unterschiedlichen *CYP51*-Haplotypen. Im Vergleich zu Abbildung 13 fällt auf, dass Prothioconazol die Haplotypen, welche in Grüntönen dargestellt sind (F120L + Y131H (+ I145V/F154Y)) besser kontrollieren kann als den roten Haplotyp (F120L + V130A + Y131F). Bei Metconazol verhalten sich die Inhibitionskurven entgegengesetzt. Hier wird der rote Haplotyp besser kontrolliert als die Grünen.

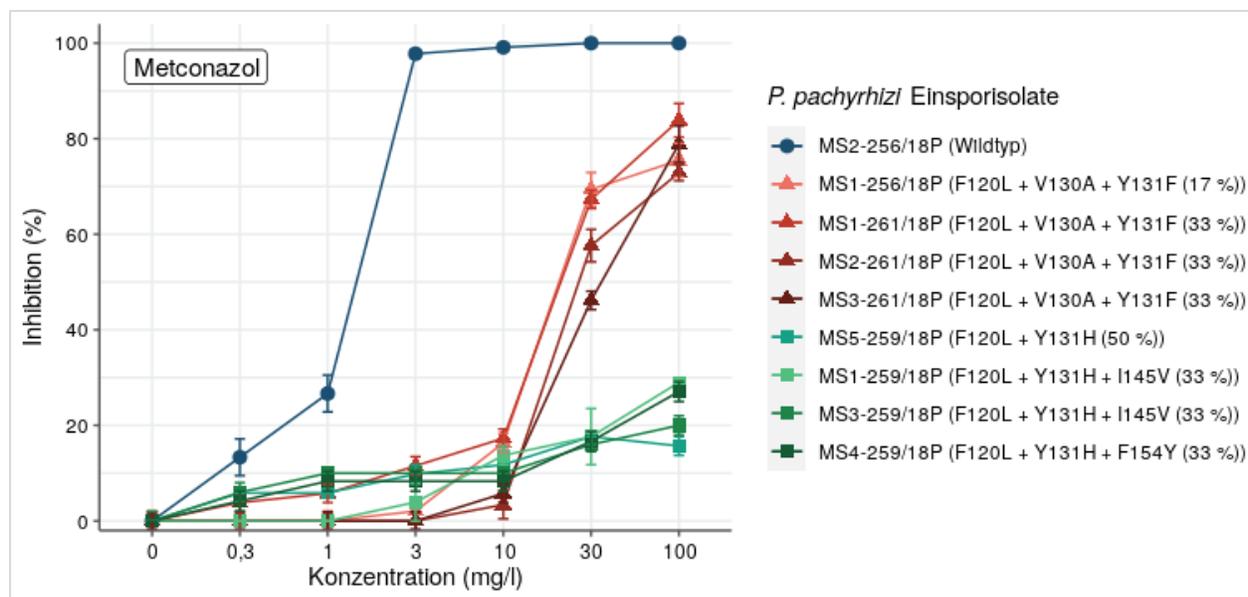


Abbildung 14: Vergleich der Inhibitionskurven der Einsporisolate von *Phakopsora pachyrhizi* durch Metconazol. Es ist die Inhibition (%) in sieben Konzentrationen (mg/l) für neun Einsporisolate aufgeführt. Jedes Einsporisolat wurde mit einer spezifischen Farbe gekennzeichnet und zusätzlich wurden Farbbereiche und Symbole verwendet, welche eine Klassifizierung der *CYP51*-Haplotypen ermöglichen (Wildtyp = Kreis (Blau), F120L + V130A + Y131F = Dreieck (Rottöne), F120L + Y131H (+ I145V/F154Y) = Viereck (Grüntöne)). Des Weiteren ist der Legende der jeweilige Mutationsanteil (%) innerhalb eines jeweiligen Einsporisolates zu entnehmen. Die Grafik wurde in RStudio erstellt und neben der Inhibition ist der Standardfehler (SE) in Form von Fehlerbalken dargestellt.

Alle weiteren Inhibitionskurven werden im Anhang in den Abbildungen A22-A26 dargestellt. Hierbei zeigen Epoxiconazol und Tetraconazol ähnliche Verläufe der Inhibitionskurven (Abbildung A22 und A24). Beiden Wirkstoffen gelingt es, das WT-Isolat im angegebenen Konzentrationsbereich vollständig zu hemmen. Das Wachstum des Haplotypen F120L + V130A + Y131F wurden mit beiden Wirkstoffen auch in der höchsten Konzentration (100 mg/l) lediglich zu 20 % reduziert. Die grünen Haplotypen (F120L + Y131H (+ I145V/F154Y)) konnten in Epoxiconazol in der höchsten Konzentration zu 70–90 %, bei Tetraconazol je nach Mutationskombination zu 50–90 % kontrolliert werden.

Cyproconazol (Abbildung A23) zeigt in der höchsten Konzentration eine ausreichende Kontrolle sowohl des Haplotypen F120L + V130A + Y131F als auch der grünen Haplotypen (F120L + Y131H (+ I145V/F154Y)). Hierbei konnten die grünen Haplotypen zu 80–100 % und der rote Haplotyp zu ca. 60 % kontrolliert werden. Der WT wird bereits bei 3 mg/l vollständig gehemmt. Cyproconazol zeigt somit, speziell im Hinblick auf den Haplotyp F120L + V130A + Y131F, eine bessere Wirksamkeit als Epoxi- und Tetraconazol.

Durch Tebuconazol gelingt eine nahezu vollständige Hemmung (> 90 %) des Haplotypen F120L + V130A + Y131F (100 mg/l). Die Haplotypen F120L + Y131H (+ I145V/F154Y) werden in der höchsten Konzentration lediglich zu ca. 15–40 % kontrolliert. Im Hinblick auf die Wirksamkeit von Tebuconazol verhält sich der Wirkstoff ähnlich wie Metconazol (Abbildung A26). Auch hier werden, im Vergleich zu den anderen DMI, der rote Haplotyp (F120L + V130A + Y131F) in der höchsten Konzentration deutlich besser kontrolliert als die Grünen.

Difenoconazol (Abbildung A25) zeigt die geringste Wirksamkeit gegenüber allen getesteten *CYP51*-Haplotypen von *P. pachyrhizi*. Ausschließlich das WT-Isolat wird in der höchsten Konzentration nahezu vollständig gehemmt. Alle weiteren *CYP51*-Haplotypen können mit den hier verwendeten Konzentrationen nicht ausreichend kontrolliert werden. Hierbei zeigt Difenoconazol eine gering stärkere Wirksamkeit gegenüber den Haplotypen F120L + Y131H (+ I145V/F154Y).

3.4.2 Inhibition bei 10/30/100 mg/l

In der nachfolgenden Abbildung 15 wurde die Inhibition (%) der Einsporisolate von *P. pachyrhizi* durch unterschiedliche DMI in drei Konzentrationen dargestellt. Hierfür wurden die Konzentrationen 10 mg/l (A), 30 mg/l (B) und 100 mg/l (C) gewählt, da hier eine Differenzierung der DMI-Sensitivitäten der unterschiedlichen *CYP51*-Haplotypen am deutlichsten herausgestellt wurde. Die prozentuale Inhibition wurde in Form von Balkendiagrammen dargestellt, welche zusätzlich den SE zwischen den Wiederholungen mittels Fehlerbalken berücksichtigt.

Der Abbildung 15 (A) lässt sich auf einem Blick entnehmen, welcher Haplotyp von *P. pachyrhizi* durch die unterschiedlichen DMI am besten kontrolliert werden kann. Es ist zu erkennen, dass in der geringsten hier abgebildeten Konzentration von 10 mg/l sowohl Prothioconazol, Epoxiconazol, Cyproconazol, Tebuconazol als auch Metconazol bereits eine vollständige Inhibition des WT-Einsporisolates von *P. pachyrhizi* erreichen. Tetraconazol liegt mit einer Wirksamkeit von ca. 75 % leicht und Difenoconazol mit 25 % deutlich darunter. Bei allen weiteren Haplotypen wird in einer Konzentration von 10 mg/l (A) keine bzw. lediglich eine geringe Inhibition erreicht. Hier zeigen Prothioconazol im Hinblick auf die grünen Haplotypen (F120L + Y131H (+ I145V/F154Y)) und Tebuconazol auf den roten Haplotyp (F120L + V130A + Y131F) bereits eine geringe Wirksamkeit.

In der nächsthöheren Konzentration von 30 mg/l (Abbildung 15, B) wird der WT von Tetraconazol vollständig und durch Difenoconazol zu 80 % gehemmt. Prothioconazol gelingt eine Inhibition der Haplotypen F120L + Y131H (+ I145V/F154Y) von 80–100 % und zeigt somit die beste Wirksamkeit bei diesen Mutationskombinationen, gefolgt von Cyproconazol mit einer Inhibition von ca. 35–65 % und Epoxiconazol (ca. 20–35 %). Alle weiteren hier getesteten Wirkstoffe zeigen bei 30 mg/l eine unzureichende Wirksamkeit gegenüber den grünen Haplotypen mit der

Mutationskombination F120L + Y131H (+ I145V/F154Y). Der Haplotyp F120L + V130A + Y131F, wurde in dieser Konzentration durch Tebuconazol und Metconazol am besten gehemmt. Hierbei zeigt Tebuconazol mit 50–80 % eine bessere Wirkung als Metconazol mit 45–70 %. Durch Prothioconazol wird eine Inhibition des roten Haplotypen von 27–45 % erreicht.

In der höchsten angewendeten Konzentration von 100 mg/l (Abbildung 15, C) zeigt Prothioconazol die beste Wirkung im Hinblick auf alle getesteten *CYP51*-Haplotypen von *P. pachyrhizi*. Hierbei werden, neben der vollständigen Kontrolle der grünen, ebenfalls der rote Haplotyp F120L + V130A + Y131F zu 80–90 % inhibiert. Auch Cyproconazol zeigt eine Kontrolle des Haplotypen F120L + V130A + Y131F (55–70 %) und eine vollständige Hemmung der Haplotypen F120L + Y131H (+ I145V/F154Y). Sowohl Epoxi- als auch Tetraconazol zeigen eine Wirkung im Hinblick auf die grünen Haplotypen (F120L + Y131H (+ I145V/F154Y)). Bei Epoxiconazol zeichnet sich eine Wirksamkeit von 70–90 % und bei Tetraconazol von 50–90 % ab. Das Wachstum des Haplotypen F120L + V130A + Y131F wird durch beide Wirkstoffe unzureichend gehemmt (max. 20 %). Difenconazol gelingt in der höchsten Konzentration lediglich eine Hemmung des WT's. Im Hinblick auf die weiteren Haplotypen wird die beste Kontrolle bei der Mutationskombination F120L + Y131H + (I145V), mit ca. 20–30 % Inhibition erreicht. Neben Prothioconazol, zeigen auch Tebuconazol und Metconazol eine Kontrolle des Haplotypen F120L + V130A + Y131F. Während Metconazol in der Wirkung mit Prothioconazol gleichzusetzen ist (ca. 80 %), zeigt Tebuconazol mit 93–100 % Inhibition eine nahezu vollständige Hemmung. Sowohl Metconazol als auch Tebuconazol zeigen, im Gegensatz zur guten Wirkung gegenüber des roten Haplotypen (F120L + V130A + Y131F), eine unzureichende Wirkung von bis zu 35 % in den Haplotypen F120L + Y131H + (I145V/F154Y).

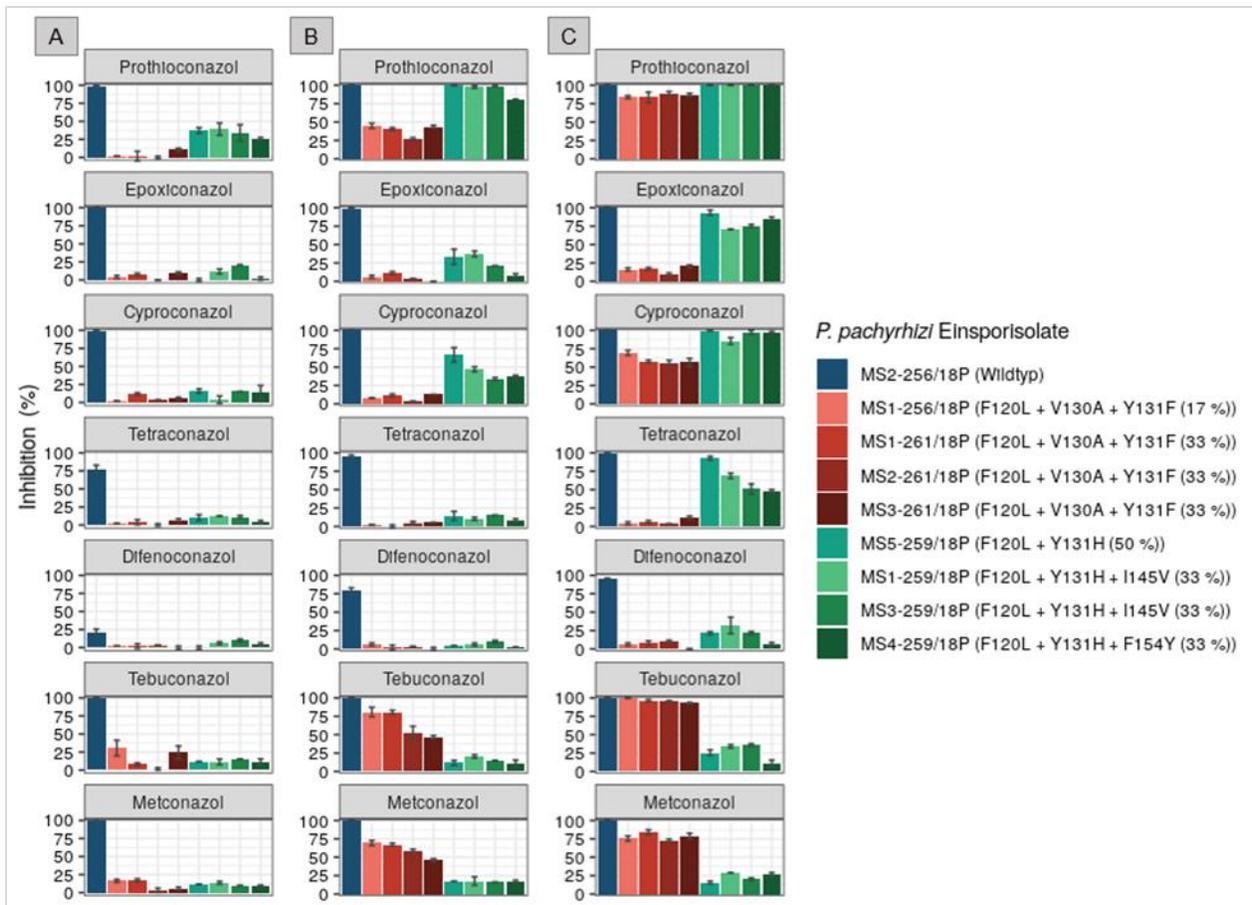


Abbildung 15: Inhibition (%) der Einsporisolate von *Phakopsora pachyrhizi* durch unterschiedliche Demethylierungsinhibitoren, dargestellt bei 10 mg/l (A), 30 mg/l (B) und 100 mg/l (C). Es wurde die Inhibition der Einsporisolate in drei Konzentrationen durch die Wirkstoffe Prothioconazol, Epoxiconazol, Cyproconazol, Tetraconazol, Difenconazol, Tebuconazol und Metconazol aufgeführt. Jedes der Einsporisolate ist mit einer spezifischen Farbe gekennzeichnet und zusätzlich wurden Farbtöne verwendet, welche die Klassifizierung der *CYP51*-Haplotypen ermöglichen (Wildtyp = Blau, F120L + V130A + Y131F = Rottöne, F120L + Y131H (+ I145V/F154Y) = Grüntöne). Des Weiteren ist der Legende der jeweilige Mutationsanteil (%) innerhalb eines Einsporisolates zu entnehmen. Neben der Inhibition (%) ist der Standardfehler (SE) in Form von Fehlerbalken dargestellt.

3.4.3 ED₅₀-Werte, Resistenzfaktor und Kreuzresistenz

Im nachfolgenden Kapitel wurden sowohl die ED₅₀-Werte, der Resistenzfaktor (RF) sowie die Korrelationen der verwendeten DMI, hinsichtlich ihrer Wirksamkeit auf unterschiedliche *CYP51*-Haplotypen von *P. pachyrhizi*, aufgeführt. Die ED₅₀-Werte wurden durch die Ergebnisse der Sensitivitätsstudien unter zusätzlicher Verwendung der Software E-WorkBook Suite/Labbooq ermittelt. Die ED₅₀-Werte geben die Konzentration an, in der das jeweilige Einsporisolat von *P. pachyrhizi* durch die Anwendung unterschiedlicher DMI zu 50 % inhibiert wurde. Der RF wurde berechnet als das Verhältnis der mittleren ED₅₀-Werte eines angepassten *CYP51*-Haplotypen zu den mittleren ED₅₀-Werten des *CYP51*-WTs von *P. pachyrhizi*. Es wurden die DMI Prothioconazol,

Epoxiconazol, Cyproconazol, Tetraconazol, Difenoconazol, Tebuconazol und Metconazol im Hinblick auf ihre Wirksamkeit gegenüber unterschiedlicher *CYP51*-Haplotypen von *P. pachyrhizi* berücksichtigt. Zur Bestimmung der Korrelation, wurden ebenfalls die durch den DLT ermittelten ED_{50} -Werte verwendet. Mittels dieser Korrelationen (R^2) kann eine Aussage über eine mögliche Kreuzresistenz getroffen werden.

In Abbildung 16 sind die ED_{50} -Werte für Prothioconazol, Epoxiconazol, Cyproconazol, Tetraconazol, Difenoconazol, Tebuconazol und Metconazol bei den jeweiligen Einsporisolaten von *P. pachyrhizi* aufgeführt. Es wurden die Mittelwerte der Versuchswiederholungen verwendet und zusätzlich der SE in Form von Fehlerbalken angegeben. Jeder der Einsporisolate ist mit einer spezifischen Farbe gekennzeichnet. Zusätzlich wurden sowohl Farbbereiche als auch Symbole verwendet, welche die Klassifizierung der *CYP51*-Haplotypen ermöglicht. Wie bereits in den vorherigen Kapiteln wird bei der Beschreibung der Abbildung zur Simplifikation teilweise von grünen bzw. roten Haplotypen gesprochen.

Je nach *CYP51*-Haplotyp und angewendetem DMI, lassen sich der Abbildung 16 ED_{50} -Werte von 0,8–100 mg/l entnehmen. Während für alle angewendeten DMI bei dem WT-Einsporisolat eine geringe Bandbreite der ED_{50} -Werte zu verzeichnen ist, sind für die vier weiteren *CYP51*-Haplotypen, welche mit Mutationskombinationen ausgestattet sind, ED_{50} -Werte in einer großen Bandbreite von 10–100 mg/l zu entnehmen.

Prothioconazol, Epoxiconazol, Cyproconazol, Tebuconazol und Metconazol verzeichnen für das WT-Einsporisolat ED_{50} -Werte von 0,78–1,75 mg/l, wohingegen Tetraconazol mit 4 mg/l und Difenoconazol mit 19 mg/l eine deutlich geringere Wirksamkeit gegenüber dem WT von *P. pachyrhizi* aufweisen. Die geringe Wirksamkeit von Difenoconazol wird auch im Hinblick auf die weiteren *CYP51*-Haplotypen deutlich, da für keinen hier getesteten Haplotyp ED_{50} -Werte unterhalb der höchsten Konzentration von 100 mg/l erreicht wurden. Tetraconazol konnte lediglich für den Haplotyp F120L + Y131H ($ED_{50} = 48$ mg/l) eine Wirksamkeit aufweisen, wohingegen für die weiteren Haplotypen ED_{50} -Werte von 82–100 mg/l ermittelt wurden.

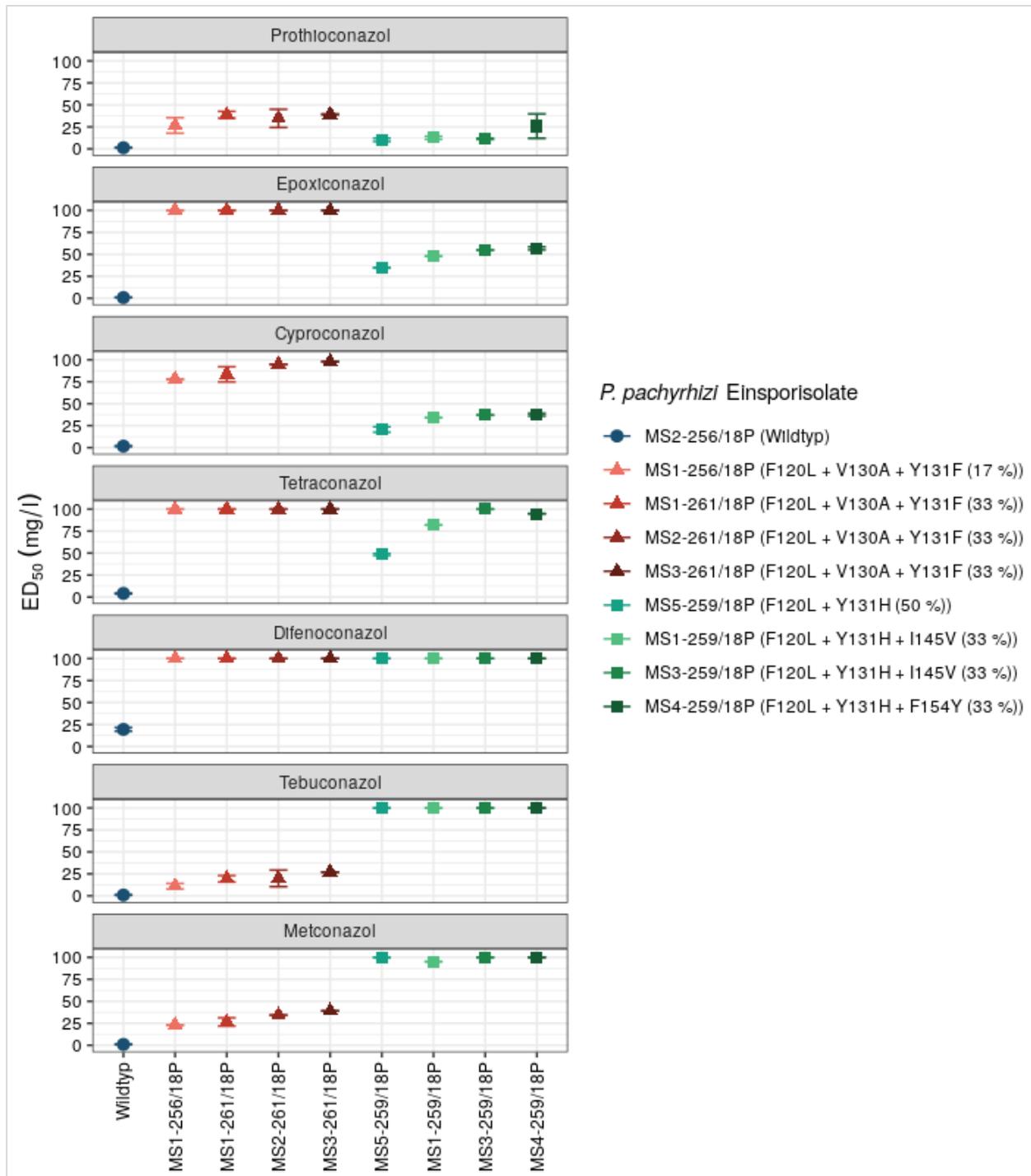


Abbildung 16: Sensitivität der Einsporisolate von *Phakopsora pachyrhizi* gegenüber Demethylierungsinhibitoren. Die mittleren ED₅₀-Werte wurden in Detached Leaf Tests für Prothioconazol, Epoxiconazol, Cyproconazol, Tetraconazol, Difenoconazol, Tebuconazol und Metconazol für die jeweiligen Einsporisolate ermittelt. Jeder der Einsporisolate ist mit einer spezifischen Farbe gekennzeichnet und zusätzlich wurden Farbtöne und Symbole verwendet, welche die Klassifizierung der *CYP51*-Haplotypen ermöglichen (Wildtyp = Kreis (Blau), F120L + V130A + Y131F = Dreieck (Rottöne), F120L + Y131H (+ I145V/F154Y) = Viereck (Grüntöne)). Des Weiteren ist der Legende der jeweilige Mutationsanteil (%) innerhalb eines jeweiligen Einsporisolates zu entnehmen. Neben den mittleren ED₅₀-Werten ist der Standardfehler (SE) in Form von Fehlerbalken dargestellt.

Der Haplotyp F120L + V130A + Y131F (Rottöne), wurde durch Tebuconazol am besten kontrolliert ($ED_{50} = 11\text{--}27$ mg/l). Auch Metconazol ($ED_{50} = 23\text{--}39$ mg/l) und Prothioconazol ($ED_{50} = 27\text{--}29$ mg/l) zeigten eine Wirkung gegenüber diesem Haplotyp. Cyproconazol mit ED_{50} -Werten von $77\text{--}98$ mg/l und Epoxiconazol ($ED_{50} > 100$), ebenso wie Tetraconazol und Difenconazol ($ED_{50} > 100$) konnten keine ausreichende Wirkung erzielen.

Für die Haplotypen F120L + Y131H + I145V/F154Y, wurden neben Difenconazol auch für Tebuconazol und Metconazol keine ED_{50} -Werte erreicht, die unterhalb der höchsten Konzentration von 100 mg/l lagen. Prothioconazol zeigte die stärkste Wirksamkeit gegenüber diesen Haplotypen ($ED_{50} = 10\text{--}25$ mg/l), gefolgt von Cyproconazol ($ED_{50} = 21\text{--}38$ mg/l) und Epoxiconazol ($ED_{50} = 35\text{--}57$ mg/l).

In Tabelle 22 ist der aus den ED_{50} -Werten resultierende Resistenzfaktor (RF) aufgeführt. Zur Berechnung des RF wurde das Verhältnis der mittleren ED_{50} -Werte eines angepassten *CYP51*-Haplotypen zu dem mittleren ED_{50} -Wert des *CYP51*-Wildtypisolates verwendet. Da der RF abhängig von der intrinsischen Aktivität eines Wirkstoffs für das WT-Isolat ist, wurden in der Tabelle 22 zusätzlich die ED_{50} -Werte des verwendeten sensitiven Einsporisolates MS2-256/18P aufgeführt. Wirkstoffe mit einer hohen intrinsischen Aktivität führen häufiger zu höheren RF als Wirkstoffe mit einer geringeren intrinsischen Aktivität. Das sensitive Einsporisolat MS2-256/18P weist keine Mutation im *CYP51* auf und wurde somit als WT-Isolat zur Berechnung des RF verwendet. Es ist allerdings zu berücksichtigen, dass für dieses Isolat eine deutliche Überexpression (70-fach) im Vergleich zu einem sensitiven Isolat aus dem Jahr 2010 festgestellt wurde (Abbildung 12). Der RF wurde zur besseren Übersicht in der nachfolgenden Tabelle 22 folgenden Abstufungen eingefärbt: geringer RF < 25 = hellgelb, moderater RF $26\text{--}50$ = hellorange und $51\text{--}75$ = orange, hoher RF > 76 = rot.

Die RF reichen von $5\text{--}128$ für alle *CYP51*-Haplotypen und verwendeten DMI. Es wurden hohe RF (> 100) für die Haplotypen F120L + Y131H (+ 145V/F154Y) für Tebuconazol und Metconazol ermittelt, während für Prothioconazol, Cyproconazol, Tetraconazol und Difenconazol bei diesen Haplotypen lediglich ein geringer RF < 25 festzustellen ist. Für Epoxiconazol wurden für diese Haplotypen moderate RF von $44\text{--}73$ ermittelt. Die RF die innerhalb der Haplotypen, welche die F120L + Y131H beinhalten, ermittelt wurden unterscheiden sich lediglich gering.

Für den Haplotypen F120L + V130A + Y131F liegen hohe RF (> 100) für Epoxiconazol vor und ein moderater RF (> 40) für Cyproconazol. Bei Prothioconazol und Metconazol liegen zusätzlich moderate RF (> 30) vor. Der Unterschied der RF zwischen ca. 17 % Mutationsanteil und 33 % Mutationsanteil innerhalb des Haplotypen ist gering, aber erkennbar. Für Tebuconazol liegen die

RF im niedrigen Bereich von 12–24. Sowohl für Tetraconazol als auch für Difenoconazol lassen sich niedrige RF, wie bereits für die Haplotypen F120L + Y131H (+ 145V/F154Y), auch für den Haplotyp F120L + V130A + Y131F feststellen. Der RF liegt bei 5 für Difenoconazol und bei 24 für Tetraconazol. Diese vergleichsweise geringen RF, insbesondere für Difenoconazol, lassen sich auf die geringe Wirksamkeit gegenüber dem WT-Einsporisolat zurückführen.

Tabelle 22: Resistenzfaktoren (RF) der Einsporisolate von *Phakopsora pachyrhizi* für unterschiedliche Demethylierungsinhibitoren. Zur Berechnung des RF wurde das Verhältnis der mittleren ED₅₀-Werte eines angepassten CYP51-Haplotypen zu dem mittleren ED₅₀-Wert des CYP51-Wildtypisolat MS2-256/18P verwendet. Neben dem RF ist der Tabelle zusätzlich der mittlere ED₅₀-Wert des sensitiven Einsporisolates für jeden Wirkstoff zu entnehmen. Die Einsporisolate, welche denselben Haplotyp aufzeigen und deren ED₅₀-Werte entsprechend ähnlich waren, wurden zusammengefasst (n). Der RF wurde in folgenden Abstufungen eingefärbt: geringer RF < 25 = hellgelb, moderater RF 26–50 = hellorange und 51–75 = orange, hoher RF > 76 = rot.

| CYP51-Haplotyp in <i>P. pachyrhizi</i> | Resistenzfaktor (RF) | | | | | | |
|---|----------------------|--------------|--------------|--------------|---------------|-------------|------------|
| | Prothioconazol | Epoxiconazol | Cyproconazol | Tetraconazol | Difenoconazol | Tebuconazol | Metconazol |
| F120L + V130A + Y131F (17 %) (n = 1) | 21 | 128 | 44 | 24 | 5 | 12 | 25 |
| F120L + V130A + Y131F (33 %) (n = 3) | 30 | 128 | 53 | 24 | 5 | 24 | 36 |
| F120L + Y131H (50 %) (n = 1) | 8 | 44 | 12 | 12 | 5 | 106 | 108 |
| F120L + Y131H + I145V (33 %) (n = 2) | 10 | 66 | 20 | 22 | 5 | 106 | 105 |
| F120L + Y131H + F154Y (33 %) (n = 1) | 21 | 73 | 21 | 23 | 5 | 106 | 108 |
| Mittelwert ED ₅₀ WT (MS2-256/18P) | 1,26 | 0,78 | 1,75 | 4,17 | 19,38 | 0,94 | 0,93 |

In der nachfolgenden Abbildung 17 sind unterschiedliche Korrelationen aufgeführt, welche eine mögliche Kreuzresistenz der DMI aufzeigen. Hierzu wurden die durch DLTs ermittelten ED₅₀-Werte (Abbildung 16) der Einsporisolate von *P. pachyrhizi* für unterschiedliche DMI korreliert und die lineare Korrelation analysiert. Die Korrelationen für Prothioconazol und Epoxiconazol (A), Prothioconazol und Cyproconazol (B), Prothioconazol und Tetraconazol (C), Prothioconazol und Tebuconazol (D), Prothioconazol und Metconazol (E) ebenso wie für Tebuconazol und

Metconazol (F) wurden in Abbildung 17 aufgeführt (weitere Korrelationen, Abbildung A27). Zur Entscheidung, ob eine aussagekräftige Korrelation vorliegt, ist zusätzlich der p-Wert und das Bestimmtheitsmaß (R^2) angegeben. Ist der p-Wert $< 0,05$ bedeutet dies, dass die Nullhypothese verworfen und die Alternativhypothese angenommen wird. Somit ist die Korrelation aussagekräftig. Liegt der Wert $> 0,05$ wird die Nullhypothese beibehalten und somit leistet die Korrelation als gewähltes Modell keinen Klärungsbedarf, d. h. es existiert keine Korrelation. Das Bestimmtheitsmaß (R^2) gibt an, wie stark abhängig die Variablen zueinander sind und kann Werte zwischen 0 (keine Abhängigkeit) und 1 (perfekte Abhängigkeit) annehmen. R^2 kann somit als Maß für eine Kreuzresistenz zwischen zwei Wirkstoffen verwendet werden. Je näher der Wert an 1 liegt, desto höher ist die Kreuzresistenz.

Aus der Abbildung 17 lässt sich ableiten, dass Prothioconazol und Epoxiconazol (A), ebenso wie Prothioconazol und Cyproconazol (B), eine hohe Korrelation der jeweiligen ED_{50} -Werte aufweisen ($R^2 > 0,8$). Zwischen Prothioconazol und Tetraconazol (C) besteht ebenfalls eine Korrelation, welche allerdings eine geringere Abhängigkeit aufweist ($R^2 = 0,56$). Im Gegensatz hierzu besteht keine Korrelation zwischen Prothioconazol und Tebuconazol (D) und Prothioconazol und Metconazol (E). Es ist zu erkennen, dass in beiden Fällen die p-Werte $> 0,05$ liegen und somit das Modell keinen Klärungsbedarf liefert, d. h. keine Korrelation besteht (R^2 -Werte $< 0,14$). Zusätzlich wurden Tebuconazol und Metconazol (F) auf ihre Korrelation überprüft. Hier liegt, von allen getesteten DMI, die höchste Korrelation und nahezu eine perfekte Abhängigkeit vor ($R^2 = 0,99$). Diese Kreuzresistenz ließ sich bereits durch die RF in Tabelle 22 vermuten, da beide Wirkstoffe hohe RF für die Haplotypen, welche mit der Mutationskombination F120L + Y131H (+ 145V/F154Y) ausgestattet sind, aufweisen.

Eine starke Korrelation zeigt sich auch bei Epoxiconazol und Cyproconazol ($R^2 = 0,95$) (Abbildung A27). Bei Difenoconazol, im Vergleich zu den anderen DMI, ergeben sich aufgrund der geringen intrinsischen Aktivität des Wirkstoffs lediglich geringe bzw. keine Korrelationen. Zwischen Prothioconazol und Difenoconazol besteht beispielsweise keine Korrelation (p-Wert = 0,11 und $R^2 = 0,32$) (Abbildung A27). Ebenso zeigt Tebuconazol, im Hinblick auf die untersuchten *CYP51*-Haplotypen von *P. pachyrhizi*, sowohl im Vergleich zu Cyproconazol (p-Wert = 0,21 und $R^2 = 0,21$) als auch zu Epoxiconazol (p-Wert = 0,37 und $R^2 = 0,12$), keinerlei Abhängigkeit zueinander (Abbildung A27).

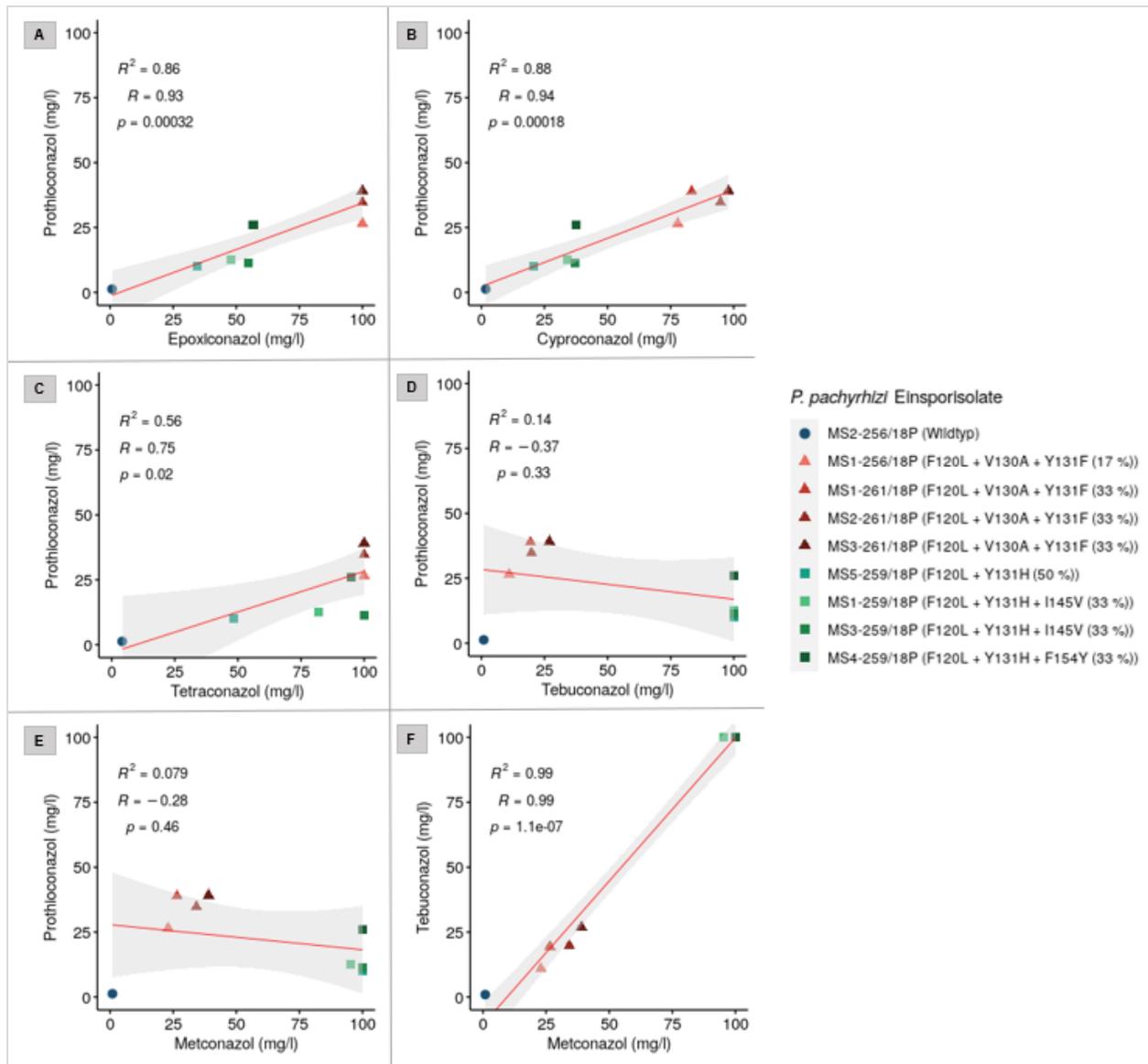


Abbildung 17: Korrelation der ED₅₀-Werte für Prothioconazol und Epoxiconazol (A), Cyproconazol (B), Tetraconazol (C), Tebuconazol (D), Metconazol (E) ebenso wie für Tebuconazol und Metconazol (F) bei Einsporisolaten von *Phakopsora pachyrhizi*. Die ED₅₀-Werte wurden zur Bestimmung der linearen Regression ebenso wie für die Berechnung von (R²) verwendet. Jedes der Einsporisolate ist mit einer spezifischen Farbe gekennzeichnet und zusätzlich wurden Farbtöne und Symbole verwendet, welche die Klassifizierung der *CYP51*-Haplotypen ermöglichen (Wildtyp = Kreis (Blau), F120L + V130A + Y131F = Dreieck (Rottöne), F120L + Y131H (+ I145V/F154Y) = Viereck (Grüntöne)). Des Weiteren ist der Legende der jeweilige Mutationsanteil (%) innerhalb eines Einsporisolates zu entnehmen.

3.5 Mutationsselektion im *CYP51* von *P. pachyrhizi* nach Anwendung unterschiedlicher DMI

Im folgenden Kapitel wurde überprüft, welche Mutationen im *CYP51* nach der Anwendung unterschiedlicher DMI selektiert werden. Für diesen Zweck wurde ein DLT mit den DMI Prothioconazol, Epoxiconazol, Cyproconazol, Tetraconazol, Difenoconazol, Tebuconazol,

Metconazol und einem Isolatmix von *P. pachyrhizi*, bestehend aus Sporen von fünf Einsporisolaten (Tabelle 14), durchgeführt. Im Anschluss wurde die gDNA der Befallsstellen jedes DMI aus sieben Konzentrationen extrahiert und hinsichtlich ihrer Mutationen im *CYP51* mittels Pyrosequenzierung überprüft. Durch diesen Versuch wurde verdeutlicht, welche der im Isolatmix vorhandenen *CYP51*-Mutationen durch die jeweilige DMI Behandlung selektiert wurden. In Abbildung 18 ist der jeweilige Mutationsanteil (%) für jede im Isolatmix vorhandene *CYP51*-Mutation nach der jeweiligen DMI-Anwendung aufgeführt. Hierbei wurden die Befallsstellen sechs unterschiedlicher Konzentrationen (0,3/1/3/10/30/100 mg/l) sowie der unbehandelten Kontrolle (0 mg/l) analysiert. Es ist zu beachten, dass für Prothioconazol keine Konzentration von 100 mg/l berücksichtigt werden konnte, da für eine DNA-Extraktion nicht ausreichend Befall von *P. pachyrhizi* zur Verfügung stand. Des Weiteren ist der Mutationsanteil des Inokulums aufgeführt. Die berücksichtigten *CYP51*-Mutationen sind F120L, V130A, Y131F, Y131H, I145V und F154Y. Die weiteren für *P. pachyrhizi* bekannten Mutationen im *CYP51*-Gen (K142R, I145F, I475T) konnten in diesem Versuchsaufbau nicht berücksichtigt werden, da keine Isolate mit diesen Mutationen vorhanden waren.

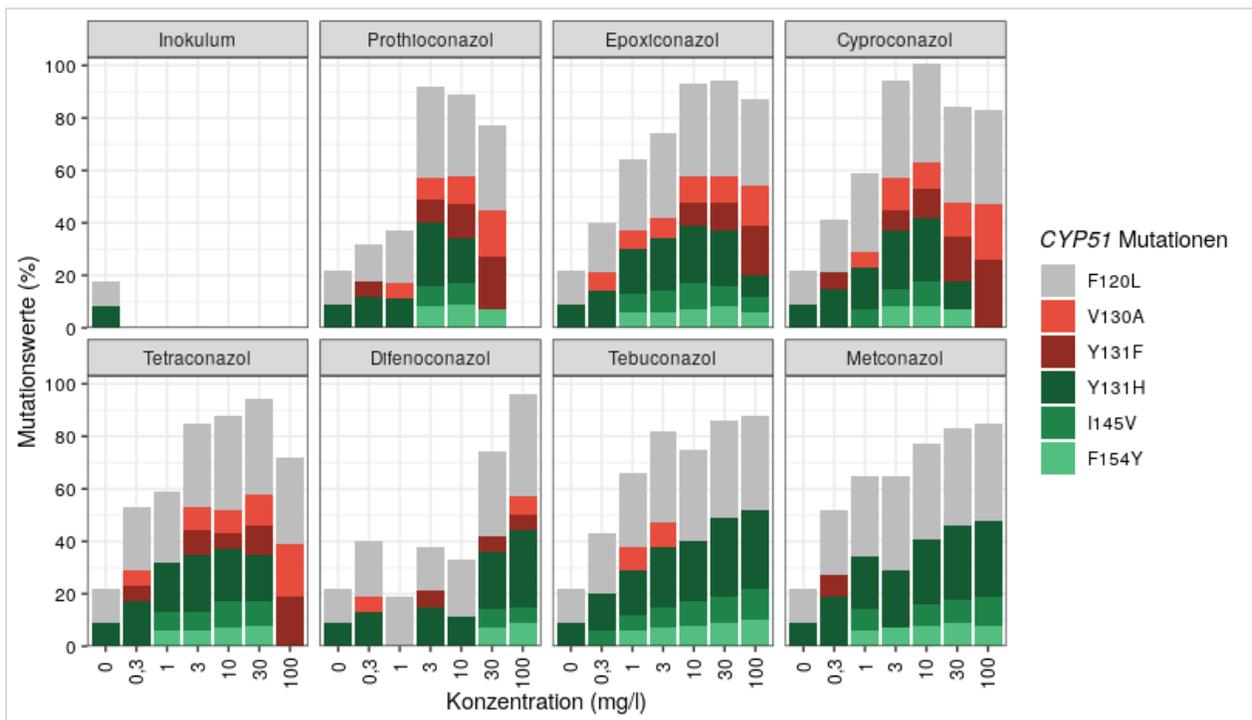


Abbildung 18: *CYP51*-Mutationswerte (%) von *Phakopsora pachyrhizi* nach Anwendung unterschiedlicher Demethylierungsinhibitoren. Die Mutationswerte wurden nach Durchführung eines Detached Leaf Tests durch eine Analyse der Befallsstellen der jeweiligen Konzentrationen mittels Pyrosequenzierung erhoben. Zusätzlich ist der Mutationsanteil des Inokulums aufgeführt. Zur Inokulation wurde ein Isolatmix von *P. pachyrhizi*, bestehend aus Sporen von fünf Einsporisolaten, verwendet. Es sind lediglich die *CYP51*-Mutationen aufgelistet, welche in den verwendeten *CYP51*-Haplotypen vorhanden waren. Die Mutationen K142R, I145F und I475T konnten nicht berücksichtigt werden.

Aus Abbildung 18 lässt sich entnehmen, dass das Inokulum einen Mutationsanteil von 10 % F120L und 8 % Y131H vorzuweisen hat. Die unbehandelten Kontrollen des DLTs (0 mg/l) unterschieden sich nicht von diesen Prozentwerten. Hier wurden im Durchschnitt 13 % F120L und 9 % Y131H detektiert. Da die Nachweisgenauigkeit der Pyrosequenzierungsmethode 5 % beträgt und somit Abweichungen von $\pm 5\%$ berücksichtigt werden müssen, sind diese Werte gleichzusetzen. Grundsätzlich lässt sich festhalten, dass der Mutationsanteil nach einer DMI-Anwendung für alle hier gelisteten Mutationen steigt. Insbesondere die Mutation F120L, welche in jedem für die Sporensuspension verwendetem *CYP51*-Haplotyp vorzufinden ist (Ausnahme WT), zeigt bereits in geringen Konzentrationen einen deutlichen Anstieg. Somit lässt sich beispielsweise bei 0,3 mg/l ein Mutationsanteil von 14–24 %, je nach angewendetem DMI, erkennen. In den höchsten Konzentrationen liegen Prozentwerte von 32–39 % vor.

Auch der Anteil der Y131H steigt von 9 % in der unbehandelten Kontrolle, auf bis zu 30 % nach den DMI-Anwendungen an. Hierbei lassen sich Unterschiede, je nach verwendetem Wirkstoff, feststellen. Während bei Tebuconazol, Metconazol und Difenconazol der prozentuale Anteil der Y131H mit der Höhe der angewendeten Konzentration zunimmt, ist für Prothioconazol, Epoxiconazol, Cyproconazol und Tetraconazol ein anderer Verlauf zu erkennen. Hierbei steigt, z. B. nach der Anwendung von Prothioconazol, der Mutationsanteil der Y131H auf 24 % (3 mg/l) und sinkt in den höheren Konzentrationen wieder. Bei 10 mg/l wurden Werte von 17 % Y131H ermittelt und bei 30 mg/l konnte die Mutation nicht mehr nachgewiesen werden. Ein ähnliches Verhalten lässt sich auch für Cyproconazol beobachten. Hier steigen die Werte auf 24 % (10 mg/l), bevor sie in den höheren Konzentrationen ebenfalls auf 0 % Y131H abfallen (100 mg/l). Auch bei Tetraconazol und Epoxiconazol ist ein solcher Verlauf sichtbar. Durch die Anwendung von Tetraconazol ist nach einem Anstieg auf 20 % Y131H (10 mg/l) ein Rückgang auf 0 % Y131H (100 mg/l) zu beobachten. Auch nach der Anwendung von Epoxiconazol wurde die Mutation Y131H nach einem Höchstwert von 22 % (10 mg/l), nach der Anwendung von 100 mg/l, lediglich zu 8 % detektiert.

Die Mutationen I145V und F154Y, welche in Kombination mit dem Haplotyp F120L + Y131H auftreten, zeigen das gleiche Verlaufsmuster, welches bereits zuvor für die Mutation Y131H beschrieben wurde. Auch hier steigen die Werte beider Mutationen nach der Anwendung von Prothioconazol, Epoxiconazol, Cyproconazol und Tetraconazol in den geringeren Konzentrationen (bis max. 30 mg/l), bevor sie in der höchsten analysierten Konzentration wieder an prozentualer Häufigkeit verlieren. Bei Tebuconazol und Metconazol hingegen ist erneut eine Zunahme der Mutationen I145V und F154Y bis hin zur höchsten Konzentration von 100 mg/l zu vermerken. Es werden Werte von maximal 12 % I145V und 10 % F154Y durch eine Applikation

von Tebuconazol erreicht. Ähnliche Maximalwerte sind ebenfalls durch die Applikation der anderen DMI zu erkennen. Grundsätzlich lässt sich somit festhalten, dass die Haplotypen F120L + Y131H + I145V/F154Y deutlich weniger durch die Fungizidanwendung selektiert werden als der Haplotyp F120L + Y131H.

Die Mutationen V130A und Y131F bilden zusammen mit der Mutation F120L einen *CYP51*-Haplotyp in *P. pachyrhizi* (Kapitel 4.4). Somit lässt sich festhalten, dass die analysierten Prozentwerte der beiden Mutationen V130A + Y131F in Abbildung 18 annähernd gleich verlaufen. Lediglich in den geringen Prozentbereichen (bis 10 %) kommt es, bedingt durch die Schwankungen von $\pm 5\%$ durch die Pyrosequenzierungsmethode, zu leicht abweichenden Werten für V130A und Y131F. Aus diesem Grund werden die Ergebnisse dieser zwei Mutationen zusammengefasst. Für Prothioconazol, Cyproconazol und Tetraconazol ist ein stetiger Anstieg der Mutationen V130A + Y131F ab einer Konzentration von 3 mg/l zu erkennen. Durch Epoxiconazol wird eine Selektion der beiden Mutationen ab einer Konzentration von 10 mg/l hervorgerufen. Der prozentuale Anteil der V130A + Y131F nimmt somit durch eine Anwendung dieser DMI mit der Höhe der angewendeten Konzentration zu. In den höchsten analysierten Konzentrationen sind Werte von jeweils bis zu 26 % Mutationsanteil erreicht worden (V130A + Y131F). Im Vergleich hierzu finden durch die Wirkstoffe Tebuconazol und Metconazol keine Selektionen dieser Mutationen statt. Mit geringen Ausnahmen von $< 8\%$ Mutationsanteil ließen sich die Mutationen V130A + Y131F in keiner hier angewandten Konzentration nachweisen. Die Ausnahmen sind möglicherweise bedingt durch die Pyrosequenzierungsmethode und können hier vernachlässigt werden.

Zusammenfassend lässt sich hervorheben, dass durch die Wirkstoffe Tebuconazol und Metconazol die Haplotypen F120L + Y131H, F120L + Y131H + I145V und F120L + Y131H + F154Y selektiert werden. Hierbei steigt der Mutationsanteil, in Abhängigkeit zu den aufsteigenden Konzentrationen, für beide Wirkstoffe auf 37 % F120L, 30 % Y131H, 12 % I145V und 10 % F154Y an. Der Haplotyp F120L + Y131H wird somit am stärksten selektiert. Der Haplotyp F120L + V130A + Y131F wird durch diese zwei DMI nicht selektiert. Ein entgegengesetztes Verhalten wird für Prothioconazol, Cyproconazol, Epoxiconazol und Tetraconazol beobachtet. Nachdem in den geringeren Konzentrationen (3–10 mg/l) vorerst die Haplotypen F120L + Y131H + I145V/F154Y selektiert werden, erhöht sich der Mutationsanteil des Haplotypen F120L + V130A + Y131F in den höchsten Konzentrationen auf bis zu 26 %. Difenconazol zeigt im Gegensatz zu den anderen DMI, bedingt durch die geringe Wirksamkeit (Kapitel 3.4.3), kein eindeutiges Selektionsmuster auf. In der höchsten Konzentration sind sowohl die Haplotypen F120L + Y131H (+ I145V/F154Y) als auch F120L + V130A + Y131F vorhanden.

4 Diskussion

Phakopsora pachyrhizi ist der Erreger des Asiatischen Sojabohnenrostes, welcher aufgrund seiner biotrophen Lebensweise unter experimentellen Bedingungen im Labor schwieriger als saprophytische Pilze zu handhaben ist, da Haltung und Vermehrung auf Kulturmedien (*in vitro*) nicht möglich sind. Zur Gewinnung der Populationen von *P. pachyrhizi* werden zumeist infizierte Blätter aus Regionen mit häufigem Auftreten des Pilzes (z. B. Südamerika) vor Ort getrocknet und an den jeweiligen Zielort versendet. In diesem Zeitraum nimmt die Vitalität der Sporen, je nach Dauer des Transportes, deutlich ab. Demzufolge ist die Isolatgewinnung und nachfolgende Vermehrung auf Pflanzenmaterial mit einem großen Zeitaufwand und mehreren Übertragungszyklen verbunden. Der erhöhte Arbeitsaufwand, welcher bereits bei der Erzeugung vitaler Populationen anfällt, ist womöglich einer der Gründe, warum bislang keine Studien von *P. pachyrhizi* veröffentlicht wurden, in denen die Sensitivität von Einsporisolaten gegenüber Fungiziden getestet und die Resistenzmechanismen dieser Pilzart in Einsporisolaten charakterisiert wurden. Unter natürlichen Bedingungen auf dem Feld treten Populationen von *P. pachyrhizi* auf, die sehr heterogen sind und aus einer Mischung von sensitiven und angepassten Individuen bestehen (Akamatsu et al., 2013; Godoy et al., 2016; García-Rodríguez et al., 2021). Selbst Populationen, die von einem Blatt gewonnen werden, können aus eigener Erfahrung eine hohe genetische Variabilität aufweisen. Diese Variabilität der Populationen wird zusätzlich durch zwei haploide Zellkerne in jeder Uredospore im Vergleich z. B. zu haploiden Ascomycota erhöht. Einsporisolate von *P. pachyrhizi* bieten somit die bestmögliche Alternative, um die genetische Variabilität des Pilzes auf ein Minimum zu reduzieren.

Zur Beurteilung der Auswirkungen einer Resistenz des Pilzes gegenüber Fungizide und des Einflusses der beteiligten Resistenzmechanismen (z. B. Punktmutationen) ist es von Vorteil, mit Einsporisolaten zu arbeiten, da diese Isolate aus einer Spore stammen und somit genetisch identische Klone sind. Eigenen Studien zufolge sind Einsporisolate von *P. pachyrhizi* hinsichtlich ihrer Genetik über einen längeren Zeitraum stabil. Die Möglichkeit die Uredosporen bei -80 °C zu konservieren und bei Bedarf zu rekultivieren (Schmitz & Stammler, 2012) bietet die Option, die genetisch identischen Isolate über einen längeren Zeitraum für mehrere Forschungsansätze und Fragestellungen zu nutzen. Somit können bspw. Sensitivitätsuntersuchungen mit unterschiedlichen Haplotypen von *P. pachyrhizi* unter konstanten Voraussetzungen (Genetik) mit unterschiedlichen Rahmenbedingungen (z. B. unterschiedliche Fungizide) wiederholt durchgeführt werden. Die genetisch identischen Isolate ermöglichen eine direkte Vergleichbarkeit der aus den Sensitivitätsstudien resultierenden ED₅₀-Werte zwischen mehreren Versuchen.

Darüber hinaus kann eine Charakterisierung der unterschiedlichen Resistenzmechanismen und deren Einfluss auf Fungizide individuell bewertet werden. Aufgrund ihrer genetischen Stabilität stellen die gewonnenen Einsporisolate von *P. pachyrhizi* somit auch für zukünftige Studien ein wichtiges Hilfsmittel dar, um die Wirksamkeit der bereits bekannten und neuer Fungizide untereinander zu vergleichen und entsprechend zu bewerten.

Eine Untersuchung der Einsporisolate und ihrer Resistenzmechanismen in Sensitivitätsstudien ergibt ein Worst-Case-Szenario für die Wirksamkeit der Fungizide, da die vorherrschenden Bedingungen in dieser Form in der freien Natur nicht anzutreffen sind. Es wurden unter anderem hoch adaptierte Einsporisolate verwendet und zudem die Bedingungen für die Pilzentwicklung optimal gewählt (z. B. Temperatur und Luftfeuchtigkeit). Dennoch bieten diese Sensitivitätsstudien mit hochadaptierten Einsporisolaten die ideale Möglichkeit, den Einfluss unterschiedlicher Resistenzmechanismen auf die Wirksamkeit von Fungiziden zu bewerten. Die Ergebnisse können genutzt werden, um zu beurteilen, wie sich die Populationen von *P. pachyrhizi* im Feld unter kontinuierlicher Fungizidanwendung entwickeln könnten und welche Auswirkungen eine selektierte, angepasste Population auf die Fungizidwirksamkeit hat. Diese Informationen sind hilfreich, um die Geschwindigkeit des Auftretens und der Ausbreitung resistenter Individuen von *P. pachyrhizi* im Feld zu bewerten und mit einem geeigneten Resistenzmanagement entgegenzuwirken.

In dieser Studie wurden Einsporisolate von *P. pachyrhizi* gewonnen, welche zur Charakterisierung der Resistenzmechanismen gegenüber Fungiziden dienen (Stilgenbauer et al., 2022). Der besondere Schwerpunkt der mit diesen Einsporisolaten durchgeführten Studien lag auf der verminderten Sensitivität gegenüber den DMI sowie auf deren Zielgen *CYP51*. Zur Beurteilung der Sensitivität der Einsporisolate gegenüber DMI wurde das Detached Leaf Testsystem verwendet, da diese Methode die Möglichkeit bietet, mehrere Isolate in einem Versuchsaufbau zu testen, ohne das Risiko einer Vermischung und Kontamination der Einsporisolate. Frühere Studien konnten bereits aufzeigen, dass mehrere Resistenzmechanismen an der Anpassung von *P. pachyrhizi* gegenüber DMI beteiligt sind (Schmitz et al., 2014). In diesem Zusammenhang wiesen Schmitz et al. (2014) darauf hin, dass neben mehreren SNPs und einer Überexpression des *CYP51* zusätzlich mehrere Kopien des *CYP51* im Genom von *P. pachyrhizi* vorhanden sind. Diese Vielzahl von Resistenzmechanismen, die in unterschiedlichen Anteilen in Populationen vorhanden sind, sowie der dikaryotische Zustand der Uredosporen des Pilzes, geben einen Hinweis auf die Komplexität der Resistenzentwicklung von *P. pachyrhizi* gegenüber DMI.

In den folgenden Abschnitten werden Sequenzanalysen des *CYP51* der Einsporisolate sowie deren Sensitivitätsunterschiede gegenüber DMI diskutiert und neben Punktmutationen und der

Überexpression auch die Kopienzahl des *CYP51* in *P. pachyrhizi* analysiert. Darüber hinaus werden Kreuzresistenzmuster verschiedener DMI im Hinblick auf den zukünftigen Fungizideinsatz bewertet und zusätzlich erläutert, welche Mutationen im *CYP51* durch die Anwendung unterschiedlicher DMI selektiert werden.

4.1 Bestätigung der genetischen Identität der Einsporisolate von *P. pachyrhizi* durch konsistente Mutationswerte nach DMI-Behandlung

Vor allem in Regionen mit einem intensiven Sojaanbau und mit geeigneten Witterungsbedingungen für eine Ausbreitung von *P. pachyrhizi*, stellt der starke Befallsdruck mit hohen Ertragsausfällen eine große ökonomische Bedeutung dar (Godoy et al., 2016; Langenbach et al., 2016; Murithi et al., 2016). Der vermehrte Einsatz von Fungiziden und der dadurch ausgeübte Selektionsdruck auf die vorherrschende Pilzpopulation, sorgte in den letzten Jahren vor allem in Südamerika für einen deutlichen Anstieg des Auftretens von Fungizidresistenzen in *P. pachyrhizi*. Dies ließ sich bei den SDHI und QoI aber auch bei den DMI beobachten (Godoy et al., 2016; Simões et al., 2017; De Mello et al., 2021; Müller et al., 2021). Bei den SDHI und den QoI sorgen je eine Mutation im jeweiligen Zielgen für eine reduzierte Sensitivität gegenüber den entsprechenden Wirkstoffen (Godoy et al., 2016; Klosowski et al., 2016b; Simões et al., 2017). Bei den DMI zeigte sich durch die vermehrte Anwendung ein kontinuierlicher „Shift“ hin zu einer angepassten Pilzpopulation auf dem Feld (Godoy et al., 2016). Diese kontinuierliche Sensitivitätsverschiebung kann unter anderem durch mehrere unterschiedlichen Punktmutationen im Zielgen *CYP51* erklärt werden (Schmitz et al., 2014).

In dieser Studie wurden Populationen von *P. pachyrhizi* zur Erzeugung der Einsporisolate verwendet, welche eine Evolution in der Fungizidanpassung gegenüber SDHI, QoI und insbesondere DMI durchlaufen hatten. Dies hatte das Ziel, aus den angepassten Populationen hoch adaptierte Einsporisolate mit Resistenzmechanismen gegenüber DMI zu erhalten. Da der Prozess der Einsporisolatgewinnung mit einer Vielzahl an Übertragungszyklen verbunden ist, musste gewährleistet werden, dass die gewonnen Einsporisolate genetisch identisch und somit Klone sind. Zu diesem Zweck wurde ein DLT mit unterschiedlichen DMI durchgeführt und im Anschluss die Mutationswerte im *CYP51* mittels Pyrosequenzierung bestimmt. Mit dieser Methode konnte gezeigt werden, dass die Mutationswerte im *CYP51* der Einsporisolate vor und nach der DMI-Behandlung nicht differieren. Im Gegensatz hierzu ließen sich in der Referenzpopulation (P-18) nach der Applikation deutliche Unterschiede in den jeweiligen Mutationshäufigkeiten erkennen. Im Ausgangsmaterial (Inokulum) der Population konnte durch die Pyrosequenzierungsmethode (Nachweisgrenze ca. 5 %) keine der bekannten Mutationen im

CYP51 nachgewiesen werden. Nach der DMI-Applikation wurden unterschiedliche Mutationen im *CYP51* deutlich selektiert (Tabelle A23). Der Haplotyp F120L + Y131H + I145V ist hierbei offensichtlich empfindlicher gegenüber Prothioconazol, Epoxiconazol, Cyproconazol und Tetraconazol als der Haplotyp F120L + V130A + Y131F. Dies wird durch die Zunahme der F120L + V130A + Y131F Mutationen in der Population nach der Behandlung mit den genannten DMI belegt. Die Sporen, welche diese Mutationskombination aufweisen, überleben die Behandlung mit höheren Konzentrationen besser als der Haplotyp F120L + Y131H + I145V. Bei Tebuconazol und Metconazol ist in den gezeigten Daten das Gegenteil der Fall. Hier nahm der Anteil des Haplotypen F120L + Y131H + I145V nach der Behandlung mit den entsprechenden DMI zu. Die unterschiedliche Selektion von *CYP51*-Haplotypen durch unterschiedliche DMI deuten auf eine fehlende Kreuzresistenz hin, welche im Zuge dieser Arbeit in Kapitel 4.6.1 detailliert diskutiert wird.

Die Tatsache, dass durch unterschiedliche DMI-Anwendungen, unterschiedliche Mutationen bereits nach einer Anwendung selektiert wurden (Tabelle A23, Population P-18), diente der Bestätigung der genetischen Identität der Einsporisolate. Sowohl im Inokulum als auch in der unbehandelten Kontrolle sowie nach der Anwendung von sieben unterschiedlicher DMI zeigten alle neun Einsporisolate keine Unterschiede in deren Mutationshäufigkeiten (Tabelle A23). Hierbei sind Abweichungen der Pyrosequenzierungsmethode von $\pm 5\%$ zu berücksichtigen. Es lässt sich festhalten, dass bei keinem der neun Einsporisolaten eine Verschiebung der vorhandenen Mutationshäufigkeiten im *CYP51* aufgrund der unterschiedlichen DMI-Behandlungen festgestellt werden konnte. Diese Beobachtung zeigt, dass trotz fehlender Kreuzresistenz (Kapitel 4.6.1), keines der getesteten DMI einen bestimmten *CYP51*-Haplotyp in den Einsporisolaten selektiert und dass somit die gewonnenen Isolate aus einer Spore erzeugt wurden und genetisch identisch sind.

4.2 Sequenzanalysen des *CYP51* der Einsporisolate von *P. pachyrhizi* zur Identifikation neuer Punktmutationen (V130A, I145V, F154Y)

In Pilzen sind mehrere Resistenzmechanismen beschrieben, welche zu einer Fungizidresistenz führen können (Ma & Michailides, 2005). Hierbei stellen Punktmutationen im Zielgen, welche in direktem Zusammenhang mit einer geringeren Sensitivität des Pilzes gegenüber Fungiziden stehen, den am häufigsten beschriebenen Mechanismus dar. Die zufällig entstandenen Mutationen verändern die Aminosäureabfolge im Zielenzym und die Bindung des Fungizids kann somit unterschiedlich stark beeinflusst werden (Ma & Michailides, 2005; Brent & Hollomon, 2007a; Deising et al., 2008). In *P. pachyrhizi* wurden bislang sechs SNPs im *CYP51* identifiziert, welche

in unterschiedlichem Ausmaß die Sensitivität des Pilzes gegenüber DMI reduzieren. Als Resistenzmutationen wurden hierbei F120L, Y131F, Y131H, K142R, I145F und I475T beschrieben (Schmitz et al., 2014). In anderen phytopathogenen Pilzen wie bspw. *Ramularia collo-cygni*, *Z. tritici* und *V. inaequalis* wurden auftretenden *CYP51*-Mutationen teilweise in Kombination vorgefunden und somit ließen sich die entsprechenden Isolate in unterschiedliche *CYP51*-Haplotypen, je nach auftretenden Mutationen bzw. Mutationskombinationen, einteilen (Huf et al., 2018; Rehfus et al., 2019; Hoffmeister et al., 2021). Auch bei *P. pachyrhizi* wurde die Vermutung geäußert, dass bestimmte Mutationen häufig in Kombinationen in Populationen nachzuweisen sind (Schmitz et al., 2014).

Zur Identifizierung der vorkommenden SNPs innerhalb des *CYP51* der Einsporisolate von *P. pachyrhizi*, wurde das Gen sequenziert und die erhaltenen Sequenzen anschließend mit der WT-Sequenz von *P. pachyrhizi* verglichen. Trotz der vorhandenen Einsporisolate musste im Voraus der Sequenzierung eine Klonierung erfolgen. Dies hat den Hintergrund, dass *P. pachyrhizi* zwei haploide Zellkerne innerhalb einer Uredospore besitzt (Loehrer et al., 2014), welche Hypothesen zufolge zusätzlich mehrere *CYP51*-Kopien enthalten (Schmitz et al., 2014). Zur Sicherstellung, dass der sequenzierte *CYP51*-Strang lediglich eine *CYP51*-Sequenz und keine Vermischung mehrerer unterschiedlicher *CYP51*-Sequenzen repräsentiert, musste vor der eigentlichen Sequenzierung eine Transformation eines einzelnen *CYP51*-Strangs in *E. coli* erfolgen.

Im Zuge der *CYP51*-Sequenzierungen der Einsporisolate konnten drei neue, bislang nicht für *P. pachyrhizi* beschriebene, Punktmutationen detektiert werden (Tabelle 17).

Die Mutation V130A, bei der an Aminosäureposition V130 ein Austausch von Valin (GTC) zu Alanin (GCC) vorliegt, kam in vier der neun Einsporisolate vor (Tabelle 17 und 18). Hierbei wurde die Mutation kombiniert auf einem DNA-Strang mit den bereits durch Schmitz et al. (2014) beschriebenen Mutationen F120L und Y131F vorgefunden. In drei der vier Einsporisolaten konnte die Mutationskombination (F120L + V130A + Y131F) in ca. 31 der 100 Sequenzen detektiert werden und in einem Isolat in 19 der 100 Sequenzen (Abbildung 7 und 9, A–C). Die jeweils verbleibenden Sequenzen setzen sich aus zwei unterschiedlichen WT-Sequenzen zusammen, welche sich lediglich an vier Positionen unterscheiden (Abbildung A21). Das Vorhandensein von zwei unterschiedlichen WT-Sequenzen sowie der mutierten Sequenzen stellt die Hypothese über drei *CYP51*-Allele innerhalb der Einsporisolate von *P. pachyrhizi* auf. Diese Aussage wird im nachfolgenden Kapitel 4.3 näher diskutiert. Die Mutation V130A konnte homolog bereits in weiteren phytopathogenen Pilzen, wie z. B. *R. collo-cygni* (V136A) und *Z. tritici* (V136A), im Zusammenhang mit einer geringeren Sensitivität gegenüber DMI beschrieben werden (Cools et

al., 2011; Rehfus et al., 2019). Diese Tatsache sowie die direkte Lage der Aminosäure V130 am aktiven Zentrum des CYP51-Enzyms (Abbildung 11), lässt die Hypothese zu, dass diese Mutation einen direkten Einfluss auf die Bindung von DMI hat. Diese Aussage wird in Kapitel 4.6 unter Einbezug der Sensitivitätsstudien abschließend diskutiert.

Des Weiteren wurde die neue Mutation I145V in zwei der neun Einsporisolaten detektiert. Diese trat in beiden Isolaten jeweils kombiniert auf einem DNA-Strang mit den bereits bekannten Mutationen F120L und Y131H (Schmitz et al., 2014) auf und wird durch eine Aminosäureveränderung an Position I145 von Isoleucin (ATC) zu Valin (GTC) hervorgerufen (Tabelle 17). In beiden Einsporisolaten wurde die Mutationskombination (F120L + Y131H + I145V) in ca. 34 der 100 Sequenzen detektiert. Die jeweils verbleibenden Sequenzen setzen sich ebenfalls aus den beiden WT-Sequenzen zusammen (Abbildung 8, A und B). Die Mutation I145V ist nach derzeitigem Kenntnisstand in keinem phytopathogenen Pilz beschrieben und somit sind keine potenziellen Sensitivitätsverluste gegenüber DMI bekannt. In einem *CYP51*-Sequenzvergleich konnten allerdings in acht von zwölf Pilzen, an der homologen Position zur I145V Mutation in *P. pachyrhizi*, die Aminosäure Valin identifiziert werden (Abbildung 10). Diese Erkenntnis lässt die Hypothese zu, dass es sich bei der I145V Mutation möglicherweise nicht um eine Resistenzmutation handelt, sondern ggf. enzymatische Vorteile hervorruft. Die Lage der Mutation I145V im CYP51-Enzym deutet ebenfalls darauf hin, dass durch eine Veränderung der Aminosäure kein direkter Einfluss auf die Bindung der DMI erfolgt (Abbildung 11). Es besteht kein Kontakt der Aminosäure zum aktiven Zentrum des Enzyms und somit zur DMI-Bindungsstelle. Allerdings steht die Aminosäure I145 in engem Kontakt zur Häm-Gruppe und kann aufgrund ihrer Nähe ungerichtete Van-der-Waals-Kräfte ausüben und somit die Position der Häm-Gruppe beeinflussen. Verändert sich die Lage der Häm-Gruppe ist eine Verlagerung des aktiven Zentrums des Enzyms möglich und die DMI-Bindung könnte somit indirekt beeinflusst werden. Der Einfluss der I145V Mutation auf die Sensitivität unterschiedlicher DMI wird ebenfalls in Kapitel 4.6 abschließend diskutiert.

Die dritte neu identifizierte Mutation ist die F154Y, welche am Codon 154 durch einen Austausch von Phenylalanin (TTT) zu Tyrosin (TAT) hervorgerufen wird (Tabelle 17). Diese Mutation kommt in einem der neun Einsporisolaten vor und wie bereits die I145V Mutation tritt sie auf einem DNA-Strang kombiniert mit den Mutationen F120L und Y131H auf. Die Mutationskombination (F120L + Y131H + F154Y) konnte innerhalb des Einsporisolates in 32 der 100 Sequenzen nachgewiesen werden (Abbildung 8, C). Bislang ist keine homologe Mutation in anderen phytopathogenen Pilzen beschrieben und die entfernte Lage der Aminosäure sowohl zur Häm-Gruppe als auch zum aktiven Zentrum des CYP51 deutet darauf hin, dass eine

Aminosäureveränderung an dieser Position keinen direkten oder indirekten Einfluss auf eine DMI-Bindung hat (Abbildung 10). Auch der Einfluss der F154Y Mutation wird in Bezug auf die Sensitivitätsstudien in Kapitel 4.6 abschließend diskutiert.

Zusammenfassend konnten drei neue Mutationen im *CYP51* der Einsporisolate von *P. pachyrhizi* identifiziert werden, deren Einfluss auf die DMI-Sensitivität in Kapitel 4.6 diskutiert wird. Diese neuen Mutationen lagen in folgenden Mutationskombinationen gekoppelt auf einem DNA-Strang vor: F120L + V130A + Y131F, F120L + Y131H + I145V und F120L + Y131H + F154Y.

4.3 Sequenzanalysen der Einsporisolate zur Ermittlung der *CYP51*-Kopienzahl im Genom von *P. pachyrhizi*

Das Vorhandensein zweier Zellkerne innerhalb einer Uredospore von *P. pachyrhizi* stellt die Hypothese auf, dass mindestens zwei *CYP51*-Kopien im Genom vorhanden sind. Diese Annahme wurde ebenfalls für das *SDHc*-Gen in *P. pachyrhizi* geäußert (Simões et al., 2017). Hier wurde nach erstmaligem Auftreten der Resistenzmutation I86F (*SDHc*) in der Saison 2015/16 kommuniziert, dass die Mutation in Populationen mittels qPCR zu maximal 50 % nachgewiesen werden konnte (Simões et al., 2017). Seit 2016 wurde diese Mutation in einem Monitoringprogramm der BASF SE in Feldproben aus Südamerika quantifiziert und bis heute wurde in keiner Population ein Mutationsanteil > 50 % nachgewiesen. Dieses Erkenntnis unterstützt die zuvor durch Simões et al. (2017) aufgestellte Hypothese, dass je eine Kopie des *SDHc* je Zellkern vorhanden ist und lediglich ein *SDHc* die Mutation I86F entwickelt. Veränderung des Zielenzym, verursacht durch eine Punktmutation, wurden bereits in anderen Pathogenen mit einer verringerten Enzymeffizienz und mit verbundenen Fitnessproblemen in Verbindung gebracht (Scalliet et al., 2012). Durch Beibehaltung einer WT-Kopie des Zielenzym *SDHc* kann *P. pachyrhizi* möglicherweise diese Nachteile, zumindest in einem gewissen Ausmaß, kompensieren.

Bereits im Jahr 2014 wurde durch Schmitz et al. (2014) die Hypothese aufgestellt, dass je Zellkern nicht nur eine, sondern mehrere Kopien des *CYP51* vorhanden sind. Diese Aussage stützte sich unter anderem auf der Tatsache, dass bei der Quantifizierung der *CYP51*-Resistenzmutationen mittels Pyrosequenzierung häufig Mutationshäufigkeiten von ca. 30 % und 50 % detektiert wurden. Mutationshäufigkeiten von ca. 30 % ließen auf mehrere Kopien des *CYP51* je Zellkern schließen, da sie nicht durch das Vorhandensein zweier Zellkerne erklärt werden konnten. Eine genauere Aussage über die Anzahl der *CYP51*-Kopien im Genom von *P. pachyrhizi* konnte zum damaligen Zeitpunkt nicht getroffen werden (Schmitz, 2013).

Das Vorhandensein mehrerer CYP51-Enzyme innerhalb eines Zellkerns wurde bereits für andere Pilzarten beschrieben (Becher et al., 2011; Cools et al., 2013; Sun et al., 2013; Hawkins et al., 2014). Sequenzanalysen von unterschiedlichen Ascomycota ergaben, dass die Anzahl der CYP51-Subtypen je nach Art zwischen einem bis drei CYP51-Enzymen variieren kann und Becher et al. (2011) teilten diese in drei Kladen (CYP51A, CYP51B, CYP51C) auf. Hierbei ist die Sequenzidentität der unterschiedlichen CYP51-Subtypen innerhalb eines Pathogens meist gering und liegt bspw. bei dem Vergleich des CYP51A und CYP51B in *Aspergillus fumigatus* gerade einmal bei 59 % (Mellado et al., 2001). Im Gegensatz zu den deutlichen Sequenzunterschieden der drei CYP51-Subtypen wurde aufgezeigt, dass in einigen Arten (z. B. *Aspergillus flavus*) Duplikate eines CYP51-Subtypes vorliegen, welche aus evolutionärer Sicht vergleichsweise jung sind und somit in ihren Sequenzen lediglich geringe Unterschiede aufwiesen (Becher et al., 2011; Becher & Wirsal, 2012). Neuste Studien konnten zusätzlich einen weiteren CYP51-Subtyp (CYP51D) in *Penicillium* bestätigen, welcher mit einer geringeren Azolsensitivität in Verbindung gebracht wurde (Van Rhijn et al., 2021). Diese Erkenntnis deuten darauf hin, dass das Vorhandensein mehrerer CYP51-Subtypen zu einer geringeren Azolsensitivität führen kann, wobei die genauen Mechanismen und Zusammenhänge noch nicht vollständig geklärt sind. Die meisten Studien wurden bislang mit Ascomycota durchgeführt. Für Basidiomycota wurde nach bisherigem Kenntnisstand lediglich ein CYP51-Subtyp beschrieben (Hawkins et al., 2014; Song et al., 2018).

Zur Ermittlung der CYP51-Kopienanzahl in *P. pachyrhizi* wurde das Gen jedes Einsporisolates amplifiziert, in *E. coli* transformiert und kloniert. Im Anschluss wurden 100 Klone je Einsporisolat sequenziert und mit der WT-Sequenz abgeglichen. Die Transformation einzelner CYP51-Stämme in *E. coli* diente der Sicherstellung, dass der sequenzierte CYP51-Strang lediglich eine CYP51-Sequenz und keine Vermischung mehrerer unterschiedlicher Sequenzen repräsentiert. Diese, in ihren Aminosäuren abweichenden Sequenzen sowie deren prozentuale Anteile, geben einen Hinweis darauf, wie viele unterschiedliche CYP51-Kopien in *P. pachyrhizi* existieren.

Bei der Analyse des Einsporisolates MS2-256/18P konnte gezeigt werden, dass in allen 100 Sequenzen keinerlei SNPs im Vergleich zur WT-Referenz vorhanden und somit alle Sequenzen untereinander identisch sind. Mithilfe dieses Isolates konnten somit keine Rückschlüsse auf die CYP51-Kopienzahl gezogen werden, da die Sequenzen untereinander nicht differierten.

In den verbleibenden Einsporisolaten konnten Mutationen innerhalb der CYP51-Sequenzen nachgewiesen werden (Tabelle 18). Hier zeigte sich, dass der jeweilige Anteil der Sequenzen, die die Mutationen enthalten, zwischen den Einsporisolaten variierte. Bei einem Einsporisolat wiesen 19 % der analysierten Sequenzen die jeweilige Mutationskombination auf, bei sechs

Einsporisolaten zeigten ca. 32 % der Sequenzen die jeweilige Mutationskombination und bei einem weiteren Einsporisolat wiesen 50 % der 100 Sequenzen die jeweilige Mutationskombination auf (Abbildung 7, 8, 9). Wie in Kapitel 4.2 bereits erläutert, lagen die Mutationen jeweils in Zweier- und Dreierkombinationen vor, gekoppelt auf einem DNA-Strang. Die neben den mutierten DNA-Strängen verbleibenden Sequenzen (50–81 Sequenzen, je nach Isolat), setzten sich aus zwei unterschiedlichen Sequenzen zusammen. Hierbei handelt es sich zum einen um die zuvor als WT definierte *CYP51*-Sequenz und zum anderen um eine weitere Sequenz, welche sich lediglich an vier Stellen in der Nukleotidsequenz der mRNA unterscheidet (Abbildung A20). Bei den Unterschieden handelt es sich um eine stille Mutation an Aminosäureposition 131 (TAC → TAT) und um drei Aminosäureaustausche an Position 164 (Threonin → Alanin), Position 280 (Glycin → Glutaminsäure) und Position 334 (Alanin → Valin). Da die Sequenz nahezu identisch zu der WT-Sequenz ist und keine Annahme besteht, dass die vorhandenen Aminosäureaustausche mit einer verringerten Sensitivität gegenüber DMI in Verbindung stehen, wird im weiteren Verlauf der Diskussion von WT1 (Abbildung A20, A) und WT2 (Abbildung A20, B) gesprochen.

In allen Einsporisolaten, welche eine Mutationskombination im *CYP51* aufwiesen, konnten drei unterschiedlichen Sequenzen des *CYP51* bestimmt werden. Hierbei handelte es sich um das WT1-Allel, das WT2-Allel und das mutierte Allel. Diese drei *CYP51*-Allele waren jedoch nicht in jedem Einsporisolat zu gleichen Anteilen vorhanden. Die durch die Sequenzierung erhaltenen Anteile der unterschiedlichen *CYP51*-Allele innerhalb der Einsporisolate wurden in Abbildung 19 schematisch zusammengefasst. Da nicht bekannt ist, wie sich die unterschiedlichen Allele auf die zwei Zellkerne von *P. pachyrrhizi* verteilen, dient diese Abbildung lediglich als schematischen Darstellung.

Aus dem prozentualen Anteil der unterschiedlichen *CYP51*-Sequenzen lässt sich schließen, dass es im gesamten Genom von *P. pachyrrhizi* sechs *CYP51*-Kopien gibt, die sich aus drei unterschiedlichen *CYP51*-Allelen zusammensetzen können. Mit dieser Kopienanzahl können alle in den Einsporisolaten vorkommenden Mutationshäufigkeiten von ca. 17 % ($100/6 \text{ Kopien} = 16,66 \%$), 33 % ($= 16,66 \% \times 2$) und 50 % ($= 16,66 \% \times 3$) erklärt werden. Wie in Abbildung 19 zu erkennen ist, setzen sich die verbleibenden Sequenzen aus der WT1-Sequenz und der WT2-Sequenz zusammen. Lediglich das nicht adaptierte WT-Einsporisolat (Abbildung 19, A) weist ausschließlich die WT1-Sequenz auf. Für diesen Fall lässt sich nicht eindeutig nachweisen, ob auch hier sechs *CYP51*-Kopien vorliegen.

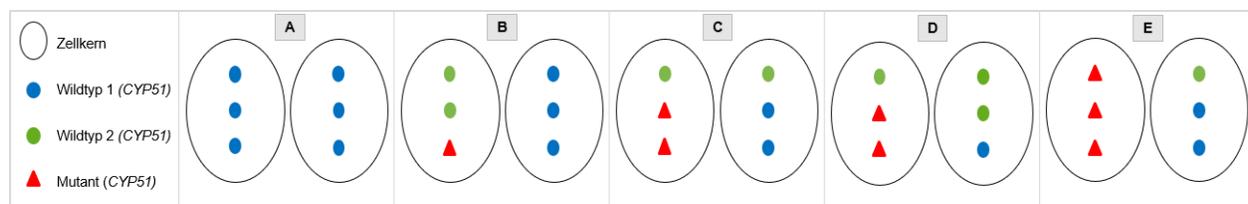


Abbildung 19: Schematische Darstellung der CYP51-Kopienanzahl in *Phakopsora pachyrhizi*. Durch eine Klonierung und anschließende Sequenzierung von 100 Klonen des CYP51 der Einsporisolate von *P. pachyrhizi* konnten drei unterschiedliche CYP51-Allele ermittelt werden. Die jeweiligen Verhältnisse der Sequenzen (WT1, WT2, Mutant) deuten auf drei CYP51-Kopien je Zellkern hin, welches einer Anzahl von insgesamt sechs CYP51-Kopien im Genom von *P. pachyrhizi* entspricht. Da keine Informationen vorliegen, wie die unterschiedlichen Allele auf die beiden Zellkerne von *P. pachyrhizi* aufgeteilt sind, dient diese schematische Darstellung lediglich als Veranschaulichung, wie viele CYP51-Kopien in welchen möglichen Verhältnissen im Genom vorliegen. Die Abbildung zeigt die Verteilung der CYP51-Kopien für das WT-Einsporisolat (A) sowie für die Isolate mit ca. 17 % (B), 33 % (C, D) und 50 % (E) Mutationsanteil. Da in den Isolaten mit ca. 33 % Mutationsanteil die jeweiligen Anteile der WT1- und WT2-Sequenzen differierten, wurden beide Möglichkeiten aufgeführt (C, D).

Eine weitere Erkenntnis ist, dass die jeweils mutierten CYP51-Allele immer mit der Sequenz des WT2 einhergehen. Mit Ausnahme der jeweiligen Mutationskombinationen weisen somit die mutierten mRNA-Stränge sowie die Sequenz des WT2 eine identische Sequenzabfolge auf. Der Grund, warum das mutierte Allel mit der Sequenz des WT2 zusammenhängt, liegt vermutlich an der stillen Mutation an Aminosäureposition Y131 (TAC (WT1) → TAT (WT2)). Die Voraussetzung sowohl für die Entstehung der Mutation Y131F (TTT) als auch für die Mutation Y131H (CAT), ist unter anderem ein T an der dritten Stelle im Triplet an Aminosäureposition Y131. Dies ist bei der Sequenz des WT2 der Fall, nicht aber bei der Sequenz des WT1. Bis auf eine Ausnahme (Mutation I145F), treten alle derzeit bekannten CYP51-Haplotypen von *P. pachyrhizi* immer in Kombination mit der Mutation Y131F oder der Mutation Y131H auf (Kapitel 4.4). Es erscheint nach aktuellem Kenntnisstand, als wäre WT2 als Vorstufe zur Entwicklung dieser Mutationskombinationen erforderlich. Lediglich die Mutation I145F kommt allein und nicht in Kombination mit einer an Aminosäureposition Y131 auftretenden Mutation vor. Die Klonierung und Sequenzierung von Populationen mit der Mutation I145F ergaben, dass die Mutation auf einem DNA-Strang und somit in Verbindung mit der Sequenz des WT1 auftrat. Somit unterscheidet sich die I145F Mutation von allen weiteren bekannten Haplotypen. In diesem Fall scheint keine Zwischenstufe (WT2) notwendig, um diese Mutation zu entwickeln. Da allerdings kein Einsporisolat mit der Mutation I145F vorlag, kann keine Aussage darüber getroffen werden, wie die Verteilung der CYP51-Allele aussehen würde und ob WT2 im Genom dieser Isolate vorhanden ist.

Da gezeigt werden konnte, dass die drei CYP51-Allele in *P. pachyrhizi* (WT1, WT2, Mutant) bis auf wenige Ausnahmen eine nahezu identische Sequenz aufzeigen, liegt die Vermutung nahe,

dass es sich jeweils um Kopien des *CYP51* (WT1) handelt. Insofern handelt es sich nicht um unterschiedliche *CYP51*-Subtypen, wie sie bspw. für *A. fumigatus* beschrieben wurden (Mellado et al., 2001; Becher et al., 2011), da die jeweiligen *CYP51*-Sequenzen in diesem Fall vermutlich in geringerem Maß übereinstimmen würden.

Außerdem wurde gezeigt, dass in keinem der Einsporisolate ein Mutationsanteil von 50 % überschritten wurde und folglich eine bis drei von sechs *CYP51*-Kopien mutiert waren (Abbildung 19). Bereits durch Schmitz (2013) wurde festgestellt, dass die durch Pyrosequenzierung ermittelten Prozentwerte der damals bekannten *CYP51*-Mutationen 50 % Mutationsanteil nicht überschritten. Diese Annahme konnte durch einer Monitoringstudie bestätigt werden. Keine Mutation im *CYP51* zeigte einen höheren Anteil als 50 % innerhalb von ca. 1400 analysierten Populationen im Zeitraum 2017-2021 auf. Wie bereits für die I86F Mutation im *SDHc* beschrieben (Simões et al., 2017), gilt daher auch für den quantitativen Anteil der *CYP51*-Mutationen nach heutigem Kenntnisstand, dass der Mutationsanteil von > 50 % nicht überschritten wird. Unter der Annahme, dass die sechs vorhandenen *CYP51*-Kopien gleichmäßig in beiden Zellkernen verteilt sind, kann die Hypothese aufgestellt werden, dass lediglich ein Zellkern die mutierten Allele und der andere Zellkern die WT-Allele trägt (Abbildung 19). Aufgrund der Tatsache, dass maximal drei der sechs vorhandenen *CYP51*-Kopien in *P. pachyrhizi* Resistenzmutationen aufweisen, wird vermutet, dass die Enzymaktivität durch Mutationen im *CYP51* negativ beeinflusst wird. Ob der Pilz in mehr als drei Kopien Resistenzmutationen entwickeln kann, oder ob diese Situation für den Pilz aufgrund reduzierter Stoffwechselfvorgänge möglicherweise letal ist, konnte zum jetzigen Zeitpunkt nicht geklärt werden.

Zusammengefasst kann festgehalten werden, dass nach bisherigem Kenntnisstand sechs *CYP51*-Kopien im Genom von *P. pachyrhizi* existieren. Diese lassen sich in drei *CYP51*-Allele mit unterschiedlichen Sequenzen unterteilen. WT2 unterscheidet sich lediglich an vier Positionen und die mutierten Allele zusätzlich an den Stellen der Mutationen zur WT1-Sequenz. Dies deutet darauf hin, dass es nicht mehrere *CYP51*-Subtypen gibt, wie z. B. für einige Pezizomycotina-Arten beschrieben (Becher et al., 2011; Becher & Wirsal, 2012), sondern lediglich ein *CYP51*, welches in drei unterschiedlichen Allelen vorliegt. Aus evolutionärer Sicht könnte die Entwicklung des WT2-Allels sowie das anschließende Auftreten der Mutationskombinationen vergleichsweise jung sein, da die Sequenzunterschiede gering sind. Die Tatsache, dass bislang keine *CYP51*-Mutation in quantitativen Anteilen von > 50 % beschrieben wurde, könnte darauf hinweisen, dass die mutierten *CYP51*-Kopien mit einem enzymatischen Nachteil verbunden sind.

4.4 CYP51-Haplotypen in *P. pachyrhizi*

Unterschiedlichste Mechanismen wie bspw. die sexuelle Rekombination, somatische Hybridisierung, Migration sowie spontan entstandene Mutationen können für die genetische Variation innerhalb von Pilzpopulationen verantwortlich sein (McDonald, 1997). Bislang wurde für *P. pachyrhizi* unter Freilandbedingungen keine sexuelle Vermehrung nachgewiesen und dennoch sind die Populationen des Pilzes genetisch sehr heterogen (Twizeyimana et al., 2011b; Zhang et al., 2012; Jorge et al., 2015; Lourdes Rocha et al., 2015; Darben et al., 2020). Diese Diversität könnte unter anderem durch parasexuelle Kernrekombinationen zwischen verschiedenen Isolaten, Keimschlauchfusionen oder Hyphenanastomosen verursacht werden (Vittal et al., 2012). Diese Wege der Rekombinationen wurden bereits für andere Rostpilze wie *P. triticina* beschrieben (Wang & McCallum, 2009). Auch das Vorhandensein zweier haploider Zellkerne sowie der kurze Entwicklungszyklus von knapp zwei Wochen tragen dazu bei, dass sich Veränderungen im Genom vergleichsweise schnell etablieren können (Goellner et al., 2010; Loehrer et al., 2014). Sowohl die räumliche Verbreitung des Pilzes als auch die Infektion der Wirtspflanzen erfolgen durch die Uredosporen von *P. pachyrhizi* (Goellner et al., 2010). Diese können mit dem Wind hunderte Kilometer weit verbreitet werden, bevor sie Wirtspflanzen infizieren (Isard et al., 2005). Aufgrund der Fähigkeit des Pilzes, sich schnell zu reproduzieren und sich über große Entfernungen zu verbreiten, können spontan erworbene Mutationen, die mit einem vorteilhaften Merkmal verbunden sind, in kurzer Zeit selektiert werden und zu einer veränderten Population führen. Somit ist der Pilz in der Lage, vergleichsweise schnell Resistenzgene in Sojapflanzen zu überwinden und eine Resistenz gegenüber Fungiziden zu etablieren (Twizeyimana et al., 2011b; Twizeyimana & Hartman, 2012; Jorge et al., 2015; Darben et al., 2020). Ein intensives Monitoring zur Bewertung der genetischen Vielfalt der Populationen von *P. pachyrhizi* spielt eine entscheidende Rolle für ein angepasstes Resistenzmanagement. Das lokale Auftreten von Resistenzmutationen gibt bspw. Aufschluss darüber, wie *P. pachyrhizi* an diesen Standorten zukünftig erfolgreich mit Fungiziden bekämpft werden kann, ohne einen starken Selektionsdruck auf die vorherrschende Pilzpopulation auszuüben.

Zum Nachweis der genetischen Vielfalt von *P. pachyrhizi* in Bezug auf die CYP51-Mutationen wurde ein Monitoringprogramm durchgeführt, um die Mutationen zu identifizieren, die in Sojaanbaugebieten in Südamerika im Zeitraum 2017-2021 auftraten. Zu diesem Zweck wurden 1400 von *P. pachyrhizi* befallene Blattproben aus diesem Zeitraum von verschiedenen Standorten aus Südamerika analysiert, indem die bekannten CYP51-Mutationen mittels Pyrosequenzierung quantifiziert wurden.

Die in dieser Arbeit durchgeführte Sequenzierung der Einsporisolate von *P. pachyrhizi* konnten aufzeigen, dass die Resistenzmutationen im *CYP51* in Kombination auf einem DNA-Strang vorliegen (Kapitel 4.2 und 4.3). Hierbei konnten Zweier- und sogar Dreierkombinationen bestätigt werden. Die in den Einsporisolaten vorkommenden Mutationskombinationen waren: F120L + V130A + Y131F, F120L + Y131H, F120L + Y131H + I145V und F120L + Y131H + F154Y (Tabelle 18 und Abbildung 20, I–V). Diese auftretenden Mutationskombinationen konnten zusätzlich im Zuge des Monitoringprogramms bestätigt werden. Auch wenn der Mutationsanteil innerhalb von Populationen und nicht innerhalb von Isolaten untersucht wurde, geben die ermittelten Mutationshäufigkeiten ein Hinweis darauf, welche Mutationen in Kombination vorhanden sind. Da die *CYP51*-Haplotypen VI–VIII (Abbildung 20) nicht in den gewonnenen Einsporisolaten vorlagen, konnten in diesen Fällen ausschließlich die Monitoringdaten zur Diskussion der *CYP51*-Haplotypen einbezogen werden. Wie bereits von Schmitz et al. (2014) vermutet, konnte bestätigt werden, dass die I145F Mutation (Haplotyp VII) alleine und ohne weitere Mutation in den analysierten Populationen auftrat. Der auch von Schmitz et al. (2014) beschriebene Haplotyp VI (Y131F + I475T) konnte mithilfe der Monitoringdaten ebenfalls bestätigt werden. Der Haplotyp Y131F + K142R (Haplotyp VIII) wiederum, konnte im Rahmen des Monitoringprogramms nicht bestätigt werden. Die von Schmitz et al. (2014) beschriebene Mutationskombination konnte in keiner der analysierten Proben nachgewiesen werden. Schmitz (2013) äußerte in diesem Zusammenhang, dass diese Mutationskombination zum damaligen Zeitpunkt lediglich an einem Standort identifiziert werden konnte. Dies stellt die Hypothese auf, dass dieser *CYP51*-Haplotyp möglicherweise kurzzeitig in einer bestimmten Region vorzufinden war, sich allerdings in den letzten Jahren aufgrund möglicher Fitnessnachteile nicht etablieren und ausbreiten konnte. Da die Mutation Y131F ebenso wie die Mutation K142R bereits homolog in anderen Pathogenen beschrieben wurden (z. B. Y137F in *Z. tritici* und *R. collo-cygni*, K143R in *C. albicans*) (Price et al., 2015; Rehus et al., 2019; Derkacz et al., 2022), kann ein Auftreten dieser Mutationskombination in Zukunft vorerst nicht ausgeschlossen werden und somit wird sie in Abbildung 20 unter Haplotyp VIII aufgeführt.

Aufgrund der in dieser Studie gewonnenen Erkenntnisse, dass die im *CYP51* von *P. pachyrhizi* vorkommenden Mutationen gekoppelt auf einem DNA-Strang vorliegen, kann nach bisherigem Kenntnisstand davon ausgegangen werden, dass die Mutationen in den in Abbildung 20 gelisteten Mutationskombinationen auftreten. Somit existieren aktuell neun Mutationen im *CYP51* von *P. pachyrhizi*, die neben dem WT in sieben weiteren *CYP51*-Haplotypen resultieren.

Mit Ausnahme des Haplotypen VIII (Y131F + K142R), konnten alle in Abbildung 20 gelisteten *CYP51*-Haplotypen in Blattproben von *P. pachyrhizi* identifiziert werden. Hierbei unterschied sich

allerdings die Häufigkeit, mit der die unterschiedlichen Haplotypen in den 1400 Feldproben aus Südamerika nachgewiesen werden konnten. Der Wildtyp (Haplotyp I) wurde indirekt nachgewiesen, da keiner der analysierten *CYP51*-Mutationen einen quantitativen Anteil von 50 % überschritten hatte. Zusätzlich war der Anteil der Resistenzmutationen in einigen Populationen sehr gering (< 10 %). Berücksichtigt man hier die Abweichung der Pyrosequenzierungsmethode von ± 5 %, so kann man davon ausgehen, dass diese Populationen zum größten Teil aus dem Haplotyp I und damit aus dem Wildtyp bestehen.

Fokussiert man sich auf die *CYP51*-Haplotypen mit Mutationskombinationen im *CYP51*, so ließ sich erkennen, dass in den meisten Proben aus den Monitoringstudien 2017–2021 die Mutationen in Häufigkeiten bis ca. 35 % nachgewiesen wurden. Lediglich die Haplotypen III (F120L + Y131H) und VII (I145F) konnten teilweise in quantitativen Anteilen von bis zu 50 % detektiert werden. Die Mutationskombination F120L + Y131H wurde lediglich in 1,5 % der analysierten Proben und die Mutation I145F in < 1 % der Proben in Anteilen zwischen 40–50 % nachgewiesen.

Haplotyp III (F120L + Y131H) konnte am häufigsten in den analysierten Proben aus den Jahren 2017–2021 nachgewiesen werden. Allerdings nahm der Anteil des Haplotypen II (F120L + V130A + Y131F) gerade in den Jahren 2020 und 2021 verstärkt zu. Der Trend zeigt, dass sich dieser *CYP51*-Haplotyp verstärkt ausweitet und in einigen Regionen den bislang vorherrschenden Haplotyp F120L + Y131H verdrängt hat. 2017 konnte in lediglich zwei von ca. 250 analysierten Feldproben die Mutationskombination F120L + V130A + Y131F nachgewiesen werden. Hierbei lag die Nachweisgrenze bei > 10 % Mutationsanteil innerhalb der analysierten Populationen. Im Jahr 2020 nahm die Häufigkeit dieses Haplotypen deutlich zu. Von ca. 180 analysierten Proben konnte der Haplotyp II in 82 Proben (46 %) und im Jahr 2021 in 98 von ca. 150 (65 %) Proben nachgewiesen werden. Wie es in den letzten Jahren zu einem solchen „Shift“ von Haplotyp III hin zu Haplotyp II kommen konnte und welche Auswirkungen unterschiedliche DMI-Anwendungen auf diese *CYP51*-Haplotypen zeigen, wird abschließend in Kapitel 4.7 und 4.8 diskutiert.

Die Haplotypen IV–VII waren in den analysierten Proben in einem deutlich geringeren Anteil vertreten als Haplotyp II und III. Der Haplotyp V (F120L + Y131H + F154Y) konnte hierbei in den wenigsten Proben (< 1 %) nachgewiesen werden. Zusätzlich ist zu vermerken, dass keiner der Proben aus 2020 und 2021 diesen Haplotypen, mit der neu identifizierten Mutation F154Y, aufzeigte. Aus diesem Grund liegt die Vermutung nahe, dass diese Mutationskombination keinen größeren Einfluss auf die Gesamtpopulation von *P. pachyrhizi* in Südamerika hat. Der Haplotyp IV (F120L + Y131H + I145V), welcher die neu identifizierte Mutation I145V aufweist, konnte in 67 Proben (5 %) detektiert werden und ist somit stärker vertreten als Haplotyp V. Die Haplotypen IV

und V unterscheiden sich lediglich in einer der drei vorhandenen Mutationen (I145V und F154Y), sodass die Hypothese aufgestellt werden kann, dass die Mutation I145V dem Pilz einen größeren Vorteil in Bezug auf eine Resistenz gegenüber DMI oder Fitnessvorteile verschafft. Der Haplotyp VI (Y131F + I475T) konnte in 143 Proben (10 %) und der Haplotyp VII (I145F) in 53 Proben (4 %) nachgewiesen werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass derzeit auf dem südamerikanischen Kontinent, neben dem Wildtyp, sieben weitere *CYP51*-Haplotypen für *P. pachyrhizi* beschrieben werden können. Im Zeitraum 2017–2021 wurden die Haplotypen F120L + V130A + Y131F und F120L + Y131H mit großem Abstand am häufigsten in den analysierten Blattproben nachgewiesen. Gefolgt wurden diese von Haplotyp Y131F + I475T mit einem Anteil von 10 %, Haplotyp F120L + Y131H + I145V mit einem Anteil von 5 % und Haplotyp I145F mit einem Anteil von 4 %. Der Haplotyp F120L + Y131H + F154Y mit einem Anteil von < 1 % und der Haplotyp Y131F + K142R (0 %) konnten kaum oder gar nicht detektiert werden.

| | |
|-------|-----------------------|
| I. | Wildtyp |
| II. | F120L + V130A + Y131F |
| III. | F120L + Y131H |
| IV. | F120L + Y131H + I145V |
| V. | F120L + Y131H + F154Y |
| VI. | Y131F + I475T |
| VII. | I145F |
| VIII. | Y131F + K142R |

Abbildung 20: *CYP51*-Haplotypen in *Phakopsora pachyrhizi*. Die unterschiedlichen Haplotypen ergeben sich aus den jeweiligen Resistenzmutationen, welche in Kombinationen auf einem DNA-Strang im *CYP51* von *P. pachyrhizi* vorliegen können. Hierbei sind sowohl Zweier- als auch Dreierkombinationen beschrieben. Neben dem Wildtyp sind die derzeit in Südamerika vorherrschenden Mutationskombinationen im *CYP51* Haplotyp II und Haplotyp III. Die Mutation I145F ist die einzig bekannte Mutation welche allein und nicht in Kombination mit weiteren Mutationen auftritt.

4.5 Überexpression des *CYP51* in Einsporisolen von *P. pachyrhizi* mit Fokus auf mutierte *CYP51*-Kopien im Transkriptom

Neben den Punktmutationen stellt die Überexpression des *CYP51* einen weiteren Mechanismus der DMI-Resistenz sowohl bei phytopathogenen als auch bei humanpathogenen Pilzen dar (Ma & Michailides, 2005). Eine Überexpression des *CYP51* wurde bereits in phytopathogenen Pilzen wie bspw. *Z. tritici* (Leroux & Walker, 2011; Huf, 2021), *V. inaequalis* (Schnabel & Jones, 2001), *Cercospora beticola* (Bolton et al., 2012; Muellender et al., 2021), *Penicillium digitatum* (Sun et

al., 2013), *Monilinia fructicola* (Luo & Schnabel, 2008), *Blumeriella jaapii* (Ma et al., 2006) und *P. triticina* (Stammler et al., 2009) nachgewiesen. Nicht in jedem Fall, wie bspw. bei *P. triticina* oder *C. beticola*, konnte der für die erhöhte Expression verantwortliche Mechanismus aufgeklärt werden (Stammler et al., 2009; Bolton et al., 2012).

Für andere Pathogene wiederum wurden zwei Mechanismen identifiziert, welche in einer höheren *CYP51*-Expression resultieren. Bei *Z. tritici*, *V. inaequalis*, *M. fructicola* und *P. digitatum* wurden Inserts in der *CYP51*-Regulationsregion ermittelt, welche mit einer *CYP51*-Überexpression einhergehen (Schnabel & Jones, 2001; Luo & Schnabel, 2008; Cools et al., 2013; Cools & Fraaije, 2013; Sun et al., 2013; Huf et al., 2020) und bei *C. albicans* und *E. necator* wurde gezeigt, dass das Vorhandensein mehrerer *CYP51*-Kopien zu einer erhöhten *CYP51*-Expression führt (Coste et al., 2007; Jones et al., 2014; Rallos & Baudoin, 2016). Im Gegensatz zu Punktmutationen kann eine Überexpression des Zielgens dem Pilz den Vorteil bieten, dass das *CYP51*-Enzym keine Veränderungen in seiner Primärsequenz hinnehmen muss. Mögliche enzymatische Nachteile, die durch eine Punktmutation verursacht werden können, würden bei einer Überexpression somit nicht auftreten (Scalliet et al., 2012; Cools et al., 2013). Bereits durch Schmitz et al. (2014) konnte gezeigt werden, dass in *P. pachyrhizi* eine *CYP51*-Überexpression vorliegen kann. Die bis zu 10-fache Überexpression konnte sowohl bei Populationen ohne Mutationskombination im *CYP51* (WT) als auch bei Populationen mit unterschiedlichen Mutationskombinationen (z. B. F120L + Y131H) aufgezeigt werden (Schmitz et al., 2014).

Für die vorliegende Studie wurde ermittelt, ob die Einsporisolate eine erhöhte *CYP51*-Expression aufzeigen und ob eine DMI-Applikation eine direkte Auswirkung auf diese Expression hat. Hierzu wurde die RNA, die durch *P. pachyrhizi* verursachte Infektionsstellen sowohl aus der unbehandelten Kontrolle als auch aus den jeweiligen DMI-Behandlungen extrahiert (Kapitel 3.3). Nach der Transkription der RNA in cDNA, wurde eine qPCR mit dem Referenzgen *α -Tubulin* sowie einem sensitiven Referenzisolat aus dem Jahr 2010 durchgeführt. Es wurde festgestellt, dass das *CYP51*-Gen in jedem Einsporisolat im Vergleich zum Referenzisolat deutlich überexprimiert vorlag (Abbildung 12). Hierbei zeigten die Einsporisolate mit Mutationskombinationen im *CYP51* eine 20–40-fache Überexpression und das *CYP51* des WT-Einsporisolates wurde am stärksten überexprimiert (70-fach). Bereits durch Schmitz et al. (2014) wurde gezeigt, dass eine einmalige DMI-Anwendung keine Veränderungen in der *CYP51*-Expression hervorruft. Diese Beobachtung wurde in der hier vorliegenden Arbeit bestätigt (Tabelle A24).

Das *CYP51* im WT-Einsporisolat und in dem Einsporisolat mit vergleichsweise geringeren Mutationshäufigkeiten in der gDNA (19 %), wurde im Vergleich zu den verbleibenden Einsporisolaten am stärksten überexprimiert (Abbildung 12). Diese Beobachtung lässt die

Hypothese zu, dass Individuen ohne Resistenzmutationen durch eine erhöhte *CYP51*-Expression eine geringere Sensitivität gegenüber DMI aufzeigen und somit diese Individuen selektiert werden. Dies würde die durch Schmitz et al. (2014) aufgestellte Annahme bestätigen, dass die Überexpression des *CYP51* in *P. pachyrhizi* ein weiterer Resistenzmechanismus gegenüber DMI darstellt. Die durch eine Überexpression hervorgerufene Resistenz ist zumeist niedriger als die, die durch entsprechende Punktmutation hervorgerufen werden kann (Cools et al., 2013). Dennoch kann eine erhöhte *CYP51*-Expression möglicherweise einen Beitrag zur Anpassung von *P. pachyrhizi* gegenüber DMI leisten. Einen Hinweis darauf liefern die ED₅₀-Werte von Epoxiconazol bei dem WT-Einsporisolat (vorliegende Studie) im Vergleich zu den ED₅₀-Werten bei dem Referenzisolat 8 aus den Studien von Schmitz et al. (2014). Hierbei konnten für Epoxiconazol ED₅₀-Werte für das sensitive Isolat 8 von < 0,1 mg/l aufgezeigt werden, wohingegen das im direkten Vergleich 70-fach überexprimierte Einsporisolat in der hier vorliegenden Studie höhere ED₅₀-Werte hervorrief (0,78 mg/l). Da beide Isolate keine Mutationen im *CYP51* aufwiesen, ist dieses Ergebnis ein Indiz dafür, dass eine *CYP51*-Überexpression mit einer Verringerung der Sensitivität von *P. pachyrhizi* gegenüber DMI einhergeht. Der genaue Einfluss dieser Überexpression auf die Empfindlichkeit der DMI konnte aufgrund der limitierten Anzahl an Einsporisolaten nicht eindeutig bestätigt werden.

Eine weitere Bestätigung der *CYP51*-Überexpression als zusätzlicher Resistenzmechanismus in *P. pachyrhizi*, liefern die hohen *CYP51*-Expressionswerte der Einsporisolate im Vergleich zu den Populationen aus Schmitz et al. (2014). Während das *CYP51* in den Populationen aus dem Jahr 2010 maximal 10-fach überexprimiert vorlag, wurde in der hier vorliegenden Studie bei den Einsporisolaten eine 20–70-fache Überexpression ermittelt. Zusätzlich konnte erneut bestätigt werden, dass eine einmalige Behandlung mit DMI keine Veränderungen in der *CYP51*-Expression hervorruft und somit die hohen *CYP51*-Expressionen der Einsporisolate nicht durch eine DMI-Anwendung induziert wurden (Tabelle A24). Es scheint nach bisherigem Kenntnisstand wahrscheinlich, dass eine hohe DMI-Exposition den Resistenzmechanismus der *CYP51*-Überexpression bei *P. pachyrhizi* selektiert. Zwischen den Analysen von Schmitz et al. (2014) und der hier vorliegenden Studie, liegen ca. zehn Jahre intensive DMI-Anwendungen auf den Feldern von Südamerika (Godoy et al., 2016). Da eine Überexpression zumeist weniger substratspezifisch ist als z. B. Punktmutationen (Cools et al., 2013), kann die vermehrte Anwendung unterschiedlichster DMI zu einer Selektion derjenigen Pilzindividuen geführt haben, welche eine erhöhte Expression des *CYP51* aufwiesen. Somit ist es möglich, dass die aktuell in Südamerika vorherrschenden Pilzpopulationen eine höhere *CYP51*-Expression aufweist als vor zehn Jahren. Die Hypothese, dass die intensive DMI-Exposition der letzten Jahre zu einem generellen Anstieg

der *CYP51*-Expression in den Populationen von *P. pachyrhizi* geführt hat, muss durch weitere Analysen aktueller Feldpopulationen aus Südamerika bestätigt werden.

Neben der *CYP51*-Überexpression wurden die relevanten Mutationen im *CYP51* in der cDNA der Einsporisolate mithilfe der Pyrosequenzierungsmethode quantifiziert. Das Ergebnis zeigte deutlich, dass die Mutationshäufigkeiten im Transkriptom (cDNA) weit über den Mutationshäufigkeiten der gDNA liegen (Tabelle 19). Für das Einsporisolat, welches 19 % Mutationsanteil in der gDNA aufzeigt, wurde in der cDNA ein Mutationsanteil von ca. 65 % ermittelt. Für die sechs Einsporisolate mit ca. 33 % Mutationsanteil in der gDNA und somit zwei mutierten *CYP51*-Kopien, wurden in der cDNA Mutationswerte von 78–86 % bestimmt. Auch für das Einsporisolat mit 50 % Mutationsanteil und somit drei mutierten *CYP51*-Kopien in der gDNA, wurden Mutationshäufigkeiten von ca. 81 % in der cDNA detektiert. Aus diesen Ergebnissen ergeben sich folgende Schlussfolgerungen: Zum einen konnte die bereits durch Schmitz et al. (2014) aufgestellte Hypothese bestätigt werden, dass die mutierten *CYP51*-Kopien stärker exprimiert werden als die ebenfalls im Genom von *P. pachyrhizi* vorhandenen WT-Kopien des *CYP51*. Hierbei wurden je nach Anzahl mutierter *CYP51*-Kopien im Genom unterschiedliche Mutationshäufigkeiten im Transkriptom hervorgerufen. Bei lediglich einer mutierten *CYP51*-Kopie im Genom (17 % Mutationshäufigkeit in gDNA), stiegen die Mutationswerte in der cDNA auf ca. 66 % (\cong vier mutierten *CYP51*-Kopien). Bei zwei ebenso wie bei drei mutierten *CYP51*-Kopien in der gDNA (33 % und 50 %), stiegen die Mutationswerte der cDNA auf ca. 83 % (\cong fünf mutierten *CYP51*-Kopien). Nach aktuellem Kenntnisstand kann die Hypothese aufgestellt werden, dass die adaptierten *CYP51*-Kopien vermehrt abgelesen werden, im Transkriptom aber nicht zu 100 % vorliegen. Dies könnte daran liegen, dass die enzymatischen Stoffwechselprozesse im WT-Allel in Situationen ohne DMI-Anwendung vorteilhafter ablaufen. Da in dieser Studie lediglich neun Isolate untersucht wurden, muss diese Hypothese durch die Analyse der cDNA mehrerer Isolate bestätigt werden. Ebenfalls wurde der Mechanismus, welcher der *CYP51*-Überexpression in *P. pachyrhizi* zugrunde liegt, im Rahmen dieser Arbeit nicht ermittelt. Hier könnte im Zuge weiterer Studien bspw. die *CYP51*-Promoterregion auf Insertionen untersucht werden, da diese in unterschiedlichen Pathogenen mit einer Überexpression des *CYP51* in Verbindung gebracht wurden (Cools et al., 2013; Huf et al., 2020). Nach derzeitigem Kenntnisstand kann die erhöhte *CYP51*-Expression bei *P. pachyrhizi* als zusätzlicher Resistenzmechanismus bestätigt werden, welcher nicht durch DMI-Anwendung induziert wird, sondern durch intensive DMI-Exposition selektiert werden kann.

4.6 Auswirkungen der unterschiedlichen *CYP51*-Haplotypen in Einsporisolaten von *P. pachyrhizi* auf die Sensitivität gegenüber DMI

Die Verwendung von DMI zur Bekämpfung von *P. pachyrhizi* auf dem südamerikanischen Kontinent und insbesondere in Brasilien, begann bereits eine Saison (2002/3) nach erstmaligem Auftreten des Pilzes (Godoy et al., 2016; Zambolim et al., 2021). Die hohen Ertragsausfälle und der damit verbundene wirtschaftliche Schaden, den der Pilz ohne Fungizidanwendung verursachte, resultierten in einer intensiven Anwendung hoch wirksamer DMI (Godoy et al., 2016). Brasilien, welches bereits zum damaligen Zeitpunkt zu einem der größten Sojaproduzenten weltweit zählte (Abbildung 1), verzeichnete bereits vier Jahre nach den ersten DMI-Anwendungen Wirksamkeitsverluste von bspw. Cyproconazol und Tebuconazol. Nach der Saison 2007/2008 war in Brasilien ein allgemeiner Rückgang in der Effizienz der zugelassenen DMI zu verzeichnen. Die intensive, mehrmalige und großflächige Anwendung von DMI-Soloformulierungen und der damit verbundene starke Selektionsdruck sorgten dafür, dass die ursprünglich sensitive Pilzpopulation bereits nach kurzer Zeit deutliche Anpassungen gegenüber den DMI aufzeigte (Schmitz et al., 2014; Godoy et al., 2016).

Die in dieser Arbeit gewonnenen Einsporisolate, welche unterschiedliche Mutationskombinationen im *CYP51* aufweisen und somit unterschiedliche *CYP51*-Haplotypen von *P. pachyrhizi* repräsentieren (Tabelle 18), wurden im Zuge von Sensitivitätsstudien genutzt, um die Wirksamkeit unterschiedlicher DMI zu bewerten. Da nach bisherigem Kenntnisstand keine Sensitivitätsstudien mit Einsporisolaten von *P. pachyrhizi* durchgeführt wurden, konnte somit der individuelle Einfluss unterschiedlicher *CYP51*-Mutationskombinationen bzw. *CYP51*-Haplotypen auf die Sensitivität gegenüber DMI beurteilt werden. Die Sensitivitätsstudien wurden mehrfach wiederholt und aufgrund der genetischen Stabilität der Isolate wurden lediglich geringe Standardabweichungen (SE) zwischen den Versuchen ermittelt (Abbildung 16). Es wurden die DMI Prothioconazol, Epoxiconazol, Cyproconazol, Tetraconazol, Difenoconazol, Tebuconazol und Metconazol als Soloformulierungen getestet, welche einen Tag präventiv appliziert wurden.

Für das WT-Einsporisolat, welches keine Mutation im *CYP51* aufwies (Abbildung 18), wurde eine hohe Sensitivität gegenüber fast allen getesteten DMI nachgewiesen. Lediglich Tetraconazol ($ED_{50} = 4 \text{ mg/l}$) zeigte eine leicht geringere und Difenoconazol ($ED_{50} = 19 \text{ mg/l}$) eine deutlich geringere Wirksamkeit als die verbleibenden DMI ($ED_{50} = \text{ca. } 1 \text{ mg/l}$) (Abbildung 16).

Der Haplotyp F120L + Y131H, welcher bereits in früheren Studien mit einer verringerten Sensitivität gegenüber DMI beschrieben wurde (Schmitz et al., 2014; Müller et al., 2021), zeigte auch in der hier vorliegenden Arbeit eine deutlich verringerte Wirksamkeit der getesteten DMI.

Gegenüber diesem Haplotyp zeigten Prothioconazol ($ED_{50} = 10 \text{ mg/l}$) und Cyproconazol ($ED_{50} = 21 \text{ mg/l}$) die beste Wirksamkeit, wohingegen Metconazol und Tebuconazol in der höchsten angewandten Dosis von 100 mg/l lediglich ca. 35 % Kontrolle erzielen konnten ($ED_{50} > 100 \text{ mg/l}$). Sie lagen damit auf einer Stufe mit Difenconazol (Abbildung 15 und 16). Auch Epoxiconazol ($ED_{50} = 35 \text{ mg/l}$) und Tetraconazol ($ED_{50} = 48 \text{ mg/l}$) zeigten deutlich schlechtere Wirksamkeiten als gegenüber dem WT, konnten allerdings in der höchsten angewandten Dosis eine nahezu vollständige Hemmung erzielen (Abbildung 15). Die für diesen Haplotypen ermittelten ED_{50} -Werte für Prothioconazol, lassen sich annähernd mit den Werten von Müller et al. (2021) vergleichen, welche Sensitivitätsstudien mit Populationen und monouredinialen Isolaten von *P. pachyrhizi* durchführte.

Die beiden neu identifizierte *CYP51*-Haplotypen, F120L + Y131H + I145V und F120L + Y131H + F154Y, zeigen keine bzw. leicht höhere ED_{50} -Werte als der Haplotyp F120L + Y131H. Allerdings sind diese Unterschiede sehr gering. Am Beispiel von Prothioconazol wurden für den Haplotypen F120L + Y131H ED_{50} -Werte von 10 mg/l , für den Haplotypen F120L + Y131H + I145V ED_{50} -Werte von 12 mg/l und für den Haplotypen F120L + Y131H + F154Y ED_{50} -Werte von 26 mg/l ermittelt. Somit zeigt lediglich F120L + Y131H + F154Y eine geringere Sensitivität gegenüber Prothioconazol (Abbildung 16).

Somit stellt sich die Frage, welchen Einfluss die zwei neu identifizierten Haplotypen (F120L + Y131H + I145V/F154Y) auf die Sensitivität gegenüber DMI haben. Da der Haplotyp F120L + Y131H + F154Y im Zuge des Monitoringprogramms lediglich in $< 1 \%$ der analysierten Proben nachgewiesen wurde, scheint dieser aktuell keine größere Bedeutung in der Population von *P. pachyrhizi* in Südamerika einzunehmen (Kapitel 4.4). Auch konnte gezeigt werden, dass die Aminosäureposition F154 keine Nähe zum aktiven Zentrum oder zur Häm-Gruppe des *CYP51*-Enzyms aufweist (Abbildung 11). Ein zusätzlicher Effekt der Mutation F154Y auf die Bindung unterschiedlicher DMI im *CYP51* ist somit nicht ersichtlich. Die leicht erhöhten ED_{50} -Werte im Vergleich zum Haplotyp F120L + Y131H, könnten möglicherweise durch die 1,7-fache *CYP51*-Überexpression des Einsporisolates, verglichen mit dem Einsporisolat mit der Mutationskombination F120L + Y131H, erklärt werden (Abbildung 12). Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass eine *CYP51*-Überexpression mit einer Verringerung der DMI-Sensitivität korreliert. Da allerdings der Einfluss der F154Y Mutation auf die DMI-Sensitivität nur bei einem Isolat bewertet werden konnte, müssen weitere Studien durchgeführt werden, um diese neue Mutation hinsichtlich ihrer Resistenz gegenüber DMI eindeutig zu bewerten. Da dieser *CYP51*-Haplotyp in unterschiedlichen Jahren zumindest in wenigen Feldproben nachgewiesen werden konnte, handelt es sich nicht um eine im Labor erzeugte Mutante.

Der neu identifizierte Haplotyp F120L + Y131H + I145V zeigte im Vergleich zum Haplotyp F120L + Y131H nahezu identische ED₅₀-Werte. Somit deutet auch hier nach aktuellem Kenntnisstand alles darauf hin, dass die zusätzliche Mutation I145V keinen, oder lediglich einen geringen Einfluss auf die Bindung unterschiedlicher DMI hat. Interessant ist allerdings, dass dieser Haplotyp im Vergleich zu Haplotyp F120L + Y131H + F154Y, in 5 % der analysierten Feldpopulationen detektiert werden konnte (Kapitel 4.4). Dies könnte bedeuten, dass mit der Mutation I145V Vorteile verbunden sind, die mit der Mutation F154Y nicht einhergehen. Ein weiterer Hinweis, der für enzymatische Vorteile (Fitnessvorteile) der Mutation I145V spricht, zeigt sich in einem *CYP51*-Sequenzvergleich mehrerer Pilze (Abbildung 10). Es konnte aufgezeigt werden, dass an der homologen Position zur I145V Mutation bei dem Basidiomyceten *Puccinia recondita* sowie bei allen sieben aufgezeigten Ascomycota (z. B. *Z. tritici*, *C. beticola*, *R. collo-cygni*), bereits in der WT *CYP51*-Sequenz die Aminosäure Valin codiert wird. Diese Information lässt die Hypothese zu, dass der Austausch von Isoleucin → Valin (I145V Mutation) in *P. pachyrhizi* mit einer Veränderung der *CYP51*-Proteinstruktur einhergeht, welche einen positiven Effekt auf die beteiligten Stoffwechselprozesse ausübt. Ähnlich verhält es sich mit der F120L Mutation, welche in diesem sowie in drei der sechs weiteren derzeit bekannten *CYP51*-Haplotypen auftritt (Kapitel 4.4). Auch hier konnte der individuelle Einfluss der Mutation F120L auf eine verringerte Sensitivität gegenüber DMI nicht aufgezeigt werden. Dennoch konnte die Veränderung der Aminosäure Phenylalanin (F) → Leucin (L) in einer Vielzahl der analysierten Feldproben identifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Wie bereits für die Mutation I145V beschrieben, konnte auch für die F120L Mutation im Zuge des *CYP51*-Sequenzvergleichs (Kapitel 3.2.3) gezeigt werden, dass in allen aufgezeigten Pathogenen an der homologen Position zur F120L Mutation bereits im WT ein Leucin (L) codiert wird (Abbildung 10). Dieser Zusammenhang sowie das Auftreten der F120L in vier der sieben adaptierten *CYP51*-Haplotypen von *P. pachyrhizi*, könnte ein Indiz dafür sein, dass auch der Haplotyp F120L + Y131H + I145V in Zukunft in mehr Feldproben identifiziert werden könnte, allerdings keine stärkere Resistenz gegenüber DMI hervorruft als der Haplotyp F120L + Y131H. Diese Schlussfolgerungen sollten im Zuge weiterer Sensitivitätsstudien sowie in Monitoringprogrammen berücksichtigt werden.

Der neu identifizierte Haplotyp F120L + V130A + Y131F zeigte, verglichen mit dem WT-Haplotyp, eine deutlich geringere Sensitivität gegenüber allen getesteten DMI. Es wurden im Hinblick auf die unterschiedlichen DMI ED₅₀-Werte in einer großen Spannweite von 22 bis >100 mg/l ermittelt. Hierbei zeigten Epoxiconazol, Difenoconazol, Cyproconazol und Tetraconazol keine ausreichende Wirkung mit ED₅₀-Werten > 92 mg/l. Prothioconazol ebenso wie Metconazol und Tebuconazol konnten mit geringeren ED₅₀-Werten eine bessere Wirkung erzielen. Im direkten

Vergleich mit dem zuvor beschriebenen Haplotyp F120L + Y131H fällt auf, dass Epoxiconazol und Cyproconazol durch den neuen Haplotypen stärker beeinflusst werden. Auch die Wirkung von Prothioconazol ist geringer als bei dem Haplotypen F120L + Y131H. Bei Tebuconazol und Metconazol hingegen, verhält sich die Situation entgegengesetzt. Beide Wirkstoffe können den Haplotypen F120L + V130A + Y131F besser kontrollieren als den Haplotypen F120L + Y131H. Diese Beobachtung wird im nachfolgenden Kapitel 4.7 im Hinblick auf eine teilweise fehlende Kreuzresistenz der DMI gegenüber *P. pachyrhizi* näher diskutiert.

Im Zuge der hier durchgeführten Sensitivitätsstudien lässt sich klar belegen, dass der neu identifizierte Haplotyp F120L + V130A + Y131F mit einer deutlich verringerten Sensitivität gegenüber allen DMI einhergeht. Sowohl die Mutation V130A als auch die Mutation Y131F konnten bereits homolog in anderen phytopathogenen Pilzen (z. B. *Z. tritici*, *R. collo-cygni*) mit einer verringerten Sensitivität gegenüber DMI beschrieben werden (Cools et al., 2011; Rehfus et al., 2019; Jørgensen et al., 2021). Auch die direkt am aktiven Zentrum des *CYP51*-Enzyms angrenzende Lage sowohl der V130A als auch der Y131F Mutation, geben einen Hinweis darauf, dass die Bindung der DMI durch diese Mutationskombination beeinflusst werden kann (Abbildung 11). Die im Zuge des Monitoringsprogramms analysierten Feldproben aus Südamerika zeigen auf (Kapitel 4.4), dass insbesondere ab der Saison 2019/20 die Häufigkeit des neu identifizierten Haplotypen F120L + V130A + Y131F zugenommen hat. Er konnte in nahezu genauso vielen Populationen nachgewiesen werden, wie der bereits länger beschriebene Haplotyp F120L + Y131H. Der neu identifizierte Haplotyp F120L + V130A + Y131F verursacht insbesondere für Epoxiconazol und Cyproconazol aber auch für Prothioconazol hohe RF (Tabelle 22). Mit den zusätzlichen Informationen über die Verbreitung des Haplotypen in den Sojaanbauregionen von Südamerika kann vermutet werden, dass die Leistung dieser Wirkstoffe auch auf dem Feld beeinträchtigt werden könnte. Ein Monitoring mit der Identifizierung dieser Mutationskombination sollte daher in jedem Fall fortgesetzt werden.

4.7 Unvollständige Kreuzresistenz von *P. pachyrhizi* gegenüber DMI

Im Allgemeinen werden Wirkstoffe, die einem gemeinsamen MoA zugeordnet werden können, als kreuzresistent eingestuft. Da alle DMI eine Wechselwirkung mit dem gleichen Zielenzym (*CYP51*) eingehen, zählen auch diese grundsätzlich als kreuzresistent zueinander (FRAC, 2022). Dennoch konnte bspw. für *Z. tritici* eine unvollständige Kreuzresistenz zwischen einzelnen DMI aufgezeigt werden, die mit Veränderungen des Zielenzym *CYP51* (Punktmutationen), einhergingen (Fraaije et al., 2007; Stammler et al., 2008; Jørgensen et al., 2018; Jørgensen et al., 2021).

In dieser Arbeit wurden die durch die Sensitivitätsstudien erhaltenen ED₅₀-Werte genutzt, um die RF zu ermitteln und Korrelationen hinsichtlich der Wirkung der getesteten DMI auf unterschiedliche *CYP51*-Haplotypen aufzustellen. Hierbei konnte aufgezeigt werden, dass die getesteten DMI in zwei Gruppen eingeteilt werden können, welche innerhalb der Gruppen eine starke Kreuzresistenz, zwischen den beiden Gruppen allerdings keine aufzeigen. Der ersten Gruppe können Prothioconazol, Epoxiconazol, Cyproconazol und Tetraconazol zugeordnet werden, welche eine starke Korrelation ($R^2 > 0,86$) zueinander aufzeigten (Abbildung 17 und A27). Die einzige Ausnahme ist Tetraconazol ($R^2 > 0,56$) mit einer gering schwächeren Korrelation aufgrund der geringeren intrinsischen Aktivität. Der zweiten Gruppe lassen sich Tebuconazol und Metconazol zuordnen. Auch diese zeigten im Hinblick auf die getesteten *CYP51*-Haplotypen von *P. pachyrhizi* eine Kreuzresistenz mit starker Korrelation zueinander auf ($R^2 = 0,99$) (Abbildung 17). Vergleicht man nun die Korrelation zwischen den beiden Gruppen, so ist hervorzuheben, dass bspw. Prothioconazol und Tebuconazol ($R^2 = 0,14$) oder Prothioconazol und Metconazol ($R^2 = 0,08$) keine Kreuzresistenz zueinander aufweisen. Aufgrund der geringen Wirksamkeit von Difenconazol gegenüber allen getesteten *CYP51*-Haplotypen von *P. pachyrhizi*, konnte hier keine Aussage zur Kreuzresistenz getroffen und somit konnte Difenconazol keiner Gruppe zugeordnet werden.

Die fehlende Kreuzresistenz zwischen der Gruppe 1 (Prothioconazol, Epoxiconazol, Cyproconazol, Tetraconazol) und der Gruppe 2 (Tebuconazol, Metconazol) wird durch den Haplotyp F120L + Y131H und den neu identifizierten Haplotyp F120L + V130A + Y131F hervorgerufen. Dieses Verhalten spiegelt sich ebenfalls in den erhaltenen RF wider (Tabelle 22). Für den Haplotypen F120L + Y131H wurden für Gruppe 2 hohe RF von > 100 ermittelt, wohingegen für den Haplotypen F120L + V130A + Y131F niedrige–moderate RF gezeigt werden konnten. Für Gruppe 1 ist die gegenteilige Situation zu beobachten. Hier wurden für den Haplotypen F120L + Y131H deutlich niedrigere RF ermittelt als bei dem Haplotyp F120L + V130A + Y131F. Die teilweise fehlende Kreuzresistenz der unterschiedlichen *CYP51*-Haplotypen von *P. pachyrhizi* gegenüber DMI, wird nach bisherigem Kenntnisstand durch die Mutation V130A hervorgerufen. Diese Mutation wurde bei *Z. tritici* (V136A) bereits mit einem Sensitivitätsverlust von Prothioconazol und Epoxiconazol und einer erhöhten Sensitivität gegenüber Tebuconazol und somit mit einer fehlenden Kreuzresistenz in Verbindung gebracht (Heick et al., 2017; Jørgensen et al., 2018; Jørgensen et al., 2021).

Damit die Erkenntnis der teilweise fehlenden Kreuzresistenz bestätigt werden konnte, wurde mithilfe einer Population von *P. pachyrhizi* (Isolatmix aus mehreren Einsporisolen) demonstriert, welche *CYP51*-Mutation bzw. welcher *CYP51*-Haplotyp durch eine Behandlung mit den

unterschiedlichen DMI selektiert wird (Kapitel 3.5). Hierbei konnte bestätigt werden, dass die DMI der Gruppe 2 (Tebuconazol, Metconazol) in allen aufgetragenen Konzentrationen lediglich den Haplotyp F120L + Y131H selektieren und demzufolge wurde Haplotyp F120L + V130A + Y131F kontrolliert (Abbildung 18). Gruppe 1 (Prothioconazol, Epoxiconazol, Cyproconazol, Tetraconazol) selektierte in den niedrigeren Konzentrationen bis ca. 3 mg/l, vorerst den Haplotyp F120L + Y131H, in den hohen Konzentrationen wurde allerdings Haplotyp F120L + V130A + Y131F selektiert. Difenconazol zeigte aufgrund der geringen intrinsischen Aktivität kein eindeutiges Selektionsmuster. Dass die Wirkstoffe der Gruppe 1 den Haplotypen F120L + Y131H in niedrigen und den Haplotypen F120L + V130A + Y131F in höheren Konzentrationen selektieren, ist ein Indiz für einen Fitnessvorteil der Mutationskombination F120L + Y131H. Es zeigt allerdings auch, dass dieser Haplotyp in höheren Konzentrationen vollständig kontrolliert werden kann, wohingegen der Haplotyp F120L + V130A + Y131F auch höhere Aufwandmengen der Gruppe 1 überlebt und somit eine höhere Anpassung gegenüber dieser Gruppe aufweist (Abbildung 18).

Die Erkenntnis einer teilweise fehlenden Kreuzresistenz der DMI gegenüber den vorherrschenden Haplotypen von *P. pachyrhizi* F120L + Y131H und F120L + V130A + Y131F bietet eine neue Möglichkeit in Bezug auf ein angepasstes Resistenzmanagement. Grundsätzlich wird für ein Resistenzmanagement die Mischung von unterschiedlichen MoA empfohlen, um einen einseitigen Selektionsdruck auf die vorherrschende Pilzpopulation so gering wie möglich zu halten. Mit der neu identifizierten fehlenden Kreuzresistenz von Gruppe 1 und 2 könnte die Verwendung von DMI aus beiden Gruppen in Fungizidmischungen oder Alternierungen als Resistenz- und Krankheitsmanagement berücksichtigt werden. Da allerdings noch nicht geklärt werden konnte, wie stark andere Resistenzmechanismen wie bspw. die *CYP51*-Überexpression zu einer generellen DMI-Anpassung in *P. pachyrhizi* beitragen können, sollten auch andere MoA einbezogen werden. Somit kann die Wirksamkeit der aktuell zugelassenen DMI so lange wie möglich geschützt und aufrechterhalten werden (Heick et al., 2017).

4.8 Ausblick zur DMI-Resistenzentwicklung in *P. pachyrhizi*

Der vermehrte Einsatz wirksamer Single-Site-DMI zur Bekämpfung des ASR in Südamerika, führte zu einem Rückgang der Sensitivität der vorherrschenden Pilzpopulation gegenüber diesem Mode of Action (Godoy et al., 2016). Die genetische Vielfalt der Populationen von *P. pachyrhizi*, das Vorhandensein von zwei haploiden Zellkernen und der kurze Entwicklungszyklus in Verbindung mit einer hohen Produktionsrate von Uredosporen tragen dazu bei, dass sich vorteilhafte Veränderungen im Genom (Mutationen) schnell etablieren können (Goellner et al.,

2010; Twizeyimana et al., 2011b; Jorge et al., 2015; Darben et al., 2020). Die Resistenzmutationen einer angepassten Population sind zumeist mit Vorteilen bei Fungizidanwendung verbunden, in Situationen ohne Fungizidanwendung ist allerdings die Fitness der Population für das Überleben entscheidend (Brent & Hollomon, 2007a). Hierbei ist es möglich, dass die Mutationen der angepassten Individuen und die damit verbundenen Veränderungen des Enzyms mit einer geringeren Stoffwechselaktivität einhergehen (Scalliet et al., 2012).

Die vorliegende Studie ergab, dass sechs Kopien des *CYP51* im Genom von *P. pachyrhizi* vorhanden sind. Nach derzeitigem Kenntnisstand sind bei adaptierten Individuen maximal drei mutierte *CYP51*-Kopien zu verzeichnen (50 % Mutationshäufigkeit) (Kapitel 4.3). Dies bedeutet, dass in jedem angepassten Individuum neben den adaptierten *CYP51* zusätzliche Wildtyp *CYP51*-Kopien enthalten sind. In diesen WT-Kopien sind die Stoffwechselprozesse des *CYP51* ohne DMI-Anwendung höchstwahrscheinlich unbeeinflusst. Das Vorhandensein mehrerer *CYP51*-Kopien ist daher vermutlich ein weiteres Merkmal, welches die schnelle Anpassung des Pilzes an sich ändernde Umweltbedingungen fördert. Zum besseren Verständnis dieser Dynamik, sollten zusätzlich Fitnessstudien mit Populationen von *P. pachyrhizi* durchgeführt werden, die mögliche Vor- und Nachteile der unterschiedlichen *CYP51*-Haplotypen aufzeigen. Diese Populationsdynamik könnte zusammen mit den Informationen über die *CYP51*-Kopienzahl in *P. pachyrhizi* Hinweis geben, wie der Pilz das Vorhandensein mehrerer *CYP51*-Allele (WT und adaptiert) in unterschiedlichen Situationen (mit und ohne DMI-Anwendung) nutzt.

Sensitivitätsstudien konnten bestätigen, dass sowohl der Haplotyp F120L + Y131H als auch der neu identifizierte Haplotyp F120L + V130A + Y131F zu einem deutlichen Sensitivitätsverlust von unterschiedlichen DMI führen (Kapitel 4.6). Diese beiden *CYP51*-Haplotypen konnten in Südamerika in einer Vielzahl von Populationen von *P. pachyrhizi* nachgewiesen werden. Der Haplotyp F120L + Y131H, der bereits in Proben aus 2010 nachgewiesen wurde (Schmitz et al., 2014), wurde an einigen Standorten ab der Saison 2019/20 zunehmend durch den Haplotyp F120L + V130A + Y131F abgelöst. Die hier vorliegende Studie konnte darlegen, dass diese beiden *CYP51*-Haplotypen mit einer unvollständigen Kreuzresistenz unterschiedlicher DMI einhergehen. Ab der Saison 2019/20 ist der Haplotyp mit der Mutationskombination F120L + V130A + Y131F vermehrt nachgewiesen worden. Dies ist voraussichtlich auf die intensive Anwendung insbesondere von Prothioconazol (Jiang & Yin, 2022; BASF interne Studien) zurückzuführen. Das *CYP51*-Gen unterliegt einer fortlaufenden Evolution. Aus diesem Grund sind ein intensives DMI-Sensitivitätsmonitoring sowie ein genetisches *CYP51*-Monitoring für wirksame Resistenzmanagementstrategien in der Zukunft erforderlich. Hierbei könnte ein Ansatz sein, dass aufgrund der teilweise fehlenden Kreuzresistenz diejenigen DMI eingesetzt

werden, welche bei vorherrschenden *CYP51*-Haplotypen die bessere Wirksamkeit erzielen (Kapitel 3.4.3). Eine größtmögliche Vielfalt verschiedener verfügbarer DMI sind wichtige Werkzeuge für eine effektive und nachhaltige Bekämpfung bestehender, aber auch eventuell neu auftretender *CYP51*-Haplotypen in *P. pachyrhizi*.

Mehrfache Anwendungen von DMI-Soloanwendungen innerhalb eines Spritzprogramms sollte auch bei fehlender Kreuzresistenz vermieden werden. Es können unspezifisch wirkenden Resistenzmechanismen, wie bspw. die Überexpression des *CYP51*, in einer generellen Anpassung der vorherrschenden Pilzpopulation gegenüber DMI resultieren. Die hier vorliegende Studie konnte aufzeigen, dass das *CYP51* in den Einsporisolaten deutlich überexprimiert wurde (Kapitel 4.5). Der genaue Einfluss dieser Überexpression sowie die daran beteiligten Mechanismen, sollten im Zuge weiterer Studien detaillierter untersucht werden. Für ein angepasstes Resistenzmanagement bei der Bekämpfung von *P. pachyrhizi* sollte unter anderem der präventive Einsatz von Zweier- oder Dreierfungizidmischungen mit unterschiedlichen MoA (DMI, QoI, SDHI) sowie der zusätzliche Einbezug von Multi-Site-Inhibitoren (z. B. Mancozeb, Chlorthalonil) erfolgen. Hier kann die hohe Effizienz der Single-Site-Inhibitoren mit dem geringen Risiko einer Resistenzentwicklung durch die Multi-Site-Inhibitoren kombiniert und folglich positive Ergebnisse sowohl bei der ASR-Kontrolle als auch im Hinblick auf das Resistenzmanagement erzielt werden (z. B. Dreiermischung: DMI + SDHI + Multi-Site) (Netto et al., 2020; Reis et al., 2021a; Reis et al., 2021b; Zambolim et al., 2021). Zur optimalen Kontrolle von *P. pachyrhizi* ist neben der Anwendung von Fungiziden ebenso der Anbau weniger anfälliger Sojasorten, die Ausnutzung der gebräuchlichen Anbaupraktiken sowie die frühzeitige Erkennung und Bewertung des ASR-Risikos für einen integrierten Pflanzenschutz obligatorisch. Ausschließlich durch die Integration aller zur Verfügung stehenden Bekämpfungsmöglichkeiten kann das Resistenzmanagement bestmöglichen Erfolg erzielen und die Wirksamkeit der vorhandenen Wirkstoffe langfristig sichern. Die im Zuge dieser Studie gewonnenen Einsporisolate von *P. pachyrhizi* stellen aufgrund ihrer genetischen Stabilität auch für zukünftige Studien ein wichtiges Hilfsmittel dar, um die Wirksamkeiten von Fungiziden hinsichtlich unterschiedlicher Haplotypen von *P. pachyrhizi* zu vergleichen und zu bewerten. Da neben den *CYP51*-Mutationen ebenfalls die Mutation F129L (*CYTb*) und die Mutation I86F (*SDHc*) in den Einsporisolaten vorhanden sind, können Sensitivitätsstudien sowohl mit SDHI, QoI als auch DMI für bereits bekannte und ebenso für neue Wirkstoffe durchgeführt werden. Durch die Möglichkeit der längerfristigen Konservierung der Uredosporen (Schmitz & Stammer, 2012), können die genetisch identischen Isolate für unterschiedliche Fragestellungen rekultiviert werden und die Ergebnisse unterschiedlicher Studien sind vergleichbar.

5 Zusammenfassung

Der pilzliche Schaderreger *Phakopsora pachyrhizi* verursacht den Asiatischen Sojabohnenrost (ASR), eine Krankheit, welche insbesondere in Südamerika den Ertrag im Sojabohnenanbau erheblich limitieren kann. Neben ackerbaulichen Maßnahmen und der Verwendung weniger anfälliger Sojasorten, beruht die Kontrolle des Pathogens überwiegend auf der Anwendung von Fungiziden mit unterschiedlichen Wirkmechanismen. Demethylierungsinhibitoren (DMI) vertreten hierbei bereits seit Beginn des Auftretens von *P. pachyrhizi* in Südamerika (2001) eine der meist genutzten Wirkstoffklassen bei der Fungizidanwendung. Diese hemmen die Sterol 14 α -Demethylase, ein wesentliches Enzym des Ergosterol-Biosynthesewegs, welches durch das *CYP51*-Gen des Pilzes kodiert wird. Der starke Selektionsdruck, verursacht durch die intensive Anwendung der DMI, führte zu einer kontinuierlichen Anpassung der Population von *P. pachyrhizi*, hin zu einer geringeren Empfindlichkeit gegenüber dieser Wirkstoffklasse (Shifting).

Bei phytopathogenen Pilzen ist die Gewinnung von Einsporisolaten oftmals der erste Ansatz zur Charakterisierung von Resistenzmechanismen (z. B. Mutationen), welche eine geringere Empfindlichkeit gegenüber Fungiziden hervorrufen. Das Herstellungsverfahren der Einsporisolate ist bei *P. pachyrhizi* aufgrund der biotrophen Lebensweise arbeitsaufwendig. Dies ist womöglich einer der Gründe, warum bisher keine Studien veröffentlicht sind, die Einsporisolate zur Charakterisierung der Resistenz von *P. pachyrhizi* gegenüber Fungiziden verwendet haben. Populationen von *P. pachyrhizi* weisen eine hohe genetische Vielfalt auf, die unter anderem durch den kurzen Entwicklungszyklus des Pilzes sowie durch dikaryotische Uredosporen, welche dem Pilz sowohl zur Verbreitung als auch zur Vermehrung dienen, gefördert wird. Aufgrund der Heterogenität der Populationen sowie der zwei haploiden Zellkerne innerhalb jeder Spore, ist es umso bedeutender mit genetisch identischen Einsporisolaten und somit mit Klonen zu arbeiten. Diese Methode bietet die einzige Möglichkeit, die unterschiedlichen Einflüsse der Resistenzmechanismen gegenüber Fungiziden individuell zu bewerten.

In dieser Studie wurden erstmals Einsporisolate von *P. pachyrhizi* isoliert, welche einen wichtigen Baustein für Untersuchungen im Rahmen der Resistenzforschung darstellen. Ziel der vorliegenden Studie war es, erstmals mithilfe dieser Einsporisolate die Resistenz gegenüber DMI sowie die beteiligten Resistenzmechanismen (v. a. Punktmutationen) von *P. pachyrhizi* zu charakterisieren.

Mithilfe von Sequenzanalysen der Einsporisolate konnte aufgezeigt werden, dass im Genom von *P. pachyrhizi* insgesamt sechs Kopien des *CYP51* vorliegen, welche drei *CYP51*-Allelen mit geringen Sequenzunterschieden zugeordnet werden konnten. Diese Allele sind in den

Einsporisolen in unterschiedlichen Verhältnissen vorhanden. Nach bisherigem Kenntnisstand liegt hierbei das adaptierte *CYP51*-Allel mit entsprechenden Resistenzmutationen in maximal drei der sechs vorhandenen *CYP51*-Kopien vor. Ein Mutationsanteil von > 50 % konnte somit in Populationen ebenso wie in Einsporisolen bislang nicht nachgewiesen werden. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass die adaptierten *CYP51*-Kopien mit Nachteilen in ihrer enzymatischen Aktivität und somit mit einer verminderten Fitness einhergehen. Das Vorhandensein mehrerer *CYP51*-Allele (Wildtyp und adaptiert) bietet dem Pilz die Möglichkeit, sowohl in Situationen mit Fungizidbehandlung (DMI) als auch ohne Fungizidbehandlung die jeweiligen Vorteile der unterschiedlichen Allele zu beanspruchen. Im Hinblick auf die Resistenzentwicklung zeigt dies, dass auch DMI-angepasste Individuen mit entsprechenden Resistenzmutationen im *CYP51* jederzeit Wildtypallele des *CYP51* besitzen, welche die enzymatischen Stoffwechselprozesse in Situationen ohne DMI-Anwendung sicherstellen können. Dies ermöglicht dem Pilz in unterschiedlichen Umweltbedingungen (mit und ohne DMI-Anwendung) sein Überleben zu gewährleisten.

Die Sequenzanalysen des *CYP51* der Einsporisolate konnten zusätzlich aufzeigen, dass die jeweils vorhandenen Resistenzmutationen in den adaptierten *CYP51*-Kopien immer gekoppelt auf einem DNA-Strang vorliegen. Mit dieser Erkenntnis lassen sich *CYP51*-Haplotypen in *P. pachyrhizi* beschreiben, welche nach bisherigem Kenntnisstand immer mit gleichbleibenden Mutationskombinationen einhergehen. Im Zuge dieser Untersuchung konnten drei neue Mutationen (V130A, I145V, F154Y) im *CYP51* von *P. pachyrhizi* bestätigt werden, welche auf einem DNA-Strang in Kombination mit bereits beschriebenen Mutationen auftreten. Bislang können somit neun Mutationen im *CYP51* von *P. pachyrhizi* beschrieben werden (F120L, V130A, Y131F/H, K142R, I145V/F, F154Y, I475T), welche durch die auf einem DNA-Strang auftretenden Mutationskombinationen in sieben adaptierte *CYP51*-Haplotypen einteilt werden können. Des Weiteren wurden die jeweiligen Positionen der derzeit bekannten Mutationen im *CYP51*-Enzym mithilfe eines Proteinmodells dargestellt.

Es wurden erstmals Sensitivitätsstudien mit Einsporisolen von *P. pachyrhizi* durchgeführt, welche den individuellen Einfluss unterschiedlicher *CYP51*-Haplotypen auf DMI aufzeigen konnten. Hierbei wurden bei den neu identifizierten *CYP51*-Haplotypen in *P. pachyrhizi* unterschiedliche Sensitivitäten gegenüber DMI beobachtet. Verglichen mit dem Wildtyp zeigt der neue Haplotyp F120L + V130A + Y131F eine deutliche Reduzierung in der Sensitivität gegenüber den getesteten DMI. Auch die Haplotypen F120L + Y131H + I145V und F120L + Y131H + F154Y konnten im Vergleich zu dem Wildtyp mit deutlich höheren ED₅₀-Werten der getesteten DMI in Verbindung gebracht werden. Im direkten Vergleich zu dem Haplotyp F120L + Y131H, konnte die

jeweils dritte Mutation (I145V und F154Y) keinen signifikanten Beitrag zu einer Verringerung der Sensitivität gegenüber DMI erzielen.

Im Zuge dieser Sensitivitätsstudien wurde erstmals eine unvollständige Kreuzresistenz der *CYP51*-Haplotypen F120L + V130A + Y131F und F120L + Y131H gegenüber DMI nachgewiesen. Es konnten zwei Gruppen der getesteten DMI gebildet werden, welche innerhalb der Gruppen eine starke Kreuzresistenz, zwischen den beiden Gruppen allerdings keine aufzeigen. Die fehlende Kreuzresistenz zwischen Gruppe 1 (Prothioconazol, Epoxiconazol, Cyproconazol, Tetraconazol) und Gruppe 2 (Tebuconazol, Metconazol) stellt eine weitere wichtige Erkenntnis in Bezug auf ein angepasstes Resistenzmanagement bei der Kontrolle von *P. pachyrhizi* durch DMI dar. Es konnte zusätzlich aufgezeigt werden, dass durch die Anwendung der DMI aus Gruppe 2 keine Selektion des Haplotypen F120L + V130A + Y131F erfolgt. Gruppe 1 hingegen selektiert in niedrigen Konzentrationen vorerst Haplotyp F120L + Y131H und in höheren Konzentrationen den Haplotyp F120L + V130A + Y131F. Diese Erkenntnis zeigt, dass der Haplotyp F120L + Y131H einen Fitnessvorteil gegenüber dem Haplotyp F120L + V130A + Y131F liefert, jedoch Haplotyp F120L + V130A + Y131F zu einem deutlich höheren Resistenzlevel gegenüber Gruppe 1 führt.

Bei den Einsporisolaten konnte neben den genannten Punktmutationen eine signifikante Überexpression des *CYP51* festgestellt werden. Die Einsporisolate aus dem Jahr 2018 weisen eine 20–70-fache Überexpression auf. Der Einfluss dieser Überexpression auf die Empfindlichkeit gegenüber DMI konnte nicht eindeutig aufgezeigt werden und bedarf weiterer Untersuchungen. Des Weiteren konnte bestätigt werden, dass die adaptierten *CYP51*-Kopien im Vergleich zu den Wildtyp *CYP51*-Kopien verstärkt abgelesen werden. In der cDNA konnten in den Einsporisolaten mittels Pyrosequenzierung Mutationshäufigkeiten von ca. 66 % und 83 % ermittelt werden, abhängig vom Mutationsanteil in der gDNA. Mutationshäufigkeiten in der cDNA von 100 % wurden nicht nachgewiesen. Somit liegt die Vermutung nahe, dass die im Genom von *P. pachyrhizi* vorhandenen Wildtyp *CYP51*-Kopien zu jeder Zeit zu einem gewissen Anteil abgelesen werden, da die mit den Punktmutationen einhergehende Veränderungen im *CYP51* mutmaßlich mit enzymatischen Nachteilen verbunden sind.

6 Literaturverzeichnis

- Ahmadian, A, Ehn, M & Hober, S. (2006).** Pyrosequencing: history, biochemistry and future. *Clinica Chimica Acta*, 363(1-2), 83-94. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cccn.2005.04.038>
- Ahmadian, A, Gharizadeh, B, Gustafsson, AC, Sterky, F, Nyrén, P, Uhlén, M & Lundeberg, J. (2000).** Single-nucleotide polymorphism analysis by pyrosequencing. *Analytical Biochemistry*, 280(1), 103-110. DOI: <https://doi.org/10.1006/abio.2000.4493>
- Akamatsu, H, Yamanaka, N, Yamaoka, Y, Soares, RM, Morel, W, Ivancovich, AJG, Bogado, AN, Kato, M, et al. (2013).** Pathogenic diversity of soybean rust in Argentina, Brazil, and Paraguay. *Journal of General Plant Pathology*, 79(1), 28-40. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10327-012-0421-7>
- Akinsanmi, OA, Ladipo, JL & Oyekan, PO. (2001).** First report of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Nigeria. *Plant Disease*, 85(1), 97-97. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.1.97B>
- Bachteler, K. (2017).** Entwicklungsstadien und Bedürfnisse der Sojabohne. *Taifun-Tofu GmbH*. Abgerufen am 20.02.2022. Verfügbar unter: https://www.sojafoerderring.de/wp-content/uploads/2018/11/Sojainfo_51_Sep18.pdf
- Bandara, AY, Weerasooriya, DK, Bradley, CA, Allen, TW & Esker, PD. (2020).** Dissecting the economic impact of soybean diseases in the United States over two decades. *PLoS One*, 15(4), e0231141. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231141>
- Barrett, A. (2020).** Long-term world soybean outlook. Abgerufen am 17.02.2022. Verfügbar unter: <https://ussoy.org/long-term-world-soybean-outlook-2/>
- Bartlett, DW, Clough, JM, Godwin, JR, Hall, AA, Hamer, M & Parr-Dobrzanski, B. (2002).** The strobilurin fungicides. *Pest Management Science*, 58(7), 649-662. DOI: <https://doi.org/10.1002/ps.520>
- Bassetti, M, Merelli, M, Temperoni, C & Astilean, A. (2013).** New antibiotics for bad bugs: where are we? *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 12(1), 1-15. DOI: <https://doi.org/10.1186/1476-0711-12-22>
- Becher, R, Weihmann, F, Deising, HB & Wirsal, SG. (2011).** Development of a novel multiplex DNA microarray for *Fusarium graminearum* and analysis of azole fungicide responses. *BMC Genomics*, 12(52), 1-17. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-52>

- Becher, R & Wirsal, SG. (2012).** Fungal cytochrome P450 sterol 14 α -demethylase (CYP51) and azole resistance in plant and human pathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95(4), 825-840. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4195-9>
- Blum, MMC & Reis, EM. (2013).** *Phakopsora pachyrhizi* in vitro sensitivity to fungicides. *Summa Phytopathologica*, 39(3), 215-216. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-54052013000300015>
- Bolton, MD, Birla, K, Rivera-Varas, V, Rudolph, KD & Secor, GA. (2012).** Characterization of *CbCyp51* from field isolates of *Cercospora beticola*. *Phytopathology*, 102(3), 298-305. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHTO-07-11-0212>
- Bonde, MR, Nester, SE, Austin, CN, Stone, CL, Frederick, RD, Hartman, GL & Miles MR. (2006).** Evaluation of virulence of *Phakopsora pachyrhizi* and *P. meibomia*e isolates. *Plant Disease*, 90(6), 708-716. DOI: <https://doi.org/10.1094/PD-90-0708>
- Brent, KJ. (2012).** Historical perspectives of fungicide resistance. In: *Fungicide Resistance in Crop protection: Risk and Management (Hrsg. Thind TS)*, S. 3-18. CABI, Wallingford, England.
- Brent, KJ & Hollomon, DW. (2007a).** *Fungicide resistance in crop pathogens: How can it be managed?* FRAC Monograph No. 1 (second, revised edition). Fungicide Resistance Action Committee. Global Crop Protection Federation Brussels, Belgium. Verfügbar unter: <https://www.frac.info/docs/default-source/publications/monographs/monograph-1.pdf>
- Brent, KJ & Hollomon, DW. (2007b).** *Fungicide Resistance: The Assessment of Risk*. FRAC Monograph No. 2 (S. 1-48). Fungicide Resistance Action Committee. Global Crop Protection Federation Brussels, Belgium. Verfügbar unter: <https://www.frac.info/docs/default-source/publications/monographs/monograph-2.pdf>
- Bromfield, KR & Hartwig, EE. (1980).** Resistance to soybean rust and mode of inheritance. *Crop Science*, 20(2), 254-255.
- Bromfield, KR. (1984).** *Soybean rust*. Monograph, American Phytopathological Society, S. 65. St. Paul, Minnesota, USA.
- Burton, JW. (1997).** Soyabean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Field Crops Research*, 53(1-3), 171-186. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(97\)00030-0](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(97)00030-0)

- Chakraborty, N, Curley, J, Frederick, RD, Hyten, DL, Nelson, RL, Hartman, GL & Diers, BW. (2009).** Mapping and confirmation of a new allele at *Rpp1* from soybean PI 594538A conferring RB lesion-type resistance to soybean rust. *Crop Science*, 49(3), 783-790. DOI: <https://doi.org/10.2135/cropsci2008.06.0335>
- Cheng, H, Shen, YQ, Pan, XY, Hou, YP, Wu, QY & Yang, GF. (2015).** Discovery of 1, 2, 4-triazole-1, 3-disulfonamides as dual inhibitors of mitochondrial complex II and complex III. *New Journal of Chemistry*, 39(9), 7281-7292. DOI: <https://doi.org/10.1039/C5NJ00215J>
- Childs, SP, Buck, JW & Li, Z. (2018a).** Breeding soybeans with resistance to soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*). *Plant Breeding*, 137(3), 250-261. DOI: <https://doi.org/10.1111/pbr.12595>
- Childs, SP, King, ZR, Walker, DR, Harris, DK, Pedley, KF, Buck, JW, Boerma, R & Li, Z. (2018b).** Discovery of a seventh *Rpp* soybean rust resistance locus in soybean accession PI 605823. *Theoretical and Applied Genetics*, 131(1), 27-41. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00122-017-2983-4>
- Christiano, RSC & Scherm, H. (2007).** Quantitative aspects of the spread of Asian soybean rust in the southeastern United States, 2005 to 2006. *Phytopathology*, 97(11), 1428-1433. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-11-1428>
- Cools, HJ, Hawkins, NJ & Fraaije, BA. (2013).** Constraints on the evolution of azole resistance in plant pathogenic fungi. *Plant Pathology*, 62(1), 36-42. DOI: <https://doi.org/10.1111/ppa.12128>
- Cools, HJ & Fraaije, BA. (2013).** Update on mechanisms of azole resistance in *Mycosphaerella graminicola* and implications for future control. *Pest Management Science*, 69(2), 150-155. DOI: <https://doi.org/10.1002/ps.3348>
- Cools, HJ, Mullins, JGL, Fraaije, BA, Parker, JE, Kelly, DE, Lucas, JA & Kelly, SL. (2011).** Impact of recently emerged sterol 14 α -demethylase (CYP51) variants of *Mycosphaerella graminicola* on azole fungicide sensitivity. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(11), 3830-3837. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.00027-11>
- Corrêa da Silva, JV, Juliatti, FC, Vaz da Silva, JR & Barros, FC. (2011).** Soybean cultivar performance in the presence of soybean Asian rust, in relation to chemical control programs. *European Journal of Plant Pathology*, 131(3), 409-418. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9818-y>

- Coste, A, Selmecki, A, Forche, A, Diogo, D, Bougnoux, ME, d'Enfert, C, Berman, J & Sanglard, D. (2007).** Genotypic evolution of azole resistance mechanisms in sequential *Candida albicans* isolates. *Eukaryotic Cell*, 6(10), 1889-1904. DOI: <https://doi.org/10.1128/EC.00151-07>
- Darben, LM, Yokoyama, A, Castanho, FM, Lopes-Caitar, VS, da Cruz Gallo de Carvalho, MC, Godoy, CV, de Carvalho, S, Gonela, A & Marcelino-Guimarães, FC. (2020).** Characterization of genetic diversity and pathogenicity of *Phakopsora pachyrhizi* monouredinial isolates collected in Brazil. *European Journal of Plant Pathology*, 156(2), 355-372. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01872-2>
- De Mello, FE, Mathioni, SM, Fantin, LH, Rosa, DD, Antunes, RFD, Filho, NRC, Duvaresch, DL & Canteri, MG. (2021).** Sensitivity assessment and SDHC-I86F mutation frequency of *Phakopsora pachyrhizi* populations to benzovindiflupyr and fluxapyroxad fungicides from 2015 to 2019 in Brazil. *Pest Management Science*, 77(10), 4331-4339. DOI: <https://doi.org/10.1002/ps.6466>
- De Waard, MA. (1997).** Significance of ABC transporters in fungicide sensitivity and resistance. *Pesticide Science*, 51(3), 271-275. DOI: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9063\(199711\)51:3<271::AID-PS642>3.0.CO;2-%23](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9063(199711)51:3<271::AID-PS642>3.0.CO;2-%23)
- De Waard, MA, Andrade, AC, Hayashi, K, Schoonbeek, Hj, Stergiopoulos, I & Zwiers, LH. (2006).** Impact of fungal drug transporters on fungicide sensitivity, multidrug resistance and virulence. *Pest Management Science*, 62(3), 195-207. DOI: <https://doi.org/10.1002/ps.1150>
- Deising, HB, Reimann, S & Pascholati, SF. (2008).** Mechanisms and significance of fungicide resistance. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(2), 286-295. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822008000200017>
- Del Ponte, EM & Esker, PD. (2008).** Meteorological factors and Asian soybean rust epidemics: a systems approach and implications for risk assessment. *Scientia Agricola*, 65(SPE), 88-97. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-90162008000700014>
- Del Sorbo, G, Schoonbeek, H & De Waard, MA. (2000).** Fungal transporters involved in efflux of natural toxic compounds and fungicides. *Fungal Genetics and Biology*, 30(1), 1-15. DOI: <https://doi.org/10.1006/fgbi.2000.1206>
- Derkacz, D, Bernat, P & Krasowska, A. (2022).** K143R amino acid substitution in 14- α -demethylase (Erg11p) changes plasma membrane and cell wall structure of *Candida*

albicans. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1631. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms23031631>

Edgington, LV, Martin, RA, Bruin, GC & Parsons, IM. (1980). Systemic fungicides: a perspective after 10 years. *Plant Disease*, 64(1), 19-23. DOI: <https://doi.org/10.1094/PD-64-19>

Edwards, HH & Bonde, MR. (2011). Penetration and establishment of *Phakopsora pachyrhizi* in soybean leaves as observed by transmission electron microscopy. *Phytopathology*, 101(7), 894-900. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-10-0248>

EPPO. (2022). Global database of European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). Abgerufen am 03.02.2022. Verfügbar unter: <https://gd.eppo.int/>

FAO. (2022). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Abgerufen am 20.02.2022. Verfügbar unter: <http://fenix.fao.org/faostat/internal/en/#data/QCL>

Fraaije, BA, Cools, HJ, Kim, SH, Motteram, J, Clark, WS & Lucas, JA. (2007). A novel substitution I381V in the sterol 14 α -demethylase (CYP51) of *Mycosphaerella graminicola* is differentially selected by azole fungicides. *Molecular Plant Pathology*, 8(3), 245-254. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00388.x>

FRAC. (2019). Pathogen Risk List (2019). Abgerufen am 03.03.2022. Verfügbar unter: <https://www.frac.info/docs/default-source/publications/pathogen-risk/frac-pathogen-list-2019.pdf>

FRAC. (2021a). FRAC code list 2021: Fungal control agents sorted by cross resistance pattern and mode of action. Abgerufen am 25.02.2022. Verfügbar unter: https://www.jcpa.or.jp/assets/file/labomechanism/2021/frac_code_list_2021.pdf

FRAC. (2021b). Summary of fungicide resistance management guidelines by FRAC Working Group (WG) and Expert Fora (EF) relevant for soybean. Abgerufen am 27.02.2022. Verfügbar unter: <https://www.frac.info/docs/default-source/summary-for-selected-crops/summary-of-frac-recommendations-for-soybean.pdf>

FRAC. (2022). Fungicide Resistance Action Committee. Abgerufen am 03.03.2022. Verfügbar unter: <https://www.frac.info/>

Frederick, RD, Snyder, CL, Peterson, GL & Bonde, MR. (2002). Polymerase chain reaction assays for the detection and discrimination of the soybean rust pathogens *Phakopsora*

pachyrhizi and *P. meibomiaae*. *Phytopathology*, 92(2), 217-227. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2002.92.2.217>

Frenkel, O, Cadle-Davidson, L, Wilcox, WF & Milgroom, MG. (2015). Mechanisms of resistance to an azole fungicide in the grapevine powdery mildew fungus, *Erysiphe necator*. *Phytopathology*, 105(3), 370-377. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-14-0202-R>

Fromtling, RA. (1988). Overview of medically important antifungal azole derivatives. *Clinical Microbiology Reviews*, 1(2), 187-217. DOI: <https://doi.org/10.1128/CMR.1.2.187>

García-Rodríguez, JC, Vicente-Hernández, Z, Grajales-Solís, M & Yamanaka, N. (2021). Virulence diversity of *Phakopsora pachyrhizi* in Mexico. *PhytoFrontiers*. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTOFR-06-21-0044-R>

Garcia, A, Calvo, ÉS, de Souza Kiihl, RA, Harada, A, Hiromoto, DM & Vieira, LGE. (2008). Molecular mapping of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) resistance genes: discovery of a novel locus and alleles. *Theoretical and Applied Genetics*, 117(4), 545-553. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00122-008-0798-z>

Genet, JL & Jaworska, G. (2009). Baseline sensitivity to proquinazid in *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* and *Erysiphe necator* and cross-resistance with other fungicides. *Pest Management Science*, 65(8), 878-884. DOI: <https://doi.org/10.1002/ps.1768>

Germer, S, Holland, MJ & Higuchi, R. (2000). High-throughput SNP allele-frequency determination in pooled DNA samples by kinetic PCR. *Genome Research*, 10(2), 258-266. DOI: <https://doi.org/10.1101/gr.10.2.258>

Gisi, U, Chin, KM, Knapova, G, Färber, RK, Mohr, U, Parisi, S, Sierotzki, H & Steinfeld, U. (2000). Recent developments in elucidating modes of resistance to phenylamide, DMI and strobilurin fungicides. *Crop Protection*, 19(8-10), 863-872. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(00\)00114-9](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(00)00114-9)

Godoy, CV & Meyer, M. (2020). Overcoming the threat of Asian soybean rust in Brazil. In: *Modern Fungicide and Antifungal Compounds IX* (Hrsg. Deising, HB, Fraaije, B, Mehl, A, Oerke, EC, Sierotzki, H & Stammler, G), S. 51-56. Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft, Braunschweig, Deutschland.

Godoy, CV. (2012). Risk and management of fungicide resistance in the Asian soybean rust fungus *Phakopsora pachyrhizi*. In: *Fungicide Resistance in Crop Protection: Risk and Management* (Hrsg. Thind TS), S. 87-95. CABI, Wallingford, England. DOI: <https://doi.org/10.1079/9781845939052.0087>

- Godoy, CV, Seixas, CDS, Soares, RM, Marcelino-Guimarães, FC, Meyer, MC & Costamilan, LM. (2016).** Asian soybean rust in Brazil: past, present, and future. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 51(5), 407-421. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2016000500002>
- Goellner, K, Loehrer, M, Langenbach, C, Conrath, U, Koch, E & Schaffrath, U. (2010).** *Phakopsora pachyrhizi*, the causal agent of Asian soybean rust. *Molecular Plant Pathology*, 11(2), 169-177. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00589.x>
- 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 Management Science*, 62(6), 465-472. DOI: <https://doi.org/10.1002/ps.1236>
- Hahn, M & Leroch, M. (2015).** Multidrug Efflux Transporters. In: *Fungicide Resistance in Plant Pathogens* (Hrsg. Ishii, H & Hollomon, D), S. 233-248. Springer, Tokyo, Japan. DOI: https://doi.org/10.1007/978-4-431-55642-8_15
- Hartman, GL, Miles, MR & Frederick, RD. (2004a).** Epidemiology and spread of soybean rust. In: *2003 Corn & Sorghum and Soybean Conference*. American Seed Trade Association Pub. Nr. 33. Verfügbar unter: <http://soydiseases.illinois.edu/presentations/epidspr.pdf>
- Hartman, GL, Bonde, MR, Miles, MR & Frederick, RD. (2004b).** Variation of *Phakopsora pachyrhizi* isolates on soybean. In: *Proceedings VII World Soybean Research Conference, IV International Soybean Processing and Utilization Conference, III Congresso Brasileiro de Soja (Brazilian Soybean Congress)* (Hrsg. Moscardi, F, Hoffmann-Campo, CB, Saraiva, OF, Galerani, PR, Krzyzanowski, FC & Carrão-Panizzi, MC), S. 440-446. Brazilian Agricultural Research Corporation, National Soybean Research Center, Londrina, Brasilien. Verfügbar unter: http://soydiseases.illinois.edu/publications/Variation_of_Phakopsora_pachyrhizi_isolates_on_soybean.pdf
- Hartman, GL, Miles, MR & Frederick, RD. (2005).** Breeding for resistance to soybean rust. *Plant Disease*, 89(6), 664-666. DOI: <https://doi.org/10.1094/PD-89-0664>
- Hartman, GL, West, ED & Herman, TK. (2011).** Crops that feed the world 2. Soybean—worldwide production, use, and constraints caused by pathogens and pests. *Food Security*, 3(1), 5-17. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12571-010-0108-x>

- Hartwig, EE & Bromfield, KR. (1983).** Relationships among three genes conferring specific resistance to rust in soybeans. *Crop Science*, 23(2), 237-239. DOI: <https://doi.org/10.2135/cropsci1983.0011183X002300020012x>
- Hartwig, EE. (1986).** Identification of a fourth major gene conferring resistance to soybean rust. *Crop Science*, 26(6), 1135-1136. DOI: <https://doi.org/10.2135/cropsci1986.0011183X002600060010x>
- Hawkins, NJ, Cools, HJ, Sierotzki, H, Shaw, MW, Knogge, W, Kelly, SL, Kelly, DE & Fraaije BA. (2014).** Paralog re-emergence: a novel, historically contingent mechanism in the evolution of antimicrobial resistance. *Molecular Biology and Evolution*, 31(7), 1793-1802. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/msu134>
- Heick, TM, Justesen, AF & Jørgensen, LN. (2017).** Anti-resistance strategies for fungicides against wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* with focus on DMI fungicides. *Crop Protection*, 99, 108-117. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.05.009>
- Hoffmeister, M, Zito, R, Böhm, J & Stammler, G. (2021).** Mutations in *Cyp51* of *Venturia inaequalis* and their effects on DMI sensitivity. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 128(6), 1467-1478. DOI: <https://doi.org/10.1007/s41348-021-00516-0>
- Hollomon, DW & Brent, KJ. (2009).** Combating plant diseases—the Darwin connection. *Pest Management Science*, 65(11), 1156-1163. DOI: <https://doi.org/10.1002/ps.1845>
- Hu, M & Wiatrak, P. (2012).** Effect of planting date on soybean growth, yield, and grain quality. *Agronomy Journal*, 104(3), 785-790. DOI: <https://doi.org/10.2134/agronj2011.0382>
- Huf, A. (2021).** *Characterisation of the sensitivity of Zymoseptoria tritici to demethylation inhibitors in Europe*. Dissertation, Universität Hohenheim. Verfügbar unter: <http://opus.uni-hohenheim.de/volltexte/2021/1891/>
- Huf, A, Pflieger, S, Strobel, D, Bryson, R, Voegelé, RT & Stammler, G. (2020).** Distribution and changes of genotypes associated to DMI sensitivity in *Zymoseptoria tritici* in Europe. In: *Modern Fungicide and Antifungal Compounds IX* (Hrsg. Deising, HB, Fraaije, B, Mehl, A, Oerke, EC, Sierotzki, H & Stammler, G), S. 93-98. Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft, Braunschweig, Deutschland.
- Huf, A, Rehfus, A, Lorenz, KH, Bryson, R, Voegelé, RT & Stammler, G. (2018).** Proposal for a new nomenclature for *CYP51* haplotypes in *Zymoseptoria tritici* and analysis of their distribution in Europe. *Plant Pathology*, 67(8), 1706-1712. DOI: <https://doi.org/10.1111/ppa.12891>

- Isard, SA, Gage, SH, Comtois, P & Russo, JM. (2005).** Principles of the atmospheric pathway for invasive species applied to soybean rust. *Bioscience*, 55(10), 851-861. DOI: [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2005\)055\[0851:POTAPF\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2005)055[0851:POTAPF]2.0.CO;2)
- Ivancovich, A. (2005).** Soybean rust in Argentina. *Plant Disease*, 89(6), 667-668. DOI: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PD-89-0667>
- Jiang, Y & Yin, J. (2022).** Analysis on global registrations, formulas and market situation of prothioconazole products. Abgerufen am 18.04.2022. Verfügbar unter <https://news.agropages.com/News/NewsDetail---41738.htm>
- Jones, L, Riaz, S, Morales-Cruz, A, Amrine, KC, McGuire, B, Gubler, WD, Walker, MA & Cantu D. (2014).** Adaptive genomic structural variation in the grape powdery mildew pathogen, *Erysiphe necator*. *BMC Genomics*, 15(1), 1-18. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-1081>
- Jordan, SA, Mailhot, DJ, Gevens, AJ, Marois, JJ, Wright, DL, Harmon, CL & Harmon, PF. (2010).** Characterization of kudzu (*Pueraria* spp.) resistance to *Phakopsora pachyrhizi*, the causal agent of soybean rust. *Phytopathology*, 100(9), 941-948. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-100-9-0941>
- Jorge, VA, Silva, MR, Guillin, EA, Freire, MCM, Schuster, I, Almeida, AMR & Oliveira, LO. (2015).** The origin and genetic diversity of the causal agent of Asian soybean rust, *Phakopsora pachyrhizi*, in South America. *Plant Pathology*, 64(3), 729-737. DOI: <https://doi.org/10.1111/ppa.12300>
- Jørgensen, LN, Matzen, N, Heick, T, Havis, N, Holdgate, S, Clark, B, Blake, J, Glazek, M, et al. (2021).** Decreasing azole sensitivity of *Z. tritici* in Europe contributes to reduced and varying field efficacy. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 128(1), 287-301. DOI: <https://doi.org/10.1007/s41348-020-00372-4>
- Jørgensen, LN, Matzen, N, Hansen, JG, Semaskiene, R, Korbas, M, Danielewicz, J, Glazek, M, Maumene, C, et al. (2018).** Four azoles' profile in the control of Septoria, yellow rust and brown rust in wheat across Europe. *Crop Protection*, 105, 16-27. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.10.018>
- Karlekar, A & Seal, A. (2020).** SoyNet: Soybean leaf diseases classification. *Computers and Electronics in Agriculture*, 172, 105342. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.compag.2020.105342>

- Kato, M & Soares, RM. (2022).** Field trials of a *Rpp*-pyramided line confirm the synergistic effect of multiple gene resistance to Asian soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*). *Tropical Plant Pathology*, 47, 222-232. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40858-021-00471-z>
- Killgore, E & Heu, R. (1994).** First report of soybean rust in Hawaii. *Plant Disease*, 78(12), 1216. DOI: <https://doi.org/10.1094/PD-78-1216B>
- Klosowski, AC, Brahm, L, Stammler, G & May De Mio, LL. (2016a).** Competitive fitness of *Phakopsora pachyrhizi* isolates with mutations in the CYP51 and CYTB genes. *Phytopathology*, 106(11), 1278-1284. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-16-0008-R>
- Klosowski, AC, May De Mio, LL, Miessner, S, Rodrigues, R & Stammler, G. (2016b).** Detection of the F129L mutation in the cytochrome *b* gene in *Phakopsora pachyrhizi*. *Pest Management Science*, 72(6), 1211-1215. DOI: <https://doi.org/10.1002/ps.4099>
- Koch, E, Ebrahim-Nesbat, F & Hoppe, HH. (1983).** Light and electron microscopic studies on the development of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Syd.) in susceptible soybean leaves. *Journal of Phytopathology*, 106(4), 302-320. DOI: <https://doi.org/10.1111/jph.1983.106.4.302>
- Kretschmer, M, Leroch, M, Mosbach, A, Walker, AS, Fillinger, S, Mernke, D, Schoonbeek, HJ, Pradier, JM, et al. (2009).** Fungicide-driven evolution and molecular basis of multidrug resistance in field populations of the grey mould fungus *Botrytis cinerea*. *PLoS Pathogens*, 5(12), e1000696. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000696>
- Langenbach, C, Campe, R, Beyer, SF, Mueller, AN & Conrath, U. (2016).** Fighting asian soybean rust. *Frontiers in Plant Science*, 7, 797. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00797>
- 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 Management Science*, 58(9), 876-888. DOI: <https://doi.org/10.1002/ps.566>
- Leroux, P, Gredt, M, Remuson, F, Micoud, A & Walker, AS. (2013).** Fungicide resistance status in French populations of the wheat eyespot fungi *Oculimacula acuformis* and *Oculimacula yallundae*. *Pest Management Science*, 69(1), 15-26. DOI: <https://doi.org/10.1002/ps.3408>

- Leroux, P & Walker, AS. (2011).** Multiple mechanisms account for resistance to sterol 14 α -demethylation inhibitors in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Management Science*, 67(1), 44-59. DOI: <https://doi.org/10.1002/ps.2028>
- Levy, C. (2005).** Epidemiology and chemical control of soybean rust in Southern Africa. *Plant Disease*, 89(6), 669-674. DOI: <https://doi.org/10.1094/PD-89-0669>
- Li, S, Smith, JR, Ray, JD & Frederick, RD. (2012).** Identification of a new soybean rust resistance gene in PI 567102B. *Theoretical and Applied Genetics*, 125(1), 133-142. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00122-012-1821-y>
- Li, X, Schuler, MA & Berenbaum, MR. (2007).** Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annual Review of Entomology*, 52, 231-253. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151104>
- Link, TI, Lang, P, Scheffler, BE, Duke, MV, Graham, MA, Cooper, B, Tucker, ML, Van De Mortel, M, et al. (2014).** The haustorial transcriptomes of *Uromyces appendiculatus* and *Phakopsora pachyrhizi* and their candidate effector families. *Molecular Plant Pathology*, 15(4), 379-393. DOI: <https://doi.org/10.1111/mpp.12099>
- Livingston, M, Johansson, R, Daberkow, S, Roberts, M, Ash, M & Breneman, V. (2004).** Economic and policy implications of wind-borne entry of Asian soybean rust into the United States. *US Department of Agriculture Electronic Outlook Report*, OCS-04D-02, S. 22. Washington D.C., USA. Verfügbar unter: <https://cybercemetery.unt.edu/archive/nisic/20110629223847/http://www.ers.usda.gov/publications/OCS/Apr04/OCS04D02/OCS04D02.pdf>
- Loehrer, M. (2016).** *Untersuchungen zum Infektionsmechanismus des Asiatischen Sojabohnenrostpilzes Phakopsora pachyrhizi auf seiner Wirtspflanze Sojabohne*. Dissertation, RWTH Aachen University. Verfügbar unter: <http://publications.rwth-aachen.de/record/674473/files/674473.pdf>
- Loehrer, M, Vogel, A, Huettel, B, Reinhardt, R, Benes, V, Duplessis, S, Usadel, B & Schaffrath, U. (2014).** On the current status of *Phakopsora pachyrhizi* genome sequencing. *Frontiers in Plant Science*, 5, 377. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00377>
- Lourdes Rocha, CM, Vellicce, GR, García, MG, Pardo, EM, Racedo, J, Perera, MF, de Lucía, A, Gilli, J, et al. (2015).** Use of AFLP markers to estimate molecular diversity of

Phakopsora pachyrhizi. *Electronic Journal of Biotechnology*, 18(6), 439-444. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejbt.2015.06.007>

Luo, CX & 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(2), 359-366. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.02159-07>

Ma, Z & Michailides, TJ. (2005). Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Protection*, 24(10), 853-863. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2005.01.011>

Ma, Z, Proffer, TJ, Jacobs, JL & Sundin, GW. (2006). Overexpression of the 14 α -demethylase target gene (*CYP51*) mediates fungicide resistance in *Blumeriella jaapii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(4), 2581-2585. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.72.4.2581-2585.2006>

Marchetti, MA, Melching, JS & Bromfield, KR. (1976). The effects of temperature and dew period on germination and infection by urediospores of *Phakopsora pachyrhizi*. *Phytopathology*, 66(4), 461-463. DOI: <https://doi.org/10.1094/Phyto-66-461>

Marchetti, MA, Uecker, FA & Bromfield, KR. (1975). Uredial development of *Phakopsora pachyrhizi* in soybeans. *Phytopathology*, 65(7), 822-823. DOI: <https://doi.org/10.1094/Phyto-65-822>

McDonald, BA. (1997). The population genetics of fungi: tools and techniques. *Phytopathology*, 87(4), 448-453. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1997.87.4.448>

McLean, RJ & Byth, DE. (1980). Inheritance of resistance to rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in soybeans. *Australian Journal of Agricultural Research*, 31(5), 951-956. DOI: <https://doi.org/10.1071/AR9800951>

Meira, D, Panho, MC, Beche, E, Woyann, LG, Madella, LA, Milioli, AS, Colonelli, LL, Malone, G, et al. (2022). Gene pyramiding combinations to confers resistance of Asian soybean rust. *Crop Science*. 62(2), 792-801. DOI: <https://doi.org/10.1002/csc2.20700>

Meira, D, Woyann, LG, Bozi, AH, Milioli, AS, Beche, E, Panho, MC, Madella, LA, Barrionuevo, F, et al. (2020). Asian soybean rust: a scientometric approach of *Phakopsora pachyrhizi* studies. *Euphytica*, 216(8), 1-12. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10681-020-02667-x>

- Melching, JS, Dowler, WM, Koogle, DL & Royer, MH. (1989).** Effects of duration, frequency, and temperature of leaf wetness periods on Soybean Rust. *Plant Disease*, 73(2), 117-122. DOI: <https://doi.org/10.1094/PD-73-0117>
- Mellado, E, Diaz-Guerra, TM, Cuenca-Estrella, M & Rodriguez-Tudela, JL. (2001).** Identification of two different 14- α sterol demethylase-related genes (*cyp51A* and *cyp51B*) in *Aspergillus fumigatus* and other *Aspergillus* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(7), 2431-2438. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.39.7.2431-2438.2001>
- Miles, MR, Bonde, MR, Nester, SE, Berner, DK, Frederick, RD & Hartman, GL. (2011).** Characterizing resistance to *Phakopsora pachyrhizi* in soybean. *Plant Disease*, 95(5), 577-581. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-10-0450>
- Miles, MR, Levy, C, Morel, W, Mueller, T, Steinlage, T, Van Rij, N, Frederick, RD & Hartman GL. (2007).** International fungicide efficacy trials for the management of soybean rust. *Plant Disease*, 91(11), 1450-1458. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-11-1450>
- Miles, MR, Hartman, GL, Levy, C & Morel, W. (2003).** Current status of soybean rust control by fungicides. *Pesticide Outlook*, 14(5), 197-200. DOI: <https://doi.org/10.1039/b311463p>
- Muellender, MM, Mahlein, AK, Stammler, G & Varrelmann, M. (2021).** Evidence for the association of target-site resistance in *cyp51* with reduced DMI sensitivity in European *Cercospora beticola* field isolates. *Pest Management Science*, 77(4), 1765-1774. DOI: <https://doi.org/10.1002/ps.6197>
- Mueller, DS. (2006).** Fungicides: terminology. *Integrated Crop Management News*, 1250. Verfügbar unter: <http://lib.dr.iastate.edu/cropnews/1250>
- Müller, MA, Stammler, G & May De Mio, LL. (2021).** Multiple resistance to DMI, QoI and SDHI fungicides in field isolates of *Phakopsora pachyrhizi*. *Crop Protection*, 145, 105618. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2021.105618>
- Murithi, HM, Beed, F, Tukamuhabwa, P, Thomma, BPHJ & Joosten, MHAJ. (2016).** Soybean production in Eastern and Southern Africa and threat of yield loss due to soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi*. *Plant Pathology*, 65(2), 176-188. DOI: <https://doi.org/10.1111/ppa.12457>
- Netto, A, Sacon, D, Gallina, A, Fochesatto, M, Stefanski, FS & Milanese, PM. (2020).** Use of systemic fungicides combined with multisite to control of asian rust and soybean yield.

- Colloquium Agrariae*, 16(1), 101-108. DOI: <https://doi.org/10.5747/ca.2020.v16.n1.a352>
- Nunkumar, A, Caldwell, PM & Pretorius, ZA. (2009).** Development of *Phakopsora pachyrhizi* on soybean at controlled temperature, relative humidity and moisture periods. *South African Journal of Plant and Soil*, 26(4), 225-230. DOI: <https://doi.org/10.1080/02571862.2009.10639959>
- Oerke, EC. (2006).** Crop losses to pests. *The Journal of Agricultural Science*, 144(1), 31-43. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0021859605005708>
- Oliver, RP & Hewitt, HG. (2014).** *Fungicides in crop protection*. S. 1-11; 71-122. CABI, Wallingford, England.
- Omrane, S, Sghyer, H, Audéon, C, Lanen, C, Duplaix, C, Walker, AS & Fillinger, S. (2015).** Fungicide efflux and the MgMFS 1 transporter contribute to the multidrug resistance phenotype in *Zymoseptoria tritici* field isolates. *Environmental Microbiology*, 17(8), 2805-2823. DOI: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12781>
- Ono, Y, Buriticá, P & Hennen, JF. (1992).** Delimitation of *Phakopsora*, *Physopella* and *Cerotelium* and their species on Leguminosae. *Mycological Research*, 96(10), 825-850. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)81029-0](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)81029-0)
- Parker, JE, Warrilow, AGS, Price, CL, Mullins, JGL, Kelly, DE & Kelly, SL. (2014).** Resistance to antifungals that target CYP51. *Journal of Chemical Biology*, 7(4), 143-161. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12154-014-0121-1>
- Patil, PV & Anahosur, KH. (1998).** Control of soybean rust by fungicides. *Indian Phytopathology*, 51(3), 265-268. Verfügbar unter: <https://epubs.icar.org.in/index.php/IPPJ/article/view/19676/9895>
- Pretorius, ZA, Kloppers, FJ & Frederick, RD. (2001).** First report of soybean rust in South Africa. *Plant Disease*, 85(12), 1288-1288. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.12.1288C>
- Pretorius, ZA, Visser, B & Du Preez, PJ. (2007).** First report of Asian soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* on kudzu in South Africa. *Plant Disease*, 91(10), 1364-1364. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-10-1364C>

- Price, CL, Parker, JE, Warrilow, AGS, Kelly, DE & Kelly, SL. (2015).** Azole fungicides – understanding resistance mechanisms in agricultural fungal pathogens. *Pest Management Science*, 71(8), 1054-1058. DOI: <https://doi.org/10.1002/ps.4029>
- PubChem. (2022).** National Center for Biotechnology Information. Abgerufen am 08.01.2022. Verfügbar unter: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Rallos, LEE & Baudoin, AB. (2016).** Co-Occurrence of two allelic variants of CYP51 in *Erysiphe necator* and their correlation with over-expression for DMI resistance. *PLoS One*, 11(2), e0148025. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148025>
- Rehfus, A, Matusinsky, P, Strobel, D, Bryson, R & Stammler, G. (2019).** Mutations in target genes of succinate dehydrogenase inhibitors and demethylation inhibitors in *Ramularia collo-cygni* in Europe. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 126(5), 447-459. DOI: <https://doi.org/10.1007/s41348-019-00246-4>
- Reis, EM, Deuner, E & Zanatta, M. (2015).** In vivo sensitivity of *Phakopsora pachyrhizi* to DMI and Qol fungicides. *Summa Phytopathologica*, 41(1), 21-24. DOI: <https://doi.org/10.1590/0100-5405/1975>
- Reis, EM, Guerra, WD, Reis, AC, Zanatta, M, Carmona, M & Sautura, F. (2021a).** Fungi resistance to multissite fungicides. *Journal of Agricultural Science*, 13(11), 141-152. DOI: <https://doi.org/10.5539/jas.v13n11p141>
- Reis, EM, Guerra, WD, Zambolim, L, Juliatti, FC, Menten, JO, Zanatta, M & de Rossi Belufi, LM. (2021b).** Asian rust severity in soybean sown in December and February in Mato Grosso State. *Journal of Agricultural Science*, 13(11), 127-140. DOI: <https://doi.org/10.5539/jas.v13n11p127>
- Saksirirat, W & Hoppe, HH. (1991).** Teliospore germination of soybean rust fungus (*Phakopsora pachyrhizi* Syd.). *Journal of Phytopathology*, 132(4), 339-342. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1991.tb00129.x>
- Scalliet, G, Bowler, J, Luksch, T, Kirchhofer-Allan, L, Steinhauer, D, Ward, K, Niklaus, M, Verras, A, et al. (2012).** Mutagenesis and functional studies with succinate dehydrogenase inhibitors in the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *PLoS One*, 7(4), e35429. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035429>
- Scherm, H, Christiano, RSC, Esker, PD, Del Ponte, EM & Godoy, CV. (2009).** Quantitative review of fungicide efficacy trials for managing soybean rust in Brazil. *Crop Protection*, 28(9), 774-782. DOI: 10.1016/j.cropro.2009.05.006

- Schmitz, HK. (2013).** *In vivo und molekularbiologische Untersuchungen zur Sensitivität von Phakopsora pachyrhizi gegenüber Demethylierungs-Inhibitoren und Qo-Inhibitoren.* Dissertation, Universität Hohenheim. Verfügbar unter: <http://opus.uni-hohenheim.de/volltexte/2013/828/>
- Schmitz, HK, Medeiros, CA, Craig, IR & Stammler, G. (2014).** Sensitivity of *Phakopsora pachyrhizi* towards quinone-outside-inhibitors and demethylation-inhibitors, and corresponding resistance mechanisms. *Pest Management Science*, 70(3), 378-388. DOI: <https://doi.org/10.1002/ps.3562>
- Schmitz, HK & Stammler, G. (2012).** Effects of long-term storage methods on the infectivity of urediospores of *Phakopsora pachyrhizi*. *Journal of Phytopathology*, 160(9), 500-503. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2012.01927.x>
- Schnabel, G & Jones, AL. (2001).** The 14 α -demethylase (*CYP51A1*) gene is overexpressed in *Venturia inaequalis* strains resistant to myclobutanil. *Phytopathology*, 91(1), 102-110. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2001.91.1.102>
- Schneider, RW, Hollier, CA, Whitam, HK, Palm, ME, McKemy, JM, Hernandez, JR, Levy, L & DeVries-Paterson, R. (2005).** First report of soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* in the continental United States. *Plant Disease*, 89(7), 774-774. DOI: <https://doi.org/10.1094/PD-89-0774A>
- Sconyers, LE, Kemerait, RC, Brock, J, Phillips, DV, Jost, PH, Sikora, EJ, Gutierrez-Estrada, A, Mueller, JD, et al. (2006).** Asian soybean rust development in 2005: a perspective from the Southeastern United States. In: *APSnet Features*, American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. Verfügbar unter: <https://www.apsnet.org/edcenter/apsnetfeatures/Documents/2006/SoybeanRustIn2005.pdf>
- Sevastos, A, Labrou, NE, Flouri, F & Malandrakis, A. (2017).** Glutathione transferase-mediated benzimidazole-resistance in *Fusarium graminearum*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 141, 23-28. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2016.11.002>
- Shea, Z, Singer, WM & Zhang, B. (2020).** Soybean production, versatility, and improvement. In: *Legume Crops-Prospects, Production and Uses (Hrsg. Hasanuzzaman, M)*, S. 29-37. IntechOpen, London, England.
- Siegel, M. (1981).** Sterol-inhibiting fungicides: effects on sterol biosynthesis and sites of action. *Plant Diseases*, 65, 986-989. DOI: <https://doi.org/10.1094/PD-65-986>

- Sierotzki, H & Stammler, G. (2019).** Resistance of plant pathogens to QoI fungicides (FRAC Code 11). In: *Fungicide Resistance in North America, Second Edition (Hrsg. Stevenson, KL, McGrath, MT & Wyenandt, CA)*, S. 97-113. American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA. DOI: <https://doi.org/10.1094/9780890546222.008>
- Simões, K, Hawlik, A, Rehfus, A, Gava, F & Stammler, G. (2017).** First detection of a SDH variant with reduced SDHI sensitivity in *Phakopsora pachyrhizi*. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 125(1), 21-26. DOI: <https://doi.org/10.1007/s41348-017-0117-5>
- Slaminko, TL, Miles, MR, Marois, JJ, Wright, DL & Hartman, GL. (2008).** Hosts of *Phakopsora pachyrhizi* identified in field evaluations in Florida. *Plant Health Progress*, 9(1). DOI: <https://doi.org/10.1094/PHP-2008-1103-01-RS>
- Song, J, Zhang, S & Lu, L. (2018).** Fungal cytochrome P450 protein Cyp51: what we can learn from its evolution, regulons and Cyp51-based azole resistance. *Fungal Biology Reviews*, 32(3), 131-142. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2018.05.001>
- Stammler, G, Carstensen, M, Koch, A, Semar, M, Strobel, D & Schlehuber, S. (2008).** Frequency of different CYP51-haplotypes of *Mycosphaerella graminicola* and their impact on epoxiconazole-sensitivity and-field efficacy. *Crop Protection*, 27(11), 1448-1456. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2008.07.007>
- Stammler, G, Cordero, J, Koch, A, Semar, M & Schlehuber, S. (2009).** Role of the Y134F mutation in *cyp51* and overexpression of *cyp51* in the sensitivity response of *Puccinia triticina* to epoxiconazole. *Crop Protection*, 28(10), 891-897. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2009.05.007>
- Stammler, G & Semar, M. (2011).** Sensitivity of *Mycosphaerella graminicola* (anamorph: *Septoria tritici*) to DMI fungicides across Europe and impact on field performance. *EPPO Bulletin*, 41(2), 149-155. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.2011.02454.x>
- Stanis, VF & Jones, AL. (1985).** Reduced sensitivity to sterol-inhibiting fungicides in field isolates of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology*, 75(10), 1098-1101. DOI: <https://doi.org/10.1094/Phyto-75-1098>
- Stewart, S, Guillin, EA & Díaz, L. (2005).** First report of soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* in Uruguay. *Plant Disease*, 89(8), 909-909. DOI: <https://doi.org/10.1094/PD-89-0909C>

- Stilgenbauer, S, Steiner, U & Stammler, G. (2022).** Generating single spore isolates of *Phakopsora pachyrhizi* for a better understanding of fungicide resistance mechanisms. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 129, 1063-1071. DOI: <https://doi.org/10.1007/s41348-022-00606-7>
- Sun, X, Xu, Q, Ruan, R, Zhang, T, Zhu, C & Li, H. (2013).** PdMLE1, a specific and active transposon acts as a promoter and confers *Penicillium digitatum* with DMI resistance. *Environmental Microbiology Reports*, 5(1), 135-142. DOI: <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12012>
- Tapiero-Ortiz, AL, López-Cardona, N, Guevara-Castro, A, Rodríguez-Triana, SM, Chavarro-Mesa, E & Ángel-Díaz, JE. (2021).** *Phakopsora pachyrhizi* is the major pathogen associated with soybean rust in Colombia. *Summa Phytopathologica*, 47(3), 149-156. DOI: <https://doi.org/10.1590/0100-5405/245533>
- Twizeyimana, M & Hartman, GL. (2012).** Pathogenic variation of *Phakopsora pachyrhizi* isolates on soybean in the United States from 2006 to 2009. *Plant Disease*, 96(1), 75-81. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-11-0379>
- Twizeyimana, M, Ojiambo, PS, Hartman, GL & Bandyopadhyay, R. (2011a).** Dynamics of soybean rust epidemics in sequential plantings of soybean cultivars in Nigeria. *Plant Disease*, 95(1), 43-50. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-10-0436>
- Twizeyimana, M, Ojiambo, PS, Haudenschild, J, Caetano-Anollés, G, Pedley, KF, Bandyopadhyay, R & Hartman, GL. (2011b).** Genetic structure and diversity of *Phakopsora pachyrhizi* isolates from soybean. *Plant Pathology*, 60(4), 719-729. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02428.x>
- Van Rhijn, N, Bromley, M, Richardson, M & Bowyer, P. (2021).** CYP51 paralogue structure is associated with intrinsic azole resistance in fungi. *MBio*, 12(5), e01945-01921. DOI: <https://doi.org/10.1128/mBio.01945-21>
- Vanden Bossche, H. (1985).** Biochemical targets for antifungal azole derivatives: hypothesis on the mode of action. In: *Current Topics in Medical Mycology (Hrsg. McGinnis, MR)*, S. 313-351. Springer, New York, USA. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4613-9547-8_12
- Vanden Bossche, H, Marichal, P, Gorrens, J, Bellens, D, Verhoeven, H, Coene, MC, Lauwers, W & Janssen PAJ. (1987).** Interaction of azole derivatives with cytochrome

- P-450 isozymes in yeast, fungi, plants and mammalian cells. *Pesticide Science*, 21(4), 289-306. DOI: <https://doi.org/10.1002/ps.2780210406>
- Villani, SM, Hulvey, J, Hily, JM & Cox, KD. (2016).** Overexpression of the *CYP51A1* gene and repeated elements are associated with differential sensitivity to DMI fungicides in *Venturia inaequalis*. *Phytopathology*, 106(6), 562-571. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-10-15-0254-R>
- Vittal, R, Yang, HC & Hartman, GL. (2012).** Anastomosis of germ tubes and migration of nuclei in germ tube networks of the soybean rust pathogen, *Phakopsora pachyrhizi*. *European Journal of Plant Pathology*, 132(2), 163-167. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9872-5>
- Voegele, RT & Mendgen, KW. (2011).** Nutrient uptake in rust fungi: how sweet is parasitic life? *Euphytica*, 179(1), 41-55. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10681-011-0358-5>
- Walker, DR, Boerma, HR, Phillips, DV, Schneider, RW, Buckley, JB, Shipe, ER, Mueller, JD, Weaver, DB, et al. (2011).** Evaluation of USDA soybean germplasm accessions for resistance to soybean rust in the Southern United States. *Crop Science*, 51(2), 678-693. DOI: <https://doi.org/10.2135/cropsci2010.06.0340>
- Walmsley-Woodward, D, Laws, F & Whittington, W. (1979).** Studies on the tolerance of *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* to systemic fungicides. *Annals of Applied Biology*, 92(2), 199-209. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1979.tb03865.x>
- Wang, X & McCallum, B. (2009).** Fusion body formation, germ tube anastomosis, and nuclear migration during the germination of urediniospores of the wheat leaf rust fungus, *Puccinia triticina*. *Phytopathology*, 99(12), 1355-1364. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-99-12-1355>
- Wieczorek, TM, Berg, G, Semaškienė, R, Mehl, A, Sierotzki, H, Stammer, G, Justesen, AF & Jørgensen, LN. (2015).** Impact of DMI and SDHI fungicides on disease control and CYP51 mutations in populations of *Zymoseptoria tritici* from Northern Europe. *European Journal of Plant Pathology*, 143(4), 861-871. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10658-015-0737-1>
- Wu, Q, Yang, Z, Nie, Y, Shi, Y & Fan, D. (2014).** Multi-drug resistance in cancer chemotherapeutics: mechanisms and lab approaches. *Cancer Letters*, 347(2), 159-166. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.03.013>

- Wyand, RA & Brown, JKM. (2005).** Sequence variation in the *CYP51* gene of *Blumeria graminis* associated with resistance to sterol demethylase inhibiting fungicides. *Fungal Genetics and Biology*, 42(8), 726-735. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2005.04.007>
- Xiong, L, Shen, YQ, Jiang, LN, Zhu, XL, Yang, WC, Huang, W & Yang, GF. (2015).** Succinate dehydrogenase: an ideal target for fungicide discovery. In: *Discovery and Synthesis of Crop Protection Products (Hrsg. Maienfisch, P & Stevenson, TM)*, S. 175-194. ACS Symposium Series, American Chemical Society, Washington D.C., USA. DOI: <https://doi.org/10.1021/bk-2015-1204.ch013>
- Yamanaka, N, Lemos, NG, Uno, M, Akamatsu, H, Yamaoka, Y, Abdelnoor, RV, Braccini, AL & Suenaga K. (2013).** Resistance to Asian soybean rust in soybean lines with the pyramided three *Rpp* genes. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 13(1), 75-82. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1984-70332013000100009>
- Yorinori, JT. (2004).** Country report and rust control strategies in Brazil. In: *Proceedings VII World Soybean Research Conference, IV International Soybean Processing and Utilization Conference, III Congresso Brasileiro de Soja (Brazilian Soybean Congress) (Hrsg. Moscardi, F, Hoffmann-Campo, CB, Saraiva, OF, Galerani, PR, Krzyzanowski, FC & Carrão-Panizzi, MC)*, S. 447-455, Brazilian Agricultural Research Corporation, National Soybean Research Center, Londrina, Brasilien.
- Yorinori, JT, Paiva, WM, Frederick, RD, Costamilan, LM, Bertagnolli, PF, Hartman, GE, Godoy, CV & Nunes, J. (2005).** Epidemics of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil and Paraguay from 2001 to 2003. *Plant Disease*, 89(6), 675-677. DOI: <https://doi.org/10.1094/PD-89-0675>
- Yu, Q & Powles, S. (2014).** Metabolism-based herbicide resistance and cross-resistance in crop weeds: a threat to herbicide sustainability and global crop production. *Plant Physiology*, 166(3), 1106-1118. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.114.242750>
- Zambolim, L, Juliatti, FC & Guerra, W. (2021).** How to cope with the vulnerability of site specific fungicides on the control of Asian soybean rust. *International Journal of Research Agronomy*, 4(1), 14-25. DOI: <https://doi.org/10.33545/2618060X.2021.v4.i1a.44>
- Zhang, XC, Freire, MCM, Le, MH, De Oliveira, LO, Pitkin, JW, Segers, G, Concibido, VC, Baley, GJ, et al. (2012).** Genetic diversity and origins of *Phakopsora pachyrhizi* isolates in the United States. *Asian Journal of Plant Pathology*, 6(3), 52-65. DOI: <https://doi.org/10.3923/ajppaj.2012.52.65>

Ziogas, BN & Malandrakis, AA. (2015). Sterol biosynthesis inhibitors: C14 demethylation (DMIs).
In: *Fungicide Resistance in Plant Pathogens* (Hrsg. Ishii, H & Hollomon, D), S. 199-216.
Springer, Tokyo, Japan. DOI: https://doi.org/10.1007/978-4-431-55642-8_13

7 Anhang

Tabelle A23: Nachweis der genetischen Identität der Einsporisolate von *Phakopsora pachyrhizi* durch Bestimmung der quantitativen Mutationsanteile (%) nach Anwendung unterschiedlicher Demethylierungsinhibitoren im Detached Leaf Test. gDNA aus mit *P. pachyrhizi* infizierten Bereichen von unbehandelten und behandelten Blättern wurde extrahiert und anschließend mittels Pyrosequenzierung und qPCR hinsichtlich ihrer Mutationswerte quantifiziert. Für die Analyse wurden die infizierten Bereiche verwendet, die in den höchsten Konzentrationen vorhanden waren (0,3/1/3/10/30/100 mg/l) sowie die Befallsstellen aus den Kontrollen (0 mg/l). Eine zusätzliche Analyse der für die Inokulation verwendeten Sporensuspension (Inokulum) wurde durchgeführt. Es wurden Prothioconazol, Epoxiconazol, Cyproconazol, Tetraconazol, Difenoconazol, Tebuconazol und Metconazol überprüft. Neben der Referenzpopulation (P-18) sind alle neun Einsporisolate aufgezeigt sowie sechs der neun *CYP51*-Mutationen. Die Mutationen K142R, I145F und I475T sind nicht aufgeführt, da diese in keinem der gewonnenen Einsporisolate vorkamen. Ferner sind die Konzentrationen gelistet, aus der die jeweiligen Befallsstellen analysiert wurden.

| Isolat | Behandlung | Konzentration (mg/l) | Mutationen (%) in gDNA | | | | | | | <i>SDHc</i> I86F | <i>CYTb</i> F129L |
|--|----------------|-------------------------|------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-----|---------------------|----------------------|
| | | | <i>CYP51</i> | | | | | | | | |
| | | | F120L | V130A | Y131F | Y131H | I145V | F154Y | | | |
| Population P-18^a | Inokulum | - ^b | udN ^d | udN | udN | udN | udN | udN | udN | 0 | 98 |
| | Kontrolle | 0 | udN | udN | udN | udN | udN | udN | udN | 0 | 96 |
| | Prothioconazol | 30 | 26 | 19 | 16 | 6 | 9 | udN | udN | 0 | 97 |
| | Epoxiconazol | 100 | 29 | 19 | 18 | 6 | 8 | udN | udN | 0 | 98 |
| | Cyproconazol | 30 | 30 | 20 | 17 | 6 | 7 | udN | udN | 0 | 98 |
| | Tetraconazol | 100 | 26 | 19 | 15 | udN | 10 | udN | udN | 0 | 98 |
| | Difenoconazol | 100 | 37 | udN | udN | 31 | udN | udN | udN | 0 | 98 |
| | Tebuconazol | 100 | 30 | udN | udN | 32 | 12 | udN | udN | 0 | 97 |
| | Metconazol | 100 | 31 | udN | udN | 32 | 20 | udN | udN | 0 | 96 |
| MS2-256/18P^c | Inokulum | - ^b | udN | udN | udN | udN | udN | udN | udN | 0 | udN |

Anhang

| Isolat | Behandlung | Konzentration (mg/l) | Mutationen (%) in gDNA | | | | | | | |
|--------------------|----------------|-------------------------|------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-------|
| | | | CYP51 | | | | | | SDHc | CYTb |
| | | | F120L | V130A | Y131F | Y131H | I145V | F154Y | I86F | F129L |
| | Kontrolle | 0 | udN | udN | udN | udN | udN | udN | 0 | udN |
| | Prothioconazol | 1 | udN | udN | udN | udN | udN | udN | 0 | udN |
| | Epoxiconazol | 1 | udN | udN | udN | udN | udN | udN | 0 | udN |
| | Cyproconazol | 1 | udN | udN | udN | udN | udN | udN | 0 | udN |
| | Tetraconazol | 3 | udN | udN | udN | udN | udN | udN | 0 | udN |
| | Difenoconazol | 30 | udN | udN | udN | udN | udN | udN | 0 | udN |
| | Tebuconazol | 1 | udN | udN | udN | udN | udN | udN | 0 | udN |
| | Metconazol | 1 | udN | udN | udN | udN | udN | udN | 0 | udN |
| MS1-256/18P | Inokulum | - ^b | 19 | 17 | 19 | udN | udN | udN | 0 | 96 |
| | Kontrolle | 0 | 18 | 18 | 18 | udN | udN | udN | 0 | 97 |
| | Prothioconazol | 30 | 18 | 16 | 18 | udN | udN | udN | 0 | 100 |
| | Epoxiconazol | 100 | 16 | 20 | 18 | udN | udN | udN | 0 | 98 |
| | Cyproconazol | 100 | 20 | 19 | 18 | udN | udN | udN | 0 | 96 |
| | Tetraconazol | 100 | 18 | 19 | 17 | udN | udN | udN | 0 | 97 |
| | Difenoconazol | 100 | 20 | 18 | 19 | udN | udN | udN | 0 | 97 |
| | Tebuconazol | 30 | 19 | 17 | 19 | udN | udN | udN | 0 | 96 |

Anhang

| Isolat | Behandlung | Konzentration (mg/l) | Mutationen (%) in gDNA | | | | | | | |
|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------|------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-------|
| | | | CYP51 | | | | | | SDHc | CYTb |
| | | | F120L | V130A | Y131F | Y131H | I145V | F154Y | I86F | F129L |
| | Metconazol | 100 | 19 | 20 | 17 | udN | udN | udN | 0 | 98 |
| MS1-261/18P^c | Inokulum | - ^b | 28 | 29 | 32 | udN | udN | udN | 0 | 96 |
| | Kontrolle | 0 | 31 | 27 | 31 | udN | udN | udN | 0 | 96 |
| | Prothioconazol | 30 | 28 | 29 | 28 | udN | udN | udN | 0 | 96 |
| | Epoconazol | 100 | 30 | 30 | 31 | udN | udN | udN | 0 | 98 |
| | Cyproconazol | 100 | 27 | 28 | 29 | udN | udN | udN | 0 | 96 |
| | Tetraconazol | 100 | 30 | 29 | 30 | udN | udN | udN | 0 | 97 |
| | Difenoconazol | 100 | 28 | 30 | 31 | udN | udN | udN | 0 | 100 |
| | Tebuconazol | 30 | 28 | 27 | 28 | udN | udN | udN | 0 | 96 |
| | Metconazol | 100 | 29 | 28 | 28 | udN | udN | udN | 0 | 99 |
| | MS2-261/18P^c | Inokulum | - ^b | 30 | 27 | 30 | udN | udN | udN | 0 |
| Kontrolle | | 0 | 29 | 27 | 28 | udN | udN | udN | 0 | 96 |
| Prothioconazol | | 30 | 31 | 27 | 30 | udN | udN | udN | 0 | 99 |
| Epoconazol | | 100 | 30 | 29 | 31 | udN | udN | udN | 0 | 98 |
| Cyproconazol | | 100 | 27 | 28 | 29 | udN | udN | udN | 0 | 99 |
| Tetraconazol | | 100 | 31 | 29 | 30 | udN | udN | udN | 0 | 97 |

Anhang

| Isolat | Behandlung | Konzentration (mg/l) | Mutationen (%) in gDNA | | | | | | | |
|--------------------------------|----------------|-------------------------|------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-------|
| | | | CYP51 | | | | | | SDHc | CYTb |
| | | | F120L | V130A | Y131F | Y131H | I145V | F154Y | I86F | F129L |
| | Difenoconazol | 100 | 28 | 29 | 29 | udN | udN | udN | 0 | 97 |
| | Tebuconazol | 30 | 29 | 28 | 28 | udN | udN | udN | 0 | 96 |
| | Metconazol | 100 | 29 | 27 | 28 | udN | udN | udN | 0 | 96 |
| MS3-261/18P^c | Inokulum | - ^b | 30 | 29 | 30 | udN | udN | udN | 0 | 95 |
| | Kontrolle | 0 | 29 | 28 | 31 | udN | udN | udN | 0 | 97 |
| | Prothioconazol | 30 | 30 | 28 | 31 | udN | udN | udN | 0 | 96 |
| | Epoxiconazol | 100 | 30 | 31 | 31 | udN | udN | udN | 0 | 98 |
| | Cyproconazol | 100 | 27 | 29 | 29 | udN | udN | udN | 0 | 100 |
| | Tetraconazol | 100 | 30 | 30 | 30 | udN | udN | udN | 0 | 98 |
| | Difenoconazol | 100 | 28 | 28 | 30 | udN | udN | udN | 0 | 97 |
| | Tebuconazol | 30 | 30 | 29 | 31 | udN | udN | udN | 0 | 95 |
| | Metconazol | 30 | 30 | 30 | 29 | udN | udN | udN | 0 | 98 |
| MS5-259/18P^c | Inokulum | - ^b | 47 | udN | udN | 47 | udN | udN | 46 | 97 |
| | Kontrolle | 0 | 48 | udN | udN | 48 | udN | udN | 46 | 96 |
| | Prothioconazol | 10 | 47 | udN | udN | 46 | udN | udN | 46 | 98 |
| | Epoxiconazol | 30 | 48 | udN | udN | 47 | udN | udN | 48 | 98 |

Anhang

| Isolat | Behandlung | Konzentration (mg/l) | Mutationen (%) in gDNA | | | | | | | |
|--------------------------------|----------------|-------------------------|------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-------|
| | | | CYP51 | | | | | | SDHc | CYTb |
| | | | F120L | V130A | Y131F | Y131H | I145V | F154Y | I86F | F129L |
| | Cyproconazol | 30 | 48 | udN | udN | 49 | udN | udN | 48 | 96 |
| | Tetraconazol | 100 | 48 | udN | udN | 46 | udN | udN | 48 | 97 |
| | Difenoconazol | 100 | 49 | udN | udN | 49 | udN | udN | 49 | 97 |
| | Tebuconazol | 100 | 46 | udN | udN | 46 | udN | udN | 46 | 99 |
| | Metconazol | 100 | 50 | udN | udN | 47 | udN | udN | 50 | 96 |
| MS1-259/18P^c | Inokulum | - ^b | 30 | udN | udN | 30 | 29 | udN | 0 | 98 |
| | Kontrolle | 0 | 28 | udN | udN | 28 | 28 | udN | 0 | 96 |
| | Prothioconazol | 10 | 28 | udN | udN | 28 | 28 | udN | 0 | 96 |
| | Epoxiconazol | 30 | 30 | udN | udN | 29 | 30 | udN | 0 | 98 |
| | Cyproconazol | 30 | 27 | udN | udN | 31 | 29 | udN | 0 | 96 |
| | Tetraconazol | 30 | 30 | udN | udN | 29 | 29 | udN | 0 | 97 |
| | Difenoconazol | 100 | 28 | udN | udN | 30 | 28 | udN | 0 | 97 |
| | Tebuconazol | 100 | 28 | udN | udN | 28 | 28 | udN | 0 | 97 |
| | Metconazol | 100 | 29 | udN | udN | 30 | 30 | udN | 0 | 96 |
| MS3-259/18P^c | Inokulum | - ^b | 28 | udN | udN | 28 | 32 | udN | 0 | 99 |
| | Kontrolle | 0 | 30 | udN | udN | 30 | 30 | udN | 0 | 98 |

Anhang

| Isolat | Behandlung | Konzentration (mg/l) | Mutationen (%) in gDNA | | | | | | | |
|--------------------------------|----------------|-------------------------|------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-------|
| | | | CYP51 | | | | | | SDHc | CYTb |
| | | | F120L | V130A | Y131F | Y131H | I145V | F154Y | I86F | F129L |
| | Prothioconazol | 10 | 30 | udN | udN | 28 | 30 | udN | 0 | 98 |
| | Epoiconazol | 30 | 29 | udN | udN | 28 | 31 | udN | 0 | 98 |
| | Cyproconazol | 30 | 27 | udN | udN | 27 | 29 | udN | 0 | 96 |
| | Tetraconazol | 100 | 30 | udN | udN | 28 | 30 | udN | 0 | 96 |
| | Difenoconazol | 100 | 29 | udN | udN | 30 | 29 | udN | 0 | 98 |
| | Tebuconazol | 100 | 28 | udN | udN | 29 | 28 | udN | 0 | 99 |
| | Metconazol | 100 | 29 | udN | udN | 29 | 31 | udN | 0 | 99 |
| MS4-259/18P^c | Inokulum | - ^b | 32 | udN | udN | 30 | udN | 30 | 0 | 96 |
| | Kontrolle | 0 | 32 | udN | udN | 29 | udN | 31 | 0 | 97 |
| | Prothioconazol | 30 | 32 | udN | udN | 29 | udN | 29 | 0 | 97 |
| | Epoiconazol | 30 | 30 | udN | udN | 29 | udN | 31 | 0 | 98 |
| | Cyproconazol | 30 | 27 | udN | udN | 27 | udN | 29 | 0 | 96 |
| | Tetraconazol | 100 | 30 | udN | udN | 31 | udN | 31 | 0 | 97 |
| | Difenoconazol | 100 | 28 | udN | udN | 29 | udN | 30 | 0 | 97 |
| | Tebuconazol | 100 | 29 | udN | udN | 28 | udN | 29 | 0 | 97 |
| | Metconazol | 30 | 30 | udN | udN | 30 | udN | 29 | 0 | 97 |

- ^a Referenzpopulation = zeigt auf, wie die Mutationswerte nach einer Behandlung mit unterschiedlichen Demethylierungsinhibitoren variieren.
- ^b Keine Werte bei Konzentration, da es sich um das verwendete Inokulum handelt.
- ^c MS = Einsporisolat (monosporic isolate)
- ^d Da die Nachweisgenauigkeit der Pyrosequenzierung 5 % beträgt, wurden alle Werte < 5 % „unterhalb der Nachweisgrenze“ (udN) gesehen und alle Werte über 95 % (F129L) können als 100 % interpretiert werden.

| A | B |
|--|--|
| ATG TCT TCC AGC GTT ATA ATC GAT CAG CTC TAC TCA TTC TCA ACT ACC AGT CTC ATC ATC 60 | ATG TCT TCC AGC GTT ATA ATC GAT CAG CTC TAC TCA TTC TCA ACT ACC AGT CTC ATC ATC 60 |
| M S S S V I I D Q L Y S F S T T S L I I | M S S S V I I D Q L Y S F S T T S L I I |
| ACA TCG CTA ACT TCC ATC CTC ACA ATC ATC GTC ATC CTC AAT GTC ACT AAT CAG TTG TTG 120 | ACA TCG CTA ACT TCC ATC CTC ACA ATC ATC GTC ATC CTC AAT GTC ACT AAT CAG TTG TTG 120 |
| T S L T S I L T I I V I L N V T N Q L L | T S L T S I L T I I V I L N V T N Q L L |
| TTC AAG GAC AGG AAT ACC CCA CCG CTA GTC TTC CAC ATA TTT CCG GTG CTC GGC TCT GTG 180 | TTC AAG GAC AGG AAT ACC CCA CCG CTA GTC TTC CAC ATA TTT CCG GTG CTC GGC TCT GTG 180 |
| F K D R N T P P L V F H I F P V L G S V | F K D R N T P P L V F H I F P V L G S V |
| ATA AGC TAT GGC ATG GAT CCG TAC CAA TTC TTT GAG GAC TGT CCG AGG AAG CAT GGA AAT 240 | ATA AGC TAT GGC ATG GAT CCG TAC CAA TTC TTT GAG GAC TGT CCG AGG AAG CAT GGA AAT 240 |
| I S Y G M D P Y Q F F E D C R R K H G N | I S Y G M D P Y Q F F E D C R R K H G N |
| GTG TTT ACG TTT GTG CTG TTG AAC AAG AAG GTC ACC GTA GCT CTC GGT CCG GAG GGA AAC 300 | GTG TTT ACG TTT GTG CTG TTG AAC AAG AAG GTC ACC GTA GCT CTC GGT CCG GAG GGA AAC 300 |
| V F T F V L L N K K V T V A L G P E G N | V F T F V L L N K K V T V A L G P E G N |
| ACG TTG GTC TTA AAT GGA AAG CTC TCA GAG GTC AAT GCC GAA GAA GCT TAC ACC CAT TTC 360 | ACG TTG GTC TTA AAT GGA AAG CTC TCA GAG GTC AAT GCC GAA GAA GCT TAC ACC CAT TTC 360 |
| T L V L N G K L S E V N A E E A Y T H F | T L V L N G K L S E V N A E E A Y T H F |
| ACT ACA CCT GTC TTT GGT AAG GAT GTA GTC TAC GAT GTA CCC AAC TCG ATC CTA ATG CAG 420 | ACT ACA CCT GTC TTT GGT AAG GAT GTA GTC TAC GAT GTA CCC AAC TCG ATC CTA ATG CAG 420 |
| T T P V F G K D V V Y D V P N S I L M Q | T T P V F G K D V V Y D V P N S I L M Q |
| CAG AAA AAG TTC ATC AAG GCT GGC CTT ACT ACT GAG AAA TTT AAG AAA TAT GTG GGG ATA 480 | CAG AAA AAG TTC ATC AAG GCT GGC CTT ACT ACT GAG AAA TTT AAG AAA TAT GTG GGG ATA 480 |
| Q K K F I K A G L T T E K F K K Y V G I | Q K K F I K A G L T T E K F K K Y V G I |
| ATT GTT AGA GAA ACA AGT TAC CTG GAA GAT CAT TTA TTC TGC TCT CCA AAT GTA AAA 540 | ATT GTT AGA GAA ACA AGT TAC CTG GAA GAT CAT TTA TTC TGC TCT CCA AAT GTA AAA 540 |
| I V R E T T S Y L E D H L F C S P N V K | I V R E T T S Y L E D H L F C S P N V K |
| TCT GTC ACT AAG GAC GTC CAT GAT ATT ACT TCT GAG ATA ACG ATT TGT ACT GCA GCA GCA 600 | TCT GTC ACT AAG GAC GTC CAT GAT ATT ACT TCT GAG ATA ACG ATT TGT ACT GCA GCA GCA 600 |
| S V T K D V H D I T S E I T I C T A A A | S V T K D V H D I T S E I T I C T A A A |
| ACT CTA CAG GGA AAA GAA GTC AGA GAA GGG CTA GAC AAA TCC TTT GCT AAA CTC TAT CAC 660 | ACT CTA CAG GGA AAA GAA GTC AGA GAA GGG CTA GAC AAA TCC TTT GCT AAA CTC TAT CAC 660 |
| T L Q G K E V R E G L D K S F A K L Y H | T L Q G K E V R E G L D K S F A K L Y H |
| GAC CTA GAT GGT GGA TTT ACA CCG TTG AAC TTT GTT TTT CCG AAC CTG CCC TTA CCC TCC 720 | GAC CTA GAT GGT GGA TTT ACA CCG TTG AAC TTT GTT TTT CCG AAC CTG CCC TTA CCC TCC 720 |
| D L D G G F L N F V F P N L P L P S | D L D G G F L N F V F P N L P L P S |
| TAC AGA CGT AGG GAC AAG GCA CAG GTC TCG ATG ACA AAC TTT TAT CTG AAC ATT CTA AAG 780 | TAC AGA CGT AGG GAC AAG GCA CAG GTC TCG ATG ACA AAC TTT TAT CTG AAC ATT CTA AAG 780 |
| Y R R R D K A Q V S M T N F Y L N I L K | Y R R R D K A Q V S M T N F Y L N I L K |
| AAA AGG AGA GCC GAA AAC AGG CAG GAT GAG TTC AAT GAC ATG GAT GTC TTG CAG GGG 840 | AAA AGG AGA GCC GAA AAC AGG CAG GAT GAG TTC AAT GAC ATG GAT GTC TTG CAG GAG 840 |
| K R R A E N R Q D E F N D M L D V L Q | K R R A E N R Q D E F N D M L D V L Q |
| CAG CAC TAC AAG GAC GGC AGA GCT TTA TCG GAC AGG GAA ATT GCT CAC ATA ATG ATT GCC 900 | CAG CAC TAC AAG GAC GGC AGA GCT TTA TCG GAC AGG GAA ATT GCT CAC ATA ATG ATT GCC 900 |
| Q H Y K D G R A L S D R E I A H I M I A | Q H Y K D G R A L S D R E I A H I M I A |
| GTC CTT ATG GCT GGT CAA CAC ACT AGT GCT GCG ACC GGC GCC TGG TTA TTG ACC CAT CTG 960 | GTC CTT ATG GCT GGT CAA CAC ACT AGT GCT GCG ACC GGC GCC TGG TTA TTG ACC CAT CTG 960 |
| V L M A G Q H T S A A T G A W L L T H L | V L M A G Q H T S A A T G A W L L T H L |
| GCT CAT TGC CCT GAC TTG GTT GAT AGA CTG AGG CGT GAA CAG GCC GAG GTC TTT GGT AAG 1020 | GCT CAT TGC CCT GAC TTG GTT GAT AGA CTG AGG CGT GAA CAG GTC GAG GTC TTT GGT AAG 1020 |
| A H C P D L V D R L R R E Q E V F G K | A H C P D L V D R L R R E Q E V F G K |
| GGG GAT GGT AGT GGA GAG TTG GAA GAT CTA GAT TAC GAT CGA CTC CAA ACA OCT CTA TTA 1080 | GGG GAT GGT AGT GGA GAG TTG GAA GAT CTA GAT TAC GAT CGA CTC CAA ACA OCT CTA TTA 1080 |
| G D G S G E L E D L D Y D R L Q T P L L | G D G S G E L E D L D Y D R L Q T P L L |
| AAT TCT TGT ATC AAA GAG GTC CTA CAG CCT CCA ATT CAT TCA ATC TTG CGC AAA 1140 | AAT TCT TGT ATC AAA GAG GTC CTA CAG CCT CCA ATT CAT TCA ATC TTG CGC AAA 1140 |
| N S C I K E V L R L H P P I H S I L R K | N S C I K E V L R L H P P I H S I L R K |
| GTT AAG TCA CCG ATC CTT GTT CCC AAA ACA CTC TCC TCA ATT GAC AAG AAC AAC CAA TAC 1200 | GTT AAG TCA CCG ATC CTT GTT CCC AAA ACA CTC TCC TCA ATT GAC AAG AAC AAC CAA TAC 1200 |
| V K S P I L V P K T L S S I D K N N Q Y | V K S P I L V P K T L S S I D K N N Q Y |
| ATC ATA CCC TCT TCC CAC TAC GTC CTA GCC GCA CCT GGC GTC TCT CAG ATT GAT CCA TCG 1260 | ATC ATA CCC TCT TCC CAC TAC GTC CTA GCC GCA CCT GGC GTC TCT CAG ATT GAT CCA TCG 1260 |
| I I P S S H Y V L A A P G V S Q I D P S | I I P S S H Y V L A A P G V S Q I D P S |
| GTT TGG GAC CAT CCA AAA GAG TTC AGA CCA GAG AGA TGG CTA TCG AAC TTT AAG AAA GAT 1320 | GTT TGG GAC CAT CCA AAA GAG TTC AGA CCA GAG AGA TGG CTA TCG AAC TTT AAG AAA GAT 1320 |
| V W D H P K E F R P E R W L S N F K K D | V W D H P K E F R P E R W L S N F K K D |
| AAG CAG GAA CAG GAG GAG ATG GTT GAC TAC GGC TTT GGA GCG ATC AGC AGC GGA GCC 1380 | AAG CAG GAA CAG GAG GAG ATG GTT GAC TAC GGC TTT GGA GCG ATC AGC AGC GGA GCC 1380 |
| K Q E Q E E E M V D Y G F G A I S S G A | K Q E Q E E E M V D Y G F G A I S S G A |
| AAT TCG CCC TAT CTA CCC TTT GGG GCT GGT CGA CAT CCG TGT ATC GGA GAG CAG TTT GCG 1440 | AAT TCG CCC TAT CTA CCC TTT GGG GCT GGT CGA CAT CCG TGT ATC GGA GAG CAG TTT GCG 1440 |
| N S P Y L P F G A G R H R C I G E Q F A | N S P Y L P F G A G R H R C I G E Q F A |
| TAC ATC CAG TTG GCC GCT GGT GCT GCT GTC ATT AGG AAC TGC GAC CTC GAG CTC GTC 1500 | TAC ATC CAG TTG GCC GCT GGT GCT GCT GTC ATT AGG AAC TGC GAC CTC GAG CTC GTC 1500 |
| Y I Q L A A V A V A V I R N C D L E L V | Y I Q L A A V A V A V I R N C D L E L V |
| AGA AAG GAG TTC CCT CTA CCT GAT TAT ACC AGT ATG TTA GTT GGA CCC AGG AAA CCT ACA 1560 | AGA AAG GAG TTC CCT CTA CCT GAT TAT ACC AGT ATG TTA GTT GGA CCC AGG AAA CCT ACA 1560 |
| R K E F P L P D Y T T M L V G P R K P T | R K E F P L P D Y T T M L V G P R K P T |
| ACT GTG AAG TTT ACT AGA AAT TAA 1587 | ACT GTG AAG TTT ACT AGA AAT TAA 1587 |
| T V K F T R R N * | T V K F T R R N * |

Abbildung A21: Unterschiedliche Wildtypsequenzen des *CYP51* in Einsporisolen von *Phakopsora pachyrhizi*. Hierbei unterscheidet sich die WT1 (A) von der WT2 (B) Sequenz an vier Positionen in der Nukleotidsequenz, wobei an drei Positionen eine andere Aminosäure codiert wird.

Tabelle A24: Relative Expression des CYP51 der Einsporisolate von *Phakopsora pachyrhizi* nach Anwendung unterschiedlicher Demethylierungsinhibitoren im Detached Leaf Test. RNA wurde aus mit *P. pachyrhizi* infizierten Befallsstellen von unbehandelten und behandelten Blättern extrahiert und in cDNA transkribiert. Es wurden die infizierten Bereiche verwendet, die in den höchsten Konzentrationen vorhanden waren (0,3/1/3/10/30/100 mg/l) sowie die Befallsstellen aus den Kontrollen (0 mg/l). Die Wirkstoffe Prothioconazol, Tebuconazol, Epoxiconazol, Difenoconazol, Cyproconazol, Metconazol und Tetraconazol wurden appliziert. Zur Normalisierung wurde das Referenzgen α -Tubulin und als Referenzisolat wurde die unbehandelte Kontrolle jedes Einsporisolates verwendet. Die Ct-Werte wurden mit der Software qPCRsoft® bestimmt und die Berechnung der relativen Expression erfolgte durch die $\Delta\Delta$ Ct-Methode. Zusätzlich wurde der Standardfehler (SE) zwischen den Wiederholungen und die für die RNA-Extraktion verwendeten Konzentrationen gelistet.

| Isolat | Behandlung | Konzentration (mg/l) ^a | Expressionsunterschied zur unbehandelten Kontrolle (0 mg/l) | Standardfehler (SE) |
|-------------------------|----------------|-----------------------------------|---|---------------------|
| MS2-256/18 (Wildtyp) | Kontrolle | 0 | 1,0 | 0,0 |
| | Prothioconazol | 3 | 1,3 | 0,3 |
| | Tebuconazol | 3 | 1,1 | 0,2 |
| | Epoxiconazol | 1 | 0,9 | 0,0 |
| | Difenoconazol | 30 | 0,9 | 0,1 |
| | Cyproconazol | 1 | 1,0 | 0,1 |
| | Metconazol | 1 | 1,1 | 0,2 |
| | Tetraconazol | 3 | 1,1 | 0,1 |
| MS1-256/18P | Kontrolle | 0 | 1,0 | 0,0 |
| | Prothioconazol | 30 | 1,0 | 0,5 |
| | Tebuconazol | 10 | 0,6 | 0,3 |
| | Epoxiconazol | 100 | 0,6 | 0,0 |
| | Difenoconazol | 100 | 0,4 | 0,1 |
| | Cyproconazol | 30 | 0,6 | 0,1 |
| | Metconazol | 10 | 0,3 | 0,0 |
| | Tetraconazol | 100 | 0,3 | 0,0 |
| MS1-261/18 | Kontrolle | 0 | 1,0 | 0,0 |
| | Prothioconazol | 10 | 0,7 | 0,1 |

Anhang

| Isolat | Behandlung | Konzentration (mg/l) ^a | Expressionsunterschied zur unbehandelten Kontrolle (0 mg/l) | Standardfehler (SE) |
|-------------|----------------|-----------------------------------|---|---------------------|
| | Tebuconazol | 30 | 1,4 | 0,5 |
| | Epoxiconazol | 100 | 2,7 | 0,5 |
| | Difenoconazol | 100 | 0,9 | 0,2 |
| | Cyproconazol | 30 | 1,0 | 0,1 |
| | Metconazol | 10 | 0,9 | 0,1 |
| | Tetraconazol | 100 | 1,0 | 0,2 |
| MS2-261/18P | Kontrolle | 0 | 1,0 | 0,0 |
| | Prothioconazol | 30 | 0,8 | 0,0 |
| | Tebuconazol | 30 | 1,4 | 0,0 |
| | Epoxiconazol | 100 | 1,3 | 0,1 |
| | Difenoconazol | 100 | 1,1 | 0,1 |
| | Cyproconazol | 100 | 1,4 | 0,2 |
| | Metconazol | 100 | 1,8 | 0,0 |
| | Tetraconazol | 100 | 1,3 | 0,3 |
| MS3-261/18P | Kontrolle | 0 | 1,0 | 0,0 |
| | Prothioconazol | 30 | 0,8 | 0,0 |
| | Tebuconazol | 10 | 0,8 | 0,1 |
| | Epoxiconazol | 100 | 0,9 | 0,1 |
| | Difenoconazol | 100 | 0,9 | 0,0 |
| | Cyproconazol | 100 | 0,5 | 0,4 |
| | Metconazol | 30 | 1,0 | 0,5 |
| | Tetraconazol | 100 | 1,0 | 0,0 |
| MS5-259/18P | Kontrolle | 0 | 1,0 | 0,0 |
| | Prothioconazol | 10 | 0,9 | 0,1 |

Anhang

| Isolat | Behandlung | Konzentration (mg/l) ^a | Expressions- unterschied zur unbehandelten Kontrolle (0 mg/l) | Standardfehler (SE) |
|-------------|----------------|--------------------------------------|---|------------------------|
| | Tebuconazol | 100 | 2,1 | 0,3 |
| | Epoxiconazol | 30 | 1,3 | 0,3 |
| | Difenoconazol | 100 | 1,2 | 0,1 |
| | Cyproconazol | 10 | 1,4 | 0,2 |
| | Metconazol | 100 | 2,4 | 0,1 |
| | Tetraconazol | 30 | 1,0 | 0,0 |
| MS1-259/18 | Kontrolle | 0 | 1,0 | 0,0 |
| | Prothioconazol | 10 | 1,1 | 0,3 |
| | Tebuconazol | 100 | 1,2 | 0,3 |
| | Epoxiconazol | 30 | 1,2 | 0,1 |
| | Difenoconazol | 100 | 0,8 | 0,1 |
| | Cyproconazol | 30 | 0,7 | 0,0 |
| | Metconazol | 100 | 0,7 | 0,1 |
| | Tetraconazol | 30 | 1,1 | 0,3 |
| MS3-259/18P | Kontrolle | 0 | 1,0 | 0,0 |
| | Prothioconazol | 10 | 0,8 | 0,0 |
| | Tebuconazol | 100 | 0,9 | 0,1 |
| | Epoxiconazol | 30 | 0,5 | 0,1 |
| | Difenoconazol | 100 | 0,7 | 0,1 |
| | Cyproconazol | 30 | 0,6 | 0,1 |
| | Metconazol | 100 | 0,7 | 0,1 |
| | Tetraconazol | 100 | 0,8 | 0,1 |
| MS4-259/18P | Kontrolle | 0 | 1,0 | 0,0 |
| | Prothioconazol | 30 | 0,8 | 0,3 |

| Isolat | Behandlung | Konzentration (mg/l) ^a | Expressionsunterschied zur unbehandelten Kontrolle (0 mg/l) | Standardfehler (SE) |
|--------|---------------|-----------------------------------|---|---------------------|
| | Tebuconazol | 100 | 0,7 | 0,3 |
| | Epoxiconazol | 30 | 0,8 | 0,3 |
| | Difenoconazol | 100 | 1,0 | 0,3 |
| | Cyproconazol | 30 | 0,7 | 0,1 |
| | Metconazol | 100 | 0,8 | 0,2 |
| | Tetraconazol | 100 | 0,9 | 0,1 |

^a Unterschiedliche Konzentrationen je nach Wirksamkeit des Wirkstoffs. Für die Analyse wurde die RNA aus den infizierten Bereichen isoliert, die in den höchsten Konzentrationen vorhanden waren (0,3/1/3/10/30/100 mg/l). Ebenfalls wurde als Referenz die RNA aus den Befallsstellen der unbehandelten Kontrollen (0 mg/l) extrahiert.

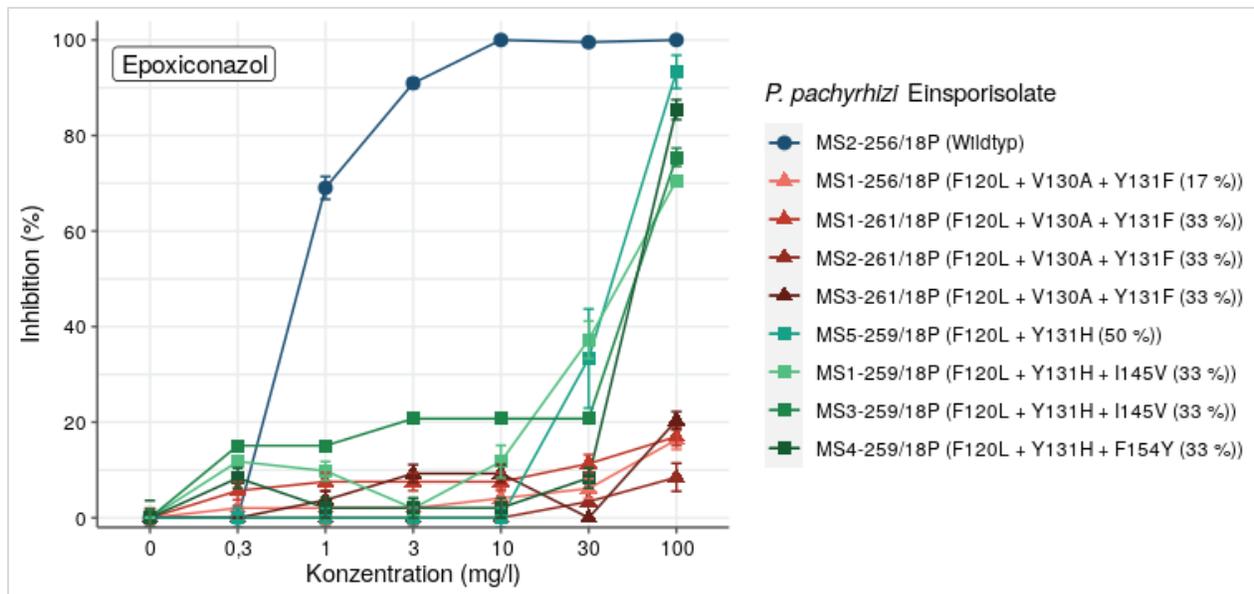


Abbildung A22: Vergleich der Inhibitionskurven der Einsporisolate von *Phakopsora pachyrhizi* durch Epoxiconazol. Es ist die Inhibition (%) in sieben Konzentrationen (mg/l) für neun Einsporisolate aufgeführt. Jedes Einsporisolat wurde mit einer spezifischen Farbe gekennzeichnet und zusätzlich wurden Farbbereiche und Symbole verwendet, welche eine Klassifizierung der *CYP51*-Haplotypen ermöglichen (Wildtyp = Kreis (Blau), F120L + V130A + Y131F = Dreieck (Rottöne), F120L + Y131H (+ I145V/F154Y) = Viereck (Grüntöne)). Des Weiteren ist der Legende der jeweilige Mutationsanteil (%) innerhalb eines jeweiligen Einsporisolates zu entnehmen. Die Grafik wurde in RStudio erstellt und neben der Inhibition ist der Standardfehler (SE) in Form von Fehlerbalken dargestellt.

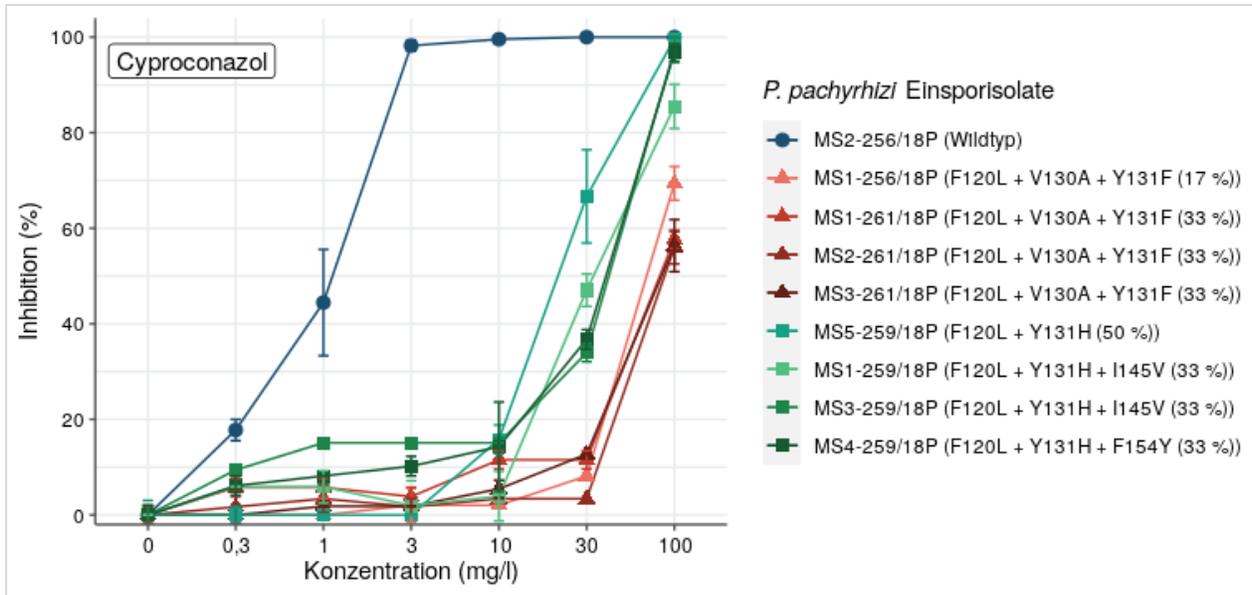


Abbildung A23: Vergleich der Inhibitionskurven der Einsporisolate von *Phakopsora pachyrhizi* durch Cyproconazol. Es ist die Inhibition (%) in sieben Konzentrationen (mg/l) für neun Einsporisolate aufgeführt. Jedes Einsporisolat wurde mit einer spezifischen Farbe gekennzeichnet und zusätzlich wurden Farbbereiche und Symbole verwendet, welche eine Klassifizierung der *CYP51*-Haplotypen ermöglichen (Wildtyp = Kreis (Blau), F120L + V130A + Y131F = Dreieck (Rottöne), F120L + Y131H (+ I145V/F154Y) = Viereck (Grüntöne)). Des Weiteren ist der Legende der jeweilige Mutationsanteil (%) innerhalb eines jeweiligen Einsporisolates zu entnehmen. Die Grafik wurde in RStudio erstellt und neben der Inhibition ist der Standardfehler (SE) in Form von Fehlerbalken dargestellt.

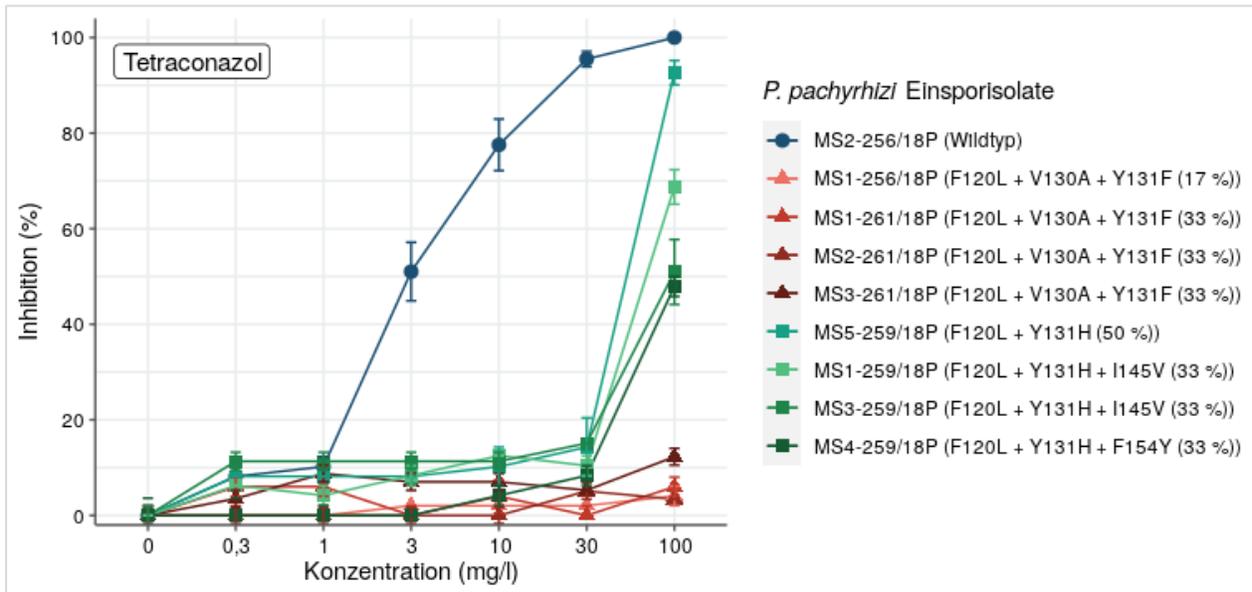


Abbildung A24: Vergleich der Inhibitionskurven der Einsporisolate von *Phakopsora pachyrhizi* durch Tetraconazol. Es ist die Inhibition (%) in sieben Konzentrationen (mg/l) für neun Einsporisolate aufgeführt. Jedes Einsporisolat wurde mit einer spezifischen Farbe gekennzeichnet und zusätzlich wurden Farbbereiche und Symbole verwendet, welche eine Klassifizierung der Haplotypen ermöglichen (Wildtyp =

Kreis (Blau), F120L + V130A + Y131F = Dreieck (Rottöne), F120L + Y131H (+ I145V/F154Y) = Viereck (Grüntöne)). Des Weiteren ist der Legende der jeweilige Mutationsanteil (%) innerhalb eines jeweiligen Einsporisolates zu entnehmen. Die Grafik wurde in RStudio erstellt und neben der Inhibition ist der Standardfehler (SE) in Form von Fehlerbalken dargestellt.

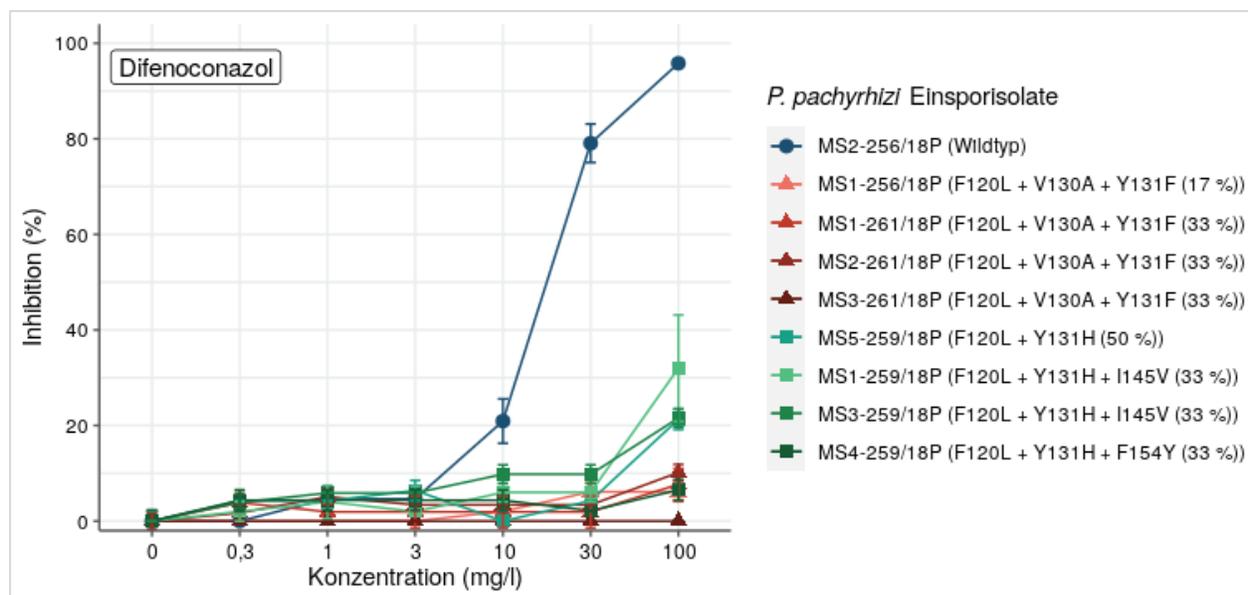


Abbildung A25: Vergleich der Inhibitionskurven der Einsporisolate von *Phakopsora pachyrhizi* durch Difenconazol. Es ist die Inhibition (%) in sieben Konzentrationen (mg/l) für neun Einsporisolate aufgeführt. Jedes Einsporisolat wurde mit einer spezifischen Farbe gekennzeichnet und zusätzlich wurden Farbbereiche und Symbole verwendet, welche eine Klassifizierung der *CYP51*-Haplotypen ermöglichen (Wildtyp = Kreis (Blau), F120L + V130A + Y131F = Dreieck (Rottöne), F120L + Y131H (+ I145V/F154Y) = Viereck (Grüntöne)). Des Weiteren ist der Legende der jeweilige Mutationsanteil (%) innerhalb eines jeweiligen Einsporisolates zu entnehmen. Die Grafik wurde in RStudio erstellt und neben der Inhibition ist der Standardfehler (SE) in Form von Fehlerbalken dargestellt.

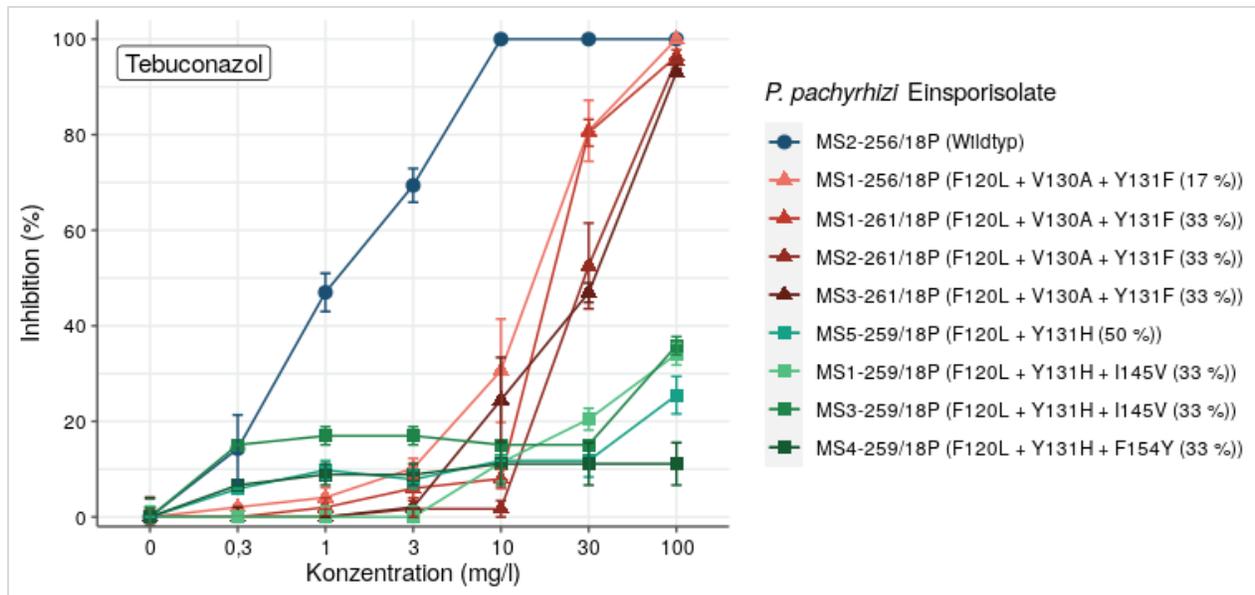


Abbildung A26: Vergleich der Inhibitionskurven der Einsporisolate von *Phakopsora pachyrhizi* durch Tebuconazol. Es ist die Inhibition (%) in sieben Konzentrationen (mg/l) für neun Einsporisolate aufgeführt. Jedes Einsporisolat wurde mit einer spezifischen Farbe gekennzeichnet und zusätzlich wurden Farbbereiche und Symbole verwendet, welche eine Klassifizierung der *CYP51*-Haplotypen ermöglichen (Wildtyp = Kreis (Blau), F120L + V130A + Y131F = Dreieck (Rottöne), F120L + Y131H (+ I145V/F154Y) = Viereck (Grüntöne)). Des Weiteren ist der Legende der jeweilige Mutationsanteil (%) innerhalb eines jeweiligen Einsporisolates zu entnehmen. Die Grafik wurde in RStudio erstellt und neben der Inhibition ist der Standardfehler (SE) in Form von Fehlerbalken dargestellt.

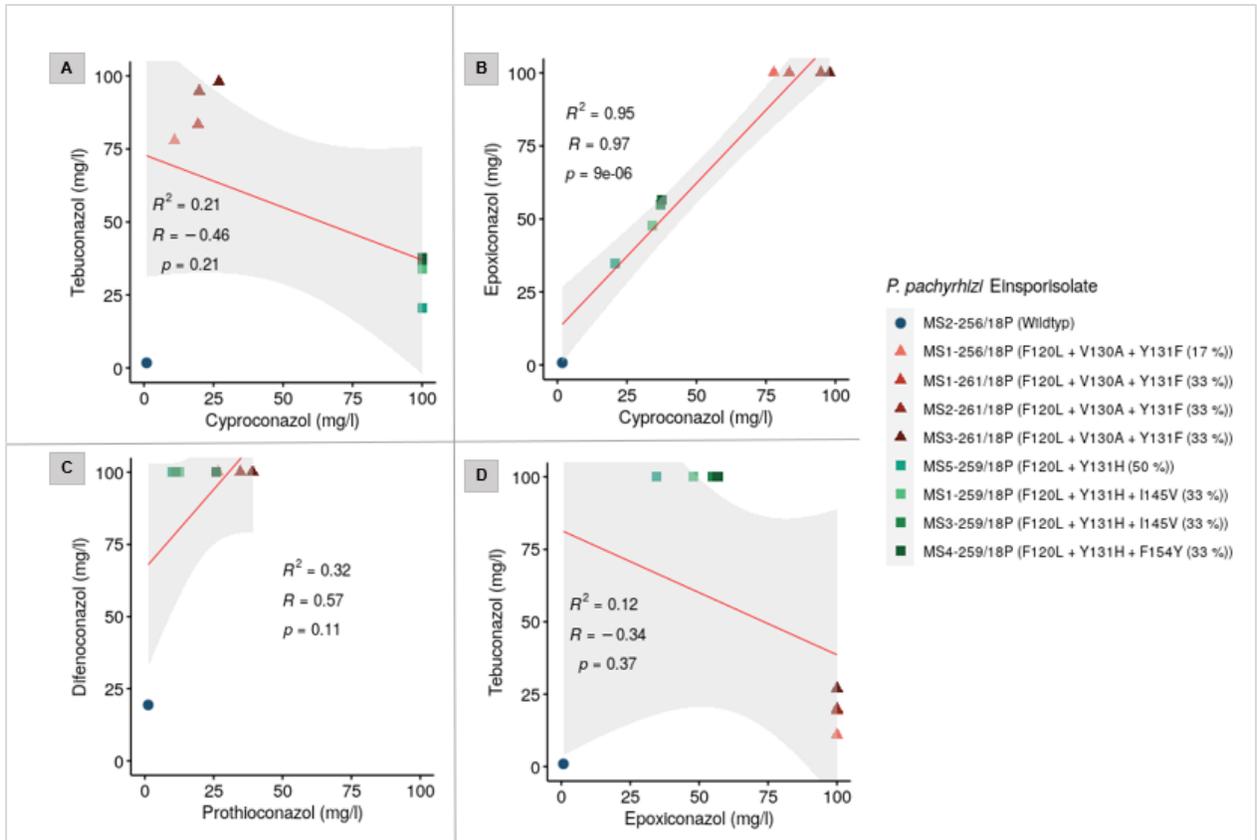


Abbildung A27: Korrelation der ED₅₀-Werte für Tebuconazol und Cyproconazol (A), Epoxiconazol und Cyproconazol (B), Difenoconazol und Prothioconazol (C) ebenso wie für Tebuconazol und Epoxiconazol (D) bei Einsporisolaten von *Phakopsora pachyrhizi*. Die ED₅₀-Werte wurden zur Bestimmung der linearen Regression ebenso wie für die Berechnung von (R²) verwendet. Jedes der Einsporisolate ist mit einer spezifischen Farbe gekennzeichnet und zusätzlich wurden Farbtöne und Symbole verwendet, welche die Klassifizierung der CYP51-Haplotypen ermöglichen (Wildtyp = Kreis (Blau), F120L + V130A + Y131F = Dreieck (Rottöne), F120L + Y131H (+ I145V/F154Y) = Viereck (Grüntöne)). Des Weiteren ist der Legende der jeweilige Mutationsanteil (%) innerhalb eines Einsporisolates zu entnehmen.

Danksagung

Zunächst möchte ich mich herzlich bei PD Dr. Ulrike Steiner für meine Betreuung der letzten Jahre bedanken. Mit Ihrer fachkundigen und freundlichen Beratung hat Sie mir ermöglicht, mich während meiner Masterarbeit und Promotion fachlich weiterzuentwickeln.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Gerd Stammler, der mir das spannende Thema und die Möglichkeit bot, meine Doktorarbeit innerhalb der Fungizidresistenzforschung der BASF SE durchzuführen. Danke Gerd, für die stets kompetente und zielführende Unterstützung und für das in mich gesetzte Vertrauen. Danke, dass ich Teil deines engagierten und freundlichen Teams sein durfte und meine Forschungen intern und extern präsentieren konnte.

Bei Prof. Dr. Gabriel Schaaf und Prof. Dr. Ralf Vögele möchte ich mich für die Übernahme des Zweit- und Drittgutachtens bedanken. Des Weiteren gilt mein Dank PD Dr. Erich-Christian Oerke für die Übernahme der Funktion des fachnahen Mitglieds sowie Prof. Dr. Dr. Helga Sauerwein für die Übernahme des Vorsitzes im Prüfungsausschuss.

Vielen Dank an Dr. Ulf Groeger und Dr. Karl-Heinz Lorenz für die Unterstützung während meiner Zeit bei der BASF sowie für die Möglichkeit an zahlreichen Meetings und Tagungen teilzunehmen, um meine Forschungsergebnisse präsentieren zu dürfen.

Im besonderen Maße möchte ich mich beim kompletten Laborteam bedanken. Danke an Angi, Birgit, Gabi, Xenia, Mascha, Kerstin, Caro, Margit und Beate, dass ihr zu jeder Zeit eine freundliche und motivierte Arbeitsatmosphäre geschaffen habt und stets ein offenes Ohr für Fragen hattet. Ganz besonders möchte ich mich auch bei meiner Kollegin Vera bedanken. Danke, dass du von Beginn an eine so großartige Zimmerkollegin warst und mich immer bei jeglichen Angelegenheiten unterstützt hast. Vielen Dank an Dr. Iain Proctor für die Hilfe bei meinen statistischen Fragen sowie an Dr. Ian Craig für die Unterstützung bei der Erstellung der Proteinmodelle. Weiterhin möchte ich ein Dank an das ganze Gewächshausteam sowie dem Team der Nährbodenküche aussprechen. Danke an alle Kollegen der Fungizidabteilung der BASF, die durch mentale und fachliche Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Meiner Familie möchte ich meinen größten Dank aussprechen. Insbesondere meinen Eltern, die mir meinen Werdegang ermöglicht und immer an mich geglaubt haben. Danke auch an meinen Partner Maik, der mich meine gesamte akademische Laufbahn unterstützt hat und mir während meiner Doktorarbeit stets den benötigten Rückhalt gab. Danke, dass ihr immer für mich da seid und eure ermutigenden Worte mir jederzeit dabei helfen meine Ziele weiter zu verfolgen.