

Schuster, C.¹; Nowak, A.¹; Marx, P.²; Gärber, U.²; Konstantinidou-Doltsinis, S.³; Seddon, B.⁴; Schmitt, A.¹
 Julius Kühn-Institut, ¹Institut für Biologischen Pflanzenschutz, Darmstadt; ²Institut für Pflanzenschutz in Gartenbau und Forst, Kleinmachnow; ³NAGREF, Plant Protection Institute of Patras, Griechenland; ⁴University of Aberdeen, Großbritannien

Biologische Bekämpfung des Falschen Mehltaus an der Gurke (*Pseudoperonospora cubensis*) im Praxisversuch

Biological control of downy mildew (*Pseudoperonospora cubensis*) of cucumbers in commercial trials

Zusammenfassung

Der Falsche Mehltau an Gurken (*Pseudoperonospora cubensis*) ist eine der bedeutendsten Krankheiten im ökologischen Gemüseanbau. Im Rahmen eines Projektes im Bundesprogramm Ökologischer Landbau wurden im Jahr 2009 weiterführende Praxisversuche im Folien- und Glasgewächshaus, sowie im Freiland zur Untersuchung der Wirksamkeit zweier Pflanzenextrakte aus Salbei (*Salvia officinalis*) und Süßholz (*Glycyrrhiza glabra*), sowie eines Bakterienpräparates (*Aneurinibacillus migulanus*) durchgeführt. Als Vergleichspräparat wurde das Pflanzenstärkungsmittel ElotVis genutzt. In den Versuchen unter Glas und Folie zeigte sich, dass eine Anwendung der Pflanzenextrakte eine signifikante Befallsverminderung an den Pflanzen hervorrief, welche stärker war, als die nach Behandlung mit ElotVis. Das Bakterienpräparat führte ebenfalls zu einer signifikanten, mit ElotVis vergleichbaren Wirkung. Eine Anwendung im Freiland bewirkte bei allen Präparaten eine Verzögerung des Befalls an den Pflanzen, wobei die Anwendung des Extraktes aus *G. glabra* zum besten Ergebnis führte. Der Extrakt aus *S. officinalis* und das Bakterienpräparat waren etwas weniger effektiv, aber genauso wirksam wie ElotVis.

Stichwörter: Ökologischer Gurkenanbau, biologischer Pflanzenschutz, Pflanzenextrakte, antagonistische Mikroorganismen

Abstract

Downy mildew on cucumber plants (*Pseudoperonospora cubensis*) plays an important role in organic cucumber production. In 2009 within the framework of a project funded by the "Bundesprogramm Ökologischer Landbau" commercial trials in green houses and under open field conditions were conducted. In these trials the effectiveness of two plant extracts, from sage (*Salvia officinalis*) and liquorice (*Glycyrrhiza glabra*), as well as cultures of a bacterium (*Aneurinibacillus migulanus*) was investigated. For comparison the plant strengthener ElotVis was used. In trials in the green house the application of the plant extracts led to a significant decrease of disease severity, which was stronger than that of ElotVis. The application of the bacterial preparation also gave significant reduction similar to those after use of ElotVis. Under open field conditions a retardation of the disease progress could be seen for all treatments. Here the application of the extract of *G. glabra* showed the best results. The extract from *S. officinalis* and the bacteria were a bit less effective but comparable to ElotVis.

Keywords: Organic cucumber production, biological control, plant extracts, antagonistic microorganisms

Serfling, Albrecht; Ordon, Frank

Julius Kühn Institut, Institut für Resistenzforschung und Stresstoleranz Quedlinburg

Untersuchungen zur Adaptation pilzlicher Pathogene an Azolwirkstoffe

Analyses of adaptation of fungal pathogens to azole fungicides

Zusammenfassung

Der Einsatz von Einzelpräparaten auf Basis von Azolen findet im Agrarbereich Anwendung gegen ein breites Spektrum pilzlicher Pathogene. Zu diesen zählt auch *Fusarium culmorum*. Die Bekämpfung erfolgt gezielt oder bei gleichzeitiger Behandlung anderer Erreger durch Azolwirkstoffe wie Prochloraz, Prothioconazol, Metconazol, Tebuconazol, Flusilazol, Propiconazol und weiteren. Dabei besteht die Gefahr der Ausbildung von Resistenzen. In unseren Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass *Fusarium culmorum* nach kurzer Zeit an hohe Dosen des Fungizides Tebuconazol adaptiert werden kann und danach eine quantitative Kreuzresistenz gegen alle untersuchten Azolfungizide entwickelt. Dies lässt sich an Hand von Assays auf Agarplatten mit unterschiedlichen Azolkonzentrationen signifikant nachweisen und konnte durch mikroskopische Aufnahmen bestätigt werden. In diesen wurde beobachtet, dass es unter Einfluss von Tebuconazol aber auch von Prochloraz zur Veränderung des Hyphenwachstums kommt, die sich durch Anschwellen der Hyphenspitzen ausprägt. In Vitalfärbungen mit Fluoreszeindiazetat konnte die geringere Empfindlichkeit qualitativ nachgewiesen werden. Da *F. culmorum* humanpathogen ist, besteht durch quantitative Kreuzresistenz die Gefahr, dass im medizinischen Bereich Antimykotika auf Azolbasis ebenfalls eingeschränkt wirken.

Stichwörter: Azole, Fungizidresistenz, *Fusarium culmorum*

Abstract

Azole fungicides are used against a broad spectrum of fungal pathogens in agriculture. Among others, these treatments comprise direct or indirect application of Prochloraz, Prothioconazole, Metconazole, Tebuconazole, Flusilazole, Propiconazole and other azole agents on *Fusarium culmorum*. These treatments are related to the occurrence of resistance against azole fungicides. In our investigations we observed adaptation of *Fusarium culmorum* to high doses of Tebuconazole and detected a quantitative cross resistance to all determined azole compounds. In agar plate assays colony diameters were measured microscopically and significant differences between the tebuconazole adapted and non adapted *F. culmorum* strains were observed. Pictures after fluorescence staining with calcofluor white showed alterations in hyphal growth and swelled hyphal tips. Vital stains by fluoresceine diacetate showed semi quantitatively a lower sensitivity. *F. culmorum* is a human as well as plant pathogen that is treated in agriculture and in human medicine by azole single compound fungicides/ antimycotica. Hence, quantitative cross resistance leads to restricted effectiveness of azole fungicides against *Fusarium culmorum*.

Keywords: azole, fungicide resistance, *Fusarium culmorum*

Einleitung

Sowohl im Agrar- als auch im medizinischen Bereich werden zahlreiche Fungizide auf der Basis von Azolwirkstoffen angewendet, die zum Teil in Kombination aber auch als Solopräparate zur Verfügung stehen (<https://portal.bvl.bund.de/psm/jsp/>). Mit der intensiven Anwendung dieser Wirkstoffe kommt es zur Ausbildung von Resistenzen zahlreicher pilzlicher Pathogene im Agrarbereich. Beschrieben sind Resistenzen bei *Blumeria graminis* (Brown & Wolfe, 1991), *Tapesia yallundae* und *Tapesia acuformis* (Leroux & Gredt, 1997), *Mycosphaerella graminicola* (Stergiopoulos et al., 2003), *Fusarium spec.* (Maldonado et al., 2005; Yin et al., 2009).

Azole sind strukturell unterschiedlich aufgebaut und lassen sich chemisch in Triazole wie beispielsweise Metconazol, Prothioconazol, Tebuconazol, Flusilazol und Imidazole wie Prochloraz, einteilen (Merk & Mukhtar, 1989). Der Wirkmechanismus, die Hemmung der Sterolbiosynthese der Pilze, ist gleich, so dass Kreuzresistenzen auftreten, die insbesondere im medizinischen Bereich negative Auswirkungen auf Behandlungsmöglichkeiten von Mykosen haben (Yoshida & Aoyama, 1991; Yoshida, 1988; Müller et al., 2007). Punktmutationen des für das Protein *CYP51* (entsprechend *ERG11p*) kodierende *erg11* Gen führen zu qualitativem Wirkverlust von Azolwirkstoffen und sind im Agrarbereich (Cools et al., 2006) und aus der Medizin beschrieben (Coste et al., 2007; Akins, 2005). Weitere resistenzauslösende Mechanismen wie die Überexpression des *erg11* Gens (Heilmann et al., 2009), die Mutation weiterer Gene der Ergosterol-biosynthese (Ghannoum & Rice, 1999) und die zusätzliche Bildung und Aktivität von Efflux-Transport-proteinen (Cannon et al., 2009) können ebenfalls Resistenzen bedingen.

Fusarium culmorum ist als toxinbildendes Pathogen in Getreide von großer Bedeutung (Edwards, 2009; Miller, 2002) aber auch in der Humanmedizin relevant (Nagano et al., 2009). Die Bekämpfung von *Fusarium culmorum* erfolgt mit Azolen wie Tebuconazol (Kang et al., 2001; Gareis et al., 2001) in Getreide und mit Voriconazol, Fluconazol, Itraconazol und anderen in der Medizin (Bueno et al., 2009). Auch von *Tapesia yallundae* sind mit Azolwirkstoffen nur schwer bekämpfbare Isolate bekannt, die sich durch Selektion nach massivem Einsatz dieser Fungizide durchsetzten (Albertini et al., 2003). Unklar ist bisher, wie sich eine Behandlung mit nicht lethalen Dosen auf die weitere Empfindlichkeit von Erregern wie *Fusarium culmorum* auswirken.

Material und Methoden

Alle verwendeten Fungizide und Farbstoffe wurden, wenn nicht anders angegeben, über Sigma Aldrich Chemie (Taufkirchen) bezogen, für Nährmedien benötigte Chemikalien über die Firma Carl Roth (Karlsruhe).

Kultivierung und Adaptation von *Fusarium culmorum*: Das verwendete *Fusarium culmorum* Isolat Fc46 ist ein Einzelsporisolat, das aus einer Probe der Universität Wageningen, Centre for Plant Breeding Research (C. H. A. Snijder, 1987) entnommen wurde. Es war seit der Entnahme aus dem Feld keiner Fungizidbehandlung ausgesetzt. Die Kultivierung erfolgte auf Kartoffelglukoseagar. Für die Adaptation von *Fusarium culmorum* wurde Kompletmedium verwendet.

Zunächst wurden aus den Kolonien auf Agarplatten mit einem Korkbohrer (4,5 mm Durchmesser) runde mit Myzel vollständig bedeckte Stücke entnommen und mit der Myzelseite auf mit Fungizid behandelte Platten aufgetragen. Bei einer maximalen Tebuconazolkonzentration, bei der Koloniewachstum auf den Platten feststellbar war, wurde das *F. culmorum* Isolat 30 d bei 21 °C unter Schwarzlicht inkubiert, um so eine Adaptation an Tebuconazol herbeizuführen. Als Kontrolle wurde *F. culmorum* unter entsprechenden Bedingungen ohne Fungizid inkubiert.

Durchführung des Agarplattenassays: Nach dem Adaptationsversuch gegen Tebuconazol wurden die unter Fungizidstress wachsende Kultur und eine zeitgleich ohne Fungizid wachsende Kultur Tebuconazol und weiteren Azolfungiziden ausgesetzt. Der Kolonieradius der Kulturen wurde 6 Tage nach dem Aufbringen auf Agarplatten mit unterschiedlichen Fungizidkonzentrationen gemessen. Diese umfassten 0; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 50 und 100 mg l⁻¹. Für Färbungen wurden diese Konzentrationen in Flüssigmedium angewendet.

Alle Kulturen wurden adaptiert und nicht adaptiert bei jeder Konzentration dreifach wiederholt auf Platten aufgebracht oder bei Raumtemperatur in Flüssigkultur inkubiert.

Formulierung der Fungizide, Farbstofflösungen und des Nährmediums: Für die Messungen wurden Tebuconazol, Prochloraz, Prothioconazol, Metconazol, Flusilazol und Propiconazol verwendet. Um die vollständige Löslichkeit der Fungizide sicherzustellen, wurden die Wirkstoffe in eine Formulierung aus 12 % (v/v) Cremophor EL und Wasser gegeben. Die entstandene Stammlösung mit 1 g l^{-1} Wirkstoff wurde daraufhin durch einen Filter mit einer Porengröße von $0,22 \text{ }\mu\text{m}$ (Macherey-Nagel, Düren) steril filtriert und in 50 ml Röhrchen überführt. Die Aufbewahrung der Lösung erfolgte bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ um eine Degradation der Wirksamkeit zu vermeiden. Kompletmedium bestehend aus 10 g Glukose, 1 g Hefeextrakt, 1 g Caseinhydrolysat, 10 ml Stammlösung A ($100 \text{ g l}^{-1} \text{ CaNO}_2$ in H_2O) und 10 ml Stammlösung B ($20 \text{ g l}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$, $25 \text{ g l}^{-1} \text{ MgSO}_4$, $5,4 \text{ g l}^{-1} \text{ NaCl}$ in H_2O) wurde mit 1,5% w/v Agar versetzt, mit H_2O auf 900 ml aufgefüllt und 20 min bei $120 \text{ }^\circ\text{C}$ und einem Druck von 2 bar autoklaviert.

Das flüssige Nährmedium wurde aliquotiert, so dass 90 ml Nährlösung für jede Konzentrationsstufe zur Verfügung standen und mit der Wirkstofflösung durch einen Magnetrührer vermischt. Für die höchste Konzentration wurden 10 ml der Wirkstoff- Stammlösung hinzugegeben. Für niedrigere Konzentrationen wurde der entsprechend geringere Anteil der Wirkstofflösung, der danach mit der Formulierung aus 12 % Cremophor EL auf 10 ml aufgefüllt wurde, verwendet, um eine konstante Konzentration des Cremophors bei allen Fungizidkonzentrationen zu erreichen. Calcofluor white wurde als 0,2%ige Lösung in PBS (*Phosphate balanced salt solution*) gelöst und lichtgeschützt bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt.

Färbung: Für Färbungen wurde Kompletmedium ohne Agar verwendet. Alle obengenannten Konzentrationen, Kulturen und Wiederholungen wurden in 50 ml Flüssigkultur ebenfalls 6 Tage in einem Schüttler bei $21 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert und das entstandene Myzel danach für Färbungen mit Calcofluor white und Fluoresceindiacetat verwendet.

Zur Färbung mit Calcofluor white wurde mit einer Pinzette ein etwa $2 \text{ mm} \times 2 \text{ mm}$ großes Stück des gebildeten Myzels aus der Flüssigkultur entnommen, in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und in je 1 ml der folgenden Lösungen gegeben. Zunächst erfolgte eine Inkubation in einer Mischung aus Lactophenol/ Ethanol (1/2 v/v) für 2 h. Die Proben wurden nach 5minütigem Sieden jeweils 15 min in Ethanol/ H_2O (1/2 v/v), 0,05M NaOH und danach sterilem Wasser geschüttelt und danach 2 h in 0,1M Tris-HCl inkubiert. Die Färbung erfolgte für 5 min in der beschriebenen Calcofluor white Lösung. Nach viermaligem Spülen und 20minütiger Inkubationszeit in sterilem H_2O wurden die Proben auf einem Objektträger in Glycerin eingebettet und für mikroskopische Beobachtungen verwendet.

Mikroskopie: Für mikroskopische Untersuchungen wurde ein Axioscope 50 Epifluoreszenzmikroskop (Carl Zeiss GmbH, Jena) genutzt. Bilder wurden mit einer Axiocam MR colour camera (Carl Zeiss GmbH, Jena) aufgenommen und mit der Software MR Grab ver. 1.0.0.4 (Carl Zeiss GmbH, Jena) digital bearbeitet. Für die Beobachtung Calcofluor white gefärbter Proben wurde eine stabilisierte 100 W Quecksilberhochdrucklampe HBO 100 (Osram GmbH, München) mit Filtersatz 5 (Carl Zeiss GmbH) mit einer Anregung von 365 nm dem Strahlteiler FT395 und einer Emission von LP 420 genutzt.

Mathematische Berechnungen und Statistik: ED_{50} - und ED_{90} (ED_x = effektive Dosis zur Hemmung des Wachstums von x %) Werte wurden durch logit Transformation der aus der Messung des Koloniedurchmessers erhaltenen Werte nach Reimann und Deising (2005) und Kunz (1997) berechnet. Die für jede der drei Wiederholungen der Versuche berechneten Werte wurden varianzanalytisch ausgewertet und bei einem signifikanten Einfluss der Adaptation auf die Varianz der Tukey-Test (α , 0,05) zum Vergleich der Mittelwerte angewandt. Signifikante Unterschiede auf Grund der Grenzdifferenz werden in Diagrammen durch Sternchen dargestellt.

Ergebnisse

Fusarium culmorum ließ sich schrittweise an Tebuconazol adaptieren. Nach einer Konzentrationsreihe konnte zunächst Wachstum von *F. culmorum* nach 6 d auf einer Konzentration von 1 mg l^{-1} Tebuconazol beobachtet werden (Abbildung 1a bis f). Wurden die Kulturen für 30 d unter Fungizidstress von 10 mg l^{-1} inkubiert, konnte Wachstum bis zu 50 mg l^{-1} Tebuconazol beobachtet werden. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 30 d bei dieser Konzentration konnte ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Toleranz gegenüber Tebuconazol im Vergleich zur ohne Fungizidstress wachsenden Kontrolle beobachtet werden (Abbildung 1 g bis l, Tabelle 1).

Die aus der Logit Transformation errechnete ED_{50} für die nicht adaptierte Kultur betrug $0,399 \pm 0,013 \text{ mg l}^{-1}$, für die tebuconazoladaptierte $0,522 \pm 0,096 \text{ mg l}^{-1}$. Für die ED_{90} wurde eine Tebuconazolkonzentration von $8,40 \pm 4,690$ (nicht adaptiert) und $47,17 \pm 4,690$ (tebuconazoladaptiert) festgestellt.

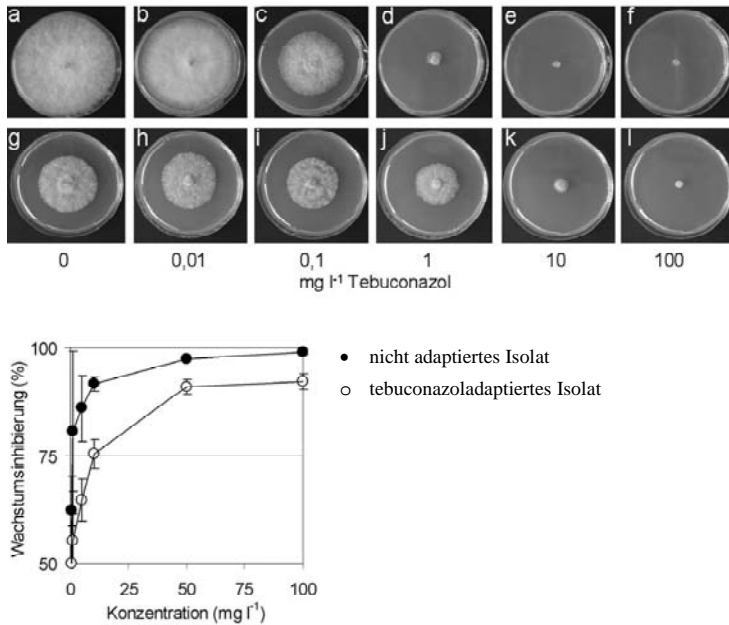


Abb. 1 Darstellung der an Tebuconazol nicht adaptierten Kultur (a bis f und m) und der an Tebuconazol adaptierten Kultur (g bis l und m). Mittelwerte der prozentualen Wachstumsinhibierung sind im Diagramm dargestellt (m).

Tab. 1 ED₅₀ und ED₉₀ Werte von nicht an Tebuconazol adaptierten und Tebuconazoladaptierten *F. culmorum* Kolonieradien in Plattenassays. Sternchen (*) bezeichnen signifikante Unterschiede hinsichtlich der Kolonieradien, ermittelt durch Tukey-Testverfahren, $\alpha=0,05$.

	nicht tebuconazoladaptiert		tebuconazoladaptiert	
	ED ₅₀	ED ₉₀	ED ₅₀	ED ₉₀
Tebuconazol	0,399 ± 0,013	8,400 ± 3,440	0,520 ± 0,096 *	47,170 ± 4,690 *
Prochloraz	0,010 ± 0,001	0,159 ± 0,062	0,364 ± 0,098 *	24,000 ± 4,900 *
Metconazol	0,041 ± 0,008	0,098 ± 0,007	0,087 ± 0,009 *	0,460 ± 0,011 *
Propiconazol	0,140 ± 0,033	1,267 ± 0,388	0,281 ± 0,033 *	103,750 ± 1,624 *
Flusilazol	0,203 ± 0,034	2,099 ± 0,385	1,034 ± 0,414 *	84,637 ± 28,91 *

Die Untersuchung weiterer Azolwirkstoffe ergab besseres Wachstum der an Tebuconazol adaptierten Kultur im Vergleich mit der ohne Fungizidstress wachsenden gegenüber Prochloraz um den Faktor 36,4 (ED₅₀) und 150,9 (ED₉₀), Metconazol 2,2 (ED₅₀) und 4,7 (ED₉₀), Propiconazol 2,0 (ED₅₀) und 81,9 (ED₉₀), und Flusilazol 5,1 (ED₅₀) und 40,3 (ED₉₀). Die Veränderungen der ED₅₀ und ED₉₀ dieser Azolwirkstoffe nach Adaptation von *F. culmorum* an Tebuconazol sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Diese Daten wurden auch nach Assays in Flüssigkultur durch Fluoreszenzmikroskopie und Färbung mit Calcofluor white für Tebuconazol und Prochloraz bestätigt. Dabei ließen sich die Auswirkungen steigender Fungizidkonzentrationen auf die Morphologie pilzlicher Hyphen darstellen und die Bildung von Blasen am Hyphenende durch Beobachtung des Flächeninhaltes bestätigen. Dabei traten ebenfalls Unterschiede zwischen an tebuconazoladaptierten und nicht adaptierten Kulturen auf (Abbildung 2).

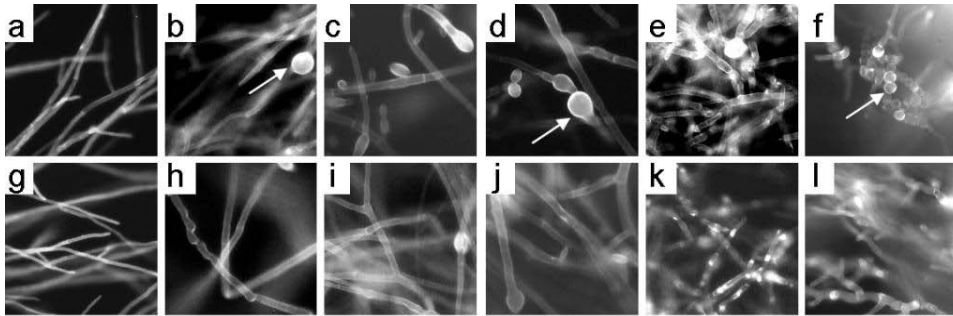


Abb. 2 Hyphenanomalien (Pfeil) in Abhängigkeit steigender Tebuconazol-konzentration bei der nicht adaptierten Kultur und bei der tebuconazoladaptierten Kultur

Diskussion

Fusarium culmorum als Erreger der Taubährigkeit ist insbesondere auf Grund der Toxinbildung von phytopathologischer Relevanz. Die Bekämpfung erfolgt mit Azolwirkstoffen wie Tebuconazol, Prochloraz, Metconazol, Prothioconazol und weiteren (BVL Pflanzenschutzmittelliste, 2009; Pirgozliev et al., 2003) die teilweise als Monopräparate eingesetzt werden. Zudem ist *F. culmorum* bei der Behandlung anderer Pathogene Azolwirkstoffen ausgesetzt. Azolresistente Isolate sind im Agrarbereich beschrieben und sind weder in Wachstum noch in der Bildung von Toxinen wie DON (Deoxinivalenol) eingeschränkt (D' Mello et al., 1998; Meier et al., 2000). Auch bei optimiertem Einsatz von Fungiziden in Feldversuchen kann keine vollständige Toxinfreiheit von Ernteprodukten gewährleistet werden (Matthies et al., 2000; Gareis & Ceynowa, 1994). Unsere Untersuchungen hinsichtlich der Azolsensitivität von *F. culmorum* zeigten, dass die Wirkung von Fungiziden auf Azolbasis eingeschränkt ist, wenn *F. culmorum* geringen Konzentrationen Tebuconazol ausgesetzt war. Quantitative Resistenz von *F. culmorum* gegen Azolwirkstoffe ist bisher nicht beschrieben, jedoch liegen vor allem aus dem medizinischen Bereich, in dem ebenfalls Azole als Monopräparate verwendet werden, Angaben über quantitative Wirkverluste vor (Morschhäuser et al., 2009; Torelli et al., 2008). In diesem Zusammenhang sind Transportproteine beschrieben, deren Gene unter Azolfungizidstress zusätzlicher Expression unterliegen. So konnten Liu et al. (2009) eine um das fünffache erhöhte Expression eines ABC Transporters (FGSG_09697) in *Fusarium graminearum* nach Einwirkung von Tebuconazol ermitteln. Als weitere Ursachen für die Ausbildung quantitativer Resistenz ist die Überexpression der dem Enzym 14-alpha-Demethylase zugrunde liegenden Gene (Heilmann et al., 2009; Akins 2005) und Mutationen dieser genannt (Xu et al., 2008; Coste et al., 2007). Die Ursachen der quantitativen Resistenz von *F. culmorum* in unseren Experimenten bleibt spekulativ, auf Grund des meist qualitativen Charakters der Azolresistenz nach Mutationen der 14-alpha-Demethylase ist Überexpression von Transportproteinen und Enzymen der Ergosterolbiosynthese zu vermuten. Die zahlreichen Mechanismen, die zu Resistenz führen und das gewaltige Vermehrungspotential pilzlicher Erreger sind Anlass, Alternativen wie beispielsweise fusariumresistente Weizensorten zu entwickeln und somit strategisch die Wirksamkeit insbesondere von im Agrarbereich und in der Medizin gemeinsam genutzten Wirkstoffen zu erhalten. Moderne Pflanzenzüchtung kann solche Alternativen bereits heute zur Verfügung stellen, so dass quantitativ resistente Sorten mit der Benotung 3, wobei 1 als vollständig resistent und 9 vollständig anfällig definiert ist, in der beschreibenden Sortenliste aufgeführt sind (<http://www.bundessortenamt.de>).

Danksagung: Dank gilt zuerst den Mitarbeitern, die das Projekt mit bearbeiteten: N. Pastor Käppner und J. Mangelsdorf. Für das Zurverfügungstellen des *F. culmorum* Isolates FC46 danken wir D. Kopahnke.

Literatur

- Akins, R.A., (2005). An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*. *Med Mycol.* **43** (4), 285-318.
- Albertini, C., Gredt, M., Leroux, P., (2003): Polymorphism of 14 α -demethylase gene (CYP51) in the cereal eyespot fungi *Tapesia acuformis* and *Tapesia yallundae*. *European J. Plant Pathol.* **109**, 117-128.
- Brown, J.K.M., Wolfe, W.S., (1991): Levels of resistance of *Erysiphe graminis* f. sp. to the systemic fungicide triadimenol. *Neth. J. Pl. Path.* **97**, 251-263.
- Bueno, J.G., Martinez, C., Zapata, B., Sanclemente, G., Gallego, M., Mesa, A.C., (2009): In vitro activity of fluconazole, itraconazole, voriconazole and terbinafine against fungi causing onychomycosis. *Clin. Exp. Dermatol.* Ahead of print.
- Cannon, R.D., Lamping, E., Holmes, A.R., Niimi, K., Baret, P.V., Keniya, M.V., Tanabe, K., Niimi, M., Goffeau, A., Monk, B.C., (2009): Efflux-mediated antifungal drug resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **22** (2), 291-321.
- Cools, H.J., Fraaije, B.A., Kim, S.H., Lucas J.A. (2006): Impact of changes in the target P450 CYP51 enzyme associated with altered triazole-sensitivity in fungal pathogens of cereal crops. *Biochem. Soc. Trans.* **34** (6), 1219-1222.

- Coste, A., Selmecki, A., Forche, A., Diogo, D., Bougnoux, M.E., d'Enfert, C., Berman, J., Sanglard, D., (2007): Genotypic evolution of azole resistance mechanisms in sequential *Candida albicans* isolates. *Eukaryot. Cell.* **6** (10),1889-1904.
- D'Mello, J.P.F., Macdonald, A.M.C., Dijkema, W. T. P., (1998): 3-Acetyl deoxynivalenol and esterase production in a fungicide insensitive strain of *Fusarium culmorum*. *Mycotoxin Res.* **14** (1), 9-18.
- Edwards, S.G., (2009): *Fusarium* mycotoxin content of UK organic and conventional wheat. *Food. Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* **26** (4), 496-506.
- Gareis, M., Ceynowa, J., (1994): Effect of the fungicide matador (tebuconazole/triadimenol) on mycotoxin production by *Fusarium culmorum*. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **198** (3), 244-248.
- Ghannoum, M.A., Rice, L.B., (1999): Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **12** (4), 501-517.
- Hans, F., Merk, M.D., and Hasan Mukhtar. P.D. (1989): Azole antifungals. *Clinics Dermat.* **7** (3), 121-127.
- Heilmann, C.J., Schneider, S., Barker, K.S., Rogers, P.D., Morschhäuser, J., (2009): An A643T mutation in the transcription factor Upc2p causes constitutive ERG11 upregulation and increased fluconazole resistance in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.* Ahead of print
- Kang, Z., Huang, L., Krieg, U., Mauler-Machnik, A., Buchenauer, H., (2001): Effects of tebuconazole on morphology, structure, cell wall components and trichothecene production of *Fusarium culmorum* in vitro. *Pest. Manag. Sci.* **57** (6), 491-500.
- Kunz, S., Deising, H., Mengden, K., (1997): Acquisition of resistance to sterol demethylation inhibitors by populations of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology.* **87**, 1272-1278.
- Leroux, P., Gredt, M., (1997): Evolution of fungicide resistance in the cereal eyespot fungi *Tapesia yelloundae* and *Tapesia acuformis* in France. *Pestic. Sci.* **51**, 321-327.
- Liu, X., Jiang, J., Shao, J., Yin, Y., Ma, Z., (2009): Gene transcription profiling of *Fusarium graminearum* treated with an azole fungicide tebuconazole. *Appl. Microbiol. Biotech.* Ahead of print
- Maldonado, M.C., Santa Runco, R., Navarro, A.R., (2005): Isolation, identification and antifungal susceptibility of lemon pathogenic and non pathogenic fungi. *Rev. Iberoam. Micol.* **22** (1), 57-59.
- Matthies, A., Flatter, A., Semar, M., Bleiholder, S., Oppitz, K., (2000): *Fusarium* in wheat: importance and toxin production in the field - possibilities and limits of fungicide treatments. *Mycotoxin Res.*, **16** (1), 6-10.
- Meier, A., Birzele, B., Oerke, E.C., Dehne, H.W., (2000): Impact of growth conditions on the occurrence of *Fusarium* spp. and the mycotoxin content of wheat *Mycotoxin Res.* **16** (1), 12-15.
- Miller J.D., (2002): Aspects of the ecology of *Fusarium* toxins in cereals. *Adv. Exp. Med. Biol.* **504**, 19-27.
- Morschhäuser, J., (2009): Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi. *Fungal Genet. Biol.* Ahead of print
- Müller, F.C., Staudigel, A., Salvenmoser, S., Tredup, A., Miltenberger, R., Herrmann, J.V., (2007): Cross-resistance to medical and agricultural azole drugs in yeasts from the oropharynx of human immunodeficiency virus patients and from environmental bavarian vine grapes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51** (8), 3014–3016.
- Nagano, Y., Elborn, J.S., Millar, B.C., Walker, J.M., Goldsmith, C.E., Rendall, J., Moore, J.E., (2009): Comparison of techniques to examine the diversity of fungi in adult patients with cystic fibrosis. *Med Mycol.* **11**, 1-12.
- Pirgozliev, S.R., Edwards, S.G., Hare, M.C. Jenkinson, P., (2003): Strategies for the control of *Fusarium* head blight in cereals. *European J. Plant Pathol.* **109** (7), 731-742.
- Reimann, S., Deising, H.B., (2005): Inhibition of efflux transporter-mediated fungicide resistance in *Pyrenophora tritici-repentis* by a derivative of 4'-hydroxyflavone and enhancement of fungicide activity. *Appl. Environ. Microbiol.* **71** (6), 3269-3275.
- Stergiopoulos, I., Van Nistelrooy, J.G., Kema, G.H., De Waard, M.A. 2003: Multiple mechanisms account for variation in base-line sensitivity to azole fungicides in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Manag Sci.* **59** (12), 1333-1343.
- Torelli, R., Posteraro, B., Ferrari, S., La Sorda, M., Fadda, G., Sanglard, D., Sanguinetti, M., (2008): The ATP-binding cassette transporter-encoding gene CgSNQ2 is contributing to the CgPDR1-dependent azole resistance of *Candida glabrata*. *Mol Microbiol.* **68** (1), 186-201.
- Xu, Y., Chen, L., Li, C., (2008): Susceptibility of clinical isolates of *Candida* species to fluconazole and detection of *Candida albicans* ERG11 mutations. *J. Antimicrob. Chemother.* **61** (4), 798-804.
- Yin, Y., Liu, X., Li, B., Ma, Z., (2009): Characterization of sterol demethylation inhibitor-resistant isolates of *Fusarium asiaticum* and *F. graminearum* collected from wheat in China. *Phytopathology.* **99** (5), 487-497.
- Yoshida, Y., Aoyama Y. (1991): Sterol 14 alpha-demethylase and its inhibition. *Biochem. Soc. Trans.* **19** (3), 778-782.
- Yoshida, Y. (1988): Cytochrome P450 of fungi: primary target for azole antifungal agents. *Curr Top Med Mycol.* **2**, 388-418.