

Received: 09.04.2025 / Accepted: 09.06.2025

KRÓTKI KOMUNIKAT

Analiza mutacji genu *CYP51* metodą wysokoprzepustowego sekwencjonowania (HTS) w populacji *Zymoseptoria tritici* z zachodniej Polski

Analysis of *CYP51* gene mutations in a *Zymoseptoria tritici* population from western Poland using high-throughput sequencing (HTS)

Katarzyna Pieczul^{1*}, Agnieszka Kiniec²

Streszczenie

Intensywne stosowanie triazoli do zwalczania *Zymoseptoria tritici* doprowadziło do obniżenia wrażliwości tego patogenu na fungicydy DMI. Głównym mechanizmem odporności na triazole są mutacje punktowe w genie *CYP51*, kodującym enzym 14 α -dimetylazę sterolu. Sekwencjonowanie NGS genu *CYP51* izolatów *Z. tritici* zbieranych na terenie Wielkopolski przeprowadzono w technologii PacBio RSII. W badaniu zidentyfikowano 40 mutacji z częstością powyżej 20%, z czego 12 prowadziło do substytucji aminokwasowych w białku 14 α -dimetylasy. Wśród nich mutacje L50S, D134G, V136A, S188N, A379G, I381V, Y461H i N513K były wcześniej opisywane, jako powiązane ze wzrostem odporności na triazole. Ponadto wykryto 22 mutacje synonimiczne, które nie wpływały na strukturę białka, ale świadczyły o dużej zmienności genetycznej populacji *Z. tritici*. Dodatkowo zidentyfikowano dwie delecje w intronach oraz złożoną delecję sześciu nukleotydów (CTATGG), która mogła modyfikować sekwencję białka.

Słowa kluczowe: septorioza paskowana liści pszenicy, mutacje w genie *CYP51*, sekwencjonowanie wysokoprzepustowe (HTS)

Abstract

The intensive use of triazoles in controlling *Zymoseptoria tritici* has led to a decrease in its sensitivity to DMI fungicides. The main mechanism of triazole resistance involves point mutations in the *CYP51* gene, which encodes the 14 α -demethylase enzyme. NGS sequencing of the *CYP51* gene in *Z. tritici* isolates collected in Wielkopolska was performed using PacBio RSII technology. The study identified 40 mutations with a frequency above 20%, of which 12 resulted in amino acid substitutions in the 14 α -demethylase protein. Among them, the L50S, D134G, V136A, S188N, A379G, I381V, Y461H, and N513K mutations were previously associated with increased triazole resistance. Additionally, 22 synonymous mutations were detected, which did not alter the protein structure but indicated high genetic variability within the *Z. tritici* population. Furthermore, two deletions in introns and a complex six-nucleotide deletion (CTATGG) were identified, potentially modifying the protein sequence.

Keywords: septoria tritici blotch of wheat, *CYP51* gene mutations, high-throughput sequencing (HTS)

¹Institut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy
ul. Władysława Węgorka 20, 60-318 Poznań

²Institut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy
Terenowa Stacja Doświadczalna w Toruniu
ul. Pigwowa 16, 87-100 Toruń

*corresponding author: k.pieczul@iorpib.poznan.pl

Wstęp / Introduction

Septorioza paskowana liści pszenicy wywoływana przez *Zymoseptoria tritici* jest jedną z najczęstszych i najbardziej destrukcyjnych chorób pszenżyta ozimego oraz pszenicy ozimej (Eyal 1999; Fones i Gurr 2015; Torriani i wsp. 2015). Prowadzi ona do przedwczesnego zamierania liści, co skutkuje zmniejszeniem masy tysiąca ziaren (MTZ) oraz znacznymi stratami w plonie. W sprzyjających warunkach pogodowych choroba może rozprzestrzeniać się gwałtownie, a w przypadku silnego porażenia upraw połączonego z brakiem ochrony chemicznej straty mogą sięgać nawet ponad 50% plonu (Jørgensen i wsp. 2014). Do kluczowych czynników sprzyjających epidemii należą: warunki pogodowe ułatwiające rozprzestrzenianie się patogenu, niewystarczająca ochrona chemiczna oraz nadmierne nawożenie azotem (Eyal 1999). Ze względu na wysokie ryzyko strat plonów, skuteczna ochrona upraw przed septoriozą paskowaną liści pszenicy wymaga intensywnego stosowania fungicydów (Eyal 1999; Kildea i wsp. 2023). W Polsce oraz innych krajach Unii Europejskiej septorioza paskowana liści pszenicy jest zwalczana przy użyciu fungicydów należących do różnych grup chemicznych. Od wielu lat najczęściej stosowanymi środkami w ochronie pszenicy pozostają triazole (DMI – demethylation inhibitors) (Wieczorek i wsp. 2015; Kildea i wsp. 2023; Vestergård i wsp. 2023). Mechanizm działania fungicydów DMI polega na hamowaniu enzymu 14 α -dimetylasy sterolu, który uczestniczy w syntezie ergosterolu – kluczowego składnika błony komórkowej grzybów. Zakłócenie tego szlaku metabolicznego prowadzi do nagromadzenia prekursorów ergosterolu (np. lanosterolu), co powoduje zmiany w strukturze błony komórkowej, wpływając na jej stabilność i płynność (Rosam i wsp. 2020).

Intensywne wykorzystanie triazoli w zwalczaniu septoriozy paskowanej liści pszenicy doprowadziło do zmniejszenia wrażliwości *Z. tritici* na tę grupę fungicydów (Cools i Fraaije 2013; Wieczorek i wsp. 2015; Birr i wsp. 2021; Kiiker i wsp. 2021; Jørgensen i wsp. 2022; Glaab i wsp. 2024; Oreiro i wsp. 2024). Spadek wrażliwości *Z. tritici* na DMI opiera się na kilku mechanizmach. Główną przyczyną odporności na triazole są mutacje punktowe w genie *CYP51*, kodującym enzym 14 α -dimetylazę sterolu. Do najczęściej opisywanych mutacji u *Z. tritici* należą te powodujące substytucje aminokwasów w sekwencji białka: L50S, D134G, V136A/C, S188N, A379G, I381V, Y461H/S, N513K, S524T oraz delecje i mutacje w regionie 459–461 (Stammler i wsp. 2008; Huf i wsp. 2018; Samils i wsp. 2021; Gutierrez Vazquez i wsp. 2022; Glaab i wsp. 2024). Dodatkowymi mechanizmami wzrostu odporności na triazole są nadekspresja genu *CYP51*, prowadząca do zwiększonej produkcji enzymu i tym samym zmniejszenia skuteczności fungicydów DMI poprzez zmniejszenie ich wewnątrzkomórkowej akumulacji (Cools i wsp. 2011; Glaab i wsp. 2024) oraz spadek stężenia substancji czynnej w komórkach wy-

nikający ze zwiększonej ekspresji białek transportowych, które aktywnie usuwają niepożądane związki na zewnątrz. W proces ten zaangażowane są przede wszystkim białka z rodziny ABC (ATP-binding cassette) oraz MFS (major facilitator superfamily) (Omrane i wsp. 2015, 2017).

Metody biologii molekularnej, takie jak PCR (polymerase chain reaction), RFLP (restriction fragment length polymorphism), czy sekwencjonowanie, od wielu lat odgrywają kluczową rolę w diagnostyce oporności grzybów na substancje czynne fungicydów. Rozwój technologii sekwencjonowania wysokoprzepustowego (HTS – high-throughput sequencing) stworzył dodatkowe możliwości monitorowania oporności grzybów na substancje czynne fungicydów. Dzięki technikom HTS możliwe jest bardziej precyzyjne śledzenie zmian genetycznych związanych ze wzrostem odporności na substancje czynne fungicydów w całych populacjach grzybów (Samils i wsp. 2021). Ich zastosowanie niejednokrotnie eliminuje konieczność czasochłonnnych analiz wzrostu patogenów na podłożach zawierających fungicydy. Ponadto pozwalają one na dokładne określenie mechanizmów genetycznych odpowiedzialnych za rozwój oporności u badanych izolatów, co ma kluczowe znaczenie dla skutecznej ochrony upraw i optymalizacji strategii ochrony roślin uprawnych za pomocą fungicydów.

Celem pracy było wykorzystanie sekwencjonowania HTS (PacBio) do identyfikacji mutacji w genie *CYP51*, które są związane ze wzrostem oporności *Z. tritici* na fungicydy DMI, a także analiza zmienności tego genu.

Materiały i metody / Materials and methods

Izolaty grzybów

W badaniu wykorzystano 40 izolatów *Z. tritici* zebranych w latach 2018–2021 na terenie województwa wielkopolskiego w okolicach miejscowości: Winna Góra, Środa Wielkopolska, Miłosław, Kleszczewo. Z każdego pola pobrano 20 liści wykazujących typowe objawy septoriozy paskowanej liści pszenicy. Liście pocięto na fragmenty o długości 4–5 cm i wysterylizowano powierzchniowo przez 1 minutę w wybielaczu zawierającym 4% podchloryn sodu (ACE, Procter & Gamble). Po sterylizacji próbki wypłukano w sterylnej wodzie destylowanej, osuszono i pozostawiono na 48 godzin w temperaturze pokojowej na szalkach Petriego zawierających wilgotny, sterylny 90 mm papier filtracyjny (POCH). Zarodniki konidialne rozwijające się w piknidiach zostały delikatnie zeszkrobane skalpelem, zmieszane w kropli sterylnej wody w probówce 1,5 ml typu Eppendorf i za pomocą ezy przeniesione na szalki Petriego zawierające agar glukozowo-ziemniaczany (PDA – potato dextrose agar) (Difco) z dodatkiem streptomycyny (100 mg/l). Kultury inkubowano przez 2 tygodnie w temperaturze pokojowej, a następnie

przechowywano w temperaturze 4°C. Wszystkie hodowle były podtrzymywane przez przenoszenie na świeżą pożywkę PDA co kilka miesięcy.

Ekstrakcja DNA

Całkowite DNA genomowe zostało wyizolowane z 10 mg świeżej grzybni hodowanej przez 2 tygodnie na pożywce PDA. Próbkę dokładnie roztarto w buforze DISFAST (Novazym) przy użyciu sterylnego plastikowego tłuczka. Próbkę inkubowano przez 15 minut w temperaturze 95°C w termomikserze (Eppendorf), okresowo mieszając. Po inkubacji próbkę odwirowywano przez 3 minuty przy 6000 rpm w wirówce Minispin (Eppendorf). Supernatant z każdej próbki ostrożnie pobierano, nie naruszając osadu, a następnie 10 µl tego supernatantu rozcieńczano w 90 µl buforu TE (Novazym). Stężenie DNA określano za pomocą spektrofotometru NanoDrop (Thermo Fisher Scientific). DNA każdej próbki rozcieńczono do 30 ng/µl, które następnie wykorzystano w reakcji PCR.

PCR, przygotowanie bibliotek, analiza danych

Reakcję PCR przeprowadzono w mieszaninie reakcyjnej o końcowej objętości 25 µl, która zawierała: po 0,6 µl 10 mM starterów (5'ATGGGTCTCCTCCAGGAAGT3' oraz 5'TCCTTCTCCTCCCTCCTCTC33') umożliwiających amplifikację fragmentu DNA o długości około 1870 par zasad genu *CYP51*, 2 µl HF Bufor (Fermenthas), 0,4 µl dNTP mix (Fermenthas), 0,1 µl Pfuision Polimerase (Fermenthas), 60 ng matrycowego DNA. Zastosowano następujący profil termiczny reakcji PCR: wstępna denaturacja przez 30 s w 98°C; 35 cykli obejmujących: denaturację 10 s w 98°C, hybrydizację starterów 20 s w 58°C, elongację 60 s w 72°C; końcową elongację – 10 min w 72°C. Reakcje PCR przeprowadzano w termocyklerze Mastercycler ep gradient S (Eppendorf). Produkty amplifikacji rozdzielano elektroforetycznie w żelu agarozowym (1,5%) z dodatkiem barwnika Midori Green (Nippon) i wizualizowano pod światłem UV (360 nm). Z każdej z 40 próbek pobrano 0,5 µl produktu PCR i wymieszano, aby uzyskać próbkę do przygotowania biblioteki HTS. Analiza NGS wykonana została w firmie świadczącej usługi komercyjne (BGI CO. Ltd) w technologii PacBio RSII. Analizę bioinformatyczną uzyskanych wyników wykonano w programie ShoRAH w wariantach uwzględniających różne progi procentowe zmian sekwencji nukleotydów w stosunku do DNA kolonii referencyjnej (NCBI AF263470).

Wyniki i dyskusja / Results and discussion

Analiza dostarczyła 30 046 zmapowanych odczytów genu *CYP51* (14 704 odczytów forward i 15 342 reverse). W badaniu zidentyfikowano 132 mutacje, jednak większość

z nich występowała z częstością poniżej 1%. Były to głównie pojedyncze substytucje (SNV – single nucleotide variant), delecje lub insercje. Ze względu na specyfikę sekwencjonowania nanoporowego – wysoki wskaźnik błędów odczytu (Delahaye i Nicolas 2021) nie uwzględniono ich w dalszej analizie, ponieważ mogły utrudniać identyfikację rzeczywistych polimorfizmów SNP (single nucleotide polymorphism). Około 40 mutacji nukleotydowych występowało z częstością powyżej 20% względem referencyjnej sekwencji genu (NCBI AF263470). Ich częstość w badanej populacji była zróżnicowana i wahała się od 20 do niemal 100%. Większość z nich stanowiły pojedyncze SNV, a tylko 12 prowadziło do substytucji aminokwasowych w białku 14 α -dimetylazy sterolu. Mutacje te oznaczono jako: L50S, D134G, V136A, S188N, H262Y, M277T, C372R, A379G, I381V, I399V, Y461H oraz N513K (tab. 1). Spośród nich mutacje L50S, D134G, V136A, S188N, A379G, I381V, Y461H i N513K były wcześniej opisane w literaturze jako związane ze wzrostem odporności na DMI (Stammler i wsp. 2008, 2012; Cools i Fraaije 2013; Samils i wsp. 2021). Znaczenie pozostałych mutacji wymaga dalszych badań. Dodatkowo zidentyfikowano 22 mutacje synonimiczne, które nie zmieniały sekwencji białka 14 α -dimetylazy sterolu. Ich wpływ na wzrost odporności na triazole wydaje się mało prawdopodobny, jednak wskazują one na dużą zmienność genetyczną badanych izolatów. Częstość ich występowania wynosiła od 30 do niemal 100% odczytów w odniesieniu do sekwencji referencyjnej. W badaniu wykryto również dwie pojedyncze delecje w niekodujących fragmentach intronów genu oraz złożoną delecję obejmującą 6 nukleotydów (CTATGG), która modyfikowała sekwencję białka (tab. 1). Delecje, zwłaszcza w regionie 459–461 zostały wielokrotnie opisywane jako czynniki zwiększające odporność na triazole (Cools i wsp. 2011).

Rodzaj oraz częstość występowania poszczególnych haplotypów zależą częściowo od miejsca pochodzenia izolatów (Glaab i wsp. 2024; Oreiro i wsp. 2024), jednocześnie zakresy ich występowania ulegają ciągłym zmianom. W ostatnich latach, w Estonii częstość występowania mutacji D134G, V136C, A379G i S524T uległa zwiększeniu, natomiast częstotliwość pojawiania się substytucji V136A i I381V umiarkowanie spadła (Kiiker i wsp. 2021). Wśród analizowanych wielkopolskich izolatów mutacje L50S i I381V występowały w niemal 100% odczytów, natomiast mutacja Y461H była obecna w 60% próbek (tab. 1). Częstość pozostałych mutacji mieściła się w przedziale 20–40%. Mutacja I381V, podobnie jak w badanej populacji dominowała w Estonii występując z częstością 86–100%, a także w Finlandii i na Łotwie (Mäe i wsp. 2020; Kiiker i wsp. 2021). W badaniach tych wykryto także mutacje D134G, V136A, V136C, Y461C, Y461H i S524T, a w Szwecji także rzadkie mutacje o niskiej częstotliwości, takie jak Y459S oraz Y459D (Oreiro i wsp. 2024).

Tabela 1. Mutacje zidentyfikowane w badanej populacji *Zymoseptoria tritici* w odniesieniu do sekwencji referencyjnej (AF263470)
Table 1. Mutations identified in the studied *Zymoseptoria tritici* population in comparison to the reference sequence (AF263470)

Lp. No.	Miejsce mutacji nukleotydu Nucleotide mutation position	Typ mutacji Type of mutation	Nukleotyd referencyjny Reference nucleotide	Oznaczony nukleotyd Observed nucleotide	Liczba sekwencji z mutacją Number of sequences with mutation	Procent sekwencji z mutacją Percentage of sequences with mutation	Oznaczenie mutacji Mutation annotation
1	30	SNV	G	A	28 776	96,41	Q10
2	149	SNV	T	C	29 026	97,14	L50S
3	168	SNV	A	G	29 036	97,16	V56
4	204	SNV	A	C	29 128	97,44	T68
5	375	SNV	G	T	12 719	42,51	P125
6	401	SNV	A	G	6357	21,24	D134G
7	407	SNV	T	C	6760	22,59	V136A
8	476	SNV	A	G	12 694	42,40	INTRON
9	485	delecja	T	–	12 658	42,28	INTRON
10	531	SNV	T	C	12 665	42,30	S158
11	579	SNV	C	T	12 632	42,18	F174
12	588	SNV	C	T	12 419	41,46	R177
13	591	SNV	C	T	12 615	42,12	N178
14	594	SNV	C	T	12 131	40,50	N179
15	597	SNV	T	A	12 645	42,22	P180
16	600	SNV	T	C	12 642	42,21	H181
17	618	SNV	C	G	12 380	41,33	T187
18	620	SNV	G	A	12 567	41,95	S188N
19	624	SNV	C	T	12 525	41,81	G189
20	627	SNV	G	C	12 073	40,31	T190
21	795	SNV	C	A	12 428	41,46	L246
22	810	SNV	G	C	29 776	99,33	R251
23	841	SNV	C	T	29 907	99,75	H262Y
24	887	SNV	T	C	12 560	41,89	M277T
25	1100	delecja	C	–	28 949	96,60	INTRON
26	1123	SNV	A	C	29 899	99,77	INTRON
27	1175	SNV	A	T	29 770	99,37	I297
28	1178	SNV	C	T	29 652	98,97	A298
29	1181	SNV	C	T	29 868	99,69	H299
30	1253	SNV	C	T	9881	32,99	L323
31	1398	SNV	T	C	29 741	99,37	C376R
32	1408	SNV	C	G	6004	20,06	A379G
33	1413	SNV	A	G	28 945	96,73	I381V
34	1470	SNV	A	G	29 801	99,62	I396V
35	1529	SNV	A	G	29 708	99,33	E515
36	1646	delecja	CTATGG	–	8968	30,01	DEL
37	1653	SNV	T	C	18 068	60,46	Y461H
38	1661	SNV	G	T	9731	32,56	L463
39	1811	SNV	C	G	9917	33,24	N513K

W tabeli pogrubioną czcionką zostały oznaczone mutacje związane ze wzrostem odporności na fungicydy triazolowe – In the table, mutations associated with increased resistance to triazole fungicides are indicated in bold font

Nagromadzenie różnych mutacji w różnych kombinacjach doprowadziło do powstania licznych haplotypów *CYP51*, charakteryzujących się zróżnicowanym stopniem odporności na fungicydy (Cools i wsp. 2011; Gutierrez Vazquez i wsp. 2022; Kildea i wsp. 2023; Oreiro i wsp. 2024). Początkowo w populacji dominowały izolaty zawierające pojedyncze mutacje w genie *CYP51*. Obecnie jednak u izolatów *Z. tritici* odpornych na triazole często występuje więcej niż jedna mutacja (Oreiro i wsp. 2024). Wśród najczęściej występujących złożonych haplotypów wymienia się te zawierające mutacje: L50S, D134G, V136A i Y461H oraz L50S, I381V i Y461H (Oreiro i wsp. 2024). W Irlandii i Wielkiej Brytanii wzrastała dominacja złożonych haplotypów *CYP51* z mutacją S524T, podczas gdy w Niemczech, Francji i Polsce wykrywano zarówno umiarkowane przystosowane haplotypy, jak i bardziej złożone formy z S524T (Huf i wsp. 2018). Mutacji S524T nie odnotowano jednak u izolatów badanych w niniejszej pracy. W krajach Europy Wschodniej i Południowej przeważały mniej złożone haplotypy *CYP51*, a mutacja S524T była tam rzadka lub nieobecna (Huf i wsp. 2018; Glaab i wsp. 2024).

Wpływ poszczególnych mutacji na wrażliwość na fungicydy z grupy DMI różni się w zależności od rodzaju substancji czynnej. Przykładowo, substytucja V136A powoduje zmniejszoną wrażliwość na epoksykonazol, protiokonazol, prochloraz i propikonazol, ale wrażliwość na tebukonazol, triadimenol i difenokonazol pozostaje wysoka (Cools i wsp. 2011; Leroux i Walker 2011). Mutacja I381V zwiększa odporność na epoksykonazol oraz metkonazol, przy jednoczesnym zachowaniu wrażliwości na tebukonazol (Leroux i wsp. 2007; Kildea i wsp. 2023). Z kolei mutacja S524T znacząco obniża wrażliwość grzyba na starsze DMI, takie jak protiokonazol i epoksykonazol (Leroux i wsp. 2007; Leroux i Walker 2011; Heick i wsp. 2017; Kildea i wsp. 2023). Mutacja Y137F obniża wrażliwość na prochloraz oraz większość triazoli, z wyjątkiem protiokonazolu. Izolaty z dodatkową substytucją S524T wykazywały jeszcze większą odporność na te związki, a także niewielką odporność na protiokonazol. U izolatów z mutacjami L50S + Y461S + V136A zaobserwowano zwiększoną odporność na prochloraz, epoksy-

konazol, propikonazol oraz protiokonazol, przy jednoczesnym wzroście wrażliwości na tebukonazol i triadimenol. Z kolei izolaty z mutacjami A379G + I381V + S524T wykazywały podwyższoną odporność na mefentriflukonazol i tebukonazol (Kiiker i wsp. 2021). Jeszcze większą odporność na epoksykonazol, propikonazol i protiokonazol wykazywały izolaty z poczwórną mutacją L50S + Y461S + V136A + S524T. Natomiast u mutantów *Z. tritici* z mutacjami L50S + Y461S + V136A + S524T + D134G stwierdzono odporność na epoksykonazol i propikonazol, znaczący wzrost odporności na prochloraz i protiokonazol oraz niewielką odporność na tebukonazol i triadimenol (Cools i wsp. 2011, 2012).

Fungicydy triazolowe nadal odgrywają kluczową rolę w ochronie upraw, jednak narastająca odporność patogenów niesie poważne konsekwencje finansowe, zwłaszcza w przypadku roślin o dużym znaczeniu gospodarczym. W Europie mechanizmy odporności na tę grupę fungicydów stają się coraz bardziej złożone, co wymaga stałego monitorowania i wdrażania skutecznych strategii antyodpornościowych (Glaab i wsp. 2024). Wdrożenie technik sekwencjonowania HTS umożliwia obecnie diagnostykę i monitoring odporności na fungicydy całych populacji grzybów, pozwalając na precyzyjną ocenę skuteczności stosowanych fungicydów (Gutierrez-Vazquez i wsp. 2022).

Wnioski / Conclusions

1. Badana populacja *Z. tritici* wykazuje dużą zmienność genetyczną genu kodującego 14 α -dimetylazę sterolu.
2. W genie białka 14 α -dimetylazy sterolu wykryto mutacje warunkujące 12 substytucji aminokwasowych. Mutacje te oznaczono jako: L50S, D134G, V136A, S188N, H262Y, M277T, C372R, A379G, I381V, I399V, Y461H oraz N513K.
3. Najczęściej występującymi mutacjami w badanej populacji *Z. tritici* były L50S oraz I381V, obecne odpowiednio w 97,14 i 96,73% przeanalizowanych sekwencji.

Literatura / References

- Birr T., Hasler M., Verreet J.-A., Klink H. 2021. Temporal changes in sensitivity of *Zymoseptoria tritici* field populations to different fungicidal modes of action. *Agriculture* 11 (3): 269. DOI: 10.3390/agriculture11030269
- Cools H.J., Bayon C., Atkins S., Lucas J.A., Fraaije B.A. 2012. Overexpression of the sterol 14 α -demethylase gene (*MgCYP51*) in *Mycosphaerella graminicola* isolates confers a novel azole fungicide sensitivity phenotype. *Pest Management Science* 68 (7): 1034–1040. DOI: 10.1002/ps.3263
- Cools H.J., Fraaije B.A. 2013. Update on mechanisms of azole resistance in *Mycosphaerella graminicola* and implications for future control. *Pest Management Science* 69 (2): 150–155. DOI: 10.1002/ps.3348
- Cools H.J., Mullins J.G., Fraaije B.A., Parker J.E., Kelly D.E., Lucas J.A., Kelly S.L. 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: 10.1128/AEM.00027-11
- Delahaye C., Nicolas J. 2021. Sequencing DNA with nanopores: Troubles and biases. *PloS One* 16 (10): e0257521. DOI: 10.1371/journal.pone.0257521

- Eyal Z. 1999. The *Septoria tritici* and *Stagonospora nodorum* blotch diseases of wheat. *European Journal of Plant Pathology* 105: 629–641.
- Fones H., Gurr S. 2015. The impact of *Septoria tritici* Blotch disease on wheat: An EU perspective. *Fungal Genetics and Biology* 79: 3–7. DOI: 10.1016/j.fgb.2015.04.004
- Glaab A., Weilacher X., Hoffmeister M., Strobel D., Stammler G. 2024. Occurrence and distribution of *CYP51* haplotypes of *Zymoseptoria tritici* in recent years in Europe. *Journal of Plant Diseases and Protection* 131: 1187–1194. DOI: 10.1007/s41348-024-00897-y
- Gutierrez Vazquez Y., Adams I.P., McGreig S., Walshaw J., van den Berg F., Sanderson R., Pufal H., Conyers C., Langton D., Broadhead R., Harrison C., Boonham N. 2022. Profiling azole resistant haplotypes within *Zymoseptoria tritici* populations using nanopore sequencing. *Frontiers in Agronomy* 4: 943440. DOI: 10.3389/fagro.2022.943440
- Heick T.M., Justesen A.F., Jørgensen L.N. 2017. Anti-resistance strategies for fungicides against wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* with focus on DMI fungicides. *Crop Protection* 99: 108–117. DOI: 10.1016/j.cropro.2017.05.009
- Huf A., Rehfus A., Lorenz K.H., Bryson R., Voegelé R.T., Stammler G. 2018. Proposal for a new nomenclature for *CYP51* haplotypes in *Zymoseptoria tritici* and analysis of their distribution in Europe. *Plant Pathology* 67 (8): 1706–1712. DOI: 10.1111/ppa.12891
- Jørgensen L.N., Hovmøller M.S., Hansen J.G., Lassen P., Clark B., Bayles R., Rodemann B., Flath K., Jahn M., Goral T., Czembor J.J., Cheyron P., Maumene C., De Pope C., Ban R., Nielsen G.C., Berg G. 2014. IPM strategies and their dilemmas including an introduction to www.eurowheat.org. *Journal of Integrative Agriculture* 13 (2): 265–281. DOI: 10.1016/S2095-3119(13)60646-2
- Jørgensen L.N., Matzen N., Heick T.M., Driscoll A., Clark B., Waite K., Blake J., Glazek M., Maumene C., Couleaud G., Rodemann B., Weigand S., Bataille C., Ban R., Hellin R., Kildea S., Stammler G. 2022. Shifting sensitivity of *Septoria tritici* blotch compromises field performance and yield of main fungicides in Europe. *Frontiers in Plant Science* 13: 1060428. DOI: 10.3389/fpls.2022.1060428
- Kiiker R., Juurik M., Heick T.M., Mäe A. 2021. Changes in DMI, SDHI, and QoI fungicide sensitivity in the Estonian *Zymoseptoria tritici* population between 2019 and 2020. *Microorganisms* 9 (4): 814. DOI: 10.3390/microorganisms9040814
- Kildea S., Dooley H., Byrne S. 2023. A note on the impact of *CYP51* alterations and their combination in the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* on sensitivity to the azole fungicides epoxiconazole and metconazole. *The Irish Journal of Agricultural and Food Research* 62 (1): 44–50. DOI: 10.15212/ijaf-2023-0103
- Leroux P., Albertini C., Gautier A., Gredt M., Walker A.S. 2007. Mutations in the *CYP51* gene correlated with changes in sensitivity to sterol 14 α -demethylation inhibitors in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Management Science* 63 (7): 688–698. DOI: 10.1002/ps.1390
- Leroux P., Walker A.S. 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: 10.1002/ps.2028
- Mäe A., Fillinger S., Sooväli P., Heick T.M. 2020. Fungicide sensitivity shifting of *Zymoseptoria tritici* in the finnish-baltic region and a novel insertion in the *MFS1* promoter. *Frontiers in Plant Science* 11: 385. DOI: 10.3389/fpls.2020.00385
- Omrane S., Audéon C., Ignace A., Duplaix C., Aouini L., Kema G., Walker A.S., Fillinger S. 2017. Plasticity of the *MFS1* promoter leads to multidrug resistance in the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *mSphere* 2 (5): e00393-17. DOI: 10.1128/mSphere.00393-17
- Omrane S., Sghyer H., Audéon C., Lanen C., Duplaix C., Walker A.S., Fillinger S. 2015. Fungicide efflux and the *MgMFS1* transporter contribute to the multidrug resistance phenotype in *Zymoseptoria tritici* field isolates. *Environmental Microbiology* 17 (8): 2805–2823. DOI: 10.1111/1462-2920.12781
- Oreiro E.G., Samils B., Kildea S., Heick T., Hellin P., Legréve A., Rodemann B., Berg G., Jørgensen L.N., Friberg H., Berlin A., Zhan J., Andersson B. 2024. DMI fungicide resistance in *Zymoseptoria tritici* is unlinked to geographical origin and genetic background: a case study in Europe. *Pest Management Science* 81 (2): 1103–1112. DOI: 10.1002/ps.8514
- Rosam K., Monk B.C., Lackner M. 2020. Sterol 14 α -demethylase ligand-binding pocket-mediated acquired and intrinsic azole resistance in fungal pathogens. *Journal of Fungi* 7 (1): 1. DOI: 10.3390/jof7010001
- Samils B., Andersson B., Edin E., Elfstrand M., Rönneburg T., Bucur D., Hutton F., Heick T.M., Hellin P., Kildea S. 2021. Development of a PacBio long-read sequencing assay for high-throughput detection of fungicide resistance in *Zymoseptoria tritici*. *Frontiers in Microbiology* 12: 692845. DOI: 10.3389/fmicb.2021.692845
- 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: 10.1016/j.cropro.2008.07.007
- Stammler G., Taher K., Koch A., Haber J., Liebmann B., Bouagila A., Yahyaoui A., Nasraoui B. 2012. Sensitivity of *Mycosphaerella graminicola* isolates from Tunisia to epoxiconazole and pyraclostrobin. *Crop Protection* 34: 32–36. DOI: 10.1016/j.cropro.2011.11.007
- Torriani S.F., Melichar J.P., Mills C., Pain N., Sierotzki H., Courbot M. 2015. *Zymoseptoria tritici*: a major threat to wheat production, integrated approaches to control. *Fungal Genetics and Biology* 79: 8–12. DOI: 10.1016/j.fgb.2015.04.010
- Vestergård N.F., Jørgensen L.N., Hellin P., Heick T.M. 2023. Fungicide spraying intensity in the field drives the selection of amino acid alterations conferring resistance in *Zymoseptoria tritici*. *European Journal of Plant Pathology* 166 (11): 1–17. DOI: 10.1007/s10658-023-02671-6
- Wieczorek T.M., Berg G., Semaškienė R., Mehl A., Sierotzki H., Stammler G., Justesen A.F., Jørgensen L.N. 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: 10.1007/s10658-015-0737-1