



Florian Freimoser | 24. Juni 2022

Schlussbericht

Häufigkeit, Mechanismen und Bedeutung natürlich vorkommender Fungizidresistenzen bei Hefen

Einleitung

Fungizidresistenzen stellen sowohl in der Medizin als auch in der Landwirtschaft ein grosses Problem dar und sind im Vergleich zu Antibiotikaresistenzen bei Bakterien nur wenig untersucht (Casadevall, 2017; Stop neglecting fungi, 2017; Fisher *et al.*, 2018). In der Medizin sind Hefen der Gattung *Candida* die wichtigsten pilzlichen Pathogene und bekannt dafür, Resistenzen gegenüber verschiedenen Wirkstoffen zu entwickeln (Butler *et al.*, 2009; Jensen, 2016). Neben einer erworbenen Fungizidresistenz (durch Mutationen und Selektion) wurde bei vielen Hefen eine natürliche, intrinsische Toleranz gegenüber bestimmten fungiziden Wirkstoffen beschrieben (Slavikova and Vadkertiova, 2003; Vadkertiova and Slavikova, 2011; Desnos-Ollivier *et al.*, 2012). Fungizidtoleranz bei medizinisch relevanten Hefen ist natürlich äusserst unerwünscht, hingegen bei antagonistischen Hefen, die als biologische Pflanzenschutzmittel eingesetzt werden sollen, könnte eine solche Unempfindlichkeit gegenüber Fungiziden wünschenswert sein. Ähnlich wie bei insektenpathogenen Pilzen und Insektiziden könnten Mischapplikationen von Antagonisten (Hefen) und Fungiziden synergistisch wirken und eine starke Reduktion der angewendeten Fungizidmengen ermöglichen (Lima *et al.*, 2006; Wang and St Leger, 2007; Paula *et al.*, 2011; Zou *et al.*, 2014; Pelizza *et al.*, 2017). Es ist völlig unklar, wie viele und welche Hefen natürlicherweise gegenüber welchen Fungiziden unempfindlich sind und wie verbreitet Fungizidtoleranz bei natürlich vorkommenden Hefen ist. Somit ist es auch nicht möglich abzuschätzen, ob Toleranz gegenüber landwirtschaftlichen Fungiziden auch mit Toleranz gegenüber medizinischen Präparaten einhergeht, welche Mechanismen diesen Unempfindlichkeiten zugrunde liegen und ob diese als Reservoir dienen und auf andere Arten übertragen werden können. Forschung auf diesem Gebiet ist deshalb dringend notwendig.

Es war deshalb das Ziel dieses Projekts die Toleranz natürlich vorkommender Hefen gegenüber Fungiziden genauer zu untersuchen, um deren Bedeutung abschätzen zu können. Dazu sollten einerseits natürlich vorkommende, fungizidtolerante Hefen gesammelt und andererseits Experimente mit Modell-Systemen im Labor durchgeführt werden. Das Projekt wurde von der Doktorandin Electine Magoye bearbeitet und von Prof. Markus Künzler (ETH Zürich, Institut für Mikrobiologie) mitbetreut. Diese Doktorarbeit ist in das Doktoratsprogramm der ETH (Immunologie und Mikrobiologie) eingebettet und wird von einem PhD Komitee begleitet. Neben Prof. Markus Künzler und mir sind Dr. Helge Sierotzki, Syngenta, und Prof. Sam Zeeman, ETH Zürich, Teil dieses Komitees. Zum Forschungsprojekt selber haben auch diverse Mitarbeitende von Agroscope beigetragen und

erhebliche eigene Ressourcen sind aufgewendet worden (z. B. für die Genomsequenzierung und – Analyse).

Methoden

Hefen wurden aus Blatt-, Blüten-, und Bodenproben aus Apfelanlagen von Agroscope isoliert. Die Isolation ist auch in der Gegenwart verschiedener Fungizide aus unterschiedlichen Klassen (Difeconazol, Captan, Trifloxystrobin, Cyprodinil, 8-Hydroxyquinoline Sulfat, Amphotericin B, Cluconazo, Capsfungin) durchgeführt worden (Magoye *et al.*, 2020). Isolate wurden mittels Sequenzieren der ITS Region bestimmt. Für alle weiterführenden Laborversuche wurden Isolate der Art *Aureobasidium pullulans* verwendet. Zusätzlich wurden klinische Isolate derselben Art (aus Stammsammlungen und von Schweizer Krankenhäusern erhalten) in die Analyse eingeschlossen. Insgesamt wurden 46 *A. pullulans* isolate für weiterführende Experimente verwendet. Die Toleranz gegenüber den Fungiziden Captan, Cyprodinil und Difenconazol wurde mit Wachstumsversuchen in Flüssigmedium bestimmt und mittels eines Mikroplatten-Readers analysiert. Zusätzlich wurden Sensitivitätsversuche auf Agarplatten durchgeführt. Die minimale Fungizidkonzentration, welche für eine Reduktion des Wachstums von 50% nötig war, wurde bestimmt. Von allen *A. pullulans* Isolaten wurde genomische DNA isoliert und von BGI Genomics sequenziert. Die gefilterten Sequenzdaten wurden assembliert und mit unserem eigenen Referenz-Genom für *A. pullulans* (Isolate NBB 7.2.1)(Rueda-Mejia *et al.*, 2021) verglichen. Die Punktmutation im Vergleich zum Referenzgenom wurden dazu verwendet, die Verwandtschaft der 46 Isolate zu bestimmen. Die Genomsequenzen und Fungizidsensitivitäts-Daten wurden mittels einer «Genome-wide association study» (GWAS) -Analyse in Korrelation gestellt und signifikante Mutationen für Toleranz gegenüber Captan, Cyprodinil und Difenconazol wurden identifiziert. Ausgewählte Gene mit signifikanten Mutationen wurden entweder von cDNA amplifiziert und kloniert oder als fertige ORFs bestellt. Alle Gene wurden in das Genom von *Saccharomyces cerevisiae* (als Modell, Stamm BY4741 oder Deletions-Mutanten) integriert. Effekte der heterolog exprimierten Gene wurden in Fungizidsensitivitäts-Assays wie oben beschrieben analysiert.

Resultate & Diskussion

Natürlich vorkommende Hefen sind gegenüber verschiedenen Fungiziden tolerant

Unterschiedliche Fungizide wurden in verschiedenen Konzentrationen mit Umweltproben (Erde, Blätter, Blüten und Früchte) gemischt, die Suspensionen wurden auf Kartoffeldextrose-Agar (PDA) ausplattiert und Pilzkolonien wurden gezählt und isoliert. Im Vergleich zu den Kontrollplatten, auf welche Suspensionen ohne Fungizide ausplattiert wurden, war die Anzahl der Pilzkolonien in der Gegenwart der Antimykotika Amphotericin B, Capsfungin, Captan, Cyprodinil, Difenconazol, Fluconazol und Tryfloxystrobin reduziert (Abbildung 1). Interessanterweise war die Zahl der Hefekolonien in Gegenwart all dieser Fungizide mit Ausnahme von Trifloxystrobin durchweg höher als die Zahl der Kolonien von filamentösen Pilzen. Bei Captan, Cyprodinil, Difenconazol und Fluconazol (nur für Hefen) nahm die Gesamtzahl der Pilzkolonien mit steigender Konzentration des Fungizids ab, während dieser Effekt bei den anderen Verbindungen nicht eindeutig zu beobachten war. Bemerkenswerterweise hatten medizinisch eingesetzte Fungizide (d. h. Amphotericin B, Capsfungin und Fluconazol) die geringste Wirkung auf die Gesamtzahl der Pilzkolonien, während Captan die

stärkste Wirkung hatte und fast keine filamentösen Pilze und nur sehr wenige Hefekolonien beobachtet wurden. Insgesamt deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die Hefen in der Umwelt die meisten der hier getesteten Fungizide tolerieren können.

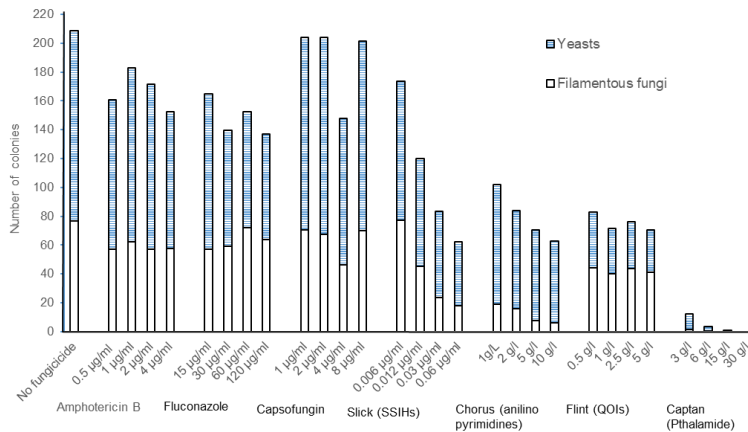


Abbildung 1. Anzahl Kolonien von filamentösen und Hefe-Pilzen, die in der Gegenwart unterschiedlicher Fungizide isoliert werden konnten.

A. *pullulans* ist die am häufigsten isolierte Hefe

Einzelne Hefekolonien wurden von den Platten mit der höchstmöglichen Fungizid-Konzentration (Hefen noch vorhanden) entnommen und zur Identifizierung verwendet. Insgesamt wurden fast 400 Hefeisolate, welche zu 48 Taxa gehörten, identifiziert (Abbildung 2). In der Gegenwart von sieben der acht Fungizide war *A. pullulans* die am häufigsten isolierte Hefe (insgesamt 73 Isolate), während einige Arten nur einmal und nur mit einem einzigen Antimykotikum isoliert wurden. Andere häufig isolierte Taxa (mindestens 16 oder mehr Isolate in Gegenwart von mindestens fünf verschiedenen Fungiziden) waren *Metschnikowia pulcherrima*, *Cryptococcus laurentii*, *Cyberlindnera misumaiensis*, *Sporidiobolus metaroseus* und *Holtermanniella*. *Pichiaceae* wurden meist mit Difenoconazol isoliert (elf der insgesamt fünfzehn *Pichiaceae*-Isolate). Die verschiedenen Hefearten kamen sowohl in der Phyllosphäre (Blätter, Blüten und Früchte) als auch im Boden vor, wobei in den Bodenproben eine größere Vielfalt (38 Arten) beobachtet wurde. Interessanterweise wurden *A. pullulans*, *S. metaroseus* und *Holtermanniella* in allen vier Probenotypen gefunden, während *M. pulcherrima* in allen Proben außer in Blüten vorkam. Die Anzahl der Isolate reichte von 11 bis 66 für jedes verwendete Antimykotikum. Saisonale

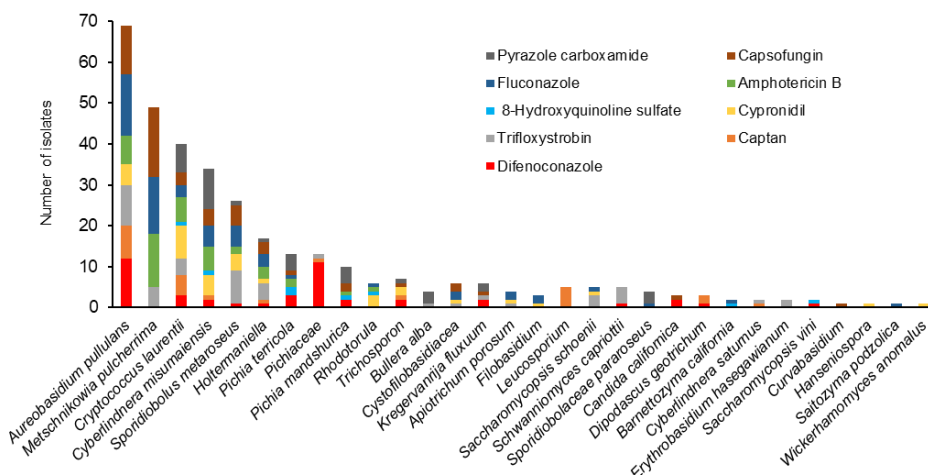


Abbildung 2. Anzahl Isolate, welche für die unterschiedlichen Hefe-Arten gesammelt wurden. *A. pullulans* war die am häufigsten isolierte Hefe.

Veränderungen wirkten sich zwar auf die Gesamtzahl, nicht aber auf die Artenvielfalt aus, da die meisten Arten während der vier Jahreszeiten gesammelt wurden.

A. pullulans zeigt hohe Toleranz gegenüber Captan, Cyprodinil und Difenconazol

Für das Bestimmen der Grundempfindlichkeit gegenüber verschiedenen Fungiziden wurde *A. pullulans* ausgewählt, weil von dieser Art die grösste Anzahl von Isolaten zur Verfügung stand. In einer ersten Versuchsserie wurde die Empfindlichkeit von 30 *A. pullulans* Umweltisolaten gegenüber Captan, Cyprodinil und Difenconazol untersucht. Es wurden umfangreiche Wachstumsversuche in Mikroplatten und in Gegenwart verschiedener Konzentrationen der drei Fungizide durchgeführt. Die 30 Isolate von *A. pullulans*, die unter verschiedenen Bedingungen (Probenquellen, Zeitpunkte und Fungizide) isoliert wurden, wurden durch die experimentellen Konzentrationen von Captan und Difenconazol kontrolliert (d. h. mindestens 50 % Wachstumsverringern), und die Mehrheit der Isolate (63 % bzw. 70 %) hatte einen MIC₅₀-Wert, der unterhalb der mittleren MIC₅₀-Konzentration für alle Isolate und das entsprechende Fungizid lag. Auch für Cyprodinil wies die Mehrheit der Isolate (70 %) eine MIC₅₀ auf, die unter dem Mittelwert für Cyprodinil lag. Allerdings wurden nicht alle Isolate kontrolliert: Isolat AL4e war unempfindlich gegenüber der hier verwendeten maximalen Cyprodinil Konzentration (256 µg/ml) und hatte einen berechneten MIC₅₀-Wert von $1,45 \times 1039 \mu\text{g/ml}$. Dieser Wert wurde daher von den weiteren Berechnungen ausgeschlossen. Die Resistenzfaktoren (d. h. der maximale MIC₅₀-Wert dividiert durch den minimalen MIC₅₀-Wert) waren für Difenconazol (25.3) und Captan (21.5) niedriger als für Cyprodinil (93.0). Insgesamt wiesen die 30 Isolate eine mittlere MIC₅₀ von 28.9 (Captan), 22.6 (Cyprodinil) und 2.2 µg/ml (Difenconazol) auf (der Median der MIC₅₀ betrug 21.9, 8.9 bzw. 1.4 µg/ml für Captan, Cyprodinil und Difenconazol). Letzteres wies den engsten MIC₅₀-Bereich auf (0.4-10.1 µg/mL), gefolgt von Captan (5.1-109.6 µg/mL), während Cyprodinil den weitesten Bereich aufwies (2.0-186.0 µg/mL).

Die Verteilungen der MIC₅₀-Werte für alle drei Fungizide und die 30 Isolate waren schief, da viele Isolate eine erhöhte Empfindlichkeit (d. h. einen niedrigeren MIC₅₀-Wert) im Vergleich zum Durchschnitt der untersuchten Population aufwiesen. Die nicht transformierten MIC₅₀-Werte für alle drei Fungizide ergaben somit nicht-normale Verteilungen (Shapiro-Wilk W = 0.82, p = 0.0001 (Captan);

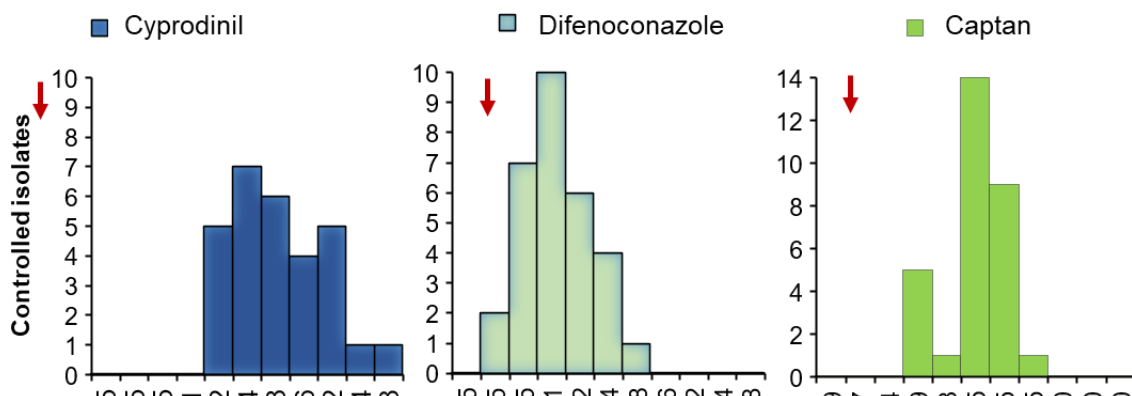


Abbildung 3. 30 *A. pullulans* zeigen eine hohe Toleranz gegenüber den Fungiziden Cyprodinil, Difenconazol und Captan. In der Landwirtschaft übliche Anwendungskonzentrationen sind durch einen roten Pfeil markiert.

W = 0.51, $p < 0.001$ (Cyprodinil); W = 0,75, $p < 0,001$ (Difenoconazol)). Insgesamt waren die Verteilungen der MIC₅₀-Werte unimodal, was möglicherweise darauf hindeutet, dass es keine störende Resistenz gibt und dass die hier untersuchte *Aureobasidium*-Population eine Grundempfindlichkeit mit erheblichen Schwankungen aufweist. Die mittleren MIC₅₀-Werte für die Bekämpfung der *A. pullulans*-Isolate wurden mit den EC₅₀-Werten verglichen, die für Anwendungen gegen pflanzenpathogene Pilze berichtet wurden. Für die Bekämpfung von *Botrytis cinerea* wurden mittlere EC₅₀-Werte von 0.9 (Captan) und 0.008 µg/mL (Cyprodinil) gemeldet, während für Difenoconazol der mittlere EC₅₀-Wert für die Bekämpfung von *Penicillium* spp. 0.16 µg/mL betrug [28,37,38]. Die mittleren MIC₅₀-Werte für die *A. pullulans*-Isolate waren also signifikant höher (Captan: T = 7.33, df = 29, $p < 0.001$; Difenoconazol: T = 5.27, df = 29, $p < 0.001$; Cyprodinil: T = 3.41, df = 28, $p = 0.002$) als die veröffentlichten mittleren EC₅₀-Werte für pflanzenpathogene Pilze, was darauf hindeutet, dass *A. pullulans* gegenüber diesen drei Fungiziden weniger empfindlich ist als die pflanzenpathogenen Ziele der jeweiligen Fungizide.

Anwendung Fungizid-toleranter Hefen zur biologischen Kontrolle von Pflanzenpathogenen

Die ursprüngliche Motivation für dieses Projekt war die kombinierte Anwendung Fungizid-toleranter Hefen und geringer Dosen eines Fungizids zur Bekämpfung pflanzenpathogener Pilze. Feldversuche mit einer antagonistischen Hefe, nach vorheriger Fungizid Behandlung, haben Hinweise auf die Wirksamkeit solcher Kombinationen gegeben.

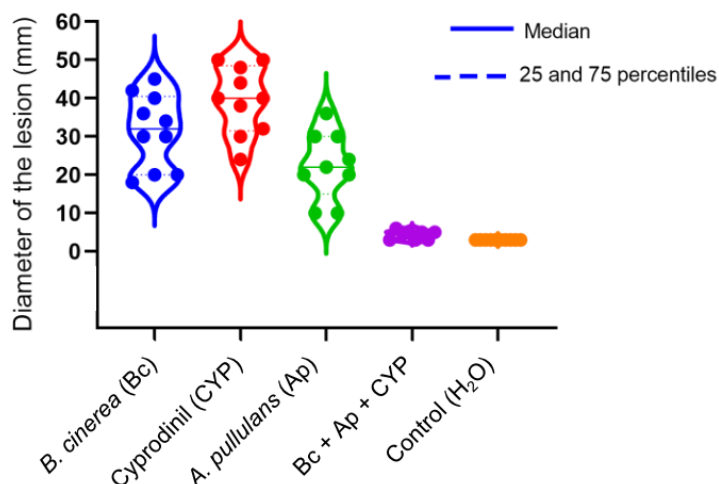


Abbildung 4. Kombination von Cyprodinil (CYP) und *A. pullulans* (tolerantes Isolat LF 5.11) reduziert *Botrytis*-Befall stärker als das Fungizid allein. Die Verbesserung gegenüber einer Behandlung mit der Hefe alleine ist gering.

Einige klinische *A. pullulans* Isolate gehören zu einer anderen Art der Gattung *Aureobasidium*

Die Genome aller *A. pullulans* Umweltisolate, sowie von 16 zusätzlichen Isolaten aus klinischen Proben (von Schweizer Krankenhäusern oder Stammsammlungen erhalten), wurden mittels short-read

Sequenzen analysiert und verglichen (untereinander und mit dem Referenzgenom unseres *A. pullulans* Isolats NBB 7.2.1).

Die Gruppierung aufgrund der Polymorphismen in den verschiedenen Isolaten widerspiegelt zu einem grossen Teil die Herkunft der Isolate (Abbildung 5). Sieben der ursprünglich als *A. pullulans* identifizierten, klinischen Isolate (CBS 626.85, CBS 298.56, CBS 699.76, CBS 121327, CBS 577.93, CBS 101119, IFIK 1931365) unterschieden sich sehr stark von allen übrigen Isolaten und waren den Referenzisolaten für *A. melanogorum*, *A. namibiae* und *A. subglaciale* ähnlicher als den beiden Referenzen für die Spezies *A. pullulans*. Aufgrund der grossen genetischen Distanz wurden diese sieben Isolate von den weiteren Analysen ausgeschlossen.

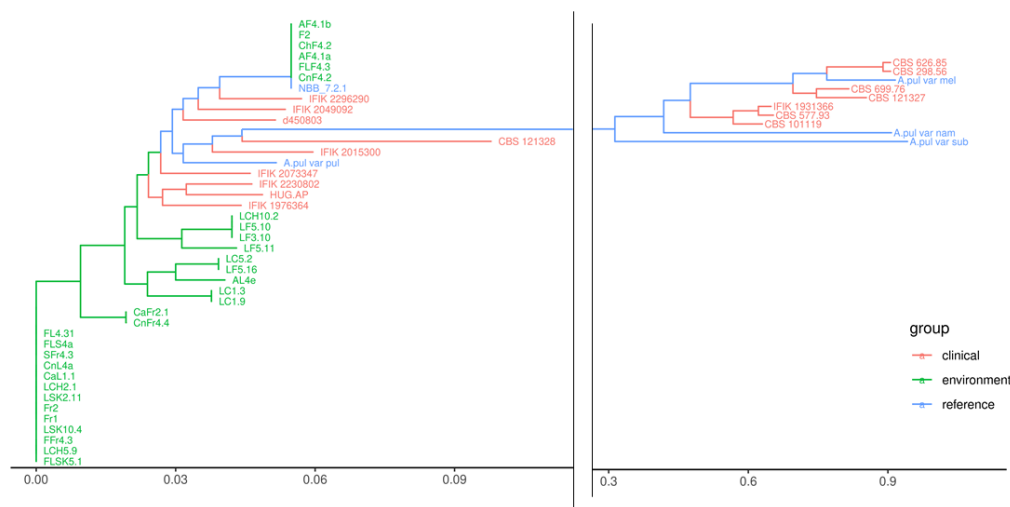


Abbildung 5. Phylogenie aller *A. pullulans* Isolate basierend auf Polymorphismen im Vergleich zum Referenzgenom des Isolats NBB 7.2.1. Umweltisolate sind grün, klinische Isolate rot und Referenzen für unterschiedliche *Aureobasidium*-Arten blau gefärbt. Die Skalierung der x-Achse ist nach dem Unterbruch stark vergrössert.

Klinische *A. pullulans* Isolate scheinen weniger tolerant gegenüber Fungiziden zu sein

Zusätzlich zu den Umweltisolaten haben wir auch die 16 *Aureobasidium* Isolate aus klinischen Proben bezüglich der Sensitivität gegenüber Captan, Cyprodinil und Difenconazol untersucht. Die klinischen Isolate waren sensitiver als die Umweltstämme, aber dieser Unterschied war nur für Captan und Cyprodinil signifikant (Abbildung 6).

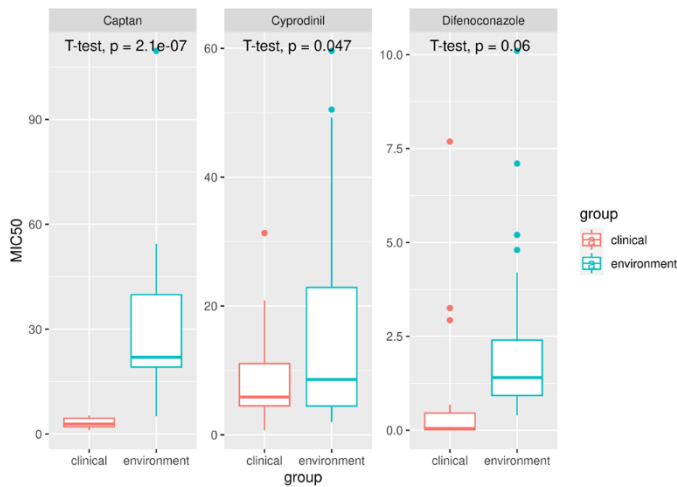


Abbildung 6. Klinische Isolate aus Schweizer Spitälern und aus Stammsammlungen (rot) weisen eine höhere Sensitivität gegenüber Captan, Cyprodinil und Difenoconazol auf als Umweltisolate (türkis). Für das Fungizid Captan ist dieser Unterschied statistisch signifikant.

Eine GWAS-Analyse identifiziert signifikante SNPs für Toleranz gegenüber Fungiziden

Die Verteilungen der Punktmutationen in den unterschiedlichen Isolaten wurden mit den Sensitivitätsdaten der entsprechenden Isolate mittels einer GWAS in Korrelation gestellt. Diese Analyse hat eine Vielzahl von Mutationen identifiziert, die signifikant mit Toleranz gegenüber Captan und Cyprodinil korrelierte (in Abbildung 7 durch grüne und rote Punkte dargestellt). Für Difenoconazol wurde keine signifikanten Polymorphismen gefunden.

Generell hat diese Analyse gezeigt, dass Polymorphismen relativ gleichmässig über alle *A. pullulans* Chromosomen/Contigs verteilt sind und dass an den Enden jeweils eine Häufung beobachtet werden kann.

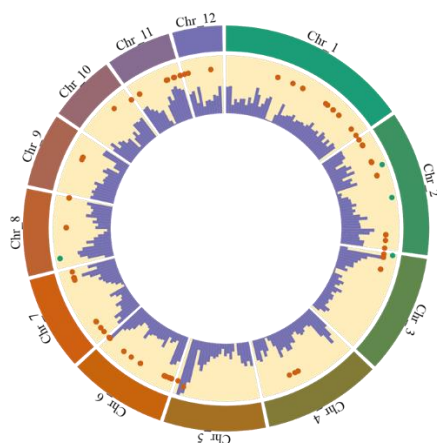


Abbildung 7. Circos Plot des *Aureobasidium* Genoms (basierend auf dem Referenzisolat NBB 7.2.1). Die Balken im inneren Kreis zeigen die Häufigkeit von einzelnen Polymorphismen (SNPs) pro 100'000 Basenpaaren an. Signifikante SNPs sind durch die farbigen Punkte gekennzeichnet. Farbige Punkte zeigen signifikante Polymorphismen für Captan (grün) und Cyprodinil (rot) an.

Heterolog exprimierte *A. pullulans* Gene führen zu erhöhter Fungizid-Toleranz in *S. cerevisiae*

Es ist schwierig *A. pullulans* genetisch zu transformieren oder bestimmte Gene gezielt auszuschalten. Um dennoch die Funktion von einigen der identifizierten Gene überprüfen zu können, haben wir den

Modellorganismus *S. cerevisiae* genutzt. Ausgewählte Gene wurden kloniert (durch einen starken, konstitutiven Promotor reguliert) und in das *S. cerevisiae* Genom integriert. Generell liess sich beobachten, dass die transferierten Gene (welche für verschiedene hypothetische Protein (HP), ein F-Box Protein (FBD) und eine Glycosyltransferase (GST) kodieren) zu einem verbesserten Wachstum von *S. cerevisiae* in Gegenwart von Cyprodinil geführt haben (**Error! Reference source not found.**). Weiterführende Analysen, um die MIC₅₀ Werte für die generierten *S. cerevisiae* Stämme zu bestimmen und vergleichen sind im Gange. Aus den bereits vorhandenen Resultaten kann aber geschlossen werden, dass die beschriebene GWAS Analyse Gene identifiziert hat, die in der Tat zu erhöhter Toleranz gegen über Fungiziden führen.

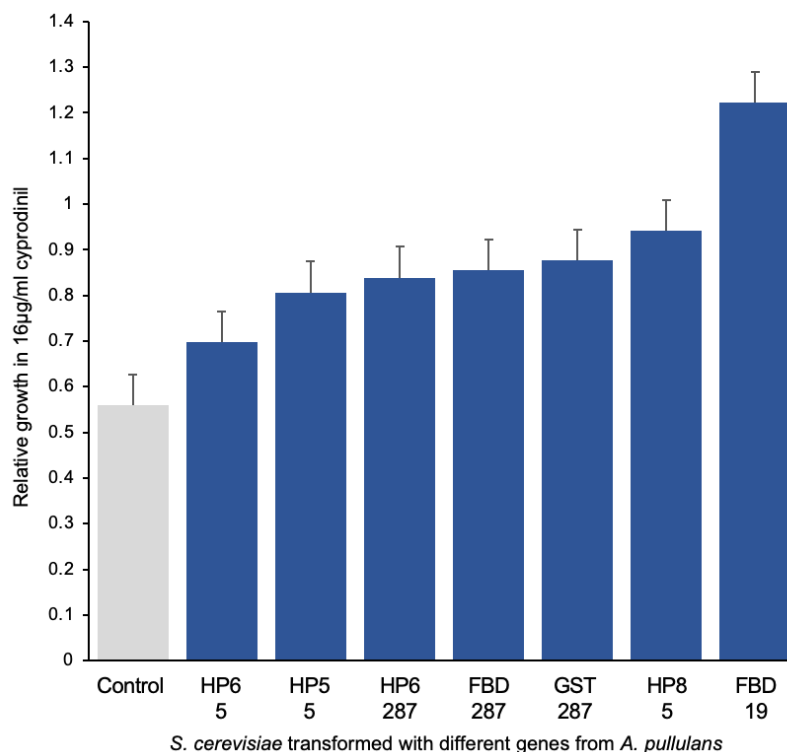


Abbildung 8. Relatives Wachstum von sieben *S. cerevisiae* Stämmen und einem Kontrollstamm (ohne zusätzliches Gen von *A. pullulans*) in der Gegenwart von 16 µg/ml Cyprodinil.

Wissensgewinn und Ausblick

Die hier zusammengefassten Arbeiten haben gezeigt, dass natürlich vorkommende Hefen und insbesondere *A. pullulans* zum Teil eine sehr hohe Toleranz gegenüber Fungiziden aufweisen. Die weiterführenden Analysen mit 46 *A. pullulans* Isolaten haben eine umfassende Datengrundlage für weitergehende Untersuchungen zur Bedeutung dieser Resultate gelegt. Diese Daten umfassen Sensitivitätsdaten mit drei Fungiziden (Captan, Cyprodinil, Difenoconazol), Genomsequenzen, und eine Vielzahl von Genen, die mit Fungizidtoleranz in Zusammenhang zu stehen scheinen. Die Mehrheit dieser Gene ist nicht charakterisiert und ihre biologischen Funktionen sind unbekannt. Gezielte Studien zu diesen nicht charakterisierten Toleranzgenen können somit wichtige Informationen darüber liefern,

wie natürliche Hefen, und Pilze ganz allgemein, Fungizide tolerieren oder wie Toleranz gegenüber Fungiziden entstehen kann. Die Kenntnis über solche Mechanismen kann sogar dazu dienen, neue Bekämpfungsstrategien gegen pathogene Pilze zu entwickeln.

Das hiermit abgeschlossene Projekt generiert aber auch weitere neue Fragestellungen, die im Zusammenhang mit Fungizidanwendungen in der Landwirtschaft und Fungizidtoleranz dringlich erscheinen. Die unerwartet hohe Toleranz gegenüber Fungiziden, und eine etwas geringere Toleranz der klinischen Isolate, könnte darauf hindeuten, dass natürlich vorkommende Hefen durch Fungizidanwendungen in der Landwirtschaft auf hohe Toleranz selektioniert wurden. Um diese Frage gezielt untersuchen zu können ist es notwendig, eine wesentlich grössere und diversere Population von *A. pullulans* Isolaten zu untersuchen. In dieser Studie wurden Isolate aus landwirtschaftlichen (nicht direkt mit Fungiziden behandelt) und klinischen Proben isoliert. Fungizid-naive Isolate, aus natürlichen Ökosystemen die möglichst weit von Landwirtschaftsflächen entfernt liegen, sollten unbedingt für solche Analysen hinzugezogen werden. Umfassendere Sensitivitätstests mit einer grösseren Auswahl an Fungiziden, auch solchen, die in der Medizin verwendet werden, würde auch darüber Auskunft geben, ob die Fungizidtoleranz genereller Natur oder spezifisch für bestimmte Wirkstoffe ist.

Publikationen

Zwei Arbeiten aus diesem Projekt sind bereits publiziert:

Magoye, E., Hilber-Bodmer, M., Pfister, M., and Freimoser, F.M. (2020) Unconventional yeasts are tolerant to common antifungals, and *Aureobasidium pullulans* has low baseline sensitivity to captan, cyprodinil, and difenoconazole. *Antibiotics* **9**: 602.

Magoye, E., Pfister, M., Hilber-Bodmer, M., and Freimoser, F.M. (2020) Competition assays to quantify the effect of biocontrol yeasts against plant pathogenic fungi on fruits. *Bio Protoc* **10**: e3518.

Weitere Publikationen zu den Genomvergleichen und –Analysen sowie den Hemmversuchen auf Äpfeln sind geplant und bereits in Arbeit.

Referenzen

Butler, G., Rasmussen, M.D., Lin, M.F., Santos, M.A., Sakthikumar, S., Munro, C.A., *et al.* (2009) Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature* **459**: 657–662.

Casadevall, A. (2017) Don't forget the fungi when considering global catastrophic biorisks. *Health Secur* **15**: 341–342.

Desnos-Ollivier, M., Robert, V., Raoux-Barbot, D., Groenewald, M., and Dromer, F. (2012) Antifungal susceptibility profiles of 1698 yeast reference strains revealing potential emerging human pathogens. *PLoS One* **7**: e32278.

Fisher, M.C., Hawkins, N.J., Sanglard, D., and Gurr, S.J. (2018) Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. *Science* **360**: 739–742.

Jensen, R.H. (2016) Resistance in human pathogenic yeasts and filamentous fungi: prevalence, underlying molecular mechanisms and link to the use of antifungals in humans and the environment. *Dan Med J* **63** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27697142>.

Lima, G., De Curtis, F., Piedimonte, D., Spina, A.M., and De Cicco, V. (2006) Integration of biocontrol yeast and thiabendazole protects stored apples from fungicide sensitive and resistant isolates of *Botrytis cinerea*. *Postharvest Biol Technol* **40**: 301–307.

Magoye, E., Hilber-Bodmer, M., Pfister, M., and Freimoser, F.M. (2020) Unconventional yeasts are tolerant to common antifungals, and *Aureobasidium pullulans* has low baseline sensitivity to captan, cyprodinil, and difenoconazole. *Antibiotics* **9**: 602.

Paula, A.R., Carolino, A.T., Paula, C.O., and Samuels, R.I. (2011) The combination of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* with the insecticide imidacloprid increases virulence against the dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasit Vectors* **4**: 8.

Pelizza, S.A., Schalamuk, S., Simon, M.R., Stenglein, S.A., Pacheco-Marino, S.G., and Scorsetti, A.C. (2017) Compatibility of chemical insecticides and entomopathogenic fungi for control of soybean defoliating pest, *Rachiplusia nu*. *Rev Argent Microbiol* <http://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2017.06.002>.

Rueda-Mejia, M.P., Nägeli, L., Lutz, S., Hayes, R.D., Varadarajan, A.R., Grigoriev, I.V., *et al.* (2021) Genome, transcriptome and secretome analyses of the antagonistic, yeast-like fungus *Aureobasidium pullulans* to identify potential biocontrol genes. *Microb Cell* **8**: 184–202.

Slavikova, E., and Vadkertiova, R. (2003) Effects of pesticides on yeasts isolated from agricultural soil. *Z Naturforsch C* **58**: 855–859.

Stop neglecting fungi (2017) *Nat Microbiol* **2**: 17120.

Vadkertiova, R., and Slavikova, E. (2011) Influence of pesticides on yeasts colonizing leaves. *Z Naturforsch C* **66**: 588–594.

Wang, C., and St Leger, R.J. (2007) A scorpion neurotoxin increases the potency of a fungal insecticide. *Nat Biotechnol* **25**: 1455–1456.

Zou, C., Li, L., Dong, T., Zhang, B., and Hu, Q. (2014) Joint action of the entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea* and four chemical insecticides against the whitefly *Bemisia tabaci*. *Biocontrol Sci Technol* **24**: 315–324.