

Zaštita bilja  
Vol. 62 (2), № 276, 109-117, 2011, Beograd

UDK: 633.65-226  
632.934  
Naučni rad

## UČESTALOST REZISTENTNOSTI *CERCOSPORA BETICOLA* (SACC.) PREMA BENZIMIDAZOLIMA I DMI FUNGICIDIMA

NENAD TRKULJA\*, NENAD DOLOVAC, ERIKA PFAF-DOLOVAC,  
MILOŠ STEVANOVIĆ, ŽARKO IVANOVIĆ,  
RATIBOR ŠTRBANOVIĆ, SVETLANA ŽIVKOVIĆ

Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd, Srbija

\*e-mail: trkulja\_nenad@yahoo.com

Pegavost lišća šećerne repe je najznačajnija bolest koja se javlja na šećernoj repi u svetu. Štete koje nastaju usled pojave bolesti mogu smanjiti prinos i do 50%. Prema fungicidima iz grupe benzimidazola rezistentnost je utvrđena 1976. godine. Poslednjih dvadeset godina njihova upotreba je redukovana, ali se i dalje koriste uglavnom formulisani u mešavini sa fungicidima inhibitorima sinteze sterola (DMI). Fungicidi inhibitori demetilacije sterola (DMI), se zadnje dve decenije intenzivno koriste za suzbijanje *C. beticola* u svetu, a pojava rezistentnosti prema njima konstatovana je 2000. godine. Rezultati istraživanja su pokazali da su populacije *C. beticola* rezistentne prema benzimidazolima prisutne na poljima šećerne repe i čine dominantnu populaciju uz učestalost rezistentnosti 83.87 – 94.28 %. Učestalost rezistentnosti prema DMI fungicidima je manja, ali veoma značajna i iznosi 12.90 – 14.29 %.

*Ključne reči:* *Cercospora beticola*, fungicidi, benzimidazoli, DMI, rezistentnost.

### UVOD

*Cercospora beticola* (Sacc.), prouzrokovatelj pegavosti lišća šećerne repe je patogen koji se redovno javlja na poljima gde se šećerna repa intenzivno gaji. Štete koje nastaju usled intenzivne pojave ove bolesti smanjuju kvalitet i prinos korena šećerne repe od 25% do 50% (Shane i Teng 1992). Povoljni vremenski

uslovi, visoka relativna vlažnost vazduha  $RH > 95\%$ , temperatura u intervalu 20-30 °C i česte padavine su glavni faktori koji utiču na razvoj bolesti (Wolf and Verreet 2004).

Fungicidi iz grupe benzimidazola su prvi sistemični fungicide koji su se koristili za zaštitu šećerne repe protiv *C. beticola* u svetu. Na početku primene oni su imali veoma visoku efikasnost u suzbijanju *C. beticola* (Solel, 1970). Međutima kao posledica specifičnog mehanizma dejstva, intenzivna primena benzimidazola izaziva jak selekcionu pritisak na rezistentne populacije favorizujući njihov razvoj. Prvi put rezistentnost *C. beticola* prema benzimidazolima utvrđena je u Grčkoj 1972. godine posle samo dve godine primene (Georgopoulos and Dovas 1973), nakon prvog nalaza rezistentnosti prema benzimidazolima je detektovana i u drugim državama u svetu u kojima su se benzimidazoli koristili za zaštitu šećerne repe protiv *C. beticola* kao što su Italija (D'Ambra et al., 1974) i USA (Ruppel and Scott, 1974).

Nakon benzimidazola u primenu se uvode i inhibitori sinteze ergosterola (DMI) fungicidi. Svoje fungicidno dejstvo DMI fungicidi ispoljavaju inhibicijom citohroma P-450 od koga zavisi aktivnost  $14\alpha$ -demetilaze sterola, odnosno C-14 demetilacija u ciklusu sinteze sterola. Razvoj rezistentnosti u prirodi je postepen i naziva se kvantitativnom ili poligenetskom rezistentnošću koja je pod kontrolom više gena. Pod selekcionim pritiskom DMI fungicida, deo populacije sa smanjenom osetljivošću se postepeno povećava, dovodeći do postepenog smanjenja efikasnosti fungicida za kontrolu bolesti (Karaoglanidis et al., 2003).

Cilj ovog rada je bio da se utvrdi učestalost rezistentnih izolata poreklom sa lokaliteta gde se šećerna repa intenzivno gaji prema benzimidazolima i DMI fungicidima.

## MATERIJAL I METODE

**Sakupljanje uzoraka.** Tokom 2007. godine sa polja šećerne repe iz lokaliteta Erdevik i Padinska skela sakupljeni su listovi šećerne repe sa simptomima *C. beticola*. Listovi su pakovani u papirne kese i u ručnom frižideru prenošeni do laboratorije Instituta za zaštitu bilja i životnu sredinu u Beogradu. Sa lokaliteta Erdevik izolovano je 35 izolata, a sa lokaliteta Padinska skela 31 izolat.

**Izolacija patogena.** U laboratoriji je obavljena izolacija patogena po metodi Karaoglanidis et al., (2000). Vrhom igle iz jedne pege sa jednog lista prenošena je po jedne konidija *C. beticola* u Petri šolju sa PDA podlogom. Inkubacija je vršena dva dana u tami na temperaturi 25°C. Nakon dva dana kolonije su prenošene na svežu PDA podlogu gde su inkubirane deset dana pod istim uslovima. Kolonije su zatim korišćene za dalja ispitivanja.

**Diskriminativna koncentracija za benzimidazole.** Fungicidi korišćeni za testiranje su komercijalne formulacije koje kao aktivnu materiju sadrže karbendazim (Galofungin 500 SC, Galenika fitofarmacija, Srbija) i tiofanat-metil (Galofungin T 450 SC, Galenika fitofarmacija, Srbija).

Na osnovu ranijih istraživanja diskriminativna koncentracija koja se pokazala kao odgovarajuća za karbendazim je 1 mg/l (Karaoglanidis et al., 2003). Diskriminativna koncentracija korišćena za tiofanat-metil po metodi koju su opisali Weiland i Halloin (2001) iznosi 5 mg/l.

Fungicidi su razređivani u sterilnoj destilovanoj vodi do koncentracije aktivne materije u razređenju od 1%. Podloga korišćena za ispitivanje je bila krompir dekstrozni agar (KDA). Nakon pripreme, podloga je autoklavirana na temperaturi od 120 C°, uz pritisak od 1,2 atm. Nakon hlađenja do 40-50 C°, u podlogu je dodavana određena količina razređenja fungicida da bi se dobila koncentracija aktivne materije od 1 mg/l za karbendazim, odnosno 5 mg/l za tiofanat-metil. Kao kontrola su korišćene Petri kutije u koje je umesto razređenja fungicida dodavana sterilizovana destilovana voda. Podloga je razlivana u sterilizovane Petri kutije, a nakon hlađenja na nju su zasejavani iseći micelije veličine 5mm u prečniku od svakog pojedinačnog izolata sa svih lokaliteta. Iseći su uz pomoć bušača uzeti sa ivice kolonije starosti 14 dana i postavljeni na podlogu sa fungicidom na taj način da micelijski isečak bude celom svojom površinom u kontaktu sa podlogom. Zasejavanje isečaka vršeno je u četiri ponavljanja, a ogled je ponovljen dva puta.

Nakon postavljanja isečaka u Petri kutije vršena je inkubacija u termostatu na temperaturi od 25 C°, bez prisustva svetlosti u trajanju od 7 dana. Poprečni porast izračunavan je kao srednji porast svakog izolata (umanjen za prečnik isečka) na osnovu merenja porasta izolata iz dva pravca. Relativni porast (RG) izolata izražavan je u procentima u odnosu na kontrolu. Izračunavanje relativnog porasta vršeno je po formuli:

$$RG = (\text{srednji porast izolata sa fungicidom} / \text{porast izolata u kontroli}) \times 100$$

Izolati koji su na diskriminativnim koncentracijama imali relativni porast  $RG \geq 50\%$  klasifikovani su kao rezistentni, dok su svi ostali izolati klasifikovani kao osetljivi (Russell, 2004).

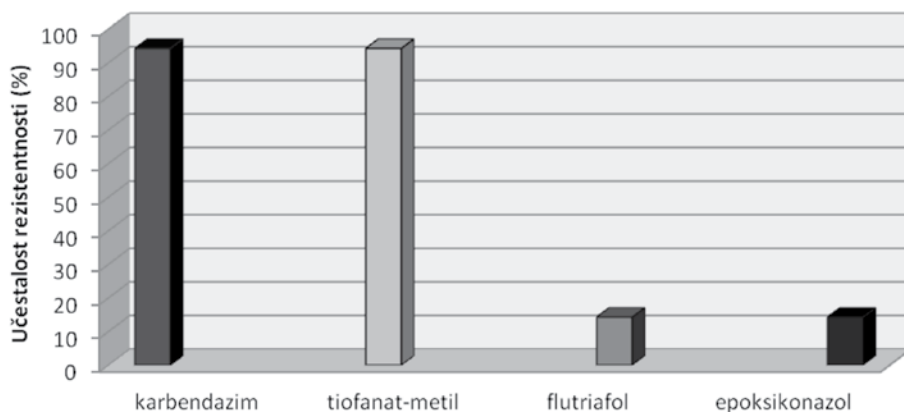
**Diskriminativna koncentracija za DMI fungicide.** Fungicidi korišćeni u testiranju su komercijalne formulacije koje kao aktivnu materiju sadrže flutriafol (Impact 25-SC, Cheminova, Danska) i tetraokonazol (Eminent 125-ME, Isagro, Italija).

Diskriminativna koncentracija koja se pokazala kao odgovarajuća u ispitivanjima kako kod drugih gljiva tako i kod *C. beticola* za DMI fungicide je 1 mg/l (Georgopoulos, 1987; Karaoglanidis et al., 2003). Dalje ispitivanje obavljeno je na isti način kao i za fungicide iz grupe benzimidazola.

## REZULTATI

Ukupno je izolovano 35 izolata sa lokaliteta Erdevik iz pojedinačnih pega sa zaraženih listova šećerne repe. Na osnovu porasta micelije na diskriminativnoj koncentraciji karbendazima od 1mg/l od ukupno 35 ispitanih izolata samo su dva bila osetljiva. Frekvencija rezistentnosti na karbendazim bila je veoma visoka 94.28 %, dok je procenat osetljivih izolata bio veoma mali 5.72 %. Isti izolati koji su imali intenzivan porast na diskriminativnoj koncentraciji karbendazima rasli su i na diskriminativnoj koncentraciji tiofanat metila 5 mg/l (Graf. 1).

Učestalost rezistentnih izolata *C. beticola* utvrđena na lokalitetu Erdevik za flutriafol iznosi 14.29 %, dok je učestalost osetljivih izolata prema flutriafolu iznosila 85.71 %. Isti izolati koji su bili rezistentni prema flutriafolu ispoljili su rezistentnost prema epoksikonazolu tako da je učestalost rezistentnosti bila identična kao i za flutriafol (Graf. 1).

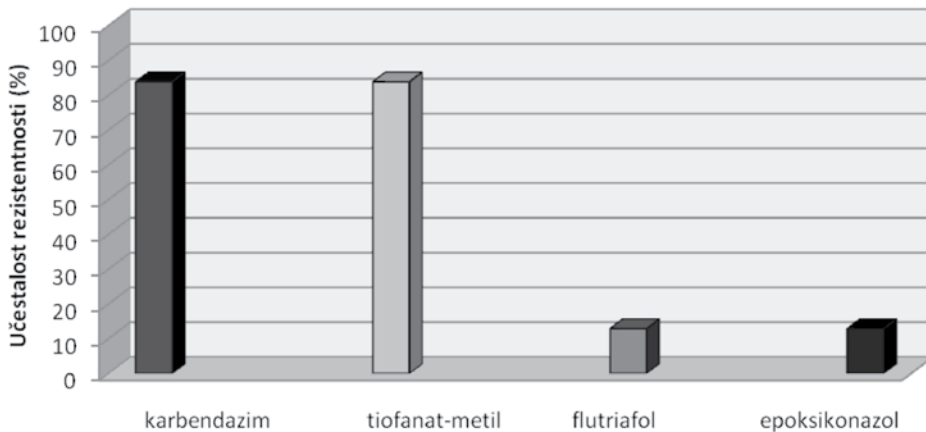


**Graf. 1** - Učestalost rezistentnosti (%) izolata sa lokaliteta Erdevik na benzimidazole (karbendazim i tiofanat metil) i DMI (flutriafol i epoksikonazol) fungicide.

**Chart 1** - Frequency of resistant isolates (%) on locality Erdevik to benzimidazole (carbendazim and thiophanate methyl) and DMI (flutriafol i epoxiconazole) fungicides.

Sa lokaliteta Padinska skela izolovan je 31 izolat *C. beticola*. Rezistentnost prema karbendazimu ispoljilo je 26 izolata *C. beticola*, isti izolati intenzivno su rasli i na diskriminativnoj koncentraciji tiofanat metila. Pet izolata ispoljilo je osetljivost prema diskriminativnoj koncentraciji karbendazima. Utvrđena učestalost rezistentnih izolata prema karbendazimu i tiofanat metilu na lokalitetu Padinska skela iznosi 83.87 % (Graf. 2).

Prema flutriafolu od ukupno 31 izolata četiri su ispoljila rezistentnost na diskriminativnoj koncentraciji, ista četiri izolata bila su rezistentna i na epoksikonazol. Učestalost rezistentnih izolata prema DMI fungicidima flutriafolu i epoksikonazolu na lokalitetu Padinska skela iznosi 12.90 % (Graf. 2).



**Graf. 2** - Učestalost rezistentnosti izolata sa lokaliteta Padinska skela na benzimidazole (karbendazim i tiofanat metil) i DMI (flutriafol i epoksikonazol) fungicide.

**Chart 2** - Frequency of resistant isolates (%) on locality Erdevik to benzimidazole (carbendazim and thiophanate methyl) and DMI (flutriafol i epoxiconazole) fungicides.

## DISKUSIJA

Prvi put rezistentnost populacija *C. beticola* prema fungicidima konstatovana je u Grčkoj (Georgopoulos i Dovas, 1973). Primena benzimidazola protiv *C. beticola* u Grčkoj počela je 1971. godine nakon dve godine izuzetno visokog nivoa efikasnosti došlo je do naglog smanjenja efikasnosti u svim oblastima gde su se benzimidazoli koristili više puta u toku godine. Pojava rezistentnosti utvrđena je i u drugim delovima sveta gde se za suzbijanje *C. beticola* koristio benomil. Ruppel i Scott (1974) su utvrdili pojavu rezistentnosti na benomil u svim regionima gde se gaji šećerna repa u SAD.

U Srbiji benomil je počeo intenzivno da se koristi 1971. godine već tokom 1974. i 1975. godine na nekoliko lokaliteta konstatovan je slab efekat zaštite na poljima šećerne repe na kojima se za zaštitu koristio benomil i do tri puta uzastopno. Potvrdu da se radi o rezistentnosti dao je Marić (1976) nakon provere osetljivosti izolata uzetih sa polja šećerne repe tokom 1974-1975 godine. U narednom

periodu benomil se koristio u kombinaciji sa organokalajnim jedinjenjima, da bi se smanjio selekcionni pritisak na rezistentne populacije.

Benomil je prvi fungicid prema kome je *C.beticola* razvila rezistentnost, učestalost rezistentnosti koja je tada zabeležena u Grčkoj bila je u intervalu 80-90% (Georgopoulos i Dovas, 1973). Nakon konstatovanja rezistentnosti benomil u narednom periodu nije primenjivan za suzbijanje *C.beticola*. Sredinom devedesetih godina prošloga veka u Grčkoj je obavljen monitoring rezistentnosti na benzimidazole i utvrđena učestalost rezistentnosti (20-25%) je bila znatno manja nego ona iz 1973. godine (Karadimos et al., 2000).

U Srbiji početkom sedamdesetih godina prošlog veka kada je benomil intenzivno korišćen za suzbijanje *C.beticola* došlo je do naglog razvoja rezistentnosti (Marić, 1976). Takvo stanje konstatovano je i 1991. godine kada se benzimidazoli nisu intenzivno koristili već je njihova upotreba bila ograničena na jedan tretman godišnje (Gavran, 1991). Komercijalne formulacije fungicida koje se danas koriste za suzbijanje *C. beticola* su dvojne formulacije benzimidazola i DMI fungicida. Rezultati ovog istraživanja ukazuju da se rezistentne populacije održavaju zahvaljujući upotrebi fungicida koji u svom sastavu sadrže neku od aktivnih materija iz grupe benzimidazola.

U Srbiji DMI fungicidi su u upotrebi od početka 80-tih godina. Marić i sar. (1981) su utvrdili visok stepen efikasnosti preparata iz grupe triazola. U narednom periodu zaštita šećerne repe od *C.beticola* zasnivala se na jednom tretmanu u toku godine sa benomilom, a ostala tretiranja su se izvodila sa DMI fungicidima i organo kalajnim preparatima (Gavran, 1991). Opsežnih ispitivanja osetljivosti populacija *C.beticola* prema DMI fungicidima u Srbiji do sada nije bilo. Trkulja i sar. (2008) su ukazali na postojanje smanjene osetljivosti *C. beticola* prema benzimidazolima i DMI fungicidima. Dobijeni rezultati ukazuju na postojanje rezistentnih populacija prema DMI fungicidima na poljima šećerne repe u Srbiji.

Obzirom da rezistentnost prema DMI fungicidima zavisi od promena na više gena (poligenetska rezistentnost). Dugotrajna upotreba DMI fungicida menja odnos rezistentnih i osetljivih populacija tako što rezistentna populacija postepeno raste i postaje dominantna. Dalja upotreba DMI fungicida bez primene antirezistentne strategije može indukovati drastično povećanje rezistentnih populacija *C. beticola* na poljima šećerne repe.

## ZAHVALNICA

Rad je realizovan u okviru Projekta TP 31018 Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije.

**LITERATURA**

- D'Ambra, V., Mutto, S., and Carula, G. (1974): Sensibilita e tolleranza di isolati di *Cercospora beticola* sensibili e tolleranti al benomyl. L'Industria Saccarifera Italiana No 1, 11-13.
- Gavran, S. M. (1991): Rezistentnost *Cercospora beticola* (Sacc.) na benzimidazole. Magistarska teza. Brograd.
- Georgopoulos, S. G., and Dovas, C. (1973): A serious outbreak of strains of *Cercospora beticola* resistant to benzimidazole fungicides in Northern Greece. Vol. 57, No.4 Plant disease reporter, 321:324.
- Georgopoulos, S. G. 1987. The development of fungicide resistance. Pages 239-251 in: Populations of plant pathogens: their dynamics and genetics. M. S. Wolfe, and C. E. Caten, eds. Blackwell Scientific Publications, Oxford, U.K.
- Giannopolitis, C. N. (1978): Occurrence of strains of *Cercospora beticola* resistant to triphenyltin fungicides in Greece. Plant Disease Reporter. No. 3. Vol. 62: 205-208.
- Karadimos, D.A., Ioannidis, P.I. and Thanassouloupoulos, C. C. (2000): The response of *Cercospora beticola* to benomyl. Phytopathol. Mediterr. 39 .329.
- Karaoglanidis, S, G., Ioannidis, P. M. and Thanassouloupoulos, C. C. (2000): Reduced sensitivity of *Cercospora beticola* isolates to sterol-demethylation-inhibiting fungicides. Plant Pathology 49, 567-572.
- Karaoglanidis, S. G., Menkissoglu-Spiroudi, U. I and Thanassouloupoulos, C. C. (2003): Sterol composition of DMI-resistant and sensitive field isolates of *Cercospora beticola*. J. Phytopathology 151, 431-435.
- Karaoglanidis, G. S., Karadimos, D. A., Ioannidis, P. M., and Ioannidis, P.I. (2003): Sensitivity of *Cercospora beticola* populations to fentin-acetate, benomyl and flutriafol in Greece. Crop Prot. 22: 735-740.
- Marić, A., Petrov, M. and Maširević, S. (1976): Pojava tolerantnosti kod *Cercospora beticola* Sacc. prema benomilu u jugoslaviji i mogućnosti suzbijanja ovog parazita. Zaštita bilja. Vol. XXVII (3-4), No. 137-138 (1976):227-236.
- Marić, A., Kosovac, V., Maširević, S. and Radulović, R. (1981): Efikasnost nekih fungicida u suzbijanju pegavosti lišća (*C. beticola*) i pepelnice (*E. Betae*) šećerne repe u mikro i makroogledima tokom 1981. godine. Jugoslovensko savetovanje o primeni pesticida. Zbornik radova. Opatija. 175-180.
- Russell, P. E. (2004): Sensitivity baselines in fungicide resistance research and management. Brussels: Global Crop Protection Federation FRAC Monograph No. 3, pp. 34-38.

- Ruppel, E. G. and Scott, P. R. (1974): Strains of *Cercospora beticola* resistant to benomyl in The U.S.A. Plant Disease Reporter 58: 434-436.
- Shane, W. W. and Teng, P. S. (1992): Impact of *Cercospora* Leaf spot on root weight, sugar yield, and purity of Beta vulgaris. Plant Disease. No. 8. Vol. 76: 812-820.
- Solel, Z. (1970): The systemic fungicidal effect of benzimidazole derivatives and thiophanate against *Cercospora* leaf spot of sugar beet. Phytopathology 60: 1186-1190.
- Trkulja, N., Živković, S., Ivanović, Žarko., Dolovac, N., Starović, M., and Vukša, P. (2008): Osetljivost izolata *Cercospora beticola* (Sacc.) na karbendazim i flutriafol. IX Savetovanje o zaštiti bilja. Zlatibor 24- 28. 11. 2008.
- Weiland, J.J. (2000): A survey for the prevalence and distribution of *Cercospora beticola* to triphenyltin hydroxide and mancozeb and resistant to thiophanate methyl in 2000. USDA, Agricultural research service. Northern Crop Science Laboratory.
- Weiland, J. J., and Halloin, J. M. (2001): Benzimidazole resistance in *Cercospora beticola* sampled from sugarbeet fields in Michigan, U.S.A. Can. J. Plant Pathol. 23: 78-82.
- Wolf, P.F.J. and Werreet, J.A. (2004): Factors affecting the onset *Cercospora* leaf spot epidemics in sugar beet and establishment of disease-monitoring thresholds. Phytopathology 95:269-274.

(Primljeno: 04.08.2011.)

(Prihvaćeno: 22.08.2011.)



## **FREQUENCY OF RESISTANCE *CERCOSPORA BETICOLA* (SACC.) POPULATIONS TO BENZIMIDAZOLE AND DMI FUNGICIDES**

NENAD TRKULJA\*, NENAD DOLOVAC, ERIKA PFAF-DOLOVAC,  
ŽARKO IVANOVIĆ, SVETLANA ŽIVKOVIĆ

Institute for Plant Protection and Environment, Belgrade, Serbia  
\*e-mail: trkulja\_nenad@yahoo.com

### **SUMMARY**

*Cercospora* leaf spot is the most important disease that occurs on sugar beet in the world. Damages caused by this disease can reduce yields up to 50 %. Resistance to the group of benzimidazole fungicide was determined in 1976. Last twenty years their use has been reduced but they're still used, mainly formulated in mixture with fungicides - sterol demethylation inhibitors (DMI). Sterol demethylation inhibitors (DMI) have been used extensively in the last two decades to control *C. beticola* in the world, and resistance to them was observed in 2000.

The results showed that populations of *C. beticola* resistant to benzimidazole are present in sugar beet fields and are the dominant population, with the prevalence of resistance 83.87 - 94.28 %. The frequency of resistance to DMI fungicides is smaller, but highly significant and amounts to 12.90 - 14.29 %.

*Key words:* *Cercospora beticola*, fungicides, benzimidazoles, DMI, resistance.

(Received: 04.08.2011.)

(Accepted: 22.08.2011.)