

Zaštita bilja

UDK: 633.63-24 (497.11)

632.952

Vol. 60 (4), № 270, 237-245, 2009, Beograd

Naučni rad

OSETLJIVOST IZOLATA *CERCOSPORA BETICOLA* PREMA KARBENDAZIMU I FLUTRIAFOLU U SRBIJI

NENAD TRKULJA, GORAN ALEKSIĆ, MIRA STAROVIĆ, NENAD DOLOVAC,
ŽARKO IVANOVIĆ, SVETLANA ŽIVKOVIĆ
Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd

Ispitivana je osetljivost izolata *Cercospora beticola* (Sacc.), prouzrokovala pegavosti lišća šećerne repe iz 11 lokaliteta u Srbiji prema karbendazimu (grupa benzimidazola) i flutriafolu (grupa triazola DMI) tokom 2007. godine. Uzorkovanje je obavljeno tokom avgusta meseca. Za ispitivane izolate izračunate su srednje efektivne koncentracije (EC_{50}), relativna osetljivost (b) i nivo rezistentnosti (NR) u odnosu na najosetljiviji izolat, po metodi Karaoglanidis i sar. (2000). Dobijeni rezultati su potvrdili već ranije dokazanu rezistentnost izolata *C. beticola* poreklom iz Srbije na karbendazim, ali po prvi put i značajno smanjenu osetljivost izolata poreklom iz Erdevika i Maradika prema flutriafolu.

Ključne reči: *Cercospora beticola*, karbendazim, flutriafol, smanjenja osetljivost.

UVOD

Pegavost lišća koju prouzrokuje *Cercospora beticola* (Sacc.) je najznačajnija bolest koja se javlja na šećernoj repi (Weiland i Koch 2004). Ukoliko se ne vrši adekvatna zaštita, štete mogu značajno smanjiti kvalitet i prinos (25-50%) korena šećerne repe (Byford 1996; Shane i Teng 1992).

Zaštita useva šećerne repe u početku se vršila protektivnim fungicidima kao što su organska jedinjenja kalaja (fentin hidroksid i fentin acetat), ditiokarbamati (maneb, mankozeb). Organo kalajna jedinjenja inhibiraju klijanje spora i delimično respiraciju. Pored protektivne aktivnosti imaju i određenu kurativnu.

Rad je realizovan u okviru Projekta 20051 Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije.

Tokom dugogodišnje primene dokazana je smanjena osetljivost *C. beticola* na fentin hidroksid i fentin acetat (Giannopilitis, 1978; Bugbee, 1995; Weiland, 2000).

Fungicidi sa nespecifičnim dejstvom deluju na više procesa ili mesta u ćeliji i obično imaju protektivnu nesistemičnu aktivnost. Dejstvo ovih fungicida uglavnom je usmereno na sprečavanje klijanja spora. Ovi fungicidi se zato uglavnom primanjuju pre ostvarenja infekcije i predstavljaju barijeru između biljke i gljive. Rizik za razvoj rezistentnosti prema ovim fungicidima je mali ili ga uopšte nema (Nene i Thapliyal, 1994).

Ranih sedamdesetih godina prošlog veka u primenu se uvode benzimidazoli (benomil i karbendazim) koji su sistemični fungicidi i imaju specifično mesto delovanja. Oni se vezuju za tubulin strukturni protein mikrotubula deobnog vretena koji se sastoji od dve podjedinice α i β čime sprečavaju njihovo izduživanje i formiranje deobnog vretena, što rezultira opstrukcijom deobe ćelija u procesu mitoze. Istraživanja su pokazala da se rezistentni patotipovi na benzimidazole ne javljaju u prirodi bez selekcionog pritiska fungicida, ali se pod njegovim uticajem rezistentna populacija razvija progresivno. Rezistentnost na benzimidazole razvija se brzo i kvalitativnog je tipa, odnosno, zvisi od monogenske mutacije (Damicone, 2006).

Nakon benzimidazola u primenu se uvode i inhibitori sinteze ergosterola (DMI) fungicidi. Oni deluju specifično putem inhibicije citohroma P-450 od koga zavisi aktivnost 14 α -demetilaze sterola, odnosno C-14 demetilacija. Rezistentnost na DMI fungicide razvija se postepeno tokom dužeg perioda primene, što u početku otežava razlikovanje rezistentnih i osetljivih populacija. Promene u osetljivosti karakterišu se kao kvantitativne (poligenske) te stoga efikasnost fungicida iz ove grupe zadržava zadovoljavajuću efikasnost duži vremenski period (Karaoglanidis i sar., 2003).

U Grčkoj DMI fungicidi, bitertanol i nuarimol su u primeni od 1979. godine. Upotreba ove dve aktivne materije je stopirana 1990. godine, ali se od 1985. godine u primenu uvodi flutriafol, a 1992. godine još jedna aktivna materija iz ove grupe, difenokonazol. Ovi fungicidi su uglavnom primenjivani u mešavini sa protektivnim fungicidima, manebom i hlorotalonilom. Brown i Waller (1986) su ispitivali efikasnost flutriafola na nekoliko lokaliteta u Francuskoj. Dobijeni rezultati ispoljili su visok nivo efikasnosti, dug period perzistentnosti kao i na eradikativnu aktivnost flutriafola pri suzbijanju *C. beticola*.

Od 1995. godine došlo je do opadanja efikasnosti DMI fungicida u nekim delovima Grčke. Karaoglanidis i sar. (2000) su u laboratorijskim uslovima utvrdili pojavu rezistentnosti *C. beticola* prema DMI fungicidima.

U našim uslovima od 1991. godine, kada je utvrđena rezistentnost *C. beticola* prema benzimidazolima (Gavran, 1991), nema podataka o osetljivosti na

ove fungicide, iako je primena nekih aktivnih materija iz ove grupe i dalje nastavljena. Balaž i sar. (1999) nisu dokazali smanjenu osetljivost izolata *C. beticola* prema flutriafolu testirajući izolate tokom 1994. godine sa područja Vojvodine.

Cilj ovog rada je da se proveri postojeća osetljivost populacija *C. beticola* prema benzimidazolima i DMI fungicidima u važnijim lokalitetima gajenja šećerne repe u Srbiji.

MATERIJAL I METODE

Prikupljanje uzoraka

Uzorci su prikupljeni iz jedanaest lokaliteta (Crvenka, Erdevik 1,2, Bečej 1,2, Padinska Skela, Maradik, Negotin 1,2 i Loznica 1,2). Sa lokaliteta Crvenka, Erdevik, Bečej, Padinska Skela i Maradik uzorci su uzimani tokom avgusta 2007. godine sa polja šećerne repe, a sa lokaliteta Negotin i Loznica iz useva cvekle. Uzimani su mladi listovi sa aktivnim pegama *C. beticola* i pakovani u papirne kese. Zatim je lišće prenošeno u laboratoriju Instituta za zaštitu bilja i životnu sredinu i dalje obrađivano.

Izolacija patogena

Izolacija patogena obavljena je po metodi koju su opisali Karaoglanidis i sar., (2000). Vrhom igle iz jedne pege prenošena je po jedne konidija *C. beticola* u Petri šolju sa KDA podlogom. Inkubacija je vršena dva dana u tami na temperaturi 25°C. Nakon dva dana kolonije su prenošene na svežu KDA podlogu gde su inkubirane deset dana pod istim uslovima. Kolonije su zatim korišćene za dalja ispitivanja. Ukupno je izolovano po deset izolata iz svih lokaliteta.

Testovi osetljivosti

Fungicidi koji su bili korišćeni za ispitivanje osetljivosti *C. beticola* su karbendazim iz grupe benzimidazola, a flutriafol iz grupe triazola (DMI). Pripremana su razređenja fungicida koja su dodavana u KDA podlogu ohlađenu do 50°C. Raspon koncentracija za karbendazim bio je 1, 10, 100, 1000, 2000, 4000, 8000 i 12000 µg/ml, dok su koncentracije za flutriafol bile 0.10, 0.25, 0.50, 1.0, 2.0 i 4.0 µg/ml. Koncentracije 8.0 µg/ml i 16.0 µg/ml korišćene su za test najmanje osetljivosti (Karaoglanidis i sar., 2000). Kontrole su bile Petri šolje sa KDA podlogom u koje nije dodavan fungicid već destilovana voda. Uz pomoć bušača isecani su sa ivice kolonije krugovi micelije prečnika 5mm i prenošeni u Petri

šolje sa ili bez fungicida. Nakon sedam dana inkubacije, u tami na 25°C, meren je porast kolonija oduziman za početni prečnik isečka. Ogledi su postavljeni u četiri ponavljanja.

Obrada podataka

Izračunavana je srednja efektivna koncentracija koja inhibira porast micelije za 50% EC_{50} za sve ispitivane izolate (110). Zatim je EC_{50} najosetljivijeg izolata korišćena za izračunavanje nivoa osetljivosti. Za sve izolate izračunate su vrednosti EC_{50} , relativni pokazatelj nivoa osetljivosti (b) i nivo rezistentnosti.

REZULTATI

Osetljivost izolata prema karbendazimu

Izolati su pokazali veoma nizak nivo osetljivosti prema karbendazimu. Samo jedan izolat Negotin-2 pokazao je značajnu osetljivost na karbendazim, njegova vrednost EC_{50} bila je 3.4 $\mu\text{g/ml}$. Za ostale izolate vrednosti EC_{50} su bile 3381.3 – 11913.8. Vrednosti EC_{50} su bile ujednačene za sve izolate iz istih lokaliteta. U tabeli 1 i 2, prikazane su vrednosti za izolate sa najmanjom osetljivošću. Koeficijent osetljivosti (b) za najosetljiviji izolat Negotin-2 bio je 3.32. Vrednost EC_{50} za izolat iz Bečaja koji je ispoljio najmanju osetljivost je 11913.8, a koeficijent osetljivosti $b=0.22$. Vrednost EC_{50} osetljivog izolata iz Negotina korišćena je za izračunavanje nivoa osetljivosti za karbendazim. Nivoi osetljivosti dobijeni su stavljanjem u odnos EC_{50} određenog izolata sa vrednošću EC_{50} najosetljivijeg izolata (Negotin = 3.4).

Osetljivost izolata prema flutriafolu

U devet lokaliteta od ukupno testiranih 11 dokazana je visoka osetljivost na flutriafol. Izolati poreklom iz Erdevika i Maradika ispoljili su smanjenu osetljivost prema flutriafolu. Najniži nivo osetljivosti na flutriafol pokazao je izolat iz Erdevika $EC_{50} = 8.25 \mu\text{g/ml}$, a koeficijent osetljivosti $b = 0.75$. Takođe sanjenu osetljivost imao je i izolat iz Maradika $EC_{50} = 7.99 \mu\text{g/ml}$, koeficijent osetljivosti $b = 0.84$. Slične vrednosti ispoljili su i ostali izolati iz ovih lokaliteta. Izolat sa najvećom osetljivošću izolovan sa lokaliteta Crvanke imao je $EC_{50} = 0.24$, a koeficijent osetljivosti $b = 1.61$. Za ostale izolate srednja efektivna koncentracija je bila u intervalu 0.25 - 1.39 $\mu\text{g/ml}$, a koeficijent osetljivosti 0.68 - 1.43.

Tabela 1 - Osetljivost izolata *C. beticola* na karbendazim. ^a**Table 1** - Sensitivity of *C. beticola* isolates to carbendazime. ^a

Br. izolata No of isolates	Lokalitet Locality	EC ₅₀ ^b	b ^c	NR ^d
1.	Crvenka	4085.5	0.15	1201.6
2.	Erdevik-1	4010.3	0.14	1179.5
3.	Erdevik-2	4129.8	0.22	1214.6
4.	Bečej-1	4899.2	0.21	1440.9
5.	Bečej-2	11913.8	0.22	3504.0
6.	Pad. Skela	4855.4	0.18	1428.0
7.	Maradik	5883.1	0.25	1730.3
8.	Loznica-1	7047.3	0.17	2072.7
9.	Loznica-2	3381.3	0.19	994.5
10.	Negotin-1	9357.5	0.23	2752.2
11.	Negotin-2	3.4	3.32	1.0

a Obračun urađen po metodi koju su primenili Karaoglanidis i sar. (2000) – Calculation done by the method which was applied by Karaoglanidis et al. (2000).

b Srednje efektivne koncentracije – Medium effective concentration.

c Relativna osetljivost – Relative sensitivity.

d Nivo osetljivosti u odnosu na izolat Negotin-2 – Resistance level in relation to isolate Negotin-2.

Tabela 2 - Osetljivost izolata *C. beticola* na flutriafol.**Table 2** - Sensitivity of *C. beticola* isolates to flutriafole.

Br. izolata No of isolates	Lokalitet Locality	EC ₅₀ ^b	b ^c	NR ^d
1.	Crvenka	0.24	1.61	1.0
2.	Erdevik-1	0.29	1.39	1.2
3.	Erdevik-2	8.25	0.75	34.3
4.	Bečej-1	0.39	1.0	1.6
5.	Bečej-2	0.51	1.36	2.1
6.	Pad. Skela	0.40	1.30	1.6
7.	Maradik	7.99	0.84	33.2
8.	Loznica-1	0.47	0.69	1.9
9.	Loznica-2	0.32	0.68	1.3
10.	Negotin-1	0.25	1.43	1.0
11.	Negotin-2	1.39	1.12	5.7

a Obračun urađen po metodi koju su primenili Karaoglanidis i sar. (2000) – Calculation done by the method which was applied by Karaoglanidis et al. (2000).

b Srednje efektivne koncentracije – Medium effective concentration.

c Relativna osetljivost – Relative sensitivity.

d Nivo osetljivosti u odnosu na izolat Negotin-2 – Resistance level in relation to isolate Negotin-2.

DISKUSIJA

Prva pojava rezistentnosti populacija *C. beticola* prema fungicidima konstatovana je u Grčkoj (Georgopoulos i Dovas, 1973), samo dve godine nakon intenzivne primene benzimidazola zaštiti šećerne repe od prouzrokovala pegavosti lišća. Početni nivo efikasnosti primene benzimidazola bio je izuzetno visok, da bi naglo došlo do njegovog smanjivanja kada su se koristili više puta u vegetaciji.

Pojava rezistentnosti utvrđena je i u drugim delovima sveta gde se za suzbijanje *C. beticola* koristio benomil. Ruppel i Scott su (1974) su utvrdili pojavu rezistentnosti na benomil u svim regionima gde se gaji šećerna repa u SAD.

Kod nas je benomil počeo intenzivno da se koristi 1971. godine. Već tokom 1974. i 1975. godine na nekoliko lokaliteta konstatovan je slab efekat zaštite na njivama na kojima se za zaštitu koristio benomil i do tri puta uzastopno. Potvrdu da se radi o rezistentnosti dali su Marić i sar., (1976) nakon provere osetljivosti izolata uzetih sa polja šećerne repe tokom 1974-1975 i Gavran (1991) u periodu od 1986-1991. Vrednosti EC_{50} karbendazima za ispitivane izolate *C. beticola* dobijene pre dvadeset godina, ukazuju na činjenicu da su se one kretale u najvećem broju slučajeva do 10 $\mu\text{g/ml}$, a da su samo pojedinačni izolati u okviru svih ispitivanih lokaliteta ispoljavali EC_{50} prema karbendazimu više hiljada $\mu\text{g/ml}$. U narednom periodu benomil se koristio u kombinaciji sa organokalajnim jedinjenjima, da bi se smanjio selekcion pritisak na rezistentne populacije. Ovaj vid zaštite se ispoljio kao neefikasan, jer je rezistentna populacija *C. beticola* i dalje prisutna u svim ispitivanim lokalitetima.

Međutim, neki preparati koji se i danas koriste za zaštitu šećerne repe za suzbijanje *C. beticola* sadrže aktivne materije iz grupe benzimidazola. Dobijeni rezultati ukazuju da se rezistentne populacije održavaju u prirodi zahvaljujući preparatima koji u svom sastavu sadrže benzimidazole.

Kod nas DMI fungicidi su u upotrebi od početka 80-tih godina. Marić i sar., (1981) utvrdili su visok stepen efikasnosti preparata iz grupe triazola, kao što su bitertanol i nuarimol. 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 organokalajnim preparatima (Gavran, 1991). Opsežnijih ispitivanja osetljivosti populacija *C. beticola* prema DMI fungicidima do sada nije bilo. Balaž i sar. (1999) su testirajući osetljivost uzoraka *C. beticola* iz različitih lokaliteta iz Vojvodine prema flutriafolu utvrdili da se njihove EC_{50} kreću ispod 1 $\mu\text{g/ml}$, a nivo rezistentnosti od 1 do 1.4. Noviji rezultati iz 2008. godine ukazuju da je u nekim lokalitetima utvrđena smanjena osetljivost populacija *C. beticola* prema DMI fungicidima (Trkulja i sar., 2008). U ovom radu navedeni rezultati su potvrđeni i ukazuju na visoke vrednosti EC_{50} flutriafola

prema izolatima poreklom iz Erdevika (8.25 µg/ml) i Maradika (7.00 µg/ml) koji su i potvrđeni rezultatima prikazanim u ovom radu. Izolati iz ova dva lokaliteta su ispoljila visok nivo rezistentnosti 34, odnosno 33, pa bi se po kriterijumima Karaoglanidisa i Thanassouloupoulos-a (2003) mogli svrstati u rezistentne izolote, jer su ispoljili NR preko 10, dok bi se po kriterijumima Leroux-a (1984), ovi izolati svrstali u osetljive (NR<50).

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 u našoj zemlji. Ovim radom želeli smo da skrenemo pažnju na takve moguće posledice.

LITERATURA

- Balaž, F., Stojšin, Vera, Gavran-Starović, Mira. (1999): Osetljivost izolata *Cercospora beticola* (Sacc.) na području Vojvodine prema nekim fungicidima. Pesticidi, 14: 514.
- Brown, M. C., Waller, C.D. (1986): The use of flutriafol based fungicides for the control of sugar beet diseases in Europe. In 1986 British Crop Protection Conference. Pests and Diseases. Vol. 3: 1055-1061.
- Bugbee, W.M. (1995): *Cercospora beticola* tolerant to triphenyltin hydroxide. J. Sugarbeet Res. 32: 167-174.
- Byford, W.J. (1996): A survey of foliar diseases of sugar beet and their control in Europe. In Proceedings of the 59th NRB Congress. Brouseles: International Institute for Beet Research, pp:1-10.
- Damicone, J. (2003): Fungicide resistance management OSU (Oklahoma State University) F-7663: 1-6.
- Gavran-Starović, Mira. (1991): Rezistentnost *Cercospora beticola* (Sacc.) na benzimidazole. Magistarska teza. Poljoprivredni fakultet, Brograd-Zemun.
- Georgopoulos, S.G., Dovas, C. (1973): A serious outbreak of strains of *Cercospora beticola* resistant to benzimidazole fungicides in Northern Greece. Vol. 57, N° 4 Plant Disease Reporter, 321: 324.
- Giannopolitis, C.N. (1978): Occurrence of strains of *Cercospora beticola* resistant to triphenyltin fungicides in Greece. Plant Disease Reporter. N° 3, Vol. 62: 205-208.
- Karaoglanidis, S.G., Ioannidis, P.M., Thanassouloupoulos, C.C. (2000): Reduced sensitivity of *Cercospora beticola* isolates to sterol-demethylation-inhibiting fungicides. Plant Pathology 49: 567-572.

- Karaoglanidis, S.G., Thanassoulopoulos, C.C. (2003): Cross-resistance patterns among sterol biosynthesis inhibiting fungicides (SBIs) in *Cercospora beticola*. European Journal of Plant Pathology, 109: 929-934.
- Karaoglanidis, S.G., Menkissoglu-Spiroudi, U., Thanassoulopoulos, C.C. (2003): Sterol composition of DMI-resistant and sensitive field isolates of *Cercospora beticola*. J. Phytopathology 151: 431-435.
- Marić, A., Petrov, Mirjana, Maširević, S. (1976): Pojava tolerantnosti kod *Cercospora beticola* Sacc. prema benomilu u Jugoslaviji i mogućnosti suzbijanja ovog parazita. Zaštita bilja, Vol. XXVII (3-4), N° 137-138: 227-236.
- Marić, A., Kosovac, V., Maširević, S., Radulović, R. (1981): Efikasnost nekih fungicida u suzbijanju pegavosti lišća (*C. beticola*) i pepelnice (*E. betae*) šećerne repe u mikro i makro ogledima tokom 1981. godine. Jugoslovensko savetovanje o primeni pesticida. Zbornik radova. Opatija. 175-180.
- Nene, Y.L., Thapliyal, P.H. (1994): Fungicides in plant disease control. Third edition.
- Ruppel, E.G., 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., Teng, P.S. (1992): Impact of *Cercospora* Leaf spot on root weight, sugar yield, and purity of *Beta vulgaris*. Plant Disease. N° 8, Vol. 76: 812-820.
- Trkulja, N., Živković, Svetlana, Ivanović, Ž., Dolovac, N., Starović, Mira, Vukša, P. (2008): Osetljivost izolata *Cercospora beticola* (Sacc.) prema flutriafolu u Vojvodini. IX savetovanje o zaštiti bilja, Zlatibor, 24-28 novembar, 2008. Zbornik rezimea, 66-67.
- Weiland, J.J. (2000): A survey for the prevalence and distribution of *Cercospora beticola* to triphenyltin hydroxide and mancozeb and resistant to thiophonate methyl in 2000. USDA, Agricultural research service. Northern Crop Science Laboratory.
- Weiland, J., Koch, G. (2004): Sugarbeet spot disease (*Cercospora beticola* Sacc.). Molecular Plant Pathology. 5 (3), 157-166

(Primljeno: 22.01.2010.)

(Prihvaćeno: 05.03.2010.)

**SENSITIVITY OF *CERCOSPORA BETICOLA* ISOLATES TO
CARBENDAZIME AND FLUTRIAFOL IN SERBIA**

NENAD TRKULJA, GORAN ALEKSIĆ, MIRA STAROVIĆ, NENAD DOLOVAC,
ŽARKO IVANOVIĆ, SVETLANA ŽIVKOVIĆ
Institut for Plant Protection and Environment, Belgrade, Serbia

SUMMARY

The sensitivity of 110 *Cercospora beticola* (Sacc.) isolates to carbendazime (benzimidazoles) and flutriafol (triazole DMI) was investigated. Isolates on PDA were obtained from diseased sugar leaves collected in 11 localities in Serbia during the August 2007. The medium effective concentration (EC_{50}), the relative sensitivity (b) and the level of resistance (NR) in relation to the most sensitive isolate were calculated the method applied by Karaoglanidis et al. (2000). The obtained results confirmed already resistance of Serbian isolates of *C. beticola* to carbendazime, but for the first time isolates from Erdevik and Maradik showed a significantly decreased sensitivity to flutriafol.

Key words: *Cercospora beticola*, carbendazime, flutriafol, reducing sensitivity .

(Received: 22.01.2010.)

(Accepted: 05.03.2010.)