

Fungicide resistance of *Rhizoctonia cerealis* isolates

Odporność na fungicydy izolatów *Rhizoctonia cerealis*

Katarzyna Pieczuł, Ilona Świerczyńska

Summary

Sharp eyespot caused by *Rhizoctonia cerealis* is a common disease of cereals in Poland. *R. cerealis* is considered a weak pathogen, but under favourable conditions the incidence of the disease increases. The pathogen control is performed with fungicides used against other stem base diseases. The aim of the study was to evaluate the resistance level of *R. cerealis* isolates to selected fungicides that are used in the cereal crop protection. Cyproconazole and pyraclostrobin were fungicides that highly limited growth of the examined isolates. The group of the fungicides well-inhibiting growth of *R. cerealis* includes: epoxiconazole, flusilazole, tebuconazole, tetraconazole, azoxystrobin, carbendazim and next kresoxim-methyl and phenpropimorph. Most of the tested isolates were resistant to thiophanate-methyl, cyprodinil and prochloraz. The results indicate the possibility of effective control of *R. cerealis* by fungicides used for protection of other stem base diseases.

Key words: sharp eyespot; *Rhizoctonia cerealis*; fungicide resistance

Streszczenie

Grzyb *Rhizoctonia cerealis* wywołujący ostrą plamistość oczkową jest częstym patogenem zbóż w Polsce. *R. cerealis* uważany jest za słabego patogena, lecz w sprzyjających warunkach występowanie choroby wzrasta. Grzyb zwalczany jest przy użyciu fungicydów stosowanych do ochrony upraw zbóż przed innymi patogenami podstawy źdźbła. Celem badań była ocena odporności izolatów *R. cerealis* na wybrane fungicydy stosowane w ochronie zbóż. Do związków bardzo dobrze ograniczających wzrost badanych izolatów zaklasyfikowane zostały cyprokonazol i piraklostrobina, do grupy dobrze hamującej wzrost *R. cerealis*: epoksykonazol, flusilazol, tebukonazol, tetrakonazol, azoksystrobina, karbendazym, następnie krezoksym metylu i fenpropimorf. Większość badanych izolatów *R. cerealis* była odporna na tiofanat metylu, cyprodinil i prochloraz. Wyniki wskazują na możliwość skutecznego ograniczania *R. cerealis* fungicydami przeznaczonymi do zwalczania innych chorób podstawy źdźbła.

Słowa kluczowe: ostra plamistość oczkowa; *Rhizoctonia cerealis*; odporność na fungicydy

Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy
Zakład Mikologii
Władysława Węgorka 20, 60-318 Poznań
k.pieczul@iorpib.poznan.pl

Wstęp / Introduction

Grzyb *Rhizoctonia cerealis* v.d. Hoeven (st. dosk. *Ceratobasidium cereale* Murray et Burpee) wywołujący ostrą plamistość oczkową jest częstym patogenem zbóż ozimych, głównie pszenicy i pszenżyta. Patogen może porażać także inne gatunki zbóż oraz traw, m.in. wykorzystywane do produkcji nawierzchni sportowych (Burpee 1980). Charakterystyczne objawy chorobowe w postaci jasnych, soczewkowatych plam z ciemną obwódką występują na pochwach i źdźbłach dolnych międzywęźli. *R. cerealis* uważany był dotychczas za słabego patogena zbóż. Pojawia się on jednak corocznie, a w sprzyjających warunkach częstotliwość jego występowania wzrasta. Nowsze doniesienia wskazują na wzrost znaczenia tego patogena w ostatnich 10 latach w Polsce oraz innych państwach (Clarkson i Cook 1983; Tunali i wsp. 2008; Hamada i wsp. 2011a; Lemańczyk 2012; Lemańczyk i Kwaśna 2013). Rozwojowi patogena sprzyja niska temperatura powietrza (16–20°C) oraz mała ilość opadów (Hamada i wsp. 2011a). Patogen może przetrwać jako grzybnia w szczątkach roślin lub w postaci sklerocjów w glebie. *R. cerealis* nie wytwarza zarodników konidialnych, a stadium doskonale grzyba rzadko obserwowane jest w warunkach naturalnych (Clarkson i Cook 1983; Hamada i wsp. 2011a).

W Polsce grzyb zwalczany jest przy użyciu środków stosowanych do ochrony upraw zbóż przed groźniejszymi patogenami podstawy źdźbła – *Fusarium* spp. (fuzaryjna zgorzel podstawy źdźbła i korzeni) oraz *Oculimacula* spp. (łamlliwość źdźbła zbóż). Do zwalczania wymienionego kompleksu chorób wykorzystywane są fungicydy o szerokim spektrum grzybobójczym z grup: benzimidazoli, triazoli, strobiluryn, morfolin i pirymidyn.

Celem badań była ocena odporności izolatów *R. cerealis* na wybrane fungicydy stosowane w zwalczaniu chorób zbóż.

Materiały i metody / Materials and methods

Izolaty. Porażone rośliny zbierane były w latach 2006–2012 na polach doświadczalnych i hodowlanych w Winnej Górze, Baborówku i Pawłowicach oraz na polach rolników indywidualnych zlokalizowanych głównie na terenie Wielkopolski. Próby pochodziły z naturalnie porażonych zbóż: pszenicy, pszenżyta i jęczmienia. Izolacje kultur grzybów dokonywano ze świeżego materiału roślinnego. Niewielkie fragmenty łodyg z objawami ostrej plamistości oczkowej odkażano powierzchniowo przez 40 sekund w wybielaczu ACE (< 5% roztwór podchlorynu sodu, Procter & Gamble), płukano dwukrotnie w sterylnej wodzie destylowanej, suszono i wykładano na pożywkę PDA (Potato Dextrose Agar, Difco). Wzrastające, pojedyncze kolonie o cechach morfologicznych *R. cerealis* przeszczepiano na nową pożywkę PDA. Izolaty zostały zidentyfikowane jako *R. cerealis* na podstawie liczby jąder komórkowych (gatunek dwujądrowy) wybarwionych zasadową safraniną.

Badania odporności na substancje czynne fungicydów.

Do badań odporności na fungicydy wytypowano 47 izolatów *R. cerealis*. Badania wykonano na pożywce PDA zawierającej dodatek czystych substancji czynnych (Sigma). Substancje czynne zostały rozpuszczone w metanolu w stężeniu 5 mg/ml. Do pożywki dodawano taką ilość roztworu, aby uzyskać końcowe stężenie fungicydu 1, 3 i 10 ppm. Na pożywkę zaszczipiano niewielki fragment pobrany z dwutygodniowej grzybni rosnącej na pożywce PDA bez dodatku fungicydu. Kontrolę stanowiły kolonie grzyba rosnące na pożywce PDA (bez substancji czynnych). W badaniach wykorzystano następujące substancje czynne: karbendazym, tiofanat metylu (benzimidazole), prochloraz (imidazol), cyprokonazol, epoksykonazol, flusilazol, tebukonazol, tetrakonazol (triazole), fenpropimorf (morfolina), azoksystrobinę, krezoksym metylu, piraklostrobinę (strobiluryny) oraz cyprodinil (anilino-pirymidyna). Po 5 dniach inkubacji w temperaturze pokojowej mierzono wzrost liniowy wszystkich izolatów, oznaczając go w skali 0–4 wyrażającej stosunek wielkości wzrostu kolonii rosnącej na podłożu z substancją czynną do kolonii kontrolnej rosnącej na czystej pożywce PDA. W badaniach przyjęto następujące oznaczenia 0 – izolaty bardzo wrażliwe, brak wzrostu, 1 – wrażliwe (1–20% wzrostu w stosunku do średnicy kolonii kontrolnej), 2 – średnio wrażliwe (21–50%), 3 – odporne (51–80%), 4 – wysoce odporne (> 81%). Do porównania średniego stopnia odporności izolatów na badane fungicydy zastosowano analizę wariancji i wielokrotny test Tukeya przy poziomie istotności 0,05.

Wyniki i dyskusja / Results and discussion

W przeprowadzonej analizie statystycznej zbadano jednorodność wariancji badanych fungicydów. Z badania jednorodności wariancji (test Bartletta chi-kwadrat = 15,755, df = 11, p = 0,15) stwierdzono, że wariancje są jednorodne. Z przeprowadzonej analizy wariancji (test F = 6,731, df = 12 i 26, p < 0,001) wynika istotne różnicowanie średnich wartości odporności izolatów *R. cerealis* na badane substancje (tab. 1). Większość badanych izolatów *R. cerealis* była wysoce odporna na tiofanat metylu (100%) i cyprodinil (100–85,4%) dodane do pożywki w stężeniu 1, 3 oraz 10 ppm (średnie stopnie odporności 4 i 3,895) (tab. 1). Karbendazym dobrze ograniczał wzrost badanych izolatów (średni stopień odporności 1,694), lecz w dawce wyższej niż 1 ppm. Wśród izolatów *R. cerealis* nie zidentyfikowano szczepów odpornych na triazole w stężeniu przekraczającym 1 ppm. Do triazoli charakteryzujących się najwyższą skutecznością ograniczania wzrostu izolatów *R. cerealis* należał cyprokonazol (średni stopień odporności 0,409), następnie epoksykonazol, tebukonazol, flusilazol i tetrakonazol (średnie stopnie odporności: 1,0347; 1,097; 1,583 i 1,687) (tab. 1). Poza Polską triazole należą do środków często stosowanych w zwalczaniu ostrej plamistości oczkowej. Doniesienia wskazują na ich dużą skuteczność w ograniczaniu rozwoju patogena oraz brak nabywania na nie odporności (Kataria i Gisi 1989; Kataria i wsp. 1991;

Tabela 1. Stopień odporności izolatów *R. cerealis* na fungicydy i wyniki testu Tukeya dla $\alpha = 0,05$
 Table 1. Resistance level of *R. cerealis* isolates to fungicides and Tukey's test results for $\alpha = 0.05$

Fungicyd Fungicide	Stężenie fungicydu The fungicide concentration [ppm]	Izolaty – Isolates [%]					Średni stopień odporności izolatów Mean resistance level of isolates	
		stopień odporności – resistance level						
		0	1	2	3	4		
Carbendazim	1	0,0	0,0	0,0	8,3	91,7	3,92	1,694 (bc)*
	3	6,3	75,0	18,8	0,0	0,0	1,13	
	10	97,9	0,0	2,1	0,0	0,0	0,04	
Tiophanate-methyl	1	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	4,00	4,000 (e)
	3	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	4,00	
	10	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	4,00	
Prochloraz	1	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	4,00	3,319 (de)
	3	0,0	0,0	0,0	37,5	62,5	3,63	
	10	0,0	4,2	58,3	37,5	0,0	2,33	
Cyproconazole	1	16,7	75,0	8,3	0,0	0,0	0,92	0,409 (a)
	3	68,8	31,3	0,0	0,0	0,0	0,31	
	10	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0	
Epoxiconazole	1	2,1	43,8	54,2	0,0	0,0	1,52	1,034 (abc)
	3	12,5	56,3	31,3	0,0	0,0	1,19	
	10	64,6	31,3	4,2	0,0	0,0	0,40	
Flusilazole	1	0,0	0,0	45,8	52,1	2,1	2,56	1,583 (abc)
	3	0,0	64,6	33,3	2,1	0,0	1,38	
	10	25,0	68,8	6,3	0,0	0,0	0,81	
Tebuconazole	1	0,0	45,8	47,9	6,3	0,0	1,60	1,097 (abc)
	3	8,3	75,0	16,7	0,0	0,0	1,08	
	10	41,7	56,3	2,1	0,0	0,0	0,60	
Tetraconazole	1	0,0	2,1	45,8	50,0	2,1	2,52	1,687 (abc)
	3	0,0	66,7	31,3	2,1	0,0	1,35	
	10	6,3	70,8	20,8	2,1	0,0	1,19	
Phenpropimorph	1	4,2	31,3	4,2	4,2	56,3	2,77	2,222 (cd)
	3	4,2	33,3	8,3	33,3	20,8	2,33	
	10	16,7	31,3	33,3	16,7	2,1	1,56	
Azoxystrobin	1	33,3	4,2	8,3	54,2	0,0	1,83	1,534 (abc)
	3	41,7	8,3	8,3	41,7	0,0	1,50	
	10	41,7	10,4	27,1	20,8	0,0	1,27	
Kresoxim-methyl	1	14,6	2,1	10,4	72,9	0,0	2,42	2,104 (cd)
	3	18,8	6,3	20,8	54,2	0,0	2,10	
	10	29,2	8,3	16,7	45,8	0,0	1,79	
Pyraclostrobin	1	12,5	56,3	31,3	0,0	0,0	1,19	0,784 (ab)
	3	39,6	60,4	0,0	0,0	0,0	0,60	
	10	43,8	56,3	0,0	0,0	0,0	0,56	
Cyprodinil	1	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	4,00	3,895 (e)
	3	0,0	2,1	0,0	0,0	97,9	3,94	
	10	2,1	2,1	0,0	10,4	85,4	3,75	

Stopień odporności izolatów podany w skali 0–4 wyrażającej stosunek wielkości kolonii rosnącej na podłożu z fungicydem do kolonii kontrolnej rosnącej na czystej pożywce PDA, 0 – izolaty bardzo wrażliwe, 1 – wrażliwe (1–20%), 2 – średnio wrażliwe (21–50%), 3 – odporne (51–80%), 4 – wysoce odporne (> 81%)

The resistance level of isolates in a scale of 0–4 expressing the ratio of colonies growing on the fungicide medium to control colonies growing on pure PDA medium, 0 – isolates highly sensitive, 1 – sensitive (1–20%), 2 – medium sensitive (21–50%), 3 – resistant (51–80%), 4 – highly resistant (> 81%)

*wyniki testu Tukeya dla $\alpha = 0,05$ – Tukey's test results for $\alpha = 0.05$

Hamada i wsp. 2011b). Zdecydowanie gorzej wzrost isolatów *R. cerealis* ograniczał imidazol – prochloraz (średni stopień odporności – 3,319). Słabe ograniczanie wzrostu *R. cerealis* przez prochloraz opisywane jest także przez innych autorów (Kataria i Gisi 1989; Kataria i wsp 1991). Strobiluryny: piraklostrobina, azoksystrobina, krezoksym metylu oraz fenpropimorf (morfolina) należały do substancji ograniczających wzrost badanych isolatów w stopniu bardzo dobrym (piraklostrobina) lub dobrym. Średnie stopnie odporności isolatów dla wyżej wymienionych substancji wynosiły kolejno: 0,784; 1,534; 2,104 oraz 2,222. Należy zaznaczyć, że wśród badanych isolatów zidentyfikowano szczepy o podwyższonej odporności na azoksystrobinę (54,2; 41,7 i 20,8% badanych isolatów) i krezoksym metylu (72,9; 54,2 i 45,8% badanych isolatów) dodane do pożywki w stężeniach 1, 3 i 10 ppm (tab. 1). W przypadku fenpropimorfu odpornych lub wysoce odpornych na stężenie 1, 3 i 10 ppm było odpowiednio 60,5; 54,1 oraz 18,8% badanych isolatów (tab. 1). Słabe oddziaływanie fenpropimorfu na *R. cerealis* opisywane było już w latach wcześniejszych (Kataria i wsp. 1991).

Na podstawie wyników wielokrotnego testu Tukeya można stwierdzić na poziomie istotności 0,05, że badane fungicydy charakteryzowały się dużą zmiennością w przypadku średnich stopni odporności na badane fungicydy. Zostały one podzielone na płynnie zachodzące na siebie grupy. Do grupy (a i ab) związków bardzo dobrze ograniczających wzrost badanych isolatów zaklasyfikowane

zostały cyprokonazol i piraklostrobina. Do grupy (abc i bc) dobrze hamującej wzrost *R. cerealis* pozostałe związki z grupy triazoli, azoksystrobina i karbendazym. W kolejnych grupach słabiej (cd) lub niewystarczająco (de i e) ograniczających wzrost isolatów *R. cerealis* znalazły się związki z grupy strobiluryn (krezoksym metylu i fenpropimorf), następnie prochloraz, cyprodinil i tiofanat metylu (tab. 1). Wyniki wskazują na możliwość skutecznego zwalczania *R. cerealis* fungicydami przeznaczonymi do ograniczania innych chorób podstawy żdźbła z wyłączeniem substancji, takich jak: tiofanat metylu, cyprodinil i prochloraz.

Wnioski / Conclusions

- Większość badanych isolatów *R. cerealis* była odporna na tiofanat metylu i cyprodinil (średnie stopnie odporności – 4,00 i 3,895).
- Większość badanych isolatów *R. cerealis* była wrażliwa na substancje czynne z grupy triazoli (średnie stopnie odporności 0,409–1,687), strobiluryny (0,784–2,104) oraz karbendazym (1,694).
- Wśród badanych isolatów *R. cerealis* zidentyfikowano szczepy o zwiększonej odporności na prochloraz i fenpropimorf.

Literatura / References

- Burpee L. 1980. *Rhizoctonia cerealis* causes yellow patch of turfgrasses. Plant Dis. 64 (12): 1114–1116.
- Clarkson J.D.S., Cook R.J. 1983. Effect of sharp eyespot (*Rhizoctonia cerealis*) on yield losses in winter wheat. Plant Pathol. 32 (4): 421–428.
- Hamada M.S., Yin Y., Chen H., Ma Z. 2011a. The escalating threat of *Rhizoctonia cerealis*, the causal agent of sharp eyespot in wheat. Pest Manage. Sci. 67 (11): 1411–1419.
- Hamada M.S., Yin Y., Ma Z. 2011b. Sensitivity to iprodione, difenoconazole and fludioxonil of *Rhizoctonia cerealis* isolates collected from wheat in China. Crop Prot. 30 (8): 1029–1033.
- Kataria H.R., Gisi U. 1989. Recovery from soil and sensitivity to fungicides of *Rhizoctonia cerealis* and *R. solani*. Mycol. Res. 92 (4): 458–462.
- Kataria H.R., Hugelshofer U., Gisi U. 1991. Sensitivity of *Rhizoctonia* species to different fungicides. Plant Pathol. 40 (2): 203–211.
- Lemańczyk G. 2012. Susceptibility of winter triticale cultivars to *Rhizoctonia cerealis* (Sharp eyespot) and *R. solani*. J. Plant Prot. Res. 52 (4): 421–434.
- Lemańczyk G., Kwaśna H. 2013. Effects of sharp eyespot (*Rhizoctonia cerealis*) on yield and grain quality of winter wheat. Eur. J. Plant Pathol. 135 (1): 187–200.
- Tunali B., Nicol J.M., Hodson D., Uckun Z., Buyuk O., Erdurmus D., Hekimhan H., Aktas H., Akbudak M.A., Bagci S.A. 2008. Root and crown rot fungi associated with spring, facultative, and winter wheat in Turkey. Plant Dis. 92 (9): 1299–1306.