

Fungicide resistance of *Cercospora beticola* isolates collected from Wielkopolska region

Odporność na fungicydy izolatów *Cercospora beticola* pochodzących z terenu Wielkopolski

Katarzyna Pieczul, Agnieszka Perek

Summary

Leaf spot caused by *Cercospora beticola* is one of the most serious disease of sugar beet. For the disease control benzimidazole, triazole, strobilurine, morpholine and pyrimidine fungicides have been used. The aim of the study was to evaluate the resistance level of *C. beticola* isolates collected in Wielkopolska region to selected fungicides. Most of the tested isolates were resistant to carbendazim and thiophanate-methyl, and only a few of the isolates were sensitive to benzimidazoles. Most of the tested isolates were sensitive to the other tested fungicides. However, several isolates resistant to triazoles and piraclostrobin were identified.

Key words: *Cercospora* leaf spot, *Cercospora beticola*, fungicide resistance

Streszczenie

Chwościk wywołany przez *Cercospora beticola* należy do najważniejszych chorób buraka cukrowego. Do ochrony upraw buraka wykorzystywane są fungicydy zawierające związki z grup benzimidazoli, triazoli, strobiluryn, morfolin i pirymidyn. Celem badań była ocena odporności izolatów *C. beticola* zbieranych na terenie Wielkopolski na wybrane fungicydy. Większość badanych izolatów *C. beticola* była odporna na karbendazym i tiofanat metylu, jedynie kilkanaście spośród badanych izolatów było wrażliwych na benzimidazole. Większość badanych izolatów była wrażliwa na pozostałe z badanych fungicydów. Wśród badanych izolatów zidentyfikowane zostały także szczepy odporne na triazole i piraklostrobinę.

Słowa kluczowe: chwościk buraka, *Cercospora beticola*, odporność na fungicydy

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

Wstęp / Introduction

Grzyb *Cercospora beticola* Sacc., wywołujący chwościka buraka należy do najważniejszych patogenów buraka cukrowego, występujących w większości rejonów uprawy na świecie (Holtschulte 2000). W Polsce chwościk obserwowany jest corocznie, ale na nasilenie występowania choroby istotny wpływ mają warunki pogodowe, szybkiemu rozwojowi i rozprzestrzenianiu się sprzyja wysoka temperatura oraz częste opady atmosferyczne w okresie od lipca do września (Nowakowska i wsp. 1997, 1999). Ograniczanie występowania chwościka buraka polega na właściwym doborze odmian, zabiegach agrotechnicznych oraz stosowaniu fungicydów (Holtschulte 2000; Wolf i Verreet 2002). W Polsce do chemicznej ochrony upraw wykorzystywane są przede wszystkim fungicydy z grup: benzimidazoli, triazoli, następnie strobiluryn, morfolin i pirymidyn. Konsekwencją intensywnego stosowania fungicydów jest wzrost częstości występowania szczepów grzybów odpornych na niektóre grupy fungicydów (Ma i Michailides 2005; Deising i wsp. 2008). *C. beticola* należy do patogenów bardzo szybko uodparniających się na stosowane fungicydy. Spowodowane jest to między innymi: możliwością wielokrotnego powtarzania infekcji roślin, produkcją dużej liczby zarodników konidialnych oraz dużą zmiennością genetyczną patogena (Ma i Michailides 2005; Deising i wsp. 2008). Coraz częściej odnotowywane jest zjawisko wielokrotnej odporności izolatów *C. beticola* na substancje czynne fungicydów należących do różnych grup chemicznych.

Celem badań była ocena odporności izolatów *C. beticola* zbieranych na terenie Wielkopolski na wybrane substancje czynne wchodzące w skład fungicydów stosowanych obecnie i we wcześniejszych latach do zwalczania chwościka buraka.

Materiały i metody / Materials and methods

Izolaty. Próby zbierane były na polach uprawnych, zlokalizowanych na terenie Wielkopolski – głównie w okolicach Buku, Grodziska Wielkopolskiego, Opałenicy, Rakoniewic, Stęszewa i Poznania, w sierpniu i wrześniu 2012 roku. Wszystkie próby pochodziły z naturalnie porażonych fragmentów liści buraka cukrowego. Izolacji kultur grzybów dokonywano ze świeżego materiału roślinnego. Fragmenty świeżych liści z objawami chorobowymi chwościka poddawano 12-godzinnej inkubacji w wilgotnej komorze. Z liści za pomocą igły preparacyjnej pobierano zarodniki konidialne *C. beticola* i sporządzano z nich wodną zawiesinę, którą rozprowadzano na powierzchni płytki Petriego z pożywką PDA (Potato Dextrose Agar, Difco). Wzrastające, pojedyncze kolonie o cechach morfologicznych *C. beticola* przeszczepiano na nową pożywkę PDA. Wszystkie izolaty zostały zidentyfikowane na podstawie makro- i mikroskopowych cech morfologicznych gatunku (Ellis 2001). Identyfikacja 40 wybranych izolatów (przeznaczonych do dalszych analiz genetycznych – dane niepublikowane) została potwierdzona na podstawie wyniku reakcji PCR

(polymerase chain reaction) ze starterami specyficznymi gatunkowo dla *C. beticola* (Groenewald i wsp. 2005).

Badania odporności na substancje czynne fungicydów. Do badań odporności na fungicydy wytypowano 185 izolatów *C. beticola*. Badania wykonano na pożywce PDA zawierającej dodatek czystych substancji czynnych (Sigma) w stężeniu 1, 3 i 10 ppm. Na pożywki zaszczerpiano 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), epoksykonazol, cyprokonazol, flusilazol, tebukonazol, tetrakonazol (triazole), fenpropimorf (morfolina) i piraklostrobineę (strobiluryna). Po 7 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

Przeprowadzone badania umożliwiły ocenę stopnia odporności na fungicydy izolatów *C. beticola* zbieranych na terenie Wielkopolski. W przeprowadzonej analizie statystycznej zbadano jednorodność wariancji badanych fungicydów. Do porównania fungicydów pod względem stopnia odporności zastosowano analizę wariancji i wielokrotny test Tukeya przy poziomie istotności 0,05. Z badania jednorodności wariancji (test Bartletta chi-kwadrat = 10,66, df = 8, p = 0,221) stwierdzono, że wariancje są jednorodne. Z przeprowadzonej analizy wariancji (test F = 25,48, df = 8 i 18, p < 0,001) wynika wysoce istotne zróżnicowanie pomiędzy fungicydami pod względem średniej wartości badanych stopni odporności (tab. 1).

Większość badanych w pracy izolatów *C. beticola* (83,2–88,6%) pochodzących z terenu Wielkopolski była całkowicie odporna na karbendazym i tiofanat metylu, dodane do pożywki w stężeniu 1, 3 i 10 ppm (średnie stopnie odporności 3,687 i 3,651). Jedynie kilka procent spośród badanych izolatów charakteryzowało się wysoką lub średnią wrażliwością na benzimidazole (tab. 1). Pierwsze izolaty *C. beticola* odporne na benzimidazole obserwowano w Grecji i Stanach Zjednoczonych na początku lat 70. XX wieku (Campbell i wsp. 1998; Briere i wsp. 2001; Weiland i Halloin 2001; Karaoglanidis i wsp. 2003). W Polsce wzrost częstości występowania szczepów

Tabela 1. Stopień odporności izolatów *C. beticola* na fungicydy i wyniki testu Tukeya dla $\alpha = 0,05$
 Table 1. Level of *C. beticola* isolates resistance to fungicides and Tukey test results for $\alpha = 0.05$

Fungicyd Fungicide	Stężenie substancji czynnej The concentration of active substance [ppm]	Izolaty Isolates [%]					Średni stopień odporności izolatów Mean resistance isolates level	
		stopień odporności – resistance level						
		0	1	2	3	4		
Carbendazim	1	2,2	2,7	4,3	2,2	88,6	3,723	3,687 (a)
	3	3,2	1,6	3,2	4,9	87,1	3,711	
	10	4,3	1,1	5,4	5,9	83,3	3,628	
Tiophanate-methyl	1	1,6	3,2	3,2	4,9	87,1	3,727	3,651 (a)
	3	4,3	2,2	4,3	3,8	85,4	3,638	
	10	5,4	1,6	4,9	4,9	83,2	3,589	
Cyproconazole	1	14,1	29,7	34,6	11,4	10,2	1,739	1,160 (b)
	3	31,4	43,2	11,4	3,8	10,2	1,182	
	10	70,3	16,8	4,3	3,8	4,8	0,56	
Epoxiconazole	1	12,4	58,4	17,8	9,7	1,7	1,299	0,865 (b)
	3	35,7	47,6	12,4	4,3	0	0,853	
	10	61,1	33,5	5,4	0	0	0,443	
Flusilazole	1	10,8	58,9	16,8	10,3	3,2	1,362	0,868 (b)
	3	39,5	43,8	12,4	3,8	0,5	0,82	
	10	68,1	23,2	7,0	1,7	0	0,423	
Tebuconazole	1	6,5	61,6	16,8	8,6	6,5	1,47	0,988 (b)
	3	26,5	51,4	13,5	6,5	2,1	1,063	
	10	67,6	23,8	7,0	1,1	0,5	0,431	
Tetraconazole	1	17,3	50,8	17,3	6,5	8,1	1,373	0,980 (b)
	3	36,2	45,4	7,0	3,8	7,6	1,012	
	10	69,7	17,3	4,9	3,8	4,3	0,557	
Phenpropimorph	1	8,6	35,7	50,8	4,9	0	1,52	1,135 (b)
	3	13,0	76,2	9,7	1,1	0	0,989	
	10	14,1	82,2	3,7	0	0	0,896	
Pyraclostrobin	1	18,3	37,8	29,2	9,8	4,9	1,452	1,040 (b)
	3	30,3	45,4	19,5	2,7	2,1	1,009	
	10	42,7	50,8	4,3	2,2	0	0,66	

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%)

C. beticola odpornych na benzimidazole obserwowany jest od kilkunastu lat (Piszczyk 2010). Wśród izolatów zbieranych na terenie Kujaw w roku 2004 odpornych na karbendazym i tiofanat metylu było blisko 30% izolatów, a w 2006 roku już 70% (Piszczyk 2004, 2010). Obecnie benzimidazole są wycofywane jako substancje zalecane do ochrony buraka cukrowego przed chwościkiem (Secor i wsp. 2010). Niektórzy autorzy wskazują, że odporność na

benzimidazole stała się cechą populacji i pozostaje na wysokim poziomie, mimo zaprzestania używania ich w ochronie buraka cukrowego (Karaoglanidis i wsp. 2003).

Zjawisko nabywania odporności na triazole jest obserwowane u *C. beticola* rzadziej niż w przypadku benzimidazoli, ale ze względu na ich częste stosowanie stanowi poważne zagrożenie. Wzrost odporności izolatów *C. beticola* na triazole odnotowywany jest od połowy lat

90. XX wieku (Karaoglanidis i wsp. 2000; Karaoglanidis i Thanassouloupoulos 2003). Także wśród izolatów *C. beticola* pochodzących z terenu Wielkopolski zidentyfikowane zostały szczepy odporne na triazole. Do triazoli charakteryzujących się najwyższą skutecznością ograniczania wzrostu izolatów *C. beticola* należał epoksykonazol i flusilazol (średnie stopnie odporności 0,865 i 0,863), a niższą tetrakonazol, tebukonazol i cyprokonazol (średnie stopnie odporności 0,980, 0,988 i 1,160) (tab. 1). Warto zaznaczyć, iż zidentyfikowane zostały także izolaty odporne na cyprokonazol (4,8%) i tetrakonazol (4,3%) dodane do pożywki w stężeniu 10 ppm (tab. 1). Wcześniejsze badania prowadzone w Polsce wskazują, że częstość występowania izolatów odpornych na triazole ulegała zmianie. W latach 2004–2008 odpornych na tebukonazol było 5–32% izolatów, na tetrakonazol 6–25%, a na epoksykonazol 0–22% (Piszczek 2010). Większość z izolatów charakteryzowała się jednoczesną odpornością na różne substancje z grupy triazoli. Zjawisko jednoczesnej odporności na różne substancje w obrębie grupy fungicydów stanowi przeszkodę w zastępowaniu poszczególnych fungicydów triazolowych innymi (Karaoglanidis i Thanassouloupoulos 2003).

Niepełna 15% badanych izolatów *C. beticola* było odpornych na piraklostrobinę (strobiluryna) dodaną do pożywki w stężeniu 1 ppm. Wzrost stężenia fungicydu w pożywce powodował spadek liczby izolatów odpornych do 4,8% dla stężenia 3 ppm i 2,2% dla 10 ppm (średni stopień odporności 1,040) (tab. 1). Zjawisko nabywania odporności na strobiluryny przez *C. beticola* nie jest obserwowane w Europie często, doniesienia takie napływają głównie ze Stanów Zjednoczonych (Malandrakos i wsp. 2011; Bolton i wsp. 2013). Fenpropimorf (morfolina), w stężeniu 1–3 ppm zdecydowanie zahamował wzrost

większości badanych izolatów *C. beticola* (średni stopień odporności 1,135). Fenpropimorf jest substancją, na którą nie odnotowywano dotychczas odporności u *C. beticola* i może być stosowany w celu zwalczania szczepów odpornych na inne grupy fungicydów.

Istotną informacją uzyskaną w trakcie badań jest identyfikacja szczepów *C. beticola* odpornych jednocześnie na substancje czynne z grup benzimidazoli, triazoli i strobiluryn. W poprzednich latach w Polsce opisywane były izolaty *C. beticola* odporne jednocześnie na benzimidazole i triazole (Piszczek i Czekalska 2006).

Na podstawie wyników wielokrotnego testu Tukeya możemy stwierdzić na poziomie istotności 0,05, że badane fungicydy podzielone zostały na dwie wyraźne grupy o różnym stopniu skuteczności ograniczania wzrostu izolatów *C. beticola*. Do pierwszej grupy (a) o niskiej skuteczności zaklasyfikowane zostały związki z grupy benzimidazoli – karbendazym i tiofanat metylu, do grupy drugiej (b) skutecznie ograniczającej wzrost izolatów pozostałe badane fungicydy (tab. 1).

Wnioski / Conclusions

1. Większość badanych izolatów *C. beticola* pochodzących z Wielkopolski była odporna na substancje czynne z grupy benzimidazoli – karbendazym i tiofanat metylu (średnie stopnie odporności 3,68–3,65).
2. Większość badanych izolatów *C. beticola* pochodzących z Wielkopolski była wrażliwa na substancje czynne z grupy triazoli, piraklostrobinę i fenpropimorf (średnie stopnie odporności 0,865–1,160).
3. Wśród badanych izolatów *C. beticola* zidentyfikowano szczepy odporne na triazole oraz piraklostrobinę.

Literatura / References

- Bolton M.D., Riviera V., Secor G. 2013. Identification of the G143A mutation associated with Qol resistance in *Cercospora beticola* field isolates from Michigan, United States. *Pest Manage. Sci.* 69: 35–39.
- Briere S.C., Franc G.D., Kerr E.D. 2001. Fungicide sensitivity characteristics of *Cercospora beticola* isolates recovered from the high plains of Colorado, Montana, Nebraska, and Wyoming. Benzimidazole and triphenyltin hydroxide. *J. Sugar Beet Res.* 38 (2): 111–120.
- Campbell L.G., Smith G.A., Lamey H.A., Cattanach A.W. 1998. *Cercospora beticola* tolerant triphenyltin hydroxide and resistant to tiophanate methyl in North Dakota and Minnesota. *J. Sugar Beet Res.* 35 (1–2): 29–41.
- Deising H.B., Reiman S., Pascholati S.F. 2008. Mechanism and significance of fungicide resistance. *Braz. J. Microbiol.* 39: 286–295.
- Ellis M.B. 2001. *More Dematiaceus Hyphomycetes*. CABI Publishing, 248 pp.
- Groenewald M., Groenewald J.Z., Crous P.W. 2005. Distinct species exist within *Cercospora apii* morphotype. *Phytopathology* 95: 951–959.
- Holtschulte B. 2000. *Cercospora beticola* – worldwide distribution and incidence. p. 5–16. In: “*Cercospora beticola* Sacc. Biology, Agronomic Influence and Control Measures in Sugar Beet. Advances in Sugar Beet Research” (M.J.C. Ascher, B. Holtschulte, M.R. Molard, F. Rosso, G. Steinrücken, R. Beckers, eds). International Institute for Beet Research, Brussels, 215 pp.
- Karaoglanidis G.S., Ioannidis P.M., Thanassouloupoulos C.C. 2000. Reduced sensitivity of *Cercospora beticola* isolates to sterol-demethylation-inhibiting fungicides. *Plant Pathol.* 49: 567–572.
- Karaoglanidis G.S., Karadimos D.A., Ioannidis P.M., Ioannidis P.I. 2003. Sensitivity of *Cercospora beticola* population to fenitacetate, benomyl, and flutriafol in Greece. *Crop Prot.* 22: 735–740.
- Karaoglanidis G.S., Thanassouloupoulos C.C. 2003. Cross-resistance patterns among sterol biosynthesis inhibiting fungicides (SBIs). *Eur. J. Plant. Pathol.* 109 (9): 929–934.
- Ma Z., Michailides T.J. 2005. Advances in understanding molecular mechanism of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Prot.* 24: 853–863.
- Malandrakos A., Markoglou A., Nikou D., Vontas J., Ziogas B. 2011. Molecular diagnostic for detecting the cytochrome b G143S – Qol resistance mutation in *Cercospora beticola*. *Pest. Biochem. Physiol.* 100: 87–92.

- Nowakowska H., Piszczek J., Włodarski J. 1997. Porażenie odmian buraka cukrowego przez *Cercospora beticola* w 1995 i 1996 roku w różnych rejonach uprawy. [Infection of sugar beet varieties by *Cercospora beticola* in different regions of Poland in 1995 and 1996]. Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Roślin 37 (2): 340–342.
- Nowakowska H., Piszczek J., Lewińska-Frymark L. 1999. Występowanie *Erysiphe betae* i *Cercospora beticola* w 1998 roku na buraku cukrowym w różnych rejonach kraju. [Occurrence of *Erysiphe betae* and *Cercospora beticola* on sugar beet in different regions of Poland in 1998]. Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Roślin 39 (2): 848–851.
- Piszczek J. 2004. Odporność niektórych szczepów *Cercospora beticola* Sacc. na fungicydy stosowane w ochronie buraka cukrowego. [Resistance of selected strains of *Cercospora beticola* Sacc. to fungicides used for sugar beet protection in Poland]. Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Roślin 44 (2): 1028–1031.
- Piszczek J. 2010. Epidemiologia chwościka buraka cukrowego (*Cercospora beticola*) w centralnej Polsce. Rozpr. Nauk. Inst. Ochrony Roślin – PIB 23, 70 ss.
- Piszczek J., Czekalska A. 2006. Oporność chwościka buraka – grzyba *Cercospora beticola* Sacc. na fungicydy stosowane do jego zwalczania w Polsce. [Resistance of *Cercospora beticola* Sacc. to fungicides used against this pathogen in Poland]. Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Roślin 46 (1): 375–379.
- Secor G.A., Rivera V.V., Khan M.F.R., Gudmestad N. 2010. Monitoring fungicide sensitivity of *Cercospora beticola* of sugar beet for disease management decisions. Plant Dis. 94 (11): 1272–1282.
- Weiland J.J., Halloin J.M. 2001. Benzimidazole resistance in *Cercospora beticola* sampled from sugarbeet fields in Michigan, USA. Can. J. Plant. Pathol. 23: 78–82.
- Wolf P.F.J., Verreet J.A. 2002. An integrated pest management system in Germany for the control of fungal leaf diseases in sugar beet: the IPM sugar beet model. Plant Dis. 86: 336–344.