

***Cercospora beticola* – rezistence na vybrané fungicidy a seznámení s metodou testování**

CERCOSPORA BETICOLA – RESISTANCE TO SELECTED FUNGICIDES
AND INTRODUCTION TO TESTING METHOD

Klára Pavlů, Ursula Benešová – Řepařský institut, spol. s r. o., Semčice

V současnosti je nejzávažnější chorobou listového aparátu cukrové řepy cercosporová listová skvrnitost řepy dříve známá jako skvrnatička řepná. Dnes se často používá zkráceného označení cercosporióza. Původcem choroby je houba *Cercospora beticola* Sacc. Již RYBÁČEK (1) uvádí, že při středním napadení mohou být ztráty na výnosu bulev 10–30 % a cukernatost se může snížit o 0,2–2,5 %. Uvádí ovšem také, že choroba v ČSSR nemá větší hospodářský význam vzhledem k malému rozsahu napadení a nepravidelnosti výskytu. Tato informace je ovšem ve výrazném rozporu se současným stavem, kdy je infekce cercosporiózou rozšířená v celém regionu pěstování cukrovky a v ročnících s nezvládnutou fungicidní ochranou působí výrazné hospodářské škody (obr. 1.). Důvody nezvládnuté fungicidní ochrany mohou být ve špatném načasování aplikací fungicidů a nebo v nízké účinnosti používaných přípravků. K nízké účinnosti může dojít v důsledku výskytu rezistentních kmenů houby *Cercospora beticola* Sacc.

Obr. 1. Cercosporová listová skvrnitost řepy – cercosporióza – je v současné době nejzávažnější chorobou listů cukrovky s významnými hospodářskými dopady



Houba *Cercospora beticola* ve fázi pseudostromat přežívá na zbytcích rostlin (zaoraný chrást) a udržuje si životaschopnost až dva roky. Délka a hloubka umístění negativně ovlivňuje přežití *C. beticola* na listech cukrové řepy. Bylo zjištěno, že po 10 měsících byla životaschopnost inokula umístěného v hloubkách 0, 10 a 20 cm snížena o 59, 74 a 76 %. Podobně po 10 měsících je životaschopnost inokula na povrchu půdy v průměru o 40 % vyšší než inokula v hloubce 10 a 20 cm. Mezi počtem listových skvrn vytvořených inokulem v hloubce 10 a 20 cm není žádný významný rozdíl. Po 22 měsících je životaschopnost inokula *Cercospora beticola* na reziduiích ponechaných na povrchu půdy velmi nízká (33 %) a inokulum v hloubkách 10 a 20 cm nepřežije. Po 34 měsících je inokulum umístěné ve všech hloubkách zcela rozloženo. Zbytky umístěné v hloubkách 10 a 20 cm degradují rychleji než zbytky ponechané na povrchu půdy (2). Tyto výsledky jsou zajímavé, ale praktická zkušenost je do značné míry zpochybňuje či relativizuje. S léty odstupem mezi řepami

v osevním postupu se podle zkušenosti tlak cercosporiózy nepochybně snižuje, ale určitě přetrvává déle než tři roky.

V porostech se pak šíří konidie deštěm nebo větrem. Infekce cercosporiózou je iniciována těmito vzdušnými konidiemi. Při hledání primárního zdroje infekce bylo zjištěno, že pokrytí půdy v okolí rostliny plastem neovlivnilo závažnost onemocnění. Z toho lze vyvodit, že v této studii nebyla půda, na které se pěstovaly rostliny cukrové řepy, významným zdrojem inokula. Pole, na kterých byly provedeny pokusy, nebyla v předchozích 48 měsících oseta cukrovou řepou. Účelem plastových klecí bylo snížit vystavení rostlin větru. Skutečnost, že rostliny cukrové řepy v kleci měly výrazně nižší závažnost onemocnění než rostliny vystavené působení větru, naznačuje, že inokulum *Cercospora beticola* je roznášeno především větrem (2). Při optimálních podmínkách, tedy vysoké relativní vlhkosti (nad 95 %) a teplotě kolem 25 °C, konidie houby vyklíčí a pronikají do listu cukrové řepy průduchy, kde zajišťují mezibuněčný růst hyf. Zhruba za 7–10 dnů se v místě infekce tvoří typické skvrny, na kterých vyrostou další generace

konidií. Za chladnějšího počasí a nižší vlhkosti se inkubační doba prodlužuje. V lézi na povrchu listu se vyvinou pseudostromata a *Cercospora beticola* nepohlavně produkuje spory, což vede k mnoha infekčním cyklům v jednom vegetačním období (obr. 2.).

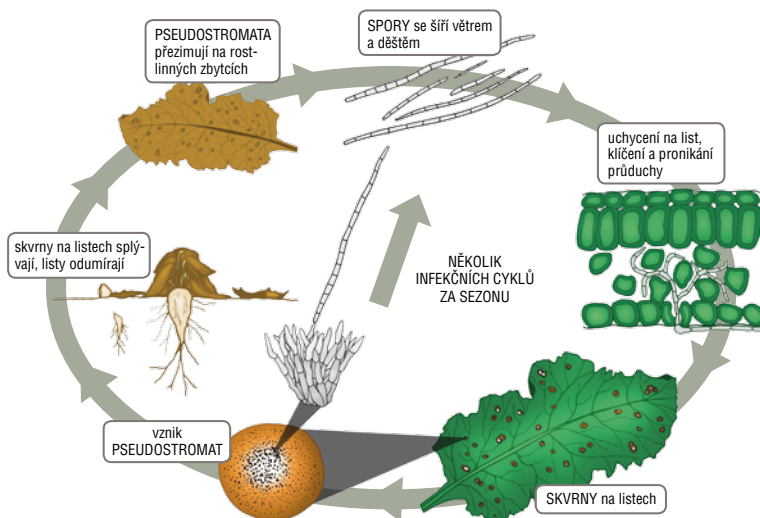
GIANNOPOLITIS (3) uvádí, že k rozvoji typických příznaků na listech cukrové řepy je nezbytná po inokulaci *Cercospora beticola* přítomnost světla. Při pokusech KHANA (2) se nepotvrdilo, že k infekci může kromě listů docházet ve větší míře přes kořeny. Tyto skutečnosti poukazují na to, že světlo hraje důležitou roli v rozvoji houby. I z tohoto důvodu je asi důležité, aby posklizňové zbytky byly zaorány co nejdříve po sklizni.

Hlavním způsobem ochrany proti infekci cercosporiízy je použití fungicidních přípravků. V současné době asi nejvíce používané jsou fungicidy syntetické. Rozlišujeme je na skupinu azolových přípravků (triazoly, imidazoly), strobilurinových přípravků a dalších (obr. 3.). V posledních letech ovšem došlo k výraznému omezení počtu povolených účinných látek (např. thiophanate-methyl). Další možností ochrany je využití tzv. anorganických fungicidů, tedy látek na bázi mědi a síry. Tyto přípravky mají často status listového hnojiva a v současnosti jich je na trhu hned několik. Kromě chemických přípravků existují i přípravky na biologické bázi – BCA (biological disease control). Biologická kontrola onemocnění (BCA) pomocí antagonistů je ekologicky udržitelnou alternativou k syntetickým fungicidům. Příkladem je *Bacillus subtilis* a nebo *Pythium oligandrum* (preparát Polygandron). Jejich účinnost je ovšem výrazně nižší než u organických i anorganických fungicidů.

Stejně jako při použití syntetických preparátů v řadě dalších plodin i zde postupně dochází k vzniku rezistencí. U azolových přípravků obvykle nedochází k celkovému rychlému selhání účinnosti, spíše se jedná o její postupné snižování. Po ukončení používání látek této skupiny se populace vrací do původního stavu a opět převládnu jedinci citlivější na tyto látky. U strobilurinových přípravků je situace jiná. Rezistence vůči látkám z této skupiny vzniká velice rychle v řádu několika málo let a riziko jejího vzniku je proto velmi vysoké. Mutace genů nevedou ke snížení fitness celého organismu a jedinci s touto mutací přetrvávají v populaci velmi dlouho i po přerušení používání strobilurinů (4).

Organizace FRAC (Fungicide Resistance Action Committee) se snaží prodloužit účinnost fungicidů, které mohou narazit na problémy s rezistencí, a omezit ztráty na úrodě, pokud by se rezistence objevila. Rezistence se ovšem objevila v cukrovce už u všech skupin fungicidů Qols (Chinon outside inhibitors), DMIs (Demethylation Inhibitors – patří sem azoly), SDHIs (inhibitory sukcinátdehydrogenázy) a MBCs.

Rezistence vůči fungicidu je konstantní a dědičné změny houby vzhledem k fungicidu vedou v důsledku ke snížení citlivosti houby na fungicid. Rezistence může být důsledkem polymorfismu jednoho nebo více nukleotidů. EC₅₀ je koncentrace fungicidu, který snižuje růst *Cercospora beticola* o 50 % ve srovnání s růstem na nepozměněných médiích. Vzhledem k tomu, že fungicid může účinně kontrolovat citlivé kmeny, rezistentní kmeny se mohou časem stát dominantními v populacích houbových patogenů pod selekčním tlakem používání fungicidů. Z tohoto důvodu je nutné při zjištění rezistence přestat danou účinnou látku používat. Konkrétní příklad ilustruje schopnost obnovení citlivosti v populaci *Cercospora beticola* a případnou

Obr. 2. Infekční cyklus houby *Cercospora beticola*

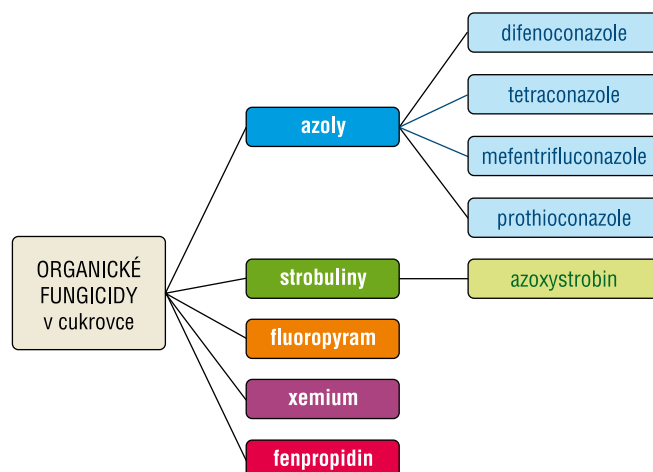
Pramen: upraveno dle RANGEL ET AL. (6)

možnost řízení rezistence. V oblasti Minn-Dak (USA) se na ošetření používal výhradně tetraconazole. V důsledku toho zde došlo k vysoké úrovni rezistence na tetraconazole (EC₅₀ = 0,25 µg·ml⁻¹). Na základě diskusí mezi průmyslem a pracovníky univerzity bylo rozhodnuto v roce 2007 neaplikovat tetraconazole, ale místo toho používat alternativní fungicidy. Rezistence izolátů *Cercospora beticola* v roce 2007, měřeno hodnotami EC₅₀, vykazovala dramatické snížení rezistence na tetraconazole, a to z 0,250 µg·ml⁻¹ v roce 2006 na 0,081 µg·ml⁻¹ v roce 2007. V následujícím roce 2008 byl znovu použit tetraconazole a hodnota EC₅₀ se zvýšila na 0,228 µg·ml⁻¹, což jasně ukazuje účinek, který má použití fungicidů na program řízení rezistence vůči fungicidům (5).

Materiál a metody

Z našich pokusných lokalit jsme se pokusili v roce 2021 a 2022 otestovat vzorky odebraných listů. Konkrétní místa odběru se mezi ročníky lišila, z čehož i vyplývá možnost rozdílného výsledku. Listy jsme odebírali na konci srpna z parcel bez

Obr. 3. Přehled účinných látek ve fungicidní ochraně cukrovky



Tab. I. Výsledky testů na rezistenci vůči fungicidu Sféra 535 SC

Lokalita	Ročník 2021		
	TEST1	TEST2	TEST3
Černuc	★★	★★	
Betno	0		
Dobrá Voda	★★		
Vyšehořovice	★★	★★	★★
Sloveč	★★		
Bylany	0	0	★

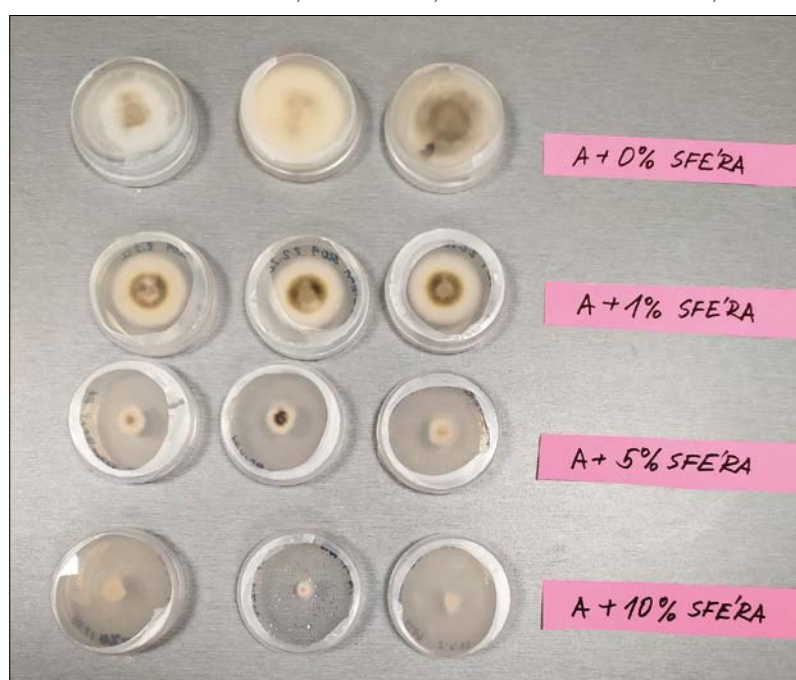
Legenda: — – negativní výsledek, 0 – nejasný výsledek, ★ – možná pozitivita, ★★ – pozitivita

Tab. II. Výsledky testů na rezistenci vůči fungicidu Amistar Gold

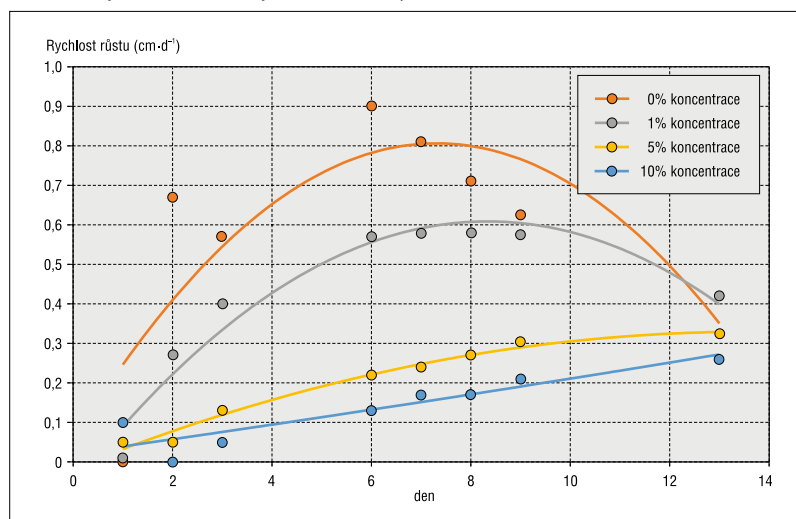
Lokalita	Ročník 2022		
	TEST1	TEST2	TEST3
Černuc	★	★	★
Betno	0	0	0
Dobrá Voda	0	★★	
Vyšehořovice	0	★	★
Sloveč	—	★	
Bylany	0	0	

Legenda: — – negativní výsledek, 0 – nejasný výsledek, ★ – možná pozitivita, ★★ – pozitivita

Obr. 4. Kultivace *C.beticola*, Sloveč 2021, koncentrace Sféra 535 SC, 6 den



Obr. 5. Rychlost růstu mycelia *Cercospora beticola*, Sloveč 2021



ošetření fungicidními přípravky. List jsme vybírali s mírnějšími projevy, s dobře patrnými a ohraničenými jednotlivými skvrnkami. Po odběru listu jsme se snažili co nejvíce zamezit kontaminaci – umístili jsme ho do plastového sáčku a ihned transportovali do laboratoře. Tam jsme odebrali list nechali volně uschnout mezi dvěma listy filtračního papíru. Následně jsme prováděli kultivaci houby *Cercospora beticola* na živném agar. Po izolování houby jsme potom prováděli testy rezistence na fungicidní přípravky. V roce 2021 jsme testovali na přípravek Sféra 535 SC. Pokoušeli jsme se stanovit rozhodnou koncentraci fungicidního přípravku. Postupně jsme testovali chování, resp. rychlost růstu houby v 1%, 2%, 4%, 5%, 8% a 10% roztoku fungicidu v agaru. V roce 2022 jsme převážně testovali na přípravek Amistar Gold. Izolace *C. beticola* trvá zhruba 2 týdny, testování jednoho izolátu na rezistenci pak zhruba 2–3 týdny. Test pak často končí nejednoznačným výsledkem, který je třeba ověřit dalším testováním. Celý pracovní proces je velmi náročný na čistotu prostředí, aby nedošlo ke kontaminaci agaru jinou houbou. Přenos konidií se musí provádět ve sterilním prostředí, např. ve Flowboxu.

Testy v roce 2021

Celkem se nám podařilo zrealizovat 11 testů z 6 pokusných lokalit. Testovali jsme citlivost vůči fungicidu Sféra 535 SC, který obsahuje cyproconazole a trifloxystrobin. V současnosti už není přípravek registrován, ale do roku 2022 byl běžně používán praxí. Zvláště jsme se zaměřili na lokality Vyšehořovice a Bylany, kde byl zaznamenán silný tlak cercosporiózy. Přehled všech testů a jejich výsledků je uveden v tab. I. Na lokalitě Vyšehořovice se podařilo potvrdit přítomnost kmenu *C. beticola* rezistentního k fungicidu Sféra. Ke stejnému závěru jsme dospěli i na lokalitě Černuc. Testy z lokalit Sloveč a Dobrá Voda by bylo vhodné před potvrzením rezistence ještě opakovat.

Na lokalitě Bylany se přítomnost rezistentního kmene houby průkazně nepotvrdila. Na lokalitě Bezno byl výsledek nejednoznačný a vzhledem k slabšímu průběhu infekce na této lokalitě a dobré účinnosti fungicidu se spíše přikláníme ke konečnému výsledku nepřítomnosti rezistentních kmenů.

Testy v roce 2022

V roce 2022 jsme odebrali opět listy ze všech pokusných lokalit a provedli jsme testování na rezistenci vůči fungicidu Amistar Gold. Celkem jsme provedli 15 testů (tab. II.). Na třech lokalitách jsme ještě znovu prověřili rezistenci na fungicid Sfera. Na lokalitě Vyšehořovice (Čelákovice) byla jednoznačně prokázána rezistence, na lokalitách Bezno a Černuc byl mírně pozitivní výsledek a lze předpokládat, že určitá míra rezistence na Sferu na pozemku byla. Fungicid Sfera bylo možné používat jen do roku 2022, takže z praktického hlediska další testování nemá význam. Nicméně z výsledků vyplývá, že rozšíření kmenů rezistentních vůči fungicidu Sfera už je značné.

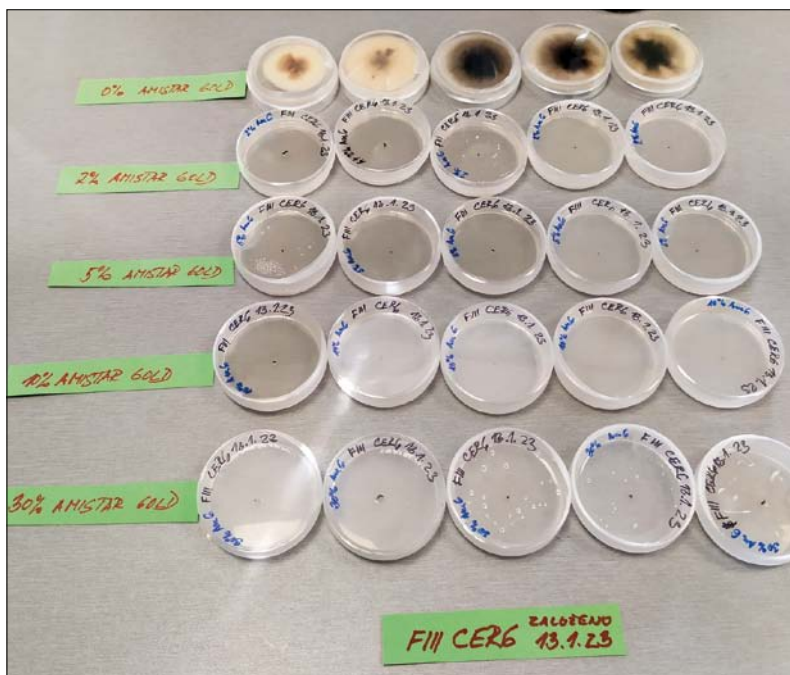
Fungicid Amistar Gold obsahuje účinnou látku azoxystrobin a léta používaný triazol difenoconazole. V testech používáme přímo fungicid, proto nemůžeme z výsledků jednoznačně určit na kterou účinnou látku rezistence vznikla. Nicméně pro praktické účely pěstitelů cukrovky postačuje informace o snížené účinnosti, popř. neúčinnosti fungicidního přípravku, který přímo používají.

Diskuse

Každý ročník je v intenzitě výskytu *Cercospora beticola* jiný, nicméně lze říci, že houba se rozšířila na všechny pozemky užívané k pěstování řepy. Je tu otázka primárního zdroje infekce. Spory se zcela jistě šíří větrem. Toho ostatně využíváme i při diagnostice lapači spór. Prvotní infekce v ročníku však logicky musí pocházet z půdy, kde houba přežívá. Otázkou tedy je, jak dlouho houba *Cercospora beticola* může v půdě přežít. Na řepných polích je často užíván čtyřletý osevní postup a cukrovka je tedy na stejném pozemku až po třech letech. Přesto se infekce v porostech stále rozšiřuje. V praxi se vyskytují případy, kdy se na poli objevilo silné ložisko na místě, kde v minulosti byla skládka řepy. To nám potvrzuje, že do určité míry musí houba v půdě přežít i déle a odtud se také vždy v daném roce začne šířit. Další průběh infekce už je pak více závislý na průběhu počasí a povětrnostních podmínkách.

V laboratoři testujeme citlivost *Cercospora beticola* na fungicidní přípravky. Jak v případě fungicidu Sfera, tak i Amistar Gold jsou přípravky vícesložkové a kombinují strobilurin s azolem. Do jaké míry se na konečném výsledku podílí strobilurin nebo azol, nemůžeme s určitostí stanovit. Vzhledem k prokázaným rezistencím uváděným

Obr. 6. Kultivace *C.beticola*, Černuc 2022, koncentrace Amistar Gold, 11. den

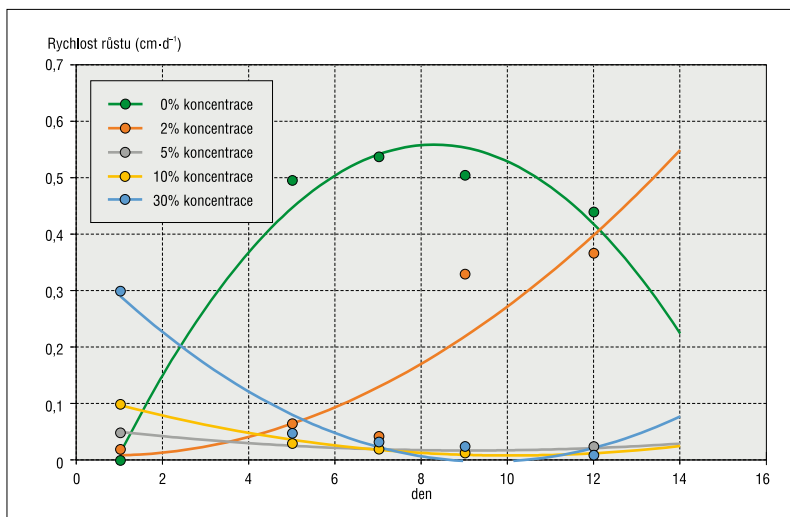


v odborné literatuře lze předpokládat, že rezistence bude existovat spíše u strobilurinu. Pro praktické účely nám toto zjištění postačuje.

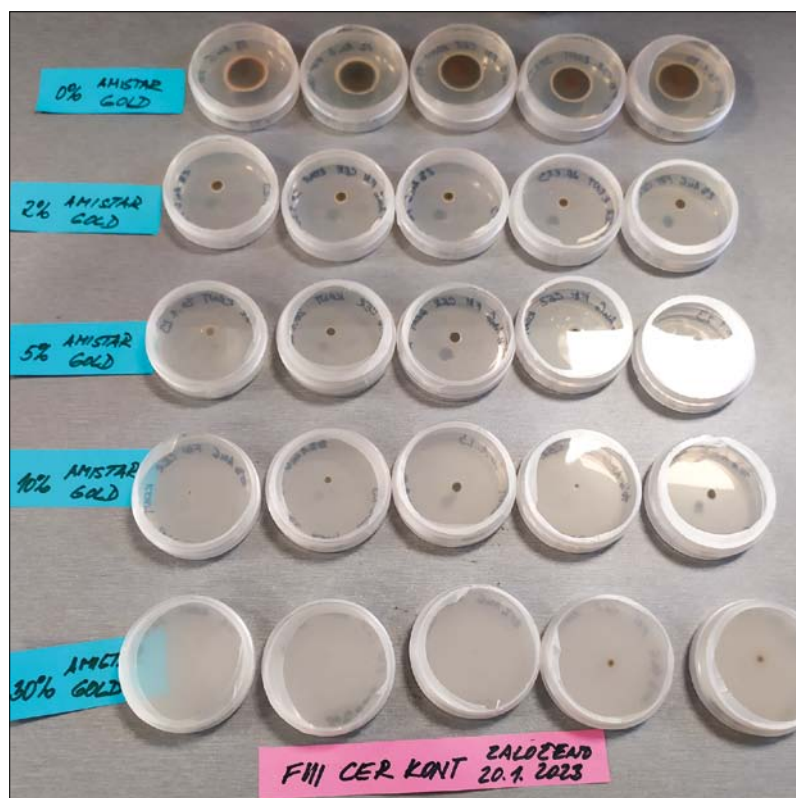
Závěr

Rezistence houbového patogena *Cercospora beticola* na různé fungicidní přípravky, resp. jejich účinné látky může být v budoucnu pro pěstitelů cukrové řepy závažným problémem. Pro dlouhodobé udržení technologie ochrany je třeba monitorovat výskyt rezistentních kmenů a získaným poznatkům případně přizpůsobit aktuální ochranu. Pro budoucnost jsou velkým příslibem nové odrůdy cukrové řepy se zvýšenou odolností proti cercosporiíze. Díky jejich vysoké odolnosti bude možné výrazně snížit frekvenci ošetření a ušetřit nejen finance, ale i životní

Obr. 7. Rychlost růstu mycelia *Cercospora beticola*, Černuc 2022



Obr. 8. Kultivace izolátu z Černuce, kontrola, 13. den



prostředí. Na druhou stranu v případě jen jedné aplikace je třeba dbát na střídání účinné látky v rámci antirezistentní strategie i meziročníkově.

Souhrn

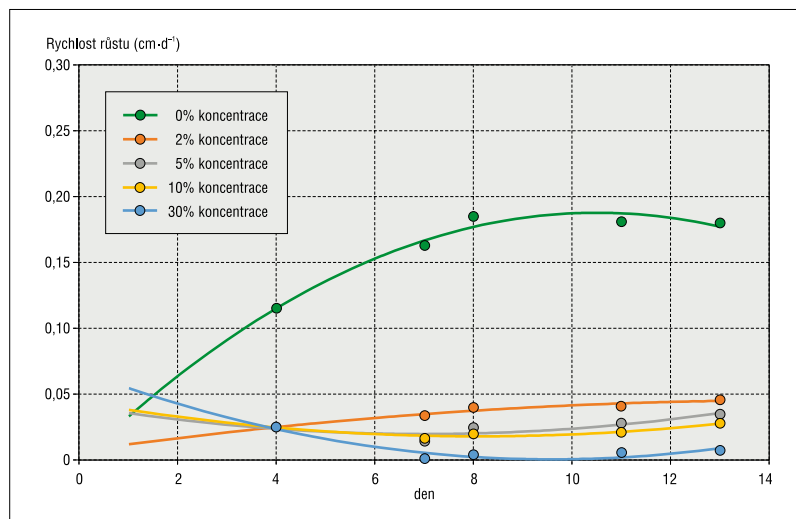
Tento článek poukazuje na problematiku fungicidní ochrany řepy cukrové z pohledu rizika vzniku rezistencí na účinné látky. V letech 2021 a 2022 jsme testovali citlivost houby *Cercospora beticola* na fungicidní přípravky Sfera 535 SC a Amistar Gold. V roce 2021 jsme z 6 sledovaných lokalit u 5 prokázali určitou míru rezistence na fungicid Sfera 535 SC. Vzhledem ke známým a v článku zmíněným údajům

o vzniku rezistencí, lze předpokládat, že rezistence se týkala hlavně účinné látky trifloxystrobin. V roce 2022 jsme opět testovali 6 lokalit ve stejných podnicích jako v roce 2021. Testovali jsme hlavně citlivost na fungicidní přípravek Amistar Gold. Rezistence na fungicid Amistar Gold se projevila na jednom místě prokazatelně a na třech lokalitách mírně pozitivně. U dvou lokalit jsme ani po opakování testu nebyli schopni jednoznačně určit, zda je snížena citlivost kmene *C. beticola*. Pro potvrzení správnosti procesu jsme ještě 3 ze sledovaných lokalit otestovali na fungicid Sfera 535 SC. Všechny 3 vzorky projevily určitou míru rezistence.

Klíčová slova: cercosporová listová skvrnitost řepy, životní cyklus, fungicidy, testování.

Literatura

- RYBÁČEK, V. ET AL.: *Cukrovka*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1985, 480 s.
- KHAN, J. ET AL.: Survival, Dispersal, and Primary Infection Site for *Cercospora beticola* in Sugar Beet. *Plant Disease*, 92, 2008 (5), s. 741–745.
- GIANNOPOLITIS, C. N.: Lesions on sugarbeet roots caused by *Cercospora beticola*. *Plant Dis. Rep.*, 62, 1978, s. 424–427.
- TVARŮŽEK, L.: Důležitost plošného monitoringu nejen u rezistence. *Agromanual*, 2019, [online] <https://www.agromanual.cz/cz/clanky/ochrana-rostlin-a-pestovani/choroby/dulezitest-plosneho-monitoringu-nejen-u-rezistence>.
- SECOR, G. A. ET AL.: Monitoring Fungicide Sensitivity of *Cercospora beticola* of Sugar Beet for Disease Management Decisions. *Plant Disease*, 94, 2010 (11), s. 1272–1282.
- RANGEL, L. I. ET AL.: *Cercospora beticola*: The intoxicating lifestyle of the leaf spot pathogen of sugar beet. *Molecular Plant Pathology*, 21, 2020, s. 1020–1041, <https://doi.org/10.1111/mpp.12962>.
- CHOCHOLA, J.: Cercosporiáza cukrové řepy – rozdílný dopad v ročníku 2020 a 2021. *Agromanual*, 2022, [online] <https://www.agromanual.cz/cz/clanky/ochrana-rostlin-a-pestovani/choroby/cercosporioza-cukrove-repy-rozdilny-dopad-v-rocniku-2020-a-2021>.
- VEREIJSEN J., SCHNEIDER, J. H. M.; JEGER, M. J.: Supervised control of *Cercospora* leaf spot in sugar beet. *Crop Prot.*, 26, 2007 (1), s. 19–28.

Obr. 9. Rychlost růstu mycelia *C. beticola*, Černuc 2022 – kontrola

Pavlu K., Benešová U.: *Cercospora beticola* – Resistance to Selected Fungicides and Introduction to Testing Method

This article describes the issue of fungicide protection of sugar beet from the point of view of the risk of resistance to active substances. In 2021 and 2022, the susceptibility of the *Cercospora beticola* to the Sfera 535 SC and Amistar Gold fungicides was tested. In 2021, out of the 6 sites monitored, 5 demonstrated a certain level of resistance to the Sfera 535 SC fungicide. Considering the known data on the emergence of resistance mentioned in the article, it can be assumed that resistance was mainly related to the active ingredient trifloxystrobin. In 2022, six sites from 2021 were subject to testing again; the tests mainly concerned susceptibility to the Amistar Gold fungicide. Resistance to this fungicide was demonstrable at one site and slightly positive at three more. At two sites, even after repeating the test,

Obr. 10. Porovnání testů izolátů z Vyšehořovic (vlevo), Černuce (uprostřed) a Bezna (vpravo)



it was impossible to clearly determine whether the susceptibility of the *C. beticola* strain was reduced. To confirm the accuracy of the process, 3 more sites were tested for the Sfera 535 SC fungicide. All 3 samples showed a certain degree of resistance.

Key words: cercospora leaf spot of beet, life cycle, fungicides, testing.

Kontaktní adresa – Contact address:

Ing. Klára Pavlů, Ph.D., Řepařský institut, spol. s r. o., 294 46 Semčice 69, Česká republika, e-mail: pavlu@semcice.cz

