

Received: 20.11.2019 / Accepted: 10.12.2019

Evaluation of validity of the use of thiophanate-methyl in controlling *Cercospora* leaf spot (*Cercospora beticola* Sacc.) based on RFLP analysis

Ocena zasadności stosowania tiofanatu metylowego w zwalczaniu chwościka buraka (*Cercospora beticola* Sacc.) na podstawie analizy RFLP

Agnieszka Kiniec^{1*}, Katarzyna Pieczul², Jacek Piszczek¹

Summary

Cercospora beticola Sacc. is the cause of Cercospora leaf spot (CLS), is the most destructive pathogen of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) worldwide. The fungus has been rapidly developing resistance to fungicides. Benzimidazole, one of the first systemic fungicides, were first used in Polish agriculture in the 1980s. The aim of the study was to analyze the occurrence of the E198A mutation among *C. beticola* isolates collected from Polish sugar beet plantations and to evaluate validity of using thiophanate-methyl in controlling the CLS. Benzimidazole-resistant strains dominate within *C. beticola* population occurring in Poland. The application of benzimidazole based fungicides to protect sugar beet crops against CLS should be excluded. Benzimidazole treatments create numerous issues as they are not efficient and do not control CLS and they affect environment conditions by generating chemical waste, and finally their applications increase production costs. The fungus's resistance to benzimidazole has been persistent for many years and is based on genetic changes.

Key words: Cercospora leaf spot, *Cercospora beticola*, benzimidazole resistance, E198A

Streszczenie

Cercospora beticola Sacc. wywołujący chwościk buraka, jest najgroźniejszym patogenem atakującym buraki cukrowe. Grzyb szybko nabywa odporność na substancje czynne fungicydów. Benzimidazole, jedne z pierwszych fungicydów systemicznych, w polskim rolnictwie zaczęto stosować w latach 80. XX wieku. Celem prowadzonych badań była analiza występowania mutacji E198A wśród izolatów *C. beticola* zbieranych na terenie polskich plantacji buraków cukrowych oraz ocena zasadności stosowania tiofanatu metylowego w zwalczaniu chwościka buraka. W polskiej populacji *C. beticola* dominują szczepy odporne na benzimidazole, co powinno wykluczyć używanie tych fungicydów do ochrony buraków cukrowych przed chwościkiem. Stosowanie benzimidazoli nie tylko nie zwalcza patogena, ale także powoduje obciążanie środowiska substancjami chemicznymi i nieuzasadniony wzrost kosztów produkcji. Odporność grzyba na benzimidazole utrzymuje się przez wiele lat, a jej podstawą są zmiany genetyczne.

Słowa kluczowe: chwościk buraka, *Cercospora beticola*, odporność na benzimidazole, E198A

¹Institut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy
Terenowa Stacja Doświadczalna w Toruniu
Pigwowa 16, 87-100 Toruń

²Institut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy
Władysława Węgorka 20, 60-318 Poznań

*corresponding author: a.kiniec@iorpib.poznan.pl

ORCID: 0000-0002-0024-8482

Wstęp / Introduction

Cercospora beticola Sacc. wywołujący chwościk buraka, jest najgroźniejszym patogenem atakującym buraki cukrowe. Grzyb występuje na całym obszarze uprawy tej rośliny (Holtschulte 2000), jednak największe straty powoduje w rejonach ciepłych, z częstymi opadami deszczu (Wolf i Verreet 2002). Choroba może doprowadzić do całkowitego zamierania liści, w konsekwencji czego roślina odtworza aparat liściowy kosztem zgromadzonego cukru, a strata plonu korzeni może wynieść nawet 50% (Shane i Teng 1992). Infekcję można ograniczać m.in. poprzez: siew odmian odpornych, odpowiedni płodozmian, głęboką uprawę gleby, eliminację żywicieli wtórnych oraz zabiegi chemiczne (Windels i wsp. 1998; Piszczek 2010).

Cercospora beticola należy do patogenów szybko nabywających odporność na stosowane związki chemiczne (Bolton i wsp. 2013), decyduje o tym m.in. możliwość wielokrotnego powtarzania infekcji w trakcie sezonu wegetacyjnego, wytwarzanie dużej liczby zarodników konidialnych oraz predyspozycje genetyczne (Ma i Michailides 2005; Deising i wsp. 2008). W ostatnich latach problem szkodliwości chwościka buraka znacznie się nasila, ponieważ intensywne wykorzystywanie środków ochrony roślin doprowadziło do powstawania odporności na ich substancje czynne (Secor i wsp. 2010; Kiniec i wsp. 2019).

Benzimidazole, jedne z pierwszych fungicydów systemicznych, były chętnie wykorzystywane przez rolników głównie z uwagi na szerokie spektrum działania (Suwan i wsp. 2012). Ich działanie polega na łączeniu się z tubuliną grzybową, co powoduje zahamowanie mitozy oraz zakłócenie funkcjonowania cytoszkieletu (Davidse 1986; Ma i Michailides 2005). Odporność na tę grupę związków chemicznych warunkuje obecność mutacji w genie β -tubuliny, powodująca zmiany w sekwencji aminokwasów białka, co skutkuje zmniejszeniem powinowactwa wiązania benzimidazoli (Sisler 1988). U *C. beticola* za nabywanie odporności odpowiada zasadniczo jedna mutacja – zamiana kwasu glutaminowego alaniną w 198 pozycji kodonu (E198A) (Davidson i wsp. 2006; Trkulja i wsp. 2013). Pierwsze doniesienia na temat odporności *C. beticola* na benzimidazole pochodzą już z lat 70. XX wieku. Szczepy odporne na benomyl zdiagnozowano zaledwie po 3 latach stosowania tej substancji czynnej (Dovas i wsp. 1976), po czym wycofano ją z użycia. W 2006 roku Piszczek i Czekalska (2006) zaobserwowali pierwsze przypadki odporności grzyba w Polsce. Trzy lata później, Piszczek (2010) stwierdził, że 29,4% izolatów pochodzących z centralnej Polski, wykazuje odporność na tiofanat metylowy, natomiast w 2006 roku ten odsetek wzrósł do 70,1%.

W polskim rolnictwie karbendazym zaczęto stosować w latach 80. XX wieku, a tiofanat metylowy na początku XXI wieku (Sobczak i wsp. 2015). Na przełomie XX i XXI wieku do ochrony plantacji buraka cukrowego

przed chwościkiem zalecane były głównie preparaty, których substancje czynne należały tylko do dwóch grup chemicznych: benzimidazoli i triazoli (Piszczek 2004). Do wykonania kolejnych zabiegów ochronnych często wykorzystywane były substancje czynne z tej samej grupy, co musiało doprowadzić do wzrostu odporności grzyba (Piszczek 2003). Fungicydy benzimidazolowe największą sprzedaż osiągnęły w naszym kraju w 2005 roku (Sporek i Sporek 2014). Obecnie benzimidazole są przestarzałymi fungicydami, których użycie systematycznie spada (GUS 2013, 2014, 2015, 2016, 2017, 2018). Pomimo tego w ciągu ostatnich 7 lat wzrosła liczba środków grzybobójczych zawierających tiofanat metylowy zarejestrowanych w buraku cukrowym – od 20% wszystkich zarejestrowanych fungicydów w 2012 roku, do 51% w 2019 roku. Prawdopodobnie jest to spowodowane faktem, że tiofanat metylowy w dalszym ciągu wykazuje dość dobrą skuteczność w innych uprawach i firmy rejestrujące swoje fungicydy nie zmieniają zakresu stosowania produkowanych preparatów.

Celem prowadzonych badań była analiza występowania mutacji E198A metodą PCR-RFLP wśród izolatów *C. beticola* zbieranych na terenie polskich plantacji buraków cukrowych oraz ocena zasadności stosowania tiofanatu metylowego w zwalczaniu chwościka buraka.

Materiały i metody / Materials and methods

Izolaty zbierane były w latach 2012–2018 na terenie województw: lubelskiego, łódzkiego, kujawsko-pomorskiego, pomorskiego i wielkopolskiego. Skrawki porażonych liści po odkażeniu powierzchniowym (30 sekund w wybielaczu ACE) układane były na pożywkę PDA (Potato Dextrose Agar; Oxoid). Identyfikacji uzyskanych kultur *C. beticola* dokonywano na podstawie oceny cech morfologicznych kolonii oraz zarodników konidialnych (Ellis 2001). W badaniach wykorzystano 67 izolatów. Izolację DNA przeprowadzono ze świeżej grzybni rosnącej na stałej pożywce PDA przy użyciu zestawu DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). Fragmenty grzybni oddzielone od podłoża rozcierano na jednolitą masę w sterylnych probówkach Eppendorf. Procedurę izolacji wykonano według protokołu producenta. Do reakcji PCR przygotowano roztwór DNA o stężeniu 20 ng/ μ l. Do reakcji PCR zastosowano startery Bt 512F i Bt 922R umożliwiające amplifikację fragmentu DNA kodującego β -tubulinę o wielkości około 500 pz (Davidson i wsp. 2006). Reakcję PCR przeprowadzono w mieszaninie reakcyjnej o końcowej objętości 20 μ l, która zawierała po: 0,2 μ l 10 mM starterów, 1 μ l Dream Tag Green PCR Master Mix 2x (Thermo Scientific), 3 μ l DNA. Zastosowano następujący profil termiczny reakcji PCR: wstępna denaturacja przez 3 min w 95°C; 39 cykli obejmujących: denaturację 40 s w 95°C, hybrydyzację starterów 40 s w 58°C, elongację

60 s w 72°C; końcową elongację – 5 min w 72°C. Do trawienia restrykcyjnego zamplifikowanego DNA stosowano enzym restrykcyjny BstU I (New England BioLabs). Został on wybrany na podstawie analizy sekwencji genu β -tubuliny izolatów *C. beticola* wrażliwych oraz odpornych na benzimidazole przeprowadzonej w programie NEBcutter2 (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>). BstU I hydrolizuje DNA wyłącznie w miejscu sekwencji zasad 5'...CG[^]CG...3'. Sekwencja zasad GCG jest kodonem alaniny, która u szczepów *C. beticola* odpornych na benzimidazole zastąpiła kwas glutaminowy (kodon GAG) w pozycji 198 sekwencji genu β -tubuliny. Mieszanina reakcyjna zawierała 8 μ l produktu PCR, 1 μ l buforu CutSmart Buffer oraz 1 μ l enzymu restrykcyjnego (BstU I). Trawienie prowadzono przez 15 min w 60°C. Produkty trawienia rozdzielano elektroforetycznie w 2% żelu agarozowym z Midori Green (Thermo Scientific) i analizowano w świetle UV.

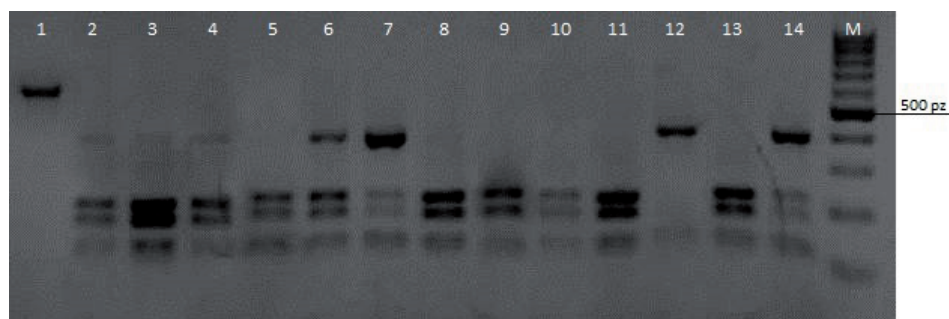
Wyniki i dyskusja / Results and discussion

W wyniku trawienia restrykcyjnego fragmentu DNA kodującego β -tubulinę (500 pz) szczepów *C. beticola* odpornych na benzimidazole obserwowano 3 fragmenty o wielkościach około 80, 220 oraz 200 pz, a w wyniku trawienia DNA szczepów wrażliwych dwa o wielkościach około 80 i 420 pz (rys. 1). Na podstawie wykonanej analizy RFLP jako odporne na benzimidazole oznaczono 39, a jako wrażliwe 13 izolatów. Piętnaście izolatów należało do szczepów mieszanych zawierających DNA obydwu rodzajów z mutacją E198A oraz bez niej.

W Polsce szczepy *C. beticola* zawierające opisaną mutację są powszechnie obserwowane na terenie całego kraju od kilku lat (tab. 1). Ich przewaga w populacji patogena decyduje o nieskuteczności tiofanatu metylowego w efek-

tywnej ochronie upraw przed chwościkiem. W roku 2017 około 92% izolatów *C. beticola* pochodzących z terenu całej Polski wykazywało wysoką odporność na tiofanat metylowy, co powinno wykluczyć używanie tego związku chemicznego do ochrony buraków cukrowych przed tym patogenem (Pieczul i Piszczek 2012). Tiofanat metylowy jest w dalszym ciągu wykorzystywany do zabiegów ochronnych, w szczególności w fungicydach dwuskładnikowych, gdzie drugą substancją czynną jest związek z grupy triazoli, choć strategię ochrony plantacji buraczanych przed chwościkiem powinny zmierzać w kierunku całkowitej rezygnacji z aplikacji benzimidazoli na rzecz substancji działających w inny sposób.

Odporność grzyba na tiofanat metylowy jest stabilna i utrzymuje się przez wiele lat. Wskazują na to badania Karaoglanidisa i Bardasa (2006), którzy w latach 2000–2001 wykonali monitoring występowania odporności na benomyl. Doświadczenie prowadzono w 4 lokalizacjach: w dwóch stosowanie benomyłu przerwano już w latach 70., kiedy stwierdzono odporność na tę substancję czynną, a w dwóch kolejnych, w późnych latach 90. ponownie używano benomyłu do ochrony buraków przed chwościkiem. Badacze wykazali, że już po jednej lub dwóch aplikacjach, poziom odporności wzrósł do tego z lat 70. Na obszarach, gdzie nie zastosowano ponownie benomyłu, obserwowano dalszy spadek odporności (Karaoglanidis i Bardas 2006). Wcześniej Dovas i wsp. (1976) stwierdzili, że szczepy odporne na benzimidazole występują nawet tam, gdzie nie był on nigdy używany, a ich obecność w populacji stwierdza się nawet 3 lata po aplikacji fungicydu. Zdaniem tych badaczy podstaw odporności powinno doszukiwać się w zmianach genetycznych (Dovas i wsp. 1976). Secor i wsp. (2010) zauważyli natomiast, że w latach 1998–2007, na terenie Dakoty Północnej i Minnesoty, spadła odporność grzyba na tiofanat metylowy i można już mówić nawet



1 – produkt PCR nietrawiony; 2, 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 13 – izolaty *Cercospora beticola* odporne na tiofanat metylowy; 12 – izolat *Cercospora beticola* wrażliwy na tiofanat metylowy; 6, 7, 14 – izolaty mieszane (szczepy zawierające część DNA z mutacją E198A); M – marker wielkości

1 – PCR product not digested; 2, 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 13 – *Cercospora beticola* isolates resistant to thiophanate-methyl; 12 – *Cercospora beticola* isolate sensitive to thiophanate-methyl; 6, 7, 14 – mixed isolates (strains containing part of the DNA with the E198A mutation); M – size marker

Rys. 1. Analiza produktów PCR-RFLP badanych izolatów *Cercospora beticola*

Fig. 1. Analysis of PCR-RFLP products of tested *Cercospora beticola* strains

Tabela 1. Badane próby buraka cukrowego oraz oznaczenie szczepów na podstawie analizy RFLP
 Table 1. Tested samples of sugar beet and strain assignation by RFLP analysis

Rok Year	Województwo Province	Oznaczenie RFLP RFLP specification			Liczba przebadanych izolatów Number of isolates tested
		odporny resistant	wrażliwy sensitive	mieszany mixed	
2012	lubelskie Lublin Voivodeship	–	1	–	1
2014	lubelskie Lublin Voivodeship	2	1	–	3
2015	lubelskie Lublin Voivodeship	3	1	–	4
	łódzkie Łódź Voivodeship	1	–	–	1
2016	kujawsko-pomorskie Kujawsko-Pomorskie Voivodeship	4	1	1	6
	lubelskie Lublin Voivodeship	5	4	7	16
	łódzkie Łódź Voivodeship	3	3	2	8
	pomorskie Pomeranian Voivodeship	4	–	1	5
2017	lubelskie Lublin Voivodeship	4	–	–	4
	wielkopolskie Wielkopolska Voivodeship	8	2	2	12
2018	wielkopolskie Wielkopolska Voivodeship	5	–	2	7
Suma – Totally		39	13	15	67

o wrażliwości na ten związek chemiczny w tamtejszej populacji *C. beticola*. Według badaczy było to spowodowane mniejszą presją selekcyjną, gdyż w tym okresie znacząco spadło wykorzystanie tiofanatu metylowego w ochronie plantacji buraka cukrowego przed chwościkiem na rzecz alternatywnych substancji czynnych. Jednakże Rosenzweig i wsp. (2015) stwierdzili mutację E198A u 80% przebadanych izolatów patogena pochodzących z Michigan. Również według danych publikowanych przez American Crystal Sugar Company, największego producenta cukru buraczanego w Stanach Zjednoczonych, odsetek izolatów *C. beticola* odpornych na tiofanat metylowy jest bardzo wysoki. Jednak koncern nadal zaleca stosowanie preparatów dwuskładnikowych zawierających tiofanat metylowy do ochrony plantacji buraka cukrowego przed chwościkiem (Anonim 2019). Truklja i wsp. (2013) nie stwierdzili różnic w częstotliwości występowania izolatów odpornych na benzimidazole na polach buraków cukrowych chronionych i niechronionych tymi związkami chemicznymi. Izolaty odporne na fungicydy benzimidazolowe wykrywano nawet na polach, gdzie nie używano substancji z tej grupy. Na podstawie przeprowadzanych analiz badacze stwierdzili, że pomiędzy

wykorzystaniem benzimidazoli a wystąpieniem odporności na tę grupę środków ochrony roślin, prawdopodobnie nie może być żadnej korelacji. Należy jednak przypuszczać, że obecność izolatów odpornych na benzimidazole na polach nietraktowanych tymi środkami grzybobójczymi wynika raczej z braku wpływu mutacji E198A na patogeniczność oraz przeżywalność *C. beticola* i jej obecność stała się trwałą cechą w populacji patogena.

Wyniki cytowanych oraz własnych badań jasno wskazują, że wykorzystywanie tiofanatu metylowego do ochrony plantacji przed chwościkiem jest bezzasadne. Ponowne wprowadzenie do użytku, poprzedzone przerwą w stosowaniu tej substancji czynnej, nie pozwoli na skuteczną ochronę plantacji, gdyż nawet po jednym zastosowaniu liczba szczepów odpornych drastycznie wzrasta. Stosowanie tej substancji nie tylko nie zwalcza patogena, ale także powoduje obciążanie środowiska substancjami chemicznymi i nieuzasadniony wzrost kosztów produkcji. Ze względu na wzrost odporności *C. beticola* także na zarejestrowane substancje czynne z grupy triazoli i strobiluryny niezbędna jest rejestracja nowych preparatów, pozwalających na skuteczne ograniczanie rozwoju choroby.

Wnioski / Conclusions

1. Zastosowanie analizy RFLP umożliwia szybką identyfikację szczepów *C. beticola* odpornych na benzimidazole i może być wykorzystywana do monitoringu ich występowania na terenie Polski.
2. Od kilku lat w polskiej populacji *C. beticola* dominują szczepy odporne na benzimidazole.
3. Substancje czynne z grupy benzimidazoli powinny być definitywnie wycofane ze stosowania w ochronie buraka cukrowego przeciw chwościkowi.

Literatura / References

- Anonim 2019. Map: Cercospora Sensitivity/Resistance – 2018 For Topsin M at 5 PPM. American Crystal Sugar Company. <https://www.crystalsugar.com/sugarbeet-agronomy/pest-alert/2018-cercospora-res-maps/> [dostęp: 17.11.2019].
- Bolton M.D., Riviera V., Secor G. 2013. Identification of the G143A mutation associated with QoI resistance in *Cercospora beticola* field isolates from Michigan. *Pest Management Science* 69 (1): 35–39. DOI: 10.1002/ps.3358
- Davidse L.C. 1986. Benzimidazole fungicides: mechanism of action and biological impact. *Annual Review of Phytopathology* 24: 43–65. DOI: 10.1146/annurev.py.24.090186.000355
- Davidson R.M., Hanson L.E., Franc G.D., Panella L. 2006. Analysis of β -tubulin gene fragments from benzimidazole-sensitive and tolerant *Cercospora beticola*. *Journal of Phytopathology* 154 (6): 321–328. DOI: 10.1111/j.1439-0434.2006.01080.x
- Deising H.B., Reiman S., Pascholati S.F. 2008. Mechanism and significance of fungicide resistance. *Brazilian Journal of Microbiology* 39 (2): 286–295. DOI: 10.1590/S1517-838220080002000017
- Dovas C., Skylakakis G., Georgopoulos S.G. 1976. The adaptability of benomyl-resistant population of *Cercospora beticola* in northern Greece. *Phytopathology* 66: 1452–1456. DOI: 10.1094/Phyto-66-1452
- Ellis M.B. 2001. *More Dematiaceus Hyphomycetes*. CABI Publishing, 248 ss.
- Główny Urząd Statystyczny 2013. *Rocznik Statystyczny Rolnictwa*, Warszawa: 138–139.
- Główny Urząd Statystyczny 2014. *Rocznik Statystyczny Rolnictwa*, Warszawa: 167–168.
- Główny Urząd Statystyczny 2015. *Rocznik Statystyczny Rolnictwa*, Warszawa: 140–141.
- Główny Urząd Statystyczny 2016. *Rocznik Statystyczny Rolnictwa*, Warszawa: 140–141.
- Główny Urząd Statystyczny 2017. *Rocznik Statystyczny Rolnictwa*, Warszawa: 158–159.
- Główny Urząd Statystyczny 2018. *Rocznik Statystyczny Rolnictwa*, Warszawa: 120–121.
- Holtschulte B. 2000. *Cercospora beticola* – worldwide distribution and incidence. s. 5–16. W: *Cercospora beticola* Sacc. Biology, Agronomic Influence and Control Measures in Sugar Beet (M.J.C. Asher, B. Holtschulte, M.R. Molard, F. Rosso, G. Steinrücken, R. Beckers, red.). *Advances in Sugar Beet Research*, International Institute for Beet Research 2, Brussels, 215 ss.
- Karaoglanidis G.S., Bardas G. 2006. Control of benzimidazole- and DMI-resistant strains of *Cercospora beticola* with strobilurin fungicides. *Plant Disease* 90 (4): 419–424. DOI: 10.1094/PD-90-0419
- Kiniec A., Piszczek J., Sitariski A. 2019. Chwościk buraka cukrowego (*Cercospora beticola* Sacc.) Część II. Zapobieganie występowaniu, ochrona przed chwościkiem, odporność na fungicydy. [Cercospora leaf spot of sugar beet (*Cercospora beticola* Sacc.) Part II. Prevention of occurrence, protection against cercospora leaf spot, resistance to fungicides]. *Progress in Plant Protection* 59 (1): 38–45. DOI: 10.14199/ppp-2019-006
- Ma Z., Michailides T.J. 2005. Advances in understanding molecular mechanism of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Protection* 24 (10): 853–863. DOI: 10.1016/j.cropro.2005.01.011
- Pieczul K., Piszczek J. 2012. Identyfikacja szczepów *Cercospora beticola* odpornych na benzimidazole metodą PCR-RFLP. [Identification of benzimidazole resistant strains of *Cercospora beticola* by PCR-RFLP]. *Progress in Plant Protection/Postępy w Ochronie Roślin* 52 (4): 781–783. DOI: 10.14199/ppp-2012-134
- Piszczek J. 2003. Odporność niektórych szczepów *Cercospora beticola* Sacc. na Duett 250 SC stosowany w uprawie buraka cukrowego w Polsce. [Resistance of strains of *Cercospora beticola* Sacc. to fungicide Duett 250 SC used for sugar beet protection in Poland]. *Progress in Plant Protection/Postępy w Ochronie Roślin* 43 (1): 869–871.
- 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]. *Progress in Plant Protection/Postępy w Ochronie Roślin* 44 (2): 1028–1031.
- Piszczek J. 2010. Epidemiologia chwościka buraka cukrowego (*Cercospora beticola*) w centralnej Polsce. *Rozprawy Naukowe Instytutu Ochrony Roślin – Państwowego Instytutu Badawczego, Zeszyt 23*, 70 ss.
- Piszczek J., Czekalska A. 2006. Odporność 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]. *Progress in Plant Protection/Postępy w Ochronie Roślin* 46 (1): 375–379.
- Rosenzweig N., Hanson L.E., Clark G., Franc G.D., Stump W.L., Jiang Q.W., Stewart J., Kirk W.W. 2015. Use of PCR-RFLP analysis to monitor fungicide resistance in *Cercospora beticola* populations from sugarbeet (*Beta vulgaris*) in Michigan, United States. *Plant Disease* 99 (3): 355–362. DOI: 10.1094/PDIS-03-14-0241-RE
- Secor G.A., Rivera V.V., Khan M.F.R., Gudmestad N.C. 2010. Monitoring fungicide sensitivity of *Cercospora beticola* of sugar beet for disease management decisions. *Journal of Plant Diseases and Protection* 94 (11): 1272–1282. DOI: 10.1094/PDIS-07-09-0471
- Shane W.W., Teng P.S. 1992. Impact of *Cercospora* leaf spot on root weight, sugar yield, and purity of *Beta vulgaris*. *Plant Disease* 76 (8): 812–820. DOI: 10.1094/PD-76-0812
- Sisler H.D. 1988. Fungicidal action and fungal resistance mechanisms. s. 6–8. W: *Fungicide Resistance in North America* (C.J. Delp, red.). The American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN, 133 ss.
- Sobczak J., Szulc M., Matyjaszyk E. 2015. Konsekwencje dla praktyki ochrony roślin wynikające z wycofania ze stosowania substancji czynnej karbendazym. [The consequences to plant protection practice resulting from withdrawal of carbendazim active substance]. *Zagadnienia Doradztwa Rolniczego* 3 (81): 83–93.

- Sporek K., Sporek M. 2014. Zagrożenia biotopów w agrosystemach. [Threats to biotopes in agroecosystems]. *Journal of Agribusiness and Rural Development* 2 (32): 171–179. DOI: 10.22004/ag.econ.252909
- Suwan N., Nuandee N., Akimitsu K., Nalumpang S. 2012. Analysis of β -tubulin gene from carbendazim resistant isolates of *Cercospora lactuca-sativae* on lettuce in Thailand. *Journal of Agricultural Technology* 8 (2): 711–723.
- Trkulja N., Ivanović Ž., Pfaf-Dolovac E., Dolovac N., Mitrović M., Toševski I., Jović J. 2013. Characterisation of benzimidazole resistance of *Cercospora beticola* in Serbia using PCR-based detection of resistance associated mutations of the β -tubulin gene. *European Journal of Plant Pathology* 135 (4): 889–902. DOI: 10.1007/s10658-012-0135-x
- Windels C.E., Lamey H.A., Hilde D., Widner J., Knudsen T. 1998. A *Cercospora* leaf spot model for sugar beet. In practice by an industry. *Plant Disease* 82 (7): 716–726.
- 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 Disease* 86 (4): 336–344. DOI: 10.1094/PDIS.2002.86.4.336